



**HAL**  
open science

# Implication du microbiote intestinal dans l'insulino-résistance et les pathologies hépatiques associées à l'obésité, étude sur modèle murin

Tiphaine Le Roy

► **To cite this version:**

Tiphaine Le Roy. Implication du microbiote intestinal dans l'insulino-résistance et les pathologies hépatiques associées à l'obésité, étude sur modèle murin. Médecine humaine et pathologie. AgroParis-Tech, 2012. Français. NNT : 2012AGPT0016 . tel-04122630

**HAL Id: tel-04122630**

**<https://pastel.hal.science/tel-04122630>**

Submitted on 8 Jun 2023

**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.



**Doctorat ParisTech**

**T H È S E**

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries  
du Vivant et de l'Environnement**

**(AgroParisTech)**

**Spécialité : Sciences du vivant**

*présentée et soutenue publiquement par*

**Tiphaine LE ROY**

le 29 Février 2012

**Implication du microbiote intestinal dans l'insulino-résistance  
et les pathologies hépatiques associées à l'obésité,  
étude sur modèle murin**

Directeur de thèse : **Philippe Gérard**

**Jury**

**Patrice D. CANI**, professeur, chercheur qualifié FRS-FNRS, Louvain Drug Research Institute  
**Annick BERNALIER-DONADILLE**, directrice de recherche, UR Microbiologie, INRA-Theix  
**Marie-José BUTEL**, professeur, EA4065, Université Paris-Descartes  
**Marielle BOUIX**, professeur, UMR GMPA, AgroParisTech  
**Philippe GERARD**, chargé de recherche, Institut Micalis

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur

**INRA - AgroParisTech  
Institut Micalis**

Domaine de Vilvert - 78350 – Jouy en Josas

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Marielle Bouix, Anne-Judith Waligora et Jean-Marc Lacorte d'avoir fait partie de mon comité de thèse, d'avoir accepté de lire et d'évaluer l'ensemble de mon travail et de m'avoir guidée dans la réalisation de cette thèse.

Merci à Annick Bernalier, Patrice Cani, Marie-José Butel et Marielle Bouix d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et du temps passé à l'évaluation de mes travaux.

Ce projet a été financé suite à l'appel d'offres SYNDIFRAIS - CNIEL "bénéfices santé des micro-organismes d'intérêt laitier" en 2009. Mes remerciements vont donc également au CNIEL pour avoir financé ces travaux.

Philippe, que dire... Je ne sais pas par où commencer ! Pourquoi pas par le début : merci de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse, je ne sais toujours pas pourquoi c'est moi qui suis là, ma formation ne m'a pas vraiment apporté les connaissances nécessaires pour traiter ce sujet... Ha oui, je sais, tu me l'as dis d'ailleurs, j'étais la "moins pire", bref, merci de m'avoir laissé passer ces 3 ans et quelques dans le labo. Merci pour ton encadrement, tu as été un directeur de thèse disponible et accessible, je ne me souviens pas que tu m'aie envoyée balader quand je débarquais pour la 1000ème fois dans ton bureau pour te poser une question qui n'a pas de réponse / pour raler parce que le cytomètre avait encore planté / pour raler tout court. Bref, merci de m'avoir supportée, j'ai été ta première thésarde, j'espère que les suivants t'embêteront moins et se poseront moins de questions capilo-tractées sur la FISH ou sur autre chose. Merci pour toutes les discussions que nous avons eu et toutes tes corrections, je garde en particulier un souvenir impérissable des réflexives, ce fut un plaisir de déconstruire mon sujet de thèse avec toi (même si je m'y suis forgé une réputation de "Tiphaine la vilaine" que tu t'es fait un plaisir de répendre au labo). Merci aussi pour m'avoir fait confiance dans la réalisation de cette thèse, tu m'as laissé beaucoup d'autonomie, j'espère que tu ne le regrettes pas trop aujourd'hui !

Merci à Gabriel Perlemuter et Anne-Marie Cassard-Doulcier d'avoir contacté Philippe, ce qui a mené à la naissance de mon sujet de thèse. Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre labo, de m'avoir conseillée et d'avoir répondu à toutes mes questions, y compris les plus naïves. Certaines devaient vraiment l'être, mes connaissances concernant l'inflammation, l'insulino-résistance et tout ce qui touche de près ou de loin à la physio étaient encore plus limitées qu'aujourd'hui : quand j'ai commencé ma thèse, je sortais d'une école où j'avais surtout appris à exploiter des bactéries et des levures pour fermenter à peu près tout ce qui était fermentable.

Je remercie aussi toute l'équipe AMIPEM, Laura, Marta, Martine, Mathilde, Aurélia, Catherine, Sylvie, Patricia, Bénédicte, Pascal, Mylène. Laura, tu es devenue bien plus qu'une collègue, cela a vraiment été un plaisir de t'avoir comme voisine de bureau, merci pour m'avoir supportée, écoutée, pour les tranches de rigolade, pour m'avoir nourrie avec des trucs super bons fait maison ! Marta, mon petit échantillon ! Si j'étais un peu plus portée

sur le culte de la personnalité, tu serais mon modèle. Plus sérieusement, j'ai eu de la chance de croiser quelqu'un avec autant de qualités humaines et scientifiques, merci pour toutes les happy pills partagées. Martine, merci pour tes coups de mains pour tout et n'importe quoi, cela a vraiment été un plaisir de partager le bureau avec toi aussi, merci en particulier pour le calendrier de l'avent. Mathilde, merci pour les papottages que l'on ne peut avoir qu'avec une autre thésarde (Coucou, ça va ? Moyen, j'ai mal à la thèse aujourd'hui), mention spéciale pour le fou-rire "les nuls partent en congrès dans leur kangoo bleue ciel". Aurélia, merci pour tous tes conseils et ton aide, en particulier pour tout ce qui se rapproche de près ou de loin à l'expérimentation animale, et tu avais raison pour la veine porte, désolée d'être un peu têtue ! Sylvie, merci pour tes conseils précieux, l'intérêt porté à mon travail et le temps que tu as passé à participer à mes comités de thèse. Bénédicte, merci pour les TLDA, sans toi j'aurais été bien embêtée pour les manips de PCR !

Je remercie tous les membres de la plateforme Anaxem : Fatima, Rosa, Anne, Benoit, Alain, Amandine, Pascal. Vous m'avez tous aidé avec gentillesse avec les manips en iso, au moins une fois, même lorsque vous n'aviez pas le temps. Fatima, merci pour tous le temps que tu as passé avec moi à peser les souris à la balance de Roberval, pour ta sympathie et pour m'avoir dis remis les pendules à l'heure de nombreuses fois quand j'avais un accès d'autodépréciation, voire d'autoflagellation, tu n'as pas été la seule d'ailleurs, n'est-ce pas Laura (les deux !), Aurélia, Mathilde et beaucoup d'autres. Merci Anne pour les prises de sang, déjà que j'ai du mal à les faire en dehors des iso, alors dedans, heureusement que tu étais là ! Alain, merci pour les souris, et pour la voiture ;).

Merci à l'équipe d'à côté, en particulier Laura numéro 2, Laurie, Camille, Jean-Jacques. Laura, merci pour tous nos échanges, pour le bavardage après les journées de manips, pour m'avoir goinfrée de trucs au chocolats pendant le congrès en Suède (oui, ma reconnaissance va à tous les gens qui me donnent à manger). Comme avec Mathilde, il n'y a des choses qu'on ne partage qu'avec une autre thésarde. Laurie, cela me manque de ne plus t'avoir au labo, je n'ai jamais vu quelqu'un qui avait autant la patate, et puis merci pour m'avoir démontré par l'exemple qu'on pouvait pleurer toutes les semaines et être une dure à cuire ;). Et puis merci comme tu l'as dit pour les mails échangés à travers le couloir et nos désaccords permanents (non, je ne mettrai jamais un titre en rose sur une de mes présentations). Camille, merci pour l'aide pour la PCRq et pour s'être fait des noeuds dans les boyaux de la tête avec le kit de dosages de lipides. JJ, cher goinfre, tu vas devoir trouver quelqu'un d'autre pour attacher les pièces jointes à tes e-mails, en tout cas merci pour tes compliments sur mes chignons.

Betty, copine de labo lointain, nous avons partagé beaucoup de formations ABIES et beaucoup de réflexions sur la thèse, les post-docs, le métier de chercheur, la rédaction d'articles... partagé quelques coups de mou aussi ! J'espère que tu vas bien te plaire dans ton grand nord !

Merci à la plate-forme ICE : Claudia, Sophie et Samira. Vous aussi avez été indispensables pour passer de mes bouts de foie de souris à des résultats de PCR dignes de ce

nom !

Je remercie infiniment André Bado et Francine Walker pour l'anatomopathologie et pour vos explications.

Merci mille fois aux souris qui ont trépassé au cours de ma thèse, sacrifiées sur l'hôtel de la science. Merci aussi à toutes les bactéries que j'ai congelées, fixées, lysées et bien plus encore malgré mes états d'âme.

Merci à ceux de ma vie "hors labo" qui m'ont entourée, soutenue et qui ont cru à ma place que je pouvais y arriver. Maman, arrête de me prendre pour Wikipedia, en dehors de ça merci pour tout. Merci Mamie, la pro du soutien sous toutes ses formes. Sylvain, ce n'est certainement pas ici que je me laisserai aller au cui-cui-bisounours, je m'en tiendrai à un "merci pour le 100% quality time".

Je ne remercierai pas l'espace temps qui a refusé de jouer en ma faveur du début à la fin de cette thèse. Je ne remercierai pas non plus Procrastination, inutile de préciser pourquoi, elle le sait très bien.

## Résumé

L'obésité prédispose à un ensemble de pathologies sévères telles que le diabète de type 2 et les NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease). Ces pathologies sont caractérisées par une insulino-résistance et une inflammation systémique de bas grade. Récemment, des éléments ont suggéré que ces pathologies sont associées à une dysbiose du microbiote intestinal. En effet, il a été montré que l'administration d'antibiotiques, de probiotiques ou de prébiotiques entraîne une diminution de cette inflammation et une amélioration des paramètres métaboliques. Par ailleurs, il a été constaté que les souris dépourvues de microbiote intestinal (axéniques) sont protégées contre le développement de l'obésité et de l'insulino-résistance.

L'objectif de ce travail a donc été i) d'étudier dans quelle mesure l'absence de microbiote intestinal conditionne la réponse métabolique à un régime hyper-lipidique par rapport à un régime standard, ii) de déterminer s'il est possible de transférer la prédisposition aux troubles métaboliques associés à l'obésité par un transfert (transplantation de microbiote intestinal).

Nous avons dans un premier temps comparé la réponse à un régime hyper-lipidique de souris conventionnelles et de souris axéniques, dépourvues de microbiote intestinal. Nous avons constaté que les souris axéniques sont effectivement résistantes à l'obésité et l'insulino-résistance induites par un régime hyper-lipidiques. Toutefois, elles ne sont que partiellement protégées contre le développement d'une stéatose hépatique, c'est-à-dire une accumulation de triglycérides dans les hépatocytes. Chez les souris conventionnelles, ce régime induit une augmentation de l'expression hépatique de gènes impliqués dans la lipogenèse et sa régulation, tandis que le phénomène inverse est observé chez les souris axéniques. Concernant la réponse du système immunitaire, tout comme chez les souris conventionnelles, le régime hyper-lipidique a induit chez les souris axéniques une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages hépatiques. Les macrophages des souris axéniques demeurent sensibles à la stimulation au LPS sous régime hyper-lipidique, contrairement à ce qui est observé chez les souris conventionnelles. Ces résultats permettent de conclure que la réponse à un régime obésogène est profondément modifiée par l'absence de microbiote intestinal. Des différences de composition du microbiote pourraient donc potentiellement expliquer des différences de susceptibilité à l'insulino-résistance et aux NAFLD, ce qui fait l'objet de la deuxième partie de cette étude.

Nous avons dans un deuxième temps colonisé des souris axéniques avec le microbiote de deux souris conventionnelles ayant présenté des réponses métaboliques différentes à un régime hyper-lipidique. Les deux souris sélectionnées pour le transfert de microbiote présentaient une glycémie à jeun et un indice d'insulino-résistance (HOMA-IR) différents à poids égal. Les deux groupes de souris colonisées ont développé une obésité comparable mais des paramètres métaboliques différents. En effet, les différences de niveaux de glycémie et d'insulino-résistance des souris donneuses se retrouvent chez les deux groupes de souris colonisées. De même, les niveaux de stéatose et d'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse sont

différents chez les deux groupes de souris colonisées. Nous avons ainsi démontré qu'il était possible de transmettre la susceptibilité aux atteintes métaboliques et hépatiques induites par un régime hyper-lipidique par un transfert de microbiote. Ceci démontre que le microbiote intestinal est à l'origine des différences de prédisposition aux troubles métaboliques observés chez une partie des personnes atteintes d'obésité. L'analyse de la composition du microbiote intestinal de ces souris met en évidence une plus forte proportion de bactéries lactiques, d'*Atopobium*, de *Bacteroides* et d'*Akkermansia muciniphila* chez les souris résistantes au développement d'une hyper-glycémie et d'une stéatose induites par un régime hyper-lipidique, ce qui laisse supposer un effet protecteur de ces bactéries.

Mots clés : microbiote intestinal, axénie, gnotobiotique, obésité, NAFLD, stéatose, insulino-résistance, régime hyper-lipidique.

## Abstract

### Involvement of gut microbiota in diet-induced insulin resistance and Non Alcoholic Fatty Liver Disease, study on a mouse model

Obesity predisposes people to several severe pathologies, including type 2 diabetes and NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease). Such pathologies are characterized by insulin resistance and systemic low grade inflammation. Recently, it has been established that such pathologies are associated to a gut microbiota dysbiosis. Moreover, recent studies in mice and human indicate that modulation of gut microbiota composition has beneficial effects on people suffering type 2 diabetes and/or NAFLD. Otherwise, it has been showed that germ-free mice remain lean, normo-glycemic and sensitive to insulin when fed a high-fat diet.

The aim of this study was i) to decipher to what extent the pathogenesis of insulin resistance and NAFLD depends on the presence or absence of gut microbiota, ii) to determine if the predisposition to metabolic disorders in an obesity context can be transferred *via* gut microbiota transplantation.

We first compared the response of germ-free and conventional mice to high fat diet. Indeed, germ-free mice appeared to be resistant to high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. However, germ-freeness only partially protects against diet-induced steatosis, that is to say accumulation of triglycerides in hepatocytes. In conventional mice, high-fat diet induced an increase of the hepatic expression of genes involved in lipogenesis. The inverse phenomenon was observed in germ-free mice. In order to study the liver inflammation, we isolated and cultivated liver macrophages from the two groups of mice. As in conventional mice, high-fat diet induced an increased secretion of pro-inflammatory cytokines by germ-free mice liver macrophages. However, germ-free mice macrophages remained sensitive to LPS stimulation, which was not observed in the conventional mice group. This results demonstrates that being devoid of gut microbiota deeply alters the immunological and metabolic responses to high-fat diet. Therefore, differences in gut microbiota composition could explain the differences of susceptibility in diet-induced insulin-resistance and NAFLD.

Then, we colonised two groups of germ-free mice with the gut microbiota of two conventional mice the responses of which to high-fat diet were discrepant. The two donors mice presented different levels of fasting glycemia and HOMA-IR index despite a similar body weight. Both groups of colonised mice developed comparable obesity but different degrees of fasting glycemia and insulin resistance. Levels of steatosis and hepatic expression of genes involved in lipogenesis were as well different in the two groups of colonised mice. Hence the results clearly show that the gut microbiota is the cause of the predisposition to diet-induced insulin resistance and hepatic steatosis. Gut microbiota analysis revealed a higher proportion of lactic acid bacteria, *Atopobium*, *Bacteroides* and *Akkermansia muciniphila* in receiver

---

mice resistant to diet-induced insulin resistance and steatosis, which allow us to hypothesize a protective effect of these bacteria in diet-induced metabolic disorders.

Key words : gut microbiota, germ-free, obesity, NAFLD, steatosis, insulin resistance, high fat diet.

# Table des matières

<b>Remerciements</b>	<b>1</b>
<b>Résumé</b>	<b>4</b>
<b>Abstract</b>	<b>6</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>13</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>14</b>
<b>Abbréviations</b>	<b>15</b>
<b>Avant-propos</b>	<b>18</b>
<b>I Introduction et revue bibliographique</b>	<b>20</b>
<b>1 Le diabète de type 2 et les pathologies hépatiques liées à l'obésité</b>	<b>21</b>
1.1 Présentation générale . . . . .	21
1.2 Insulino-résistance et signalisation de l'insuline . . . . .	22
1.3 insulino-résistance et inflammation . . . . .	25
1.3.1 Généralités sur le système immunitaire et l'inflammation . . . . .	25
1.3.2 TNF- $\alpha$ . . . . .	28
1.3.3 Interleukine-6 . . . . .	29
1.3.4 Interleukine-1 . . . . .	30
1.3.5 Les voies IKK $\beta$ et NF $\kappa$ B . . . . .	31
1.3.6 Rôle des adipokines dans l'insulino-résistance et les NAFLD . . . . .	31
1.4 Métabolisme hépatique des lipides et NAFLD . . . . .	34

---

1.4.1	La lipogenèse hépatique . . . . .	35
1.4.2	L'absorption des lipides par les hépatocytes . . . . .	38
1.4.3	L'oxydation des lipides dans le foie . . . . .	39
1.4.4	La sécrétion de lipides . . . . .	41
1.4.5	Le rôle des lipides dans les NAFLD et l'insulino-résistance . . . . .	42
1.5	Rôle des hormones entéroendocrines dans l'insulino-résistance et l'obésité . .	43
1.5.1	Les leçons de la chirurgie bariatrique . . . . .	43
1.5.2	Les hormones digestives . . . . .	44
<b>2</b>	<b>Le microbiote intestinal</b>	<b>48</b>
2.1	Généralités sur le microbiote intestinal . . . . .	48
2.1.1	Structure et composition . . . . .	48
2.1.2	Régulation de la composition du microbiote . . . . .	49
2.1.3	La prise d'antibiotiques . . . . .	51
2.1.4	Les fonctions du microbiote intestinal . . . . .	52
2.2	Implication du microbiote intestinal dans le syndrome métabolique . . . . .	55
2.2.1	Ce que nous apprennent les études sur rongeurs axéniques . . . . .	55
2.2.2	Une dysbiose du microbiote intestinal est associée à l'obésité . . . . .	58
2.2.3	Les mécanismes liant le microbiote intestinal aux altérations du métabolisme . . . . .	61
2.3	Vers une prévention ou un traitement des pathologies métaboliques par une modulation de la composition du microbiote . . . . .	66
2.3.1	Intérêt potentiel des probiotiques dans le traitement des pathologies métaboliques . . . . .	66
2.3.2	Intérêt potentiel des prébiotiques dans le traitement des pathologies métaboliques . . . . .	67
2.4	Conclusion . . . . .	68
<b>II</b>	<b>Articles et résultats</b>	<b>70</b>
<b>1</b>	<b>L'axénie protège partiellement contre la stéatose et complètement contre l'obésité et l'insulino-résistance induites par un régime hyper-lipidique</b>	<b>71</b>
1.1	Résumé . . . . .	71

---

1.2	Germ-free mice are protected against diet-induced obesity and insulin resistance but not from mild steatosis . . . . .	74
1.2.1	Abstract . . . . .	76
1.2.2	Introduction . . . . .	76
1.2.3	Material and methods . . . . .	78
1.2.4	Results . . . . .	80
1.2.5	Discussion . . . . .	92
<b>2</b>	<b>La susceptibilité aux troubles métaboliques engendrés par un régime-hyperlipidique est transmissible <i>via</i> un transfert de microbiote intestinal</b>	<b>94</b>
2.1	Résumé . . . . .	94
2.2	Gut microbiota transplantation demonstrates its causal role in the development of insulin resistance and fatty Liver . . . . .	96
2.2.1	Abstract . . . . .	98
2.2.2	Introduction . . . . .	98
2.2.3	Material and methods . . . . .	100
2.2.4	Results . . . . .	103
2.2.5	Discussion . . . . .	113
<b>III</b>	<b>Discussion et perspectives</b>	<b>117</b>
1	Stratégies expérimentales . . . . .	118
2	Implication du microbiote intestinal dans l'obésité et l'insulino-résistance . .	119
3	Métabolisme hépatique des lipides . . . . .	122
4	Implication du microbiote intestinal dans l'inflammation . . . . .	124
5	Perspectives et pistes de recherche . . . . .	127
	<b>Valorisation des résultats de la thèse</b>	<b>129</b>
	<b>Références bibliographiques</b>	<b>130</b>

# Table des figures

1	Différents stades évolutifs des NAFLD . . . . .	23
2	Les voies de signalisation de l'insuline [259] . . . . .	24
3	Les Toll-like receptors et leurs ligands . . . . .	26
4	Les mécanismes moléculaires de l'insulino-résistance [259] . . . . .	29
5	Les principales étapes de la synthèse de triglycérides (Choi <i>et al</i> , [62]) . . . . .	36
6	Synthèse des mécanismes connus par lesquels le microbiote intestinal module le métabolisme énergétique de l'hôte ([258]) . . . . .	69
1	Hepatic triglyceride concentration of conventional and germ-free mice at the end of the feeding period (control diet : CD, high-fat diet : HFD). n = 22 for CV-CD, n = 24 for CV-HFD, n = 12 for CV-CD, n = 12 for GF-HFD . . . . .	82
2	Relative hepatic gene expression analyses of transcription factors (a), lipogenic enzymes (b) and lipids transporters (c). Results were normalized on the CV-CD group. Data are shown as mean $\pm$ standard deviation, n = 22 for CV-CD, n = 24 for CV-HFD, n = 12 for CV-CD, n = 12 for GF-HFD. * P < .05; *** P < .001 . . . . .	83
3	Relative hepatic gene expression analyses of cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TGF $\beta$ ) (a) and Toll-like Receptors 2, 4, 5 and 9 (b). Results were normalized on the CV-CD group. n = 15 for CV-CD, n = 15 for CV-HFD, n = 12 for CV-CD, n = 12 for GF-HFD. . . . .	86
4	Relative hepatic gene expression of CD68, a macrophage infiltration marker. Results were normalized on the CV-CD group. n = 15 for CV-CD, n = 15 for CV-HFD, n = 12 for CV-CD, n = 12 for GF-HFD. . . . .	87
5	Cytokines and chemokines secretion by isolated Kupffer cells from conventional and germ-free mice fed a control diet and a high fat diet. n = 22 for CV-CD, n = 24 for CV-HFD, n = 12 for CV-CD, n = 12 for GF-HFD. . . . .	89

6	Plasma concentration of aspartate and alanine aminotransferases in conventional and germ-free mice at the end of the feeding period (control diet : CD, high-fat diet : HFD). n = 22 for CV-CD, n = 24 for CV-HFD, n = 12 for CV-CD, n = 12 for GF-HFD. . . . .	90
7	Representative hematoxylin and eosin stains of paraformaldehyde-fixed liver sections prepared from germ-free and conventional mice's livers at the end of the feeding period (control diet : CD, high-fat diet : HFD). n = 22 for CV-CD, n = 24 for CV-HFD, n = 12 for CV-CD, n = 12 for GF-HFD . . . . .	91
8	Relative hepatic gene expression analyses of inducible NO-synthase : iNOS . Results were normalized on the CV-CD group. n = 15 for CV-CD, n = 15 for CV-HFD, n = 12 for CV-CD, n = 12 for GF-HFD. . . . .	91
1	Metabolic responses to HFD of Non Responder Receiver (NRR) and Responder Receiver (RR) mice. All mice were fasted for 6h before blood sampling. Data are mean $\pm$ standard deviation, n=18 for NRR and n=22 for RR mice. ** P < .01; *** P < .001 (Student's t test) . . . . .	105
2	Representative hematoxylin and eosin stains of paraformaldehyde-fixed liver sections prepared from NRR (a) and RR mice (b). The steatosis score corresponds to the percentage of hepatocytes presenting macrovesicular steatosis multiplied by the intensity of the steatosis of the concerned hepatocytes (c) and hepatic triglyceride concentrations (mmol of triglycerides per mg of liver) (d). Data are shown as mean $\pm$ standard deviation, n=18 for NRR and n=22 for RR mice. * P < .05; ** P < .01 (Student's t test) . . . . .	107
3	Relative hepatic gene expression analyses of transcription factors (a), lipogenic enzymes (b) and lipids transporters (c). Results were normalized on the NRR group. Data are shown as mean $\pm$ standard deviation, n=14 for NRR and n=16 for RR mice. * P < .05; *** P < .001 . . . . .	109
4	Relative hepatic gene expression analyses of a macrophage infiltration marker : CD68 (a), and Toll-like Receptors 2, 4, 5 and 9 (b). Results were normalized on the NRR group. Data are shown as mean $\pm$ standard deviation, n=14 for NRR and n=16 for RR mice. . . . .	110
5	Composition of the fecal microbiota of NRR and RR mice based on FISH analysis. Results are expressed as percentages of the total cells detected by the bacterial domain probe Eub338. <i>Lactic Acid Bacteria</i> (a), <i>Atopobium</i> (b), <i>Bacteroides</i> (c) and <i>Akkermansia muciniphila</i> (d). Data are shown as mean $\pm$ standard deviation, n=18 for NRR mice and n=22 for RR mice. ** P < .01; *** P < .001 (Mann-Whitney test) . . . . .	112

6 TTGE fingerprint patterns of the colonic mucus microbial community of NRR (light grey arrows) and RR mice (dark grey arrows). The TTGE profiles were obtained using primers targeting all bacteria. Thin arrows (→) indicate the band corresponding to the RR-specific species. n=8 for NRR and n=8 for RR mice . . . . . 113

# Liste des tableaux

1	Les cellules entéroendocrines et leurs produits . . . . .	45
1	Body weight, tissue weights and plasma parameters of germ-free and conventional mice at the end of the feeding period (control diet : CD, high-fat diet : HFD). n = 22 for CV-CD, n = 24 for CV-HFD, n = 12 for GF-CD, n = 12 for GF-HFD . . . . .	81
2	Plasma inflammatory markers of conventional and germ-free mice at the end of the feeding period (control diet : CD, high-fat diet : HFD). n = 22 for CV-CD, n = 24 for CV-HFD, n = 12 for GF-CD, n = 12 for GF-HFD . . . . .	85
1	Designations, sequences and targets of probes used in fluorescent in situ hybridization experiments . . . . .	102
2	Metabolic status of conventional and donor mice fed the high fat diet . . . . .	104
3	Plasma lipid and pro-inflammatory cytokines concentration in receiver mice after 16 weeks of high fat diet . . . . .	106
4	Hepatic relative expression of cytokines in receiver mice . . . . .	111
5	Composition of the fecal microbiota of NRR and RR mice based on FISH analysis. . . . .	113

## Abbréviations

<b>ACC</b>	acetyl-CoA carboxylase
<b>ACTH</b>	adrénocorticotrophine
<b>ADSF</b>	adipocyte-specific secretory factor
<b>AGCC</b>	acides gras à chaîne courte (ou SCFA pour short chain fatty acids)
<b>AGL</b>	acides gras libres
<b>Akt</b>	Protein kinase B
<b>AMPK</b>	5' adenosine monophosphate-activated protein kinase
<b>ALT</b>	alanine aminotransférase
<b>Angptl4</b>	angiopoietin-like protein 4
<b>ApoB</b>	apolipoprotéine B
<b>AST</b>	aspartate aminotransférase
<b>CAP/Cbl</b>	c-Casitas B-lineage Lymphoma-associated protein
<b>CD14</b>	cluster of differentiation 14
<b>ChREBP</b>	carbohydrate responsive element binding protein
<b>CPT1</b>	carnitine palmitoyltransferase 1
<b>CMH</b>	complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CY5</b>	cyanine 5
<b>CV</b>	conventional
<b>DAG</b>	diacylglycérol
<b>DGAT</b>	acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase
<b>DGGE</b>	denaturing gradient gel electrophoresis
<b>DPP4</b>	dipeptidyl peptidase 4
<b>GLUT-4</b>	transporteur de glucose 4
<b>HOMA-IR</b>	homeostasis model assessment - insulin-resistance
<b>EDTA</b>	acide éthylène diamine tétraacétique
<b>ERK</b>	extracellular-signal-regulated kinases
<b>FABP</b>	fatty acid binding protein
<b>FAS</b>	fatty acid synthase
<b>FAT</b>	fatty acid translocase
<b>FATP</b>	fatty acid transport protein
<b>FCS</b>	fetal calf serum
<b>FAF</b>	fasting induced adipose factor
<b>FITC</b>	fluorescein isothiocyanate
<b>FIZZ3</b>	found in inflammatory zone
<b>FOXO-1</b>	forkhead box O1

<b>GIP</b>	gastric inhibitory peptide
<b>GF</b>	germ-free
<b>GLP-1</b>	glucagon like peptide 1
<b>GLP-2</b>	glucagon like peptide 2
<b>gp130</b>	glycoprotéine 130
<b>Gpr</b>	protéine G
<b>HDL</b>	high density lipoprotein
<b>HEPES</b>	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
<b>HFD</b>	high fat diet
<b>ICAM-1</b>	inter-cellular adhesion molecule 1
<b>IFN</b>	interféron
<b>IKK</b>	I kappa B kinase
<b>iNOS</b>	inductible nitric oxide synthase
<b>IL</b>	interleukine
<b>IMC</b>	indice de masse corporelle
<b>IRS</b>	insulin receptor substrate
<b>JNK1</b>	c-Jun N-terminal kinase
<b>LCCoA</b>	long chain acyl-coenzymes A
<b>Lpl</b>	lipoprotéine lipase
<b>LPS</b>	lipopolysaccharide
<b>LDL</b>	low-density lipoprotein
<b>LXR</b>	liver X receptor
<b>lymphocytes Tc</b>	lymphocytes T cytotoxiques
<b>lymphocytes Th1</b>	lymphocytes T helper 1
<b>lymphocytes NK</b>	lymphocytes natural killer
<b>MAP</b>	mitogenactivated protein
<b>MCP-1</b>	Monocyte chimoattractant protein 1
<b>mtGPAT</b>	mitochondrial acyl-coenzyme A (CoA) :glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase
<b>mTOR</b>	mammalian Target of Rapamycin
<b>MTP</b>	microsomal triglyceride transfer protein
<b>NAFLD</b>	Non Alcoholic Fatty Liver Disease
<b>NASH</b>	Non Alcoholic SteatoHepatitis
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
<b>NPY</b>	neuropeptide Y
<b>NOD</b>	nucleotide-binding oligomerization domain
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol 3-kinases

<b>PYY</b>	peptide YY
<b>PGC-1</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1
<b>PPAR</b>	peroxisome proliferator activated receptor
<b>PKCe</b>	protein kinase Ce
<b>PRR</b>	pattern recognition receptor
<b>PXR</b>	pregnane X receptor
<b>RELM</b>	Resistin-like molecule
<b>ROS</b>	Reactive oxygene species
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute medium
<b>SREBP-1c</b>	sterol regulatory element binding protein 1c
<b>SCD1</b>	stearoyl-CoA desaturase 1
<b>SOCS</b>	suppressor of cytokine signaling
<b>TAG</b>	triacylglycérol ou triglycéride
<b>TGF</b>	transforming growth factor
<b>TNF</b>	tumor necrosis factor
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>TTGE</b>	Temporal Temperature Gel Electrophoresis
<b>VCAM-1</b>	vascular cell adhesion molecule 1
<b>VLDL</b>	very low-density lipoprotein

## Avant-propos

La prévalence de l'obésité et des pathologies métaboliques associées a considérablement augmenté durant les dernières dizaines d'années. Les complications de l'obésité, telles que le diabète de type 2, les pathologies hépatiques, l'athérosclérose et certains cancers, sont nombreuses et fréquentes. Il a récemment été suggéré puis démontré que le microbiote intestinal, c'est-à-dire l'ensemble des microorganismes colonisant notre tube digestif, jouait un rôle important dans le développement de l'obésité et de ses complications.

L'écosystème microbien hébergé par le tube digestif humain est extrêmement complexe et diversifié. Il est constitué de  $10^{14}$  bactéries et archéobactéries réparties en dizaines de milliers espèces ([221]). Le microbiote de chaque individu est quant à lui composé d'approximativement 100 espèces. Dans son ensemble, il est considéré que le microbiote intestinal comporte 150 fois plus de gènes que le génome humain, ce qui lui confère un panel de fonctions métaboliques immense. En dehors de sa contribution à la digestion, cet écosystème a donc un potentiel d'interactions physiologiques et/ou pathologiques avec son hôte très important. Par exemple, il a déjà été démontré que le microbiote conditionne le développement du système immunitaire, autant au niveau mucosal que systémique ([246]).

Le développement de l'obésité et des pathologies métaboliques associées est un processus complexe impliquant des facteurs génétiques et environnementaux. Ce processus met en jeu des voies connectant le métabolisme énergétique avec le système immunitaire ([276]). L'étude des liens entre le microbiote intestinal et l'obésité a permis de découvrir au cours des dernières années que la composition et les fonctions métaboliques du microbiote d'obèses sont altérées, ce qui se traduit par une capacité accrue du microbiote à extraire l'énergie des aliments ([173]). De plus, ces études ont démontré que l'interaction du microbiote intestinal avec les cellules épithéliales module la sécrétion par ces dernières de facteurs régulant le stockage et la dépense d'énergie ([25]).

L'obésité en tant que telle n'est pas problématique, si ce n'est d'un point de vue psychosocial. Par contre, les complications de l'obésité le sont. En effet, le diabète de type 2, l'athérosclérose et les stéatohépatites non alcooliques pour ne citer qu'elles, sont à l'origine d'une mortalité élevée et représentent un coût économique conséquent dans les pays industrialisés. Elles constituent donc un problème de santé publique majeur. Ces complications ne touchent pas tous les obèses, toutefois, les facteurs conditionnant le développement de ces complications chez certains individus mais pas chez d'autres sont mal connus. En dehors de la chirurgie bariatrique, les traitements proposés à l'heure actuelle pour prévenir et traiter l'obésité et une partie de ses complications sont inefficaces. Une meilleure compréhension des mécanismes menant au développement de ces complications est donc essentielle afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et prévenir le développement de ces complications.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon sujet de thèse, qui porte sur l'étude de l'implication du microbiote intestinal dans le développement de l'insulino-résistance et des patho-

logies hépatiques liées à l'obésité. L'objectif de mon travail de thèse a donc été i) d'étudier dans quelle mesure le microbiote intestinal est impliqué dans le développement de l'insulino-résistance et des pathologies hépatiques liées à l'obésité (appelées NAFLD pour Non alcoholic Fatty Liver Disease), ii) de déterminer si le microbiote intestinal était, du moins partiellement, à l'origine de la susceptibilité aux troubles métaboliques associés à l'obésité. Afin de répondre au premier objectif, nous avons dans un premier temps comparé la réponse à un régime hyper-lipidique de souris conventionnelles et de souris axéniques, dépourvues de microbiote intestinal (Le Roy *et al*, manuscrit en préparation). Dans un second temps, notre travail a consisté à déterminer s'il était possible de transmettre la susceptibilité aux troubles métaboliques par un transfert de microbiote intestinal (Le Roy *et al*, en révision).

Ce travail a été réalisé sous la direction de Philippe Gérard au sein de l'équipe AMIPEM (Alimentation, Microbiote Intestinal, Pathologies Encéphaliques et Métaboliques), qui fait partie de l'institut Micalis (Microbiologie de l'alimentation au service de la santé, UMR 1319). Ce projet s'est fait en collaboration avec l'équipe "Inflammation and cell recruitment in obesity- and alcohol-induced liver diseases" de l'unité INSERM "Cytokines, chimiokines et immunopathologie" (INSERM, U 996), animée par le professeur Gabriel Perlemuter.

L'ensemble des travaux réalisés est présenté en 3 chapitres. Le premier chapitre de ce manuscrit est constitué de l'introduction bibliographique. Dans un premier temps, vous y trouverez une revue bibliographique portant sur les complications de l'obésité auxquelles nous nous intéressons : le diabète de type 2 et les NAFLDs. Les mécanismes menant au développement de ces pathologies seront détaillés, ainsi que leur lien avec le système immunitaire et la fonction entéroendocrine. Dans un deuxième temps vous y trouverez un descriptif du microbiote intestinal ainsi qu'une synthèse sur les conséquences métaboliques de son interaction avec l'hôte.

La deuxième partie de ce mémoire expose l'ensemble des travaux effectués sous forme d'articles. Le premier expose les résultats que nous avons obtenus en étudiant les caractéristiques de la réponse métabolique de souris axéniques soumises à un régime hyper-lipidique. Le second article est une démonstration de principe du lien de cause à effet entre la composition du microbiote intestinal et la prédisposition aux complications de l'obésité.

Le chapitre 3 propose une discussion générale sur l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse, expose les limites de l'étude et définit les perspectives de recherche.

# Première partie

## Introduction et revue bibliographique

# 1 Le diabète de type 2 et les pathologies hépatiques liées à l'obésité

## 1.1 Présentation générale

L'obésité est définie par l'OMS comme étant "un excès de masse grasse qui entraîne des conséquences néfastes pour la santé" et a été reconnue comme maladie à part entière en 1997. Un individu est considéré comme obèse lorsque son indice de masse corporelle dépasse  $30 \text{ kg/m}^2$ . En 2005, toujours d'après l'OMS, il y avait environ 1,6 milliard d'adultes et au moins 20 millions d'enfants de moins de cinq ans en surpoids ( $\text{IMC} > 25$ ), dont au moins 400 millions d'adultes obèses. La prévalence de l'obésité est en constante augmentation dans le monde, au point de parler de pandémie. Les estimations de l'OMS prévoient que d'ici 2015, environ 2,3 milliards d'adultes seront en surpoids et plus de 700 millions seront obèses. 6 ou 7 gènes seraient impliqués dans les formes monogéniques (dues à un seul gène) de l'obésité. Une vingtaine d'autres, à faible effet, causeraient ou faciliteraient des obésités dues à l'action conjointe de plusieurs gènes. Mais cela n'explique encore ni tous les mécanismes, ni le caractère héréditaire de cette maladie. Dans une grande majorité des cas, l'obésité est la conséquence d'un déséquilibre entre l'apport et la dépense énergétique, lui-même la conséquence d'une modification du mode de vie dans les pays industrialisés.

La mortalité s'accroît dès que l'indice de masse corporelle dépasse  $25 \text{ kg/m}^2$  et l'espérance de vie diminue d'autant plus que cet indice est élevé ([31]). Cette diminution de l'espérance de vie est due au fait qu'un certain nombre de pathologies graves ont un taux de prévalence plus élevée dans la population obèse par rapport à la population d'indice de masse corporelle normal ( $20$  à  $24,9 \text{ kg/m}^2$ ). Les pathologies associées à l'obésité les plus connues sont le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires (hyper-tension, accidents vasculaires cérébraux, athérosclérose, etc.). L'obésité prédispose au développement de ces complications, qui ne touchent cependant qu'une proportion de la population obèse. Toutefois, les facteurs à l'origine de la prédisposition à ces complications à l'intérieur de la population obèse sont mal connus. Il a été montré que l'hérédité était un facteur de prédisposition important, mais comme dans le cas de l'obésité les facteurs environnementaux sont essentiels. Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant, est une maladie métabolique acquise, par opposition au diabète de type 1, qui se caractérise par une incapacité de l'organisme à réguler la

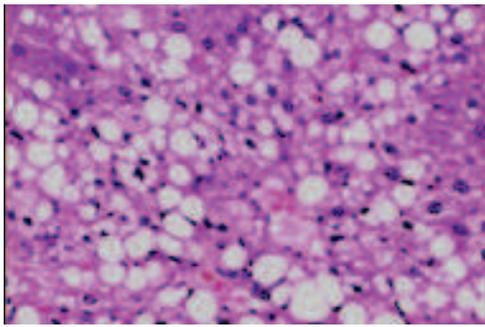
glycémie. Au début de la maladie, l'organisme devient de plus en plus résistant à l'insuline, c'est-à-dire que de plus en plus grandes quantités d'insuline sont nécessaires pour maintenir une glycémie normale. A ce stade, la production d'insuline par le pancréas est normale. Au fur et à mesure de l'avancée de la maladie, les cellules  $\beta$  vont s'épuiser et leur production d'insuline va diminuer jusqu'à disparaître, la glycémie va alors augmenter et devenir anormale. Cette augmentation de la glycémie conduit à une glucotoxicité, qui elle-même est à l'origine de pathologies associées : troubles oculaires, neuropathies, sensibilité aux infections, néphropathies et maladies cardiovasculaires.

L'obésité n'est pas seulement associée au développement du diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires : elle affecte aussi la fonction hépatique ([81] [36]). En effet, de plus en plus d'éléments laissent penser que les NAFLDs sont une des composantes du syndrome métabolique [161] et la grande majorité des individus atteints de NAFLDs sont en surpoids ou obèses. On parle de syndrome métabolique chez un individu lorsque celui-ci est obèse et présente plusieurs des critères suivants : obésité abdominale, hyper-tension, hypercholestérolémie, hyper-insulinémie et/ou hyper-glycémie. Les NAFLD sont caractérisées par une accumulation de lipides dans le foie, c'est-à-dire une stéatose, (FIG. 1a) qui touche au minimum 60% des obèses et est généralement asymptomatique ([14]). Dans 20 à 40% des cas, les patients atteints de stéatose développent une stéatohépatite caractérisée par l'apparition d'infiltrats inflammatoires, constitués d'amas de cellules du système immunitaire (macrophages, neutrophiles, lymphocytes...) ([287], [72], [97]). Ce stade de la maladie est généralement appelé NASH pour Non Alcoholic Steatohepatitis (FIG. 1b). La NASH est une pathologie sévère, qui entraîne de nombreuses complications comme la fibrose (FIG. 1c), la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Il est estimé que 1 à 2 % de la population occidentale est atteinte de NASH. 28% des patients ayant développé une NASH vont jusqu'au stade de la cirrhose dont la moitié nécessitera une transplantation hépatique ([238]). La distinction entre la stéatose simple et la NASH n'est possible que par l'analyse anatomopathologique d'une biopsie du foie, le diagnostic posé à l'aide de symptômes cliniques et de variables biologiques telles que le taux de transaminases étant peu fiable.

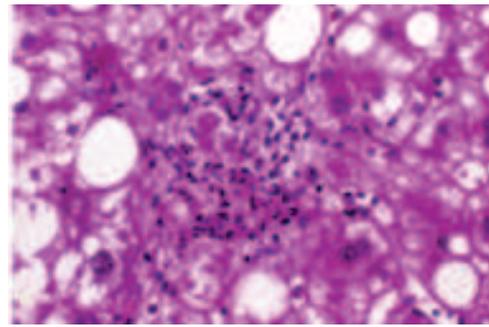
À l'heure actuelle, aucun traitement pharmacologique n'a montré son efficacité pour éviter cette évolution. Les facteurs déclenchant l'évolution de la stéatose vers la NASH sont mal connus mais il est établi que l'insulino-résistance est un facteur crucial ([189]).

## 1.2 Insulino-résistance et signalisation de l'insuline

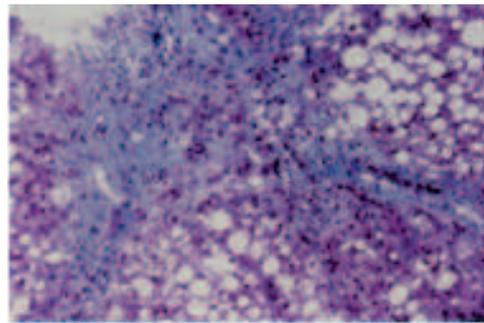
L'insuline est une hormone peptidique sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas. Elle a avec le glucagon un rôle majeur dans la régulation des substrats énergétiques, dont les principaux sont le glucose, les acides gras et les corps cétoniques. Elle est sécrétée en fonction de l'état nutritionnel et de l'activité physique, de sorte qu'après les repas, sous l'influence de l'élévation de la glycémie et de la présence des aliments dans le



(a) Coupe histologique d'un foie stéatosique



(b) Coupe histologique d'un foie atteint de NASH



(c) Coupe histologique d'un foie atteint de fibrose

FIGURE 1 – Différents stades évolutifs des NAFLD

tractus digestif, la sécrétion d'insuline est stimulée, ce qui permet le stockage du glucose. L'insuline joue un rôle anabolique majeur dans la mise en réserve des substrats glucidiques et lipidiques : entrée de glucose dans les cellules, synthèse de glycogène, inhibition de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse. Ses effets résultent de sa liaison à un récepteur membranaire spécifique exprimé en priorité sur ses trois tissus cibles, le foie, le muscle et le tissu adipeux. La régulation de la mise en réserve et de la libération de glucose permet ainsi la régulation de la glycémie sanguine.

La fixation de l'insuline sur son récepteur induit une cascade de mécanismes assurant la transduction du signal ([169]). Le récepteur de l'insuline possède une activité tyrosine-kinase qui permet une autophosphorylation du récepteur puis la phosphorylation sur des résidus tyrosine des protéines substrats, protéines IRS (FIG. 2) en priorité, et la création de complexes macromoléculaires d'activation à proximité du récepteur. Plusieurs voies sont activées par la phosphorylation des IRS :

- la voie MAP kinase, qui médie plusieurs fonctions cellulaires, comme la mitose et la croissance.
- la voie PI3K-Akt, qui contrôle la néoglucogenèse, la synthèse de protéines et de glycogène via la régulation de mTOR et de FOXO-1, entre autres.
- la voie CAP/Cbl et TC10 (petite protéine G), qui régule l'import de lipides dans les adipocytes et dans les muscles via GLUT-4 ([33]).

En cas d'insulino-résistance, l'import de glucose dans les muscles et le tissu adipeux est diminué et la libération de glucose par le foie n'est plus inhibée. Les mécanismes cellulaires et moléculaires menant à l'insulino-résistance ainsi que la contribution de processus inflammatoires à son développement ne sont compris que partiellement à ce jour.

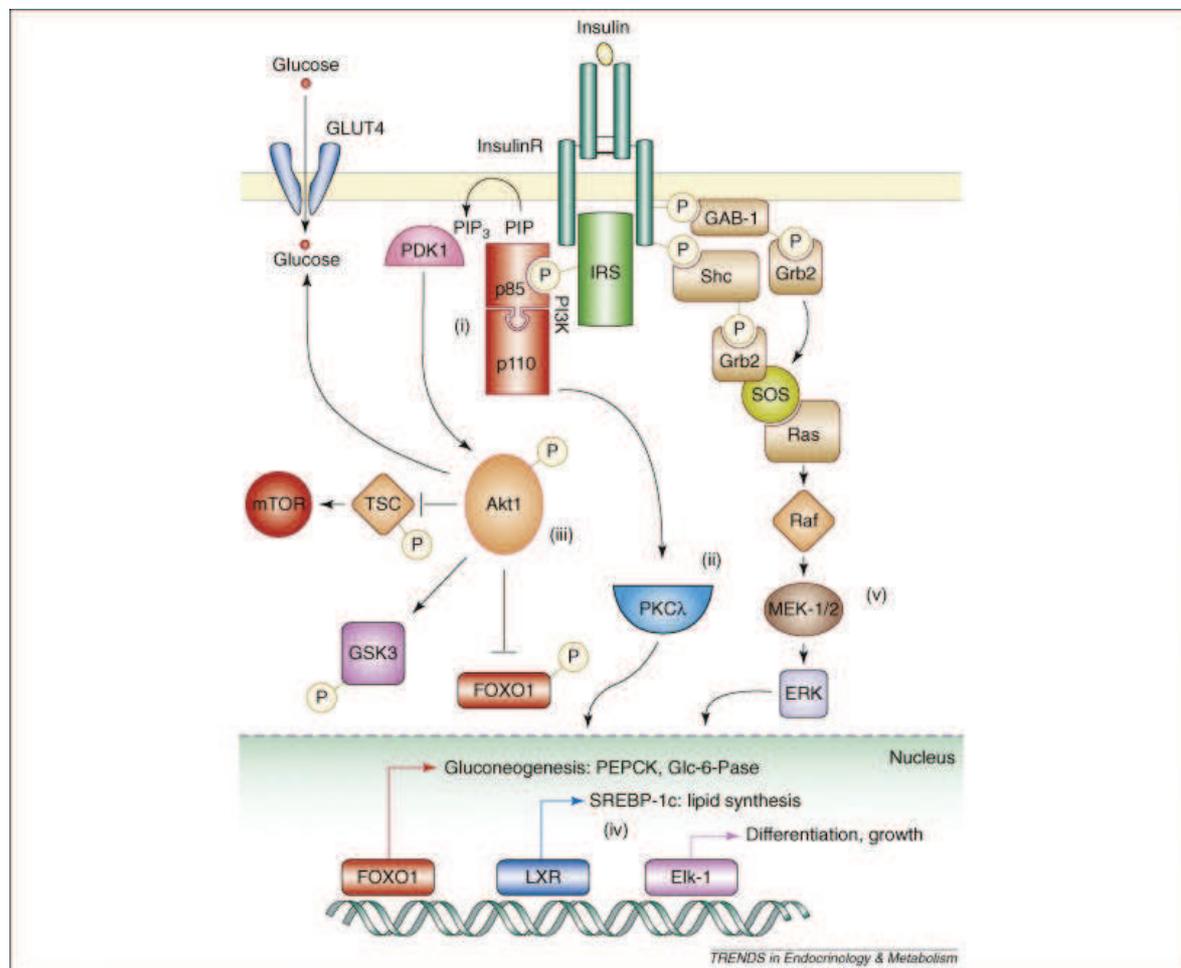


FIGURE 2 – Les voies de signalisation de l'insuline [259]

Plusieurs mécanismes différents contribuent à la mise en place de l'insulino-résistance ([276]). L'activité de plusieurs protéines des voies de transduction du signal de l'insuline est perturbée. Par exemple, la phosphorylation d'IRS-1 induite par différents signaux inflammatoires (par JNK1 ou NF- $\kappa$ B) est un des mécanismes principaux par lesquels la voie de signalisation de l'insuline est perturbée ([276]). De plus, la sur-expression des protéines SOCS, induite par la cytokine pro-inflammatoire IL-6, altère l'action de l'insuline en entraînant une dégradation d'IRS-1 et IRS-2 ([276]). En effet, la sur-expression de SOCS-1 et SOCS-3 provoque une insulino-résistance hépatique chez la souris et augmente la forme active de SREBP-1c, un facteur de transcription régulant la lipogenèse hépatique. Inversement, il a été démontré que l'inhibition de SOCS-1 et SOCS-3 chez des souris obèses et diabétiques réduisait la résistance à l'insuline ainsi que le degré de stéatose hépatique ([139]). Le niveau

d'expression de SREBP-1c était également normalisé. Ces éléments montrent à quel point les voies métaboliques et immunitaires sont intégrées et à quel point le rôle de l'inflammation est prépondérant dans le développement de l'insulino-résistance.

## 1.3 insulino-résistance et inflammation

L'obésité est associée à une réponse inflammatoire chronique caractérisée par une production anormalement élevée de cytokines, protéines de la phase aigüe et donc une activation des voies de signalisation de l'inflammation ([139]).

Comme cela a été évoqué précédemment (section 1.1), un des éléments clef de ces pathologies est l'apparition d'une inflammation chronique, systémique et/ou localisée. L'inflammation se développe lorsque le système immunitaire met en place une réponse immunitaire suite à la reconnaissance d'antigènes par le système immunitaire inné.

### 1.3.1 Généralités sur le système immunitaire et l'inflammation

#### Reconnaissance des antigènes et initiation de la réponse immunitaire

Le système immunitaire inné a la capacité de reconnaître des groupes de molécules (patterns) conservés communément retrouvés sur certains groupes de pathogènes. Les récepteurs de ces motifs conservés sont appelés PRRs (pattern recognition receptor), ils peuvent être sécrétés ou cellulaires. Les TLRs font partie de la famille des PRR cellulaires avec les récepteurs NOD (nucleotide-binding oligomerization domain). La fixation des ligands des TLRs entraîne l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et des MAP-kinases. Les TLRs sont des protéines transmembranaires ayant un domaine intra-cellulaire de structure commune. Les TLRs connus ainsi que leurs ligands sont listés FIG. 3.

Plusieurs TLRs agissent sous forme de dimères (homodimères ou hétérodimères). L'appariement des TLRs modifie leur spécificité.

#### La réponse inflammatoire locale

L'inflammation est une réponse physiologique à toute une série de stimuli, tels que la reconnaissance d'un antigène ou les lésions tissulaires. Lors de l'inflammation, une série de médiateurs sont libérés par les cellules du système immunitaire inné et du système immunitaire acquis. Ces médiateurs déclenchent ou amplifient des aspects spécifiques de la réponse inflammatoire. Ils sont libérés par les mastocytes, les plaquettes sanguines et toute une variété de leucocytes, comprenant les neutrophiles, les monocytes/macrophages, les éosinophiles, les basophiles et les lymphocytes. Une classe essentielle de ces médiateurs est constituée par les cytokines, qui sont des protéines ou glycoprotéines de faible poids moléculaire. Les cytokines

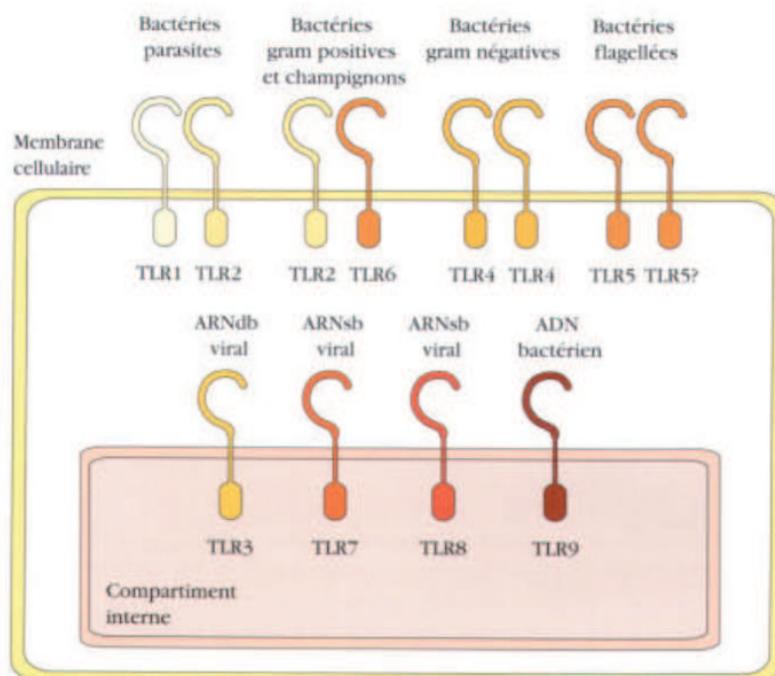


FIGURE 3 – Les Toll-like receptors et leurs ligands

jouent en effet un rôle important dans le développement d'une réponse inflammatoire, aussi bien aigüe que chronique. L'IL-1 (interleukine 1), l'IL-6 (interleukine 6), le TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), l'IL-12 (interleukine 12) et de nombreuses chimiokines (cytokines ayant une activité chimiottractante et permettant le recrutement de cellules spécifiques du système immunitaire) présentent des effets redondants et pléiotropiques qui ensemble contribuent à la réaction inflammatoire. De plus l'IFN- $\gamma$  (interféron  $\gamma$ ) contribue à la réaction inflammatoire en agissant tardivement dans la réponse aigüe et en contribuant à l'inflammation chronique par attraction et activation des macrophages. Une activation immunitaire persistante peut conduire à une inflammation chronique qui a souvent des conséquences pathologiques.

Une des premières étapes de l'inflammation est le recrutement et l'infiltration de neutrophiles dans le tissu. Les médiateurs de l'inflammation, tels que l'IL-1 et le TNF $\alpha$ , induisent une augmentation de l'expression des sélectines au niveau des cellules endothéliales. Les neutrophiles expriment des mucines qui se lient aux sélectines. Cette liaison entraîne la fixation ou l'attachement des neutrophiles à l'endothélium vasculaire. Des chimiokines telles que l'IL-8 (interleukine 8) déclenchent chez les neutrophiles un signal qui conduit à un changement de la conformation des molécules d'adhésion (intégrines), ce qui aboutit à une adhésion et une migration transendothéliale des neutrophiles. Une fois dans le tissu les neutrophiles migrent dans le sens du gradient de chimioattractant et parviennent au site d'inflammation. Les signaux sécrétés au niveau du site d'inflammation augmentent le pouvoir phagocytaire des macrophages. Les voies métaboliques de la respiration sont également stimulées, ce qui pro-

duit des intermédiaires réactifs dérivés de l'oxygène et de l'azote. Les neutrophiles libèrent également des granules primaires et secondaires (contenant des protéases, phospholipases et collagénases) qui jouent un rôle important dans la destruction de divers pathogènes. Toutes ces substances contribuent à la lésion tissulaire qui résulte généralement d'une réponse inflammatoire.

L'IL-1 induit plus tardivement une augmentation de l'expression d'ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) et VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), qui se fixent aux intégrines des lymphocytes et monocytes. Comme les neutrophiles, les lymphocytes et monocytes migrent alors dans le tissu.

Les macrophages tissulaires activés sécrètent entre autres trois cytokines (IL-1, IL-6 et  $\text{TNF}\alpha$ ) qui induisent la production de chimiokines chez les cellules endothéliales et les macrophages recrutés, entretenant ainsi l'inflammation.

La régulation de la durée et de l'intensité de la réponse inflammatoire locale est nécessaire afin de contrôler les dommages cellulaires et faciliter les mécanismes de réparation des tissus. Le  $\text{TGF}\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) joue un rôle important dans la limitation de la réponse inflammatoire. Il provoque l'accumulation et la prolifération de fibroblastes ainsi que le dépôt de matrice extra-cellulaire nécessaire à la réparation tissulaire.

### **La réponse inflammatoire systémique**

Cette réponse est caractérisée par de la fièvre, une augmentation de la synthèse d'hormones telles que l'ACTH (adrénocorticotrophine) et l'hydrocortisone, de protéines de la phase aigüe, et de leucocytes dans le sang. Ces effets systémiques de l'inflammation sont dus à l'action combinée de l'IL-1, de l'IL-6 et du  $\text{TNF}\alpha$  au niveau de l'hypothalamus, du foie et de la moëlle osseuse. Des concentrations importantes de cytokines pro-inflammatoires sont retrouvées dans le sang.

### **Le développement de l'inflammation chronique**

L'inflammation chronique se développe lorsque l'antigène persiste, ce qui est le cas lors de l'endotoxémie, c'est-à-dire une augmentation anormale du taux de LPS sanguin. En effet, le LPS est produit en permanence par le microbiote intestinal et active le système immunitaire de manière chronique lorsque la perméabilité intestinale est trop importante.

Une réponse inflammatoire chronique se traduit par une lésion tissulaire importante. L'accumulation et l'activation de macrophages sont caractéristiques de l'inflammation chronique. Les cytokines libérées de façon chronique par les macrophages activés stimulent la prolifération des fibroblastes et la production de collagène. Il se développe alors une fibrose au niveau des sites d'inflammation chronique, c'est-à-dire le développement d'un tissu cicatriciel au détriment de l'architecture normale du tissu. L'inflammation chronique conduit

souvent à la formation d'un granulome, c'est-à-dire une masse constituée d'une zone centrale de macrophages activés entourée de lymphocytes activés.

L'IFN- $\gamma$  et le TNF $\alpha$  jouent un rôle essentiel dans le développement de l'inflammation chronique. Les lymphocytes Th1, les lymphocytes Tc et les lymphocytes NK sécrètent majoritairement l'IFN $\gamma$  tandis que les macrophages activés sécrètent du TNF $\alpha$ . L'IFN $\gamma$  a de nombreuses activités, l'une d'elles est sa capacité à activer les macrophages. Les macrophages activés expriment massivement les molécules de classe II du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité), produisent de grandes quantités de cytokines et ont une activité phagocytaire et microbicide exacerbée. Dans une réponse inflammatoire chronique, l'accumulation d'un grand nombre de macrophages activés est responsable de la plupart des lésions cellulaires. En effet les enzymes hydrolytiques et les intermédiaires réactifs dérivés de l'oxygène ou de l'azote sécrétés par ces macrophages endommagent les tissus environnants. L'activation des macrophages par l'IFN $\gamma$  favorise également l'augmentation de la transcription du gène du TNF $\alpha$  et de la stabilité de son ARNm, ce qui conduit à une production importante de TNF $\alpha$ . Diverses preuves indiquent que le TNF- $\alpha$  contribue en grande partie à la destruction cellulaire. L'effet de ces deux cytokines sur leurs cibles est synergique.

### 1.3.2 TNF- $\alpha$

Le lien entre l'obésité, le TNF $\alpha$  et l'action de l'insuline a été mis en évidence pour la première fois par Hotamisligil *et al* en 1993 ([138]). Dans cette étude, les auteurs font la démonstration du lien entre obésité et inflammation en mettant en évidence la capacité des adipocytes à sécréter du TNF $\alpha$ . Des études ultérieures confirment l'impact négatif du TNF $\alpha$  sur l'insulino-résistance en rapportant que des souris dont la synthèse de TNF $\alpha$  ou de ses récepteurs a été inactivée présentaient une amélioration de la sensibilité à l'insuline dans des modèles d'obésité génétiques ou nutritionnels [267]. Des observations concordantes ont été faites chez l'humain, en effet, il a été constaté que les obèses présentaient une expression de TNF $\alpha$  élevée dans le tissu adipeux et que la perte de poids était associée à une diminution de cette expression ([73]). De plus, la neutralisation du TNF $\alpha$  suite à l'administration d'anticorps anti-TNF à des rats rendus insulino-résistants par l'administration d'un régime hyperlipidique a permis une amélioration de la signalisation de l'insuline et du degré de stéatose ([21]). Tous ces éléments soulignent le rôle capital de cette cytokine dans la régulation de l'insulino-résistance et l'obésité. D'un point de vue moléculaire, il a été constaté que le TNF $\alpha$  aussi bien que les AGL stimulaient la phosphorylation d' IRS-1, ce qui inhibe la transduction du signal de l'insuline ([216]).

Au niveau hépatique, une augmentation de l'expression de TNF $\alpha$  a été observée chez des patients atteints de NAFLD. De plus, l'expression de TNF $\alpha$  et de ses récepteurs p55 et p75 corrèle positivement avec le degré de fibrose et le niveau de diabète de type 2 ([68]). Quelques années plus tard, plusieurs autres études ont abouti à des observations similaires,

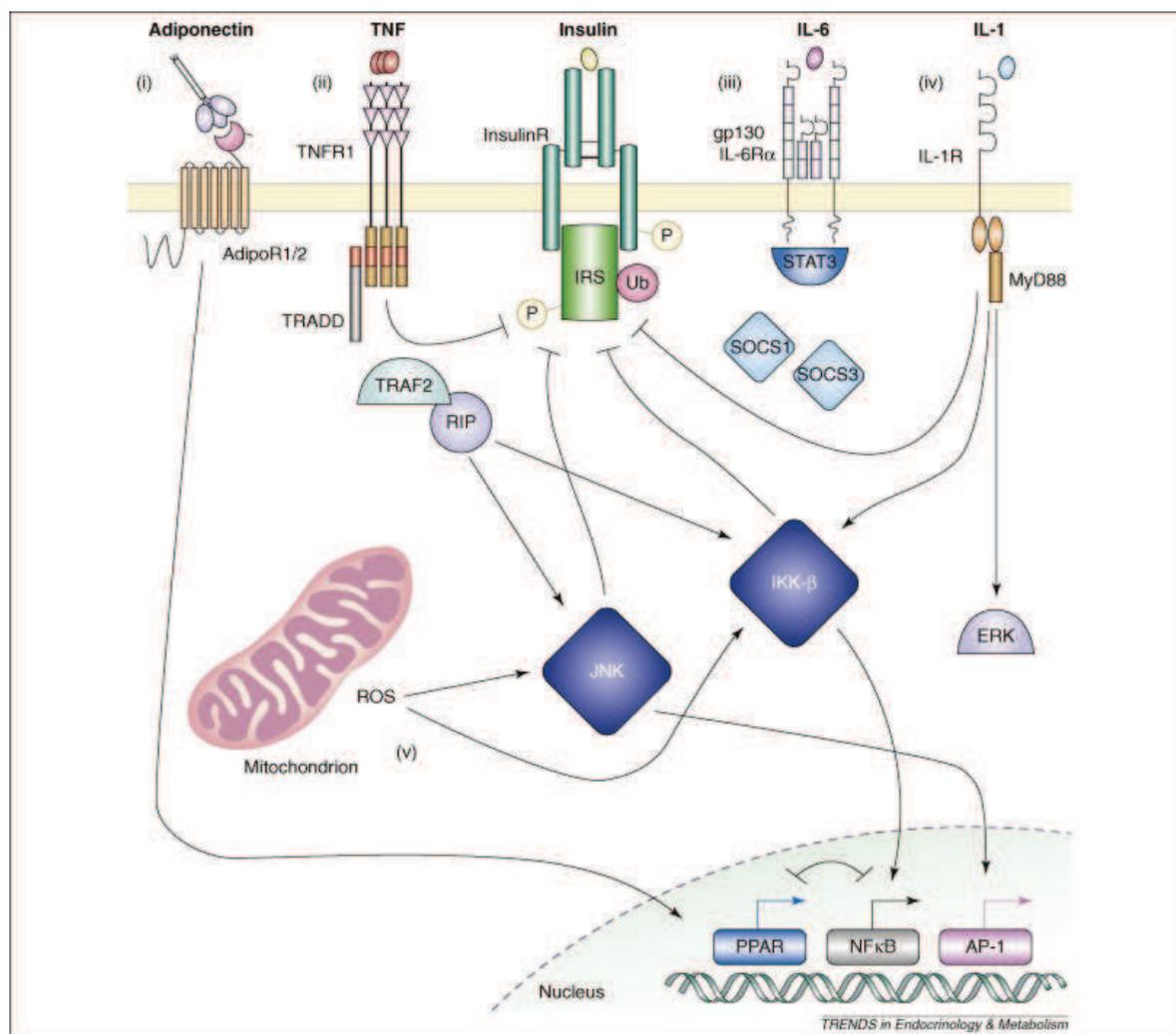


FIGURE 4 – Les mécanismes moléculaires de l'insulino-résistance [259]

c'est-à-dire une corrélation positive entre l'expression ou le niveau de  $\text{TNF}\alpha$  et la sévérité de la pathologie hépatique ([131], [1], [186], [281]).

Toutefois, ces avancées sur la compréhension du rôle du  $\text{TNF}\alpha$  dans l'insulino-résistance n'ont pas encore permis la mise en place de traitements. En effet, contrairement à ce qui a été constaté chez le rat, l'administration d'anti-corps anti-TNF chez l'humain n'a pas été associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline ([30]).

### 1.3.3 Interleukine-6

L'IL-6 a été une des premières cytokines associées à l'insulino-résistance. Tout comme dans le cas du  $\text{TNF}\alpha$ , une diminution de la concentration d'IL-6 est associée à la perte de poids et à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline ([160]). Encore de la même manière que pour le  $\text{TNF}\alpha$ , un traitement avec des anti-corps neutralisant l'IL-6 permet d'obtenir une

augmentation de la sensibilité à l'insuline chez la souris ([158]). Le tissu adipeux viscéral est un site important de synthèse d'IL-6, en effet, la production d'IL-6 par le tissu adipeux intra-abdominal est au moins trois fois plus importante que celle du tissu adipeux sous-cutané ([110]).

Les expériences basées sur des modèles de souris génétiquement modifiées fournissent des résultats contradictoires : une étude rapporte qu'une souche de souris IL-6<sup>-/-</sup> est insulino-résistante et prédisposée à développer des complications de l'obésité ([273]) tandis qu'une autre rapporte qu'une autre souche de souris IL-6<sup>-/-</sup> n'est pas plus prédisposée aux altérations métaboliques que les souris sauvages ([84]). Les auteurs de la première étude ont par la suite montré que ces souris IL-6<sup>-/-</sup> avaient une dépense énergétique (activité et thermogénèse) plus faible que les souris sauvages, ce qui explique que leur vieillissement est associé au développement d'une obésité et des complications associées.

Le rôle de l'IL-6 a aussi été démontré dans les NAFLD ([131], [1] et [277]). En effet, Wieckowska *et al* ont démontré chez l'humain que l'expression hépatique d'IL-6 corrèle significativement avec le degré d'inflammation, de fibrose et d'insulino-résistance systémique ([277]). En ce qui concerne le rôle de l'IL-6 dans l'inflammation hépatique, il semble que le foie sécrète de l'IL-6 mais que la source majeure de cette cytokine reste le tissu adipeux ([30]).

D'un point de vue mécanistique, il a été montré que l'IL-6 provenant du tissu adipeux influe sur l'insulino-résistance hépatique en stimulant l'expression de SOCS-3 ([228]). La transduction du signal se fait *via* l'induction de la gp130. Le récepteur de gp130 présente un certain nombre de similarités avec le récepteur de la leptine. La leptine est d'ailleurs connue pour activer des voies aboutissant à une augmentation de la dépense énergétique et de la sensibilité à l'insuline. La leptine comme l'IL-6 ont la capacité d'activer AMPK dans les muscles squelettiques et dans le tissu adipeux. En adéquation avec l'activation d'AMPK, l'IL-6 stimule l'oxydation de lipides *in vitro* et *in vivo* ([258]).

### 1.3.4 Interleukine-1

Les souris IL-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup> ont une glycémie à jeun plus basse ainsi qu'une meilleure sensibilité à l'insuline que les souris sauvages ([193]), ce qui montre que cette cytokine est également impliquée dans les processus de régulation de la glycémie. De plus, la sécrétion d'IL-1 $\alpha$  par des cellules sanguines de patients souffrant de NAFLD stimulées par du LPS est plus élevée que celle de patients sains ([219]). Les concentrations de cytokines sont par ailleurs positivement corrélées avec le niveau d'insulino-résistance et le stade de NAFLD.

Par ailleurs, l'IL $\beta$  a la capacité de réprimer l'expression d'IRS1 *via* un mécanisme impliquant ERK. Cette action sur IRS1 perturbe la signalisation de l'insuline et pourrait potentiellement contribuer avec d'autres cytokines au développement de l'inflammation associée à l'insulino-résistance.

### 1.3.5 Les voies IKK $\beta$ et NF $\kappa$ B

NF $\kappa$ B est un facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire (comme les cytokines, les radicaux libres, les LDL oxydés, antigènes d'origine bactérienne ou virale). NF $\kappa$ B est présent dans le cytoplasme sous une forme inactive, associé à une protéine inhibitrice. Lorsqu'un signal active IKK $\beta$  (I kappa B kinase) par l'intermédiaire de récepteurs membranaires (TLRs, récepteur de cytokines, etc.), IKK $\beta$  phosphoryle la protéine inhibitrice de NF $\kappa$ B, ce qui déclenche la libération de ce dernier. La forme activée de NF $\kappa$ B est alors transloquée dans le noyau où elle se lie à des séquences spécifiques de l'ADN (response elements). Ceci déclenche l'expression de nombreux gènes et des modifications des fonctions cellulaires.

Yuan *et al* ont montré que la voie IKK $\beta$  était un médiateur important de l'action du TNF $\alpha$  dans l'insulino-résistance. Ils ont observé sur une culture de cellules embryonnaires de rein (lignée cellulaire HEK 293) que la surexpression d'IKK $\beta$  était associée à une perturbation des voies de transduction de l'insuline ([291]). *In vivo*, les souris ob/ob IKK $\beta$   $^{+/-}$  sont protégées contre le développement de l'insulino-résistance par rapport aux souris ob/ob IKK $\beta$   $^{+/+}$ . Ces éléments confirment le rôle de processus inflammatoires dans l'insulino-résistance et montrent le rôle capital d'IKK $\beta$  dans ces processus.

Deux groupes ont démontré au même moment le lien entre l'expression hépatique d'IKK $\beta$  et l'insulino-résistance ([17], [44]). Arkan *et al* ont montré chez la souris que l'inactivation du gène codant pour IKK $\beta$  dans les hépatocytes permet de maintenir une sensibilité à l'insuline du foie sous régime hyper-lipidique ([17]). Les muscles et le tissu adipeux ne sont par contre pas protégés, l'action d'IKK $\beta$  est donc dans ce cas locale. Inversement, l'activation spécifique d'IKK $\beta$  au niveau du foie conduit à une forte insulino-résistance hépatique qui se répercute au niveau systémique avec le développement d'une insulino-résistance modérée. Par contre, l'IKK $\beta$  produit par les cellules myéloïdes régule la sensibilité à l'insuline au niveau systémique ([44]).

### 1.3.6 Rôle des adipokines dans l'insulino-résistance et les NAFLD

Les adipokines, ou adipocytokines, sont des cytokines ou hormones sécrétées exclusivement ou essentiellement par le tissu adipeux. Elles ont un rôle important dans la régulation d'un grand nombre de processus inflammatoires et immunitaires. L'adiponectine, la leptine et la résistine sont considérées depuis quelques années comme des effecteurs majeurs du lien entre l'obésité, la résistance à l'insuline et les processus inflammatoires associés. L'adiponectine et la leptine sont produites en grandes quantités par les adipocytes. D'autres molécules produites par le tissu adipeux ont été caractérisées, un certain nombre sont des cytokines déjà connues telles que le TNF $\alpha$ , l'IL-1 et l-IL-6. D'autres sont des chimiokines, des facteurs de coagulation et certains composés du système du complément. Les adipocytes ont la capacité de sécréter la plupart des cytokines, toutefois d'autres types de cellules du tissu

adipeux telles que les préadipocytes, les macrophages et les cellules endothéliales contribuent à la production d'hormones par le tissu adipeux.

### L'adiponectine

L'adiponectine est une protéine très abondante dans le sang par rapport aux autres hormones, elle représente environ 0,01% de toutes les protéines plasmatiques, soit environ 5 à 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Cette protéine existe sous forme complète et sous forme clivée (forme globulaire) ([28]).

L'adiponectine module un grand nombre de processus métaboliques, dont la régulation de la glycémie et le catabolisme des acides gras ([87]). La concentration sérique d'adiponectine est réduite chez les individus atteints d'obésité, de diabète de type 2 ou d'insulino-résistance ([16]). Inversement, la perte de poids est à l'origine d'une augmentation de la concentration d'adiponectine ([177]). Cette cytokine exerce un effet anti-inflammatoire sur les cellules endothéliales en inhibant l'action du  $\text{TNF}\alpha$  et de la voie  $\text{NF}\kappa\text{B}$  ([210]). Chez les souris obèses, l'administration d'adiponectine réduit l'hyper-glycémie et l'insulino-résistance et diminue le taux plasmatique d'acides gras libres.

Chez la souris, toutes les études sur l'action de l'adiponectine sur l'insulino-résistance ne vont pas dans le même sens. Deux équipes constatent que les souris déficientes en adiponectine développent de l'insulino-résistance sous divers régimes ([183], [162]) tandis qu'une autre rapporte l'incapacité de ces souris à devenir insulino-résistantes, y compris sous régime hyper-lipidique ([178]). Une étude portant cette fois sur le récepteur à l'adiponectine tend toutefois à confirmer l'action sensibilisatrice à l'insuline de l'adiponectine. En effet, la délétion des récepteurs de type 1 et 2 a mené à une augmentation du degré de stéatose, une inflammation, un stress oxydatif, une insulino-résistance et une intolérance au glucose ([285]). De plus, Kim *et al* ont montré qu'une surexpression de la forme complète de l'adiponectine chez les souris ob/ob permettait de rétablir des niveaux normaux de glycémie et d'insulinémie ([156]).

Les patients atteints de NASH ont une concentration plasmatique d'adiponectine faible, ce qui suggère une association de cette adipokine aux NAFLD, du moins en temps que facteur prédictif ([142]). Une autre étude met en évidence une corrélation négative entre le taux d'adiponectine et le degré de nécroinflammation et de fibrose ([201]), ce qui permet là encore d'envisager l'hypoadiponectinémie comme un facteur prédictif de la sévérité de la NAFLD. Ceci est confirmé par le fait que chez les patients atteints de NASH, le taux d'adiponectine et l'expression hépatique d'adiponectine sont plus faibles que chez des sujets sains ([149], [43], [211]).

Globalement, une diminution du taux circulant d'adiponectine est associée aux altérations métaboliques telles que le diabète de type 2 et les NAFLD.

## La leptine

La leptine est une hormone protéique essentiellement synthétisée par les adipocytes du tissu adipeux blanc. Elle peut aussi être produite en moindre quantité par le tissu adipeux brun, l'estomac, les muscles squelettiques, les cellules épithéliales, l'estomac et le foie ([190]). Cette hormone a initialement été découverte pour sa capacité à réguler la prise alimentaire, elle joue toutefois un rôle beaucoup plus large en participant également à la régulation du métabolisme énergétique et de l'inflammation.

Il a été rapporté que la leptine possède une activité pro-inflammatoire *in vitro* et *in vivo* ([103]). En effet, la leptine stimule directement la sécrétion de plusieurs cytokines pro-inflammatoires par les lymphocytes T, et donc influe sur la balance Th1/Th2. Il semble également que la leptine stimule la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-12) par les monocytes et les macrophages [233].

L'obésité est associée à un taux circulant élevé de leptine et une résistance à la leptine du système nerveux central. La leptine a une action forte sur l'homéostasie du glucose : elle permet de rétablir une glycémie normale chez les souris ob/ob avant toute perte de poids ([217]). L'administration de leptine permet également de normaliser la glycémie chez des souris et des patients lipodystrophiques. Toutefois, l'administration de leptine ne permet pas d'abaisser la glycémie de patients obèses hyperglycémiques, ceci soutient l'idée selon laquelle les obèses ayant un taux élevé de leptine sont résistants à la leptine ([132]). Cette résistance à la leptine pourrait s'expliquer par l'expression élevée de SOCS généralement observée chez les rongeurs et humains obèses. En effet, SOCS3 se lie au récepteur de la leptine et inhibe son activation([217]).

La corrélation entre la concentration plasmatique de leptine et le stade de NAFLD a été mis en évidence dans plusieurs études ([186] [281] [117] [61]). Ce résultat n'est cependant pas retrouvé systématiquement ([204]). Globalement, le taux de leptine est positivement corrélé avec le degré de stéatose, de fibrose et d'inflammation hépatique. Le taux de leptine est logiquement supérieur chez les patients atteints de NASH par rapport à ceux atteints de stéatose simple.

## La résistine

La résistine, aussi appelée FIZZ3 ou ADSF est un polypeptide exprimé et sécrété essentiellement par le tissu adipeux blanc. Comme la leptine, elle peut être produite en quantités plus modestes par de nombreux autres organes/tissus/cellules. Elle appartient à la famille des protéines riches en cystéine, appelées RELM. La résistine semble être un senseur de l'état nutritionnel global étant donné que son expression diminue durant le jeun et augmente après la prise alimentaire ([157]).

En 2001, Stepan *et al* constatent chez la souris que la concentration plasmatique de résistine est diminuée par un traitement à la rosiglitazone (anti-diabétique) et augmentée avec

l'obésité, que celle-ci soit d'origine génétique ou nutritionnelle [252]. De plus l'administration de résistine entraîne une détérioration de la tolérance au glucose et de l'action de l'insuline. La résistine limite l'action de l'insuline au niveau des adipocytes, ce qui a pour conséquence une diminution de l'absorption de glucose. La résistine est donc une adipokine capitale dans le développement du diabète de type 2.

Les propriétés pro-inflammatoires de la résistine laissent penser que celle-ci est un médiateur de l'inflammation dans le cadre de l'obésité ([163]). La résistine et l'adiponectine ont des effets opposés sur les cellules endothéliales vasculaires : la résistine stimule la production de VCAM-1 et ICAM-1, tandis que l'adiponectine réprime la synthèse de ces molécules ([150]). D'un point de vue mécanistique, il a été montré que l'action de la résistine au niveau hypothalamique augmentait l'expression hépatique du TNF $\alpha$ , de l'IL-6 et de SOCS3 ([200]).

Bien que les études chez les rongeurs aient démontré l'importance du rôle de la résistine dans la pathogenèse de l'insulino-résistance et du diabète de type 2, à ce jour la corrélation chez l'humain entre la concentration plasmatique de résistine et le degré d'insulino-résistance n'a pu être clairement mise en évidence ([212], [288] et [304]). Le taux de résistine est corrélé avec le score histologique du foie mais pas avec le degré d'insulino-résistance, le rôle de la résistine dans le développement des NAFLD et de l'insulino-résistance reste donc incertain.

## 1.4 Métabolisme hépatique des lipides et NAFLD

Une accumulation de lipides, principalement sous forme de triglycérides, en l'absence de consommation d'alcool ou d'infection virale est le facteur commun de tous les stades de NAFLD. Cette accumulation de lipides résulte d'un déséquilibre entre l'apport de lipides (apport *via* la circulation sanguine ou synthèse *de novo*) et leur élimination (sécrétion de particules lipoprotéiques ou oxydation des acides gras) ([202]). Tous ces mécanismes sont altérés dans une plus ou moins grande mesure dans le cas des NAFLD. La régulation de ces voies est complexe et implique des facteurs nucléaires, des enzymes cellulaires et des protéines de transport membranaires. Les sources d'acides gras contribuant au développement de la stéatose sont :

- Les lipides originellement stockés dans le tissu adipeux et qui sont libérés dans le système sanguin et lymphatique sous forme d'acides gras non estérifiés. L'insulino-résistance est associée à une dérégulation de la sécrétion d'acides gras par le tissu adipeux durant le jeûne. Dans le cas des NAFLD, de nombreuses études mettent en évidence une défaillance de l'action inhibitrice de l'insuline sur la lipolyse.
- Les acides gras nouvellement synthétisés dans les hépatocytes.
- L'apport alimentaire de lipides, qui peuvent être absorbés par le foie aussi bien sous la forme de chylomicrons en provenance de l'intestin que d'acides gras non estérifiés.

### 1.4.1 La lipogenèse hépatique

La lipogenèse *de novo* est à l'origine de 26% du contenu en lipides du foie chez les obèses (Donnelly *et al* [90]) contre environ 5% chez les individus sains ([260]). De plus, la lipogenèse reste très active à jeun chez les personnes atteintes de NAFLD ce qui n'est pas le cas chez les individus sains, chez qui la lipogenèse n'est stimulée qu'en postprandial. La lipogenèse hépatique est régulée par un ensemble de récepteurs nucléaires et de facteurs de transcription qui régulent l'expression des enzymes impliquées dans les différentes étapes de la lipogenèse.

#### Les facteurs de transcription

L'expression d'enzymes de la lipogenèse est stimulée entre autres par le facteur de transcription SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein 1c). Dans le cadre des NAFLD, la sensibilité à l'insuline des voies de la lipogenèse est relativement préservée. L'hyperinsulinémie et l'activation par les récepteurs endocannabinoïdes entraînent une sur-expression de SREBP-1c ([59]). Contrairement aux formes 2 et 1a, l'expression de SREBP-1c et sa concentration dans le noyau ne sont pas augmentées suite à une faible concentration en cholestérol dans la cellule. Ce facteur de transcription est en effet plutôt sous le contrôle du statut nutritionnel ([137]) et du taux d'insuline. L'expression de SREBP-1c est aussi stimulée par LXR- $\alpha$  (liver X receptor  $\alpha$ ). Les concentrations de SREBP-1c sont élevées dans le foie de souris *ob/ob* ([245]), qui sont connues pour présenter une forte stéatose. D'autre part, la diminution de l'expression d'enzymes lipogéniques et de la stéatose par l'administration d'acides gras polyinsaturés se fait via la répression de SREBP-1c ([242]).

LXR- $\alpha$  est un facteur de transcription fortement exprimé dans le foie, le tissu adipeux et les macrophages. Il est activé par les oxystérols (composés dérivés du cholestérol) et le glucose. Il stimule l'expression d'enzymes lipogéniques, directement et par l'intermédiaire de SREBP-1c ([59]). L'activation exogène de LXR- $\alpha$  induit une stéatose massive et multiplie par 2,5 le taux sérique de VLDL (very low-density lipoprotein). Ce phénomène est accompagné par une légère amélioration de l'insulino-résistance périphérique et une diminution de la glycémie, imputables à une augmentation de l'absorption périphérique de glucose ([126]).

La stimulation de la glycolyse et de la lipogenèse en réponse à une absorption de glucides dépend à la fois de la glycémie et de l'insulinémie. La découverte du facteur de transcription ChREBP (carbohydrate responsive element binding protein) a permis d'expliquer les mécanismes par lesquels le glucose affecte la transcription de gènes impliqués dans la glycolyse et la lipogenèse ([266]). Le glucose active ChREBP en permettant son passage du cytoplasme dans le noyau et ainsi sa fixation sur les régions promotrices présentes en amont des gènes codant les enzymes lipogéniques. L'expression de ChREBP est considérablement augmentée dans le foie de souris *ob/ob* par rapport aux souris sauvages, que les animaux soient à jeun ou non. L'inactivation de ChREBP dans les hépatocytes a pour conséquence une diminution

de la glycolyse, de la stéatose et de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse d'acides gras ([143]).

### Les enzymes lipogéniques

De nombreuses enzymes sont impliquées dans la synthèse d'acides gras et de triglycérides. Les principales, ainsi que leurs facteurs de transcription, sont représentées FIG. 5.

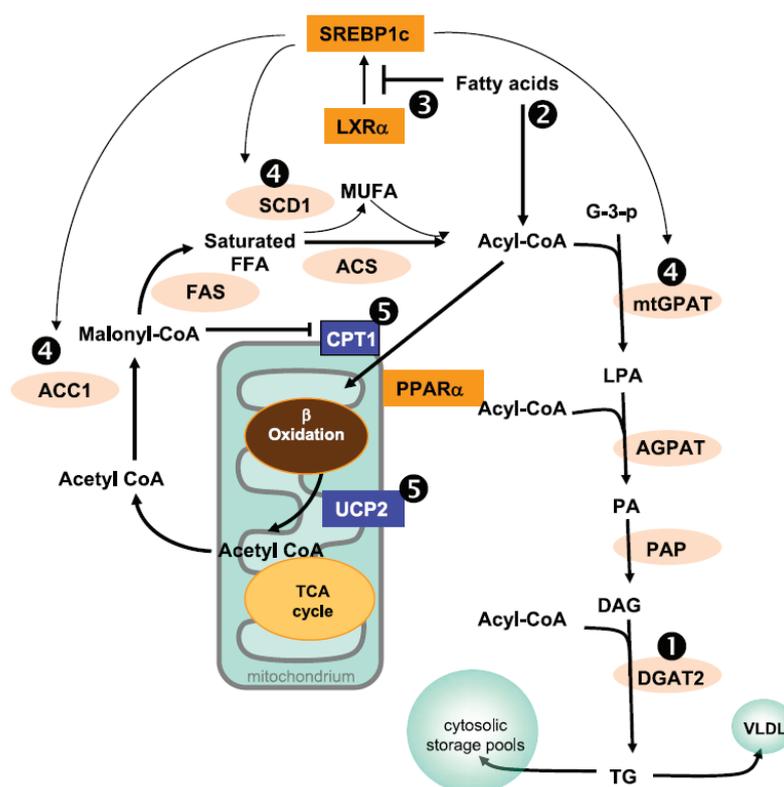


FIGURE 5 – Les principales étapes de la synthèse de triglycérides (Choi *et al.*, [62])

L'ACC (acetyl-CoA carboxylase) catalyse une étape limitante de la synthèse des acides gras : la synthèse du malonyl-CoA. Ce dernier est à la fois un intermédiaire de la synthèse d'acides gras et un inhibiteur de l'oxydation des lipides via l'inhibition de CPT1. L'isoforme 1 d'ACC est retrouvée dans le cytosol des hépatocytes et des adipocytes tandis que l'isoforme 2 est plutôt retrouvée dans le coeur et les muscles squelettiques. ACC2 possède un domaine hydrophobe, ce qui en fait une protéine membranaire, généralement associée à la membrane des mitochondries, où cette enzyme régule la concentration locale de malonyl-CoA, l'activité de CPT1 et l'oxydation lipidique ([3]). Les souris dont le gène ACC1 a été délété meurent au stade embryonnaire ([253]). Dans le cas d'ACC2, les souris sont viables et plus minces que

les souris sauvages en raison de la forte oxydation des lipides dans le coeur et les muscles squelettiques ([4]).

Savage *et al* on étudié le rôle d'ACC1 et 2 spécifiquement dans le foie de rats rendus obèses en inhibant l'expression de chaque forme ([236]). Les résultats obtenus leur ont permis de déduire que :

- l'inhibition de l'une ou l'autre des formes d'ACC diminue le contenu hépatique de triglycérides et de diacylglycérol. Dans les deux cas, le taux d'oxydation des lipides était augmenté, mais de manière plus importante suite à l'inhibition d'ACC2 étant donné qu'ACC2 régule la concentration de malonyl-coA à proximité de CPT1. Seule l'inhibition d'ACC1 a entraîné une diminution de la synthèse d'acides gras, ce qui montre que seulement le malonyl-coA produit dans le cytosol est utilisé comme substrat dans la lipogénèse.
- l'inhibition de l'une ou l'autre des formes d'ACC n'a pas eu d'impact sur la prise alimentaire, le poids et le degré d'insulino-résistance systémique. Par contre, l'insulino-résistance hépatique était diminuée. Ceci s'explique par une augmentation de l'activité d'Akt2 et de la phosphorylation de FOXO-1. La phosphorylation de FOXO-1 empêche ce dernier d'entrer dans le noyau et d'activer l'expression de gènes impliqués dans la néoglucogénèse.

La FAS est un complexe enzymatique qui catalyse la dernière étape de la synthèse d'acides gras. De même que pour ACC1, la délétion du gène codant pour FAS a pour conséquence une mort au stade embryonnaire ([5]). Les souris dont le gène codant pour FAS a été inactivé spécifiquement au niveau du foie ne sont pas protégées contre le développement d'une stéatose, au contraire : après 4 semaines de régime pauvre en lipides et riche en glucides, ces souris développent une stéatose. Celle-ci est due à une diminution de la  $\beta$ -oxydation, mise en évidence par une multiplication par 3 de la concentration hépatique de malonyl-CoA et une diminution significative de la concentration sanguine en corps cétoniques ([57]). Les auteurs de cette étude avancent que cette diminution de la  $\beta$ -oxydation vient du fait que les acides gras nouvellement synthétisés par FAS activeraient spécifiquement certains facteurs de transcription (PPAR $\alpha$ ) qui activeraient la  $\beta$ -oxydation. Ceci prête toutefois à discussion étant donné qu'il a précédemment été démontré que les acides gras à chaîne longue régulent la  $\beta$ -oxydation *via* des mécanismes indépendants de la voie PPAR $\alpha$  ([167]).

La SCD1 (stearoyl-CoA desaturase 1) est une enzyme catalysant la synthèse d'acides gras mono-insaturés à chaîne longue sous forme estérifiée à partir des acyl-CoA saturés. Les esters formés constituent majoritairement les VLDLs-TAGs ([197]). La SCD1 est majoritairement exprimée dans le foie. Chez la souris, la délétion du gène codant pour SCD1 protège contre l'obésité, l'insulino-résistance et la stéatose induites par un régime hyper-lipidique et hyper-glucidique. La SCD1 serait donc une enzyme potentiellement impliquée dans les mécanismes aboutissant au développement de ces pathologies. La délétion de ce gène a pour conséquence à la fois une diminution de la lipogénèse *de novo* et une augmentation du taux

de  $\beta$ -oxydation ([65]).

SCD1 est un médiateur important de la lipogénèse induite par l'absorption d'acides gras saturés. En effet, la désaturation de ces acides gras est indispensable à l'activation de la lipogénèse. Lorsque SCD1 est inhibé ou délété, l'action de ces acides gras est opposée à ce qui est observé en temps normal, l'acide stéarique par exemple, stimule alors la  $\beta$ -oxydation, ce qui induit une protection contre l'obésité généralement induite par l'absorption d'acides gras saturés ([88]). Ces éléments laissent supposer que SCD1 agit comme un régulateur, orientant la réponse à un régime riche en acides gras saturés vers la lipogénèse ou la  $\beta$ -oxydation.

L'inhibition spécifique de SCD1 au niveau hépatique chez des rongeurs sous régime hyper-lipidique (riche en acides gras saturés) diminue l'expression d'enzymes lipogéniques (FAS et ACC1) et donc la lipogénèse ([195]). Cette inhibition entraîne également une diminution de la transcription des facteurs de transcription SREBP1c et ChREBP, qui régulent l'expression de gènes impliqués dans la lipogénèse sous l'action du glucose et de l'insuline. Il semble que le mécanisme par lequel SCD1 affecte ces deux facteurs de transcription soit lié aux concentrations d'oléate dans les hépatocytes, étant donné qu'une supplémentation en oléate a permis de rétablir les concentrations de SREBP1c et ChREBP dans le noyau des hépatocytes. L'inhibition spécifique de SCD1 au niveau hépatique a aussi pour conséquence une augmentation de la  $\beta$ -oxydation (*via* l'activation de CPT1a) et une augmentation de la sécrétion de lipides par le foie. Ceci aboutit à une protection contre la stéatose induite par un régime hyper-lipidique ainsi que les autres altérations métaboliques associées.

La DGAT (acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase) catalyse la dernière étape de la synthèse des triglycérides. Cette enzyme existe sous deux isoformes, DGAT 1 et 2. DGAT1 est exprimée dans l'intestin et le tissu adipeux tandis que DGAT2 est exprimée dans le foie et le tissu adipeux. La mutation de DGAT2 est létale, ce qui n'est pas le cas pour DGAT1. DGAT2 joue donc un rôle essentiel dans le métabolisme des lipides. L'inactivation de DGAT2 dans le foie par des oligonucléotides antisens chez des souris obèses (modèle génétique ou nutritionnel) entraîne une diminution de l'expression des autres enzymes lipogéniques et de la stéatose parallèlement à une augmentation de l'oxydation des acides gras ([290]). Cette inactivation s'accompagne d'une diminution de l'expression des autres enzymes impliquées dans la lipogénèse (SREBP1c, FAS, ACC, etc.). Le poids et l'insulino-résistance systémique ne sont pas affectés par cette inhibition. Toutefois, l'insulino-résistance hépatique est améliorée lorsque DGAT2 est inhibé chez le rat ([62]). Dans cette expérience, la PKC $\epsilon$  est réprimée. Cette protéine a la capacité de se lier au récepteur de l'insuline et d'inhiber son activité protéine kinase, ce qui explique l'amélioration de la sensibilité à l'insuline hépatique par l'inhibition de DGAT2 ([231]).

### 1.4.2 L'absorption des lipides par les hépatocytes

L'absorption de lipides d'origine alimentaire au niveau des hépatocytes est 50% plus élevée chez les personnes atteintes de diabète de type 2 en comparaison avec des témoins

sains ([224]). L'absorption des acides gras libres au niveau du foie nécessite l'intervention de protéines membranaires ayant une forte affinité pour les acides gras. Les FATPs (Fatty Acid Transport Protein) forment une famille de 6 transporteurs membranaires présents chez tous les vertébrés. La FATP5 est retrouvée uniquement au niveau de la membrane basale des hépatocytes. Son expression est régulée par des hormones (insuline par exemple), des composés pro-inflammatoires comme les LPSs, le TNF $\alpha$  et l'IL ainsi que des activateurs des PPARs (peroxisome proliferator activated receptor) ([251], [237]). La délétion du gène de la FATP5 entraîne une diminution de 50% du taux de lipides hépatique chez les souris ([89]). Les souris délétées pour la FATP5 sont également protégées contre l'obésité et la stéatose induites par un régime hyper-lipidique. Ces données indiquent que ce transporteur est une protéine essentielle dans l'absorption des lipides par le foie.

La FAT ou CD36 est un autre transporteur membranaire qui accélère la dissociation de l'albumine et des acides gras et catalyse l'intégration d'acides gras non dissociés dans la double-couche de phospholipides. CD36 est exprimé dans un grand nombre de tissus et cellules, dont les hépatocytes et les macrophages. Cette protéine est multifonctionnelle, elle est le récepteur de nombreux ligands, dont les collagènes de type I et IV, les VLDLs et les LDLs (low-density lipoprotein) oxydées. L'implication du CD36 dans l'athérosclérose a été particulièrement étudiée et il a été montré que sa capacité à se lier à des LDLs oxydées était un élément clef de la différenciation des macrophages en cellules spumeuses (macrophages activés gorgés de lipides). Par ailleurs, une augmentation de l'activité de CD36 au niveau hépatique participe au développement de la stéatose en conditions pathologiques (obésité, diabète, régime hyper-lipidique) ([159], [297]). Chez l'homme, il a été constaté que l'expression de CD36 était augmentée en cas de NAFLD et positivement corrélée avec la stéatose ([125]). Au niveau hépatique, l'expression de CD36 est stimulée par PPAR $\alpha$  et  $\gamma$ , LXR (liver X receptor) et PXR (pregnane X receptor). Les souris dont le gène du CD36 a été délété présentent une meilleure sensibilité périphérique à l'insuline, un plus faible taux de glucose sanguin mais un taux d'acides gras libres et de triglycérides sanguins élevés, une forte stéatose et insulino-résistance hépatique ([120]).

Les FABPs (fatty acid binding protein) sont fortement exprimées et fixent les acides gras, les eicosanoïdes (formes spécifiques des acides gras oxydés), et d'autres formes de lipides. La forme 1 est retrouvée dans le foie et l'intestin grêle, la forme 6 dans l'iléon et la forme 4 dans les adipocytes et les macrophages. Les FABPs sont localisées au niveau de la membrane et du cytosol, en plus de faciliter le transport des lipides à travers la membrane, elles pourraient contribuer au transport intercellulaire des acides gras et autres lipides.

### 1.4.3 L'oxydation des lipides dans le foie

La plupart des acides gras sont métabolisés par la  $\beta$ -oxydation, qui a lieu majoritairement dans les mitochondries, mais aussi dans les peroxysomes. Une autre voie de catabolisme

des acides gras est l'  $\omega$ -oxydation dans les microsomes du réticulum endoplasmique. L'oxydation ailleurs que dans les mitochondries devient proportionnellement plus importante lorsque les acides gras sont disponibles en grande quantité dans le foie, ce qui est le cas lors des NAFLD ([179]).

### La $\beta$ -oxydation mitochondriale

La  $\beta$ -oxydation mitochondriale permet l'oxydation des acides gras à chaînes courte, moyenne et longue et produit de l'énergie utilisée par les activités cellulaires. Les acides gras sont progressivement réduits en acétyl-CoA, qui est condensé en corps cétoniques. Ces derniers sont utilisés comme substrat énergétique dans le cycle de Krebs ou sont exportés vers d'autres tissus. La  $\beta$ -oxydation mitochondriale est régulée par CPT1a, qui est inhibée par le malonyl-CoA.

Une morphologie anormale des mitochondries est observée chez les patients et les animaux atteints de NASH ([275]). Par ailleurs, une inhibition de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale par des médicaments ou par la délétion d'un gène codant pour une enzyme clef de la  $\beta$ -oxydation entraîne l'apparition d'une stéatose et d'une NASH, ce qui laisse supposer qu'un défaut de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale est un des éléments entrant en jeu dans le développement des NAFLD. La NASH est de plus associée à une diminution de la quantité d'ADN mitochondrial, une plus faible activité des complexes I, II, III, IV de la chaîne respiratoire mitochondriale ([32]) et une moins bonne capacité à rétablir la concentration d'ATP intra-cellulaire après un challenge au fructose. Une dysfonction de la chaîne respiratoire mène directement à la production de ROS : l'interruption du flux d'électrons à n'importe quelle étape de la chaîne respiratoire provoque un transfert d'électron vers un atome d'oxygène, ce qui produit des ions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène.

Différents facteurs peuvent provoquer une dysfonction de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale ou tout du moins une diminution de la quantité d'acides gras oxydés :

- Une inhibition de l'import de lipides dans la mitochondrie via CPT1a par le malonyl-CoA (présenté partie 1.4.1).
- Les acides gras libres, qui peuvent perturber le flux de protons à travers la membrane mitochondriale en se dissociant. Cette dissociation est favorisée par l'activation de la protéine UCP2 par PPAR- $\alpha$  ([66]).
- Le TNF- $\alpha$ , qui favorise la formation d'ions super-oxydes et d'espèces réactives de l'azote en activant l'iNOS. ([248]).
- Les produits de la peroxydation tels que le malondialdéhyde et l'hydroxynonanal, qui réagissent avec une enzyme de la  $\beta$ -oxydation (cytochrome C oxydase), diminuent l'expression des protéines de la chaîne respiratoire et stimulent la formation de ROS. Ceci entraîne une peroxydation encore plus forte et stimule la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les cellules de Kupffer, formant un cercle vicieux ([261]).

### La $\beta$ -oxydation peroxysomale

La  $\beta$ -oxydation dans les peroxysomes métabolise les acides gras à chaîne très longue (plus de 20 carbones), qui sont ensuite transférés dans les mitochondries en cours d'oxydation lorsqu'ils sont suffisamment courts. Elle permet aussi de métaboliser les acides dicarboxyliques, les acides gras avec un groupement méthyl, etc. Les acides dicarboxyliques sont générés par l'oxydation dans les microsomes et sont toxiques pour les mitochondries, en effet, ils y inhibent l'oxydation des acides gras ([179]). Le bon fonctionnement de l'oxydation dans les peroxysomes est donc nécessaire pour prévenir la stéatose potentiellement induite par les acides gras dicarboxyliques.

L'oxydation peroxysomale se fait en 4 étapes, chacune pouvant être réalisée par au moins deux enzymes. Certaines sont inductibles par la voie PPAR.

### L' $\omega$ -oxydation dans les microsomes

L' $\omega$ -oxydation a pour substrat les acides gras saturés et insaturés. La première étape de cette oxydation est réalisée par le complexe enzymatique CYP4A, elle consiste à hydroxyler l'acide gras. Le produit de cette réaction est ensuite déshydrogéné en acide dicarboxylique dans le cytosol.

Bien que l' $\omega$ -oxydation soit une voie mineure du métabolisme des acides gras, elle peut produire des quantités significatives d'acides dicarboxyliques en cas d'apport important en lipides, ce qui est le cas dans le cadre de l'obésité et du diabète. Ces acides dicarboxyliques ne sont pas seulement un substrat de la  $\beta$ -oxydation dans les peroxysomes, ce sont aussi des ligands de PPAR. L'activation de PPAR par ces acides stimule les trois voies d'oxydation des lipides ([179]).

## 1.4.4 La sécrétion de lipides

Fabbrini *et al* (2008 [101]), entre autres, ont montré que la sécrétion de VLDL était dans l'absolu augmentée chez les individus atteints de NAFLD. Néanmoins, cette augmentation de la sécrétion de lipides n'est pas suffisante par rapport à l'augmentation de la disponibilité de lipides dans le foie. Ceci indique que la capacité de sécrétion de VLDL est réduite proportionnellement au degré de stéatose en cas de NAFLD.

Les VLDL sont formées par l'assemblage de particules lipoprotéiques avec la protéine ApoB, des triglycérides et du cholestérol. Cet assemblage est médiée par MTP. Les triglycérides sont transférés à ApoB dans le réticulum endoplasmique puis maturés. La taille des VLDL dépend de la quantité de triglycérides ajoutés aux particules lipoprotéiques lors de la maturation. Tous les triglycérides hépatiques ne sont pas traités de la même manière : les acides gras liés à l'albumine sont préférentiellement assemblés et sécrétés par rapport aux triglycérides sous forme de gouttelettes ([296]).

Il a été montré que les mécanismes de régulation de la synthèse d'ApoB et par conséquence de sécrétion de VLDL ne se font pas au niveau transcriptionnel, mais plutôt par dégradation de la protéine nouvellement synthétisée ([105]). Il est à noter que la dégradation d'ApoB est stimulée par la présence de ROS ([214]). MTP exerce un rôle central dans la régulation de l'assemblage et de la sécrétion de VLDL : des résultats expérimentaux montrent qu'une diminution de l'activité de MTP est suffisante pour induire une stéatose. L'inactivation de MTP chez les souris provoque une multiplication par 3 de la quantité de triglycérides hépatiques, en l'absence d'augmentation des transaminases et d'inflammation hépatique ([171]). Ce lien entre inhibition de MTP et augmentation du degré de stéatose est retrouvé chez l'humain ([69]). Plusieurs études ont montré que l'exposition des hépatocytes à un stress oxydatif stimule la dégradation d'ApoB et inhibe l'expression de MTP, ce qui a pour conséquence une diminution de la sécrétion de VLDL et une augmentation de la quantité de lipides dans les hépatocytes ([38]). Ces mécanismes contribuent vraisemblablement à l'accumulation de lipides dans le cas des NAFLD, où la présence d'un stress oxydatif est avérée.

### 1.4.5 Le rôle des lipides dans les NAFLD et l'insulino-résistance

Différents éléments laissent penser que le stockage de lipides dans le foie sous forme de triglycérides aurait un effet protecteur contre l'insulino-résistance et l'inflammation provoqués par un régime hyper-lipidique. Tout d'abord, lorsque SCD1 est inhibée dans le foie sur une courte période chez la souris (quelques jours), une amélioration de la sensibilité à l'insuline et une diminution de la néoglucogenèse sont observées alors que le degré de stéatose augmente transitoirement ([146]). L'amélioration de la sensibilité à l'insuline se fait donc indépendamment du degré de stéatose. Selon les auteurs de cette étude, l'amélioration rapide de la sensibilité à l'insuline pourrait inhiber la sécrétion de VLDL. En effet, au niveau hépatique l'insuline limite la sécrétion de VLDL, c'est pourquoi la dyslipidémie est associée à l'insulino-résistance. La répression de la néoglucogenèse et de la sécrétion de VLDL aboutirait donc à cette augmentation transitoire de la stéatose. Bien que la stéatose soit indiscutablement associée à l'insulino-résistance, il est difficile de déterminer si l'insulino-résistance entraîne une accumulation excessive de triglycérides dans le foie ou si l'augmentation du taux de triglycérides ou de métabolites de leur voie de synthèse précèdent l'apparition de l'insulino-résistance. Sur ce point, les résultats de différentes études divergent. Certaines données laissent penser que l'accumulation de lipides dans le foie précède l'insulino-résistance tandis que d'autres montrent que les triglycérides en eux-mêmes ne sont pas toxiques et protégeraient même le foie de la lipotoxycité en stockant les acides gras sous une forme inerte, suggérant que la stéatose n'est pas nécessairement associée à l'insulino-résistance ([42], [175] et [198]).

Par ailleurs, les DAGs sont suspectés d'être un des liens entre lipides et insulino-résistance. En effet, des souris dont le gène codant pour la mtGPAT mitochondrial acyl-coenzyme A (CoA) :glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase a été délété accumulent des

LCCoAs dans le foie, ont un taux réduit de DAG et sont protégées contre l'insulino-résistance induite par un régime hyper-lipidique ([231]). L'inhibition spécifique de DGAT2 réduit le taux de DAG dans le foie, probablement en raison d'une boucle de régulation de SREBP1c et de l'activation de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale par les LCCoAs. Ceci, associé au fait que les DAG sont des activateurs de PKC $\epsilon$ , indique que les DAG sont probablement un des médiateurs de l'insulino-résistance induite par les lipides ([62] et [289]).

L'amélioration de la stéatose par l'inhibition de DGAT2 a été envisagée comme traitement des NAFLD, ce qui a mené Yamaguchi *et al* ([284]) à étudier l'inhibition de DGAT2 dans le foie dans un modèle de souris obèses recevant un régime déficient en méthionine et en choline. L'inhibition de DGAT2 a permis une diminution flagrante du taux de triglycérides hépatiques et une amélioration de la sensibilité à l'insuline. L'expression de TNF $\alpha$  était également diminuée, toutefois, l'analyse anatomopathologique amis en évidence l'apparition d'une nécro-inflammation et d'une fibrose, c'est-à-dire une évolution vers les stades sévères des NAFLD (NASH). Cela s'accompagnait d'une augmentation de la concentration hépatique d'acides gras libres et de LCCoAs, de ROS et de marqueurs de la peroxydation des lipides. Cette étude dissocie la souffrance hépatique de l'accumulation de triglycérides dans les hépatocytes et des paramètres métaboliques systémiques. Ceci met en évidence à quel point les mécanismes reliant la stéatose hépatique, l'insulino-résistance systémique et l'inflammation hépatique sont complexes. Le concept souligné par cette étude est que le stockage des lipides dans le foie sous forme de triglycérides serait un mécanisme de protection contre la lipotoxicité des acides gras libres et de ses précurseurs ([185]).

## 1.5 Rôle des hormones entéroendocrines dans l'insulino-résistance et l'obésité

Excepté dans des cas de mutation génétique, somme toute assez rares chez l'humain, le développement de l'obésité et donc des pathologies associées est la conséquence d'un déséquilibre entre la prise alimentaire et la dépense énergétique. La balance entre ces deux éléments, l'apport et la dépense énergétique, est régulée par un processus complexe impliquant des signaux métaboliques, hormonaux et neuronaux. Le système digestif est à l'origine d'un grand nombre de ces signaux, en particulier plusieurs hormones sécrétées par des cellules entéroendocrines spécialisées. Plus de 20 hormones digestives ont été identifiées à ce jour, la plupart sont des peptides. Certaines agissent à distance de leur site de production en passant dans la circulation tandis que d'autres ont plutôt une action paracrine (sur les cellules voisines).

### 1.5.1 Les leçons de la chirurgie bariatrique

Les interventions sur le mode de vie et les traitement médicamenteux se sont jusqu'à maintenant révélés inefficaces pour obtenir et maintenir une perte de poids conséquente et

une réduction de l'insulino-résistance. Par contre la chirurgie bariatrique (bypass) s'est révélée très efficace, elle permet une perte de poids importante et durable ainsi qu'une réduction notable de la mortalité. Cette chirurgie consiste à réduire le volume de l'estomac et à diminuer la surface d'absorption de l'intestin grêle. Cette chirurgie a pour effet de réduire considérablement l'appétit et l'absorption. Le diabète de type 2 est également amélioré très rapidement, avant même que la perte de poids ne soit significative ([113]). Cet effet rapide du bypass semble s'expliquer par les changements importants et rapides de la sécrétion de beaucoup d'hormones produites par le système digestif ([151] et [168]).

La restriction alimentaire et la perte de poids induisent une chute du taux plasmatique de leptine, et en conséquence une augmentation de la sensation de faim. Dans le cas du bypass, la chute du taux de leptine et la perte de poids ne s'accompagnent pas d'une augmentation de la sensation de faim ([153]). Ceci illustre l'importance des signaux envoyés par le système digestif dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

## 1.5.2 Les hormones digestives

Les principales hormones produites par le système digestif sont listées TAB. 1. Les cellules endocrines du tube digestif sont retrouvées dans le pancréas et dans l'épithélium des muqueuses digestives, dans les cryptes ou à la base des villosités. Par leur effet soit local, soit systémique, elles ont un effet sur toute la physiologie de l'organisme.

- Ces peptides sécrétés par les cellules endocrines intestinales peuvent avoir un effet sur :
- la motilité gastro-intestinale : elles agissent sur les muscles lisses de l'oesophage, l'estomac, le duodénum, les canaux biliaires et pancréatiques, l'intestin grêle et le côlon. Ces cellules coordonnent les mouvements faisant progresser le bol alimentaire par une homogénéisation mécanique et activent les contractions musculaires d'un segment intestinal à la fois.
  - la régulation de l'appétit et de la balance énergétique. Les hormones entéroendocrines influent sur des organes périphériques impliqués dans le stockage et la dépense d'énergie, ainsi que sur l'homéostasie glucidique via la stimulation de la synthèse et sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$ .

### Peptide YY

Le peptide YY est constitué d'une chaîne de 36 acides aminés, présentant un résidu tyrosine (YY) à chaque extrémité. La forme complète de ce peptide est un agoniste de trois récepteurs NPY (Y1, Y2 et Y5). Toutefois dans le tube digestif la partie N-terminale est rapidement hydrolysée par la DPP4 (dipeptidyl peptidase 4), ce qui donne la forme principale de circulation de PYY en postprandial (3-36) ([121]). PYY(3-36) a une action sélective sur le récepteur Y2. La sécrétion de PYY est augmentée après une prise alimentaire, en proportion avec la quantité d'énergie absorbée. La sécrétion de PYY induite par la prise alimentaire

Type de cellule	Hormone sécrétée	Localisation
Cellules $\alpha$	Glucagon	Pancreas (îlots de Langerhans)
Cellules $\beta$	Insuline, IAPP	Pancréas (îlots de Langerhans)
Cellules PP	Polypeptide pancréatique (PP)	Pancréas (îlots de Langerhans)
Cellules D	Somatostatine	Pancréas (îlots de Langerhans)
Cellules G	Gastrine	Estomac, occasionnellement pancréas
Cellules X/A-like	Ghréline, nesfatin.1	Estomac, occasionnellement intestin grêle
Cellules S	Sécrétine	Intestin grêle
Cellules K (ou GIP)	GIP	Intestin grêle
Cellules I (ou CCK)	Cholécystokinine	Intestin grêle
Cellules N	Neurotensine	Intestin grêle
Cellules L	PYY, GLP-1, GLP-2	Intestin grêle et côlon

TABLE 1 – Les cellules entéroendocrines et leurs produits

dépend également de la composition de l'aliment, en particulier la proportion de lipides et de protéines ([24]). La concentration de PYY est augmentée après un bypass, aussi bien à jeun qu'en postprandial.

L'injection de PYY (1-36) inhibe la sécrétion de sucs gastriques et ralentit la vidange gastrique et la vitesse du transit. Cet effet est spécifique de la stimulation du récepteur Y2, *via* une stimulation du nerf vague et de l'hypothalamus ([23]). Ces actions de PYY ont un effet anorexigène chez l'animal ([58]). Chez l'humain, l'injection de PYY (3-36) diminue la prise alimentaire chez les individus minces et obèses ([22]). Dans cette étude l'obésité n'avait pas de conséquence sur la sensibilité à ce peptide.

### Polypeptide pancréatique

Ce peptide est sécrété en post-prandial et a une forte affinité pour le récepteur Y4. Il possède également une affinité plus faible pour le récepteur Y5 ([114]). Chez la souris, la surexpression du gène du polypeptide pancréatique dans les cellules des îlots de Langerhans réduit la prise alimentaire, ce qui met en évidence le rôle anorexigène de ce peptide ([265]). Le même effet est observé lorsque l'on administre la forme mature du polypeptide. Lorsque cette administration est répétée, une perte de poids est obtenue chez la souris ([20]). Ces résultats laissent penser que des traitements à base d'agonistes du récepteur Y4 pourraient être efficaces dans le traitement de l'obésité.

### Glucagon-like peptide 1

Le GLP-1 est un des produits du clivage du proglucagon, deux formes circulantes sont rencontrées : le GLP1 (7-37) et le GLP1 (7-36amide), cette dernière est majoritaire chez l'homme ([209]). GLP-1 exerce à la fois une action de neurotransmetteur et d'hormone. Comme les autres hormones digestives décrites jusqu'à présent, ce peptide est sécrété après une prise alimentaire, en proportion avec la quantité d'énergie absorbée. La sécrétion de GLP-1 peut être stimulée par des signaux nerveux aussi bien que par l'interaction du contenu luminal avec les récepteurs de la surface apicale des cellules L (G-protein-coupled receptor 119 par exemple) ([64] et [226]). Les concentrations plasmatiques de GLP-1 à jeun et en post-prandial sont augmentées suite à un bypass ([168]).

Ce peptide stimule la sécrétion d'insuline et inhibe la sécrétion de glucagon, il a donc un rôle hypo-glycémiant en conditions physiologiques. Il contribue donc au pic insulinaire observé en postprandial. L'action de GLP-1 sur la sécrétion d'insuline est dépendante du glucose, l'action hyperinsulinémiante de GLP-1 est donc annulée lorsque la glycémie est normale. GLP-1 ralentit également la vidange gastrique et donc limite la prise alimentaire ([107]). L'injection répétée de GLP-1 à des patients obèses atteints de diabète de type 2 a permis d'obtenir une perte de poids et une amélioration de la glycémie ([293]).

La demi-vie de GLP-1 dans la circulation sanguine est de moins de deux minutes, en effet, ce peptide est inactivé par la DPP4. Une étude venant d'être publiée rapporte que l'expression hépatique de DPP4 est plus élevée chez les patients atteints de NAFLD et négativement corrélée avec l'HOMA-IR ([196]). DPP4 et GLP-1 auraient donc un rôle important dans les mécanismes régulant la glycémie. Les molécules ayant une action similaire au GLP-1 ou inhibant la DPP4 ont donc un potentiel thérapeutique évident et un certain nombre de molécules sont étudiées. Le premier agoniste du récepteur de GLP-1 approuvé comme traitement du diabète de type 2 est l'exendine 4 (exanatide), une molécule initialement isolée du venin d'un lézard (*Heloderma suspectum*) ([98]). Il a été montré que l'administration d'exanatide à des patients diabétiques de type 2 et ne répondant pas aux traitements classiques (metformine et/ou sulfonylurée) permettait d'atteindre des niveaux acceptables d'hémoglobine glyquée chez environ 40% d'entre eux ([152]). La liraglutide est une autre molécule également utilisée, cette molécule est un analogue du GLP-1 résistant à la DPP4 dont la capacité à réduire le taux d'hémoglobine glyquée a également été démontré ([182]).

### Glucagon-like peptide 2

Le GLP-2 est comme le GLP-1 un produit du clivage du proglucagon, c'est un peptide de 33 acides aminés. Il est donc co-sécrété avec le GLP-1 en postprandial et exerce un effet intestinotrophique ([91], [92]). Le GLP-2 influe donc sur plusieurs aspects de la physiologie intestinale : la mobilité, l'absorption, la fonction barrière et la prolifération cellulaire. Les

mécanismes par lesquels GLP-2 exerce ces actions sont complexes et mettent en jeu des voies de signalisation uniques et plusieurs médiateurs indirects.

Il a été montré à plusieurs reprises que GLP-2 est indispensable au maintien de la barrière intestinale et que l'administration de GLP-2 restaurait la fonction barrière de l'épithélium lorsque celle-ci est altérée ([27], [45]). La prise d'un repas riche en lipides a pour conséquence une augmentation du passage de LPS dans le sang ([99]), ce qui pourrait être la conséquence d'une augmentation de l'absorption de LPS avec les chylomicron et/ou une altération de la barrière intestinale. Compte tenu du fait que l'inflammation systémique observée en cas d'obésité et de diabète de type 2 est associée à une augmentation du taux sanguin de LPS d'origine intestinale, GLP-2 serait un élément supplémentaire à prendre en compte dans l'étude des mécanismes menant au développement des pathologies métaboliques (ce point sera détaillé section 2.2.3).

## 2 Le microbiote intestinal

### 2.1 Généralités sur le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est l'ensemble des bactéries qui peuplent notre tractus digestif. La concentration de ces bactéries augmente tout au long du tube digestif : elle va de  $10^2$  bactéries par gramme dans l'estomac à  $10^{11}$  bactéries par gramme dans le côlon, en passant par  $10^4$  (jéjunum) à  $10^7$  (iléon) dans l'intestin grêle. Les bactéries retrouvées dans l'intestin grêle sont principalement des bactéries Gram - et Gram + aérobies ou anaérobies facultatives, dans le côlon, le microbiote est en majorité constitué de bactéries anaérobies facultatives ou anaérobies strictes. Au total, chaque être humain abrite environ  $10^{14}$  bactéries, ce qui représente 10 fois plus de bactéries que de cellules eucaryotes ([118]). Ces bactéries sont réparties en plus de 1000 espèces différentes. Le microbiote de chaque individu est unique en termes d'espèces dominantes ([299]) et de leur proportions.

#### 2.1.1 Structure et composition

Initialement, les méthodes d'analyse basées sur la culture en boîtes de Pétri ont fourni les premières données sur le nombre et la diversité des microorganismes peuplant le tube digestif. Le nombre d'espèces bactériennes cultivables était alors estimé à 400 et le nombre d'archaebactéries à 2 ([235]). Les méthodes moléculaires basées sur l'ADN ribosomal ont permis des progrès importants dans la détection et l'identification des microorganismes ([280]). Il a alors été possible de détecter les bactéries non cultivables, selon les études, il est rapporté qu'au moins 70 % du microbiote intestinal est non cultivable à ce jour ([10], [173] et [301]).

Les premiers inventaires des gènes de l'ARNr 16S du microbiote fécal humain ont mis en évidence la grande diversité de cet écosystème et un grand nombre d'espèces ne correspondant à aucune souche cultivée connue ([255], [279]). Il est alors constaté que la grande majorité du microbiote est constitué par les membres de trois groupes phylogénétiques : le groupe des *Bacteroidetes*, le groupe *Clostridium coccoïdes* et le groupe *Clostridium leptum*.

Au cours des dernières années, le séquençage à haut débit a donné une nouvelle dimension à l'étude de la composition du microbiote ([118] et [187]). Le microbiote du tractus digestif humain apparaît alors constitué d'un très petit nombre de phyla dominants par

rapport aux autres écosystèmes complexes connus comme le sol ou les océans. Toutefois, le niveau de diversité est très élevé au niveau des phylotypes. La diversité entre les individus est elle aussi très élevée.

Le phylum des Firmicutes représente plus de 75% du microbiote, il comporte 274 genres, essentiellement des bactéries Gram +. Les Firmicutes sont divisés en trois classes de bactéries Gram + : les Clostridia (anaérobie), les Bacilli (aérobie stricte ou facultatif) et les Erysipelotrichi, anciennement appelés Mollicutes. Ce phyla comprend donc les *Enterococaceae* et les *Lactobacillaceae* ainsi que *Lactococcus spp.* Le second phylum majoritaire est celui des Bacteroidetes, il représente environ 17% du microbiote et est composé de trois classes de bactéries Gram - : Cytophaga, Flavobacterium et Bacteroidetes ([173] et [256]). Le genre *Bacteroides* est le membre principal de la classe Bacteroidetes, il comprend en particulier les espèces *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis* et *Bacteroides ovatus* ([96]). Les Actinobacteria constituent le troisième phylum majoritaire, regroupant des espèces bactériennes Gram + à haut pourcentage GC. Il ne représente qu'environ 3% des eubactéries du microbiote. Les Actinobacteria comprennent en particulier le genre *Bifidobacterium*. Trois autres phyla sont rencontrés de manière plus limitée : celui des Proteobacteria, celui des Lentisphaera et celui des Verrucomicrobia.

### 2.1.2 Régulation de la composition du microbiote

Zoetendal *et al* ont étudié au cours du temps le profil d'espèces du microbiote d'individus sains et ont constaté que ce profil d'espèces est très spécifique de l'individu, en terme de composition et de diversité d'espèces ([299]). Cette étude a aussi permis de constater que la composition du microbiote d'adultes sains était stable au cours du temps. Toujours chez l'adulte sain, la composition du microbiote intestinal est relativement résiliente après un traitement antibiotique de courte durée ([75]). Le fait que le profil d'espèces de chaque individu soit unique soutient que les facteurs (ou leur association) régulant la composition du microbiote sont eux aussi spécifiques de l'individu. Il est ainsi possible de citer : les facteurs environnementaux lors de la mise en place du microbiote, l'alimentation et la génétique de l'hôte.

#### Facteurs influençant la mise en place du microbiote au cours de l'enfance

Le fœtus est stérile lorsqu'il est dans l'utérus et est colonisé par les bactéries à partir de la naissance. Pendant et juste après cette dernière, l'enfant est exposé à un grand nombre de sources environnementales de bactéries (vagin, peau, lait de la mère, etc.). Ce microbiote initial évolue beaucoup au cours des premiers mois en raison de l'exposition continue à des bactéries de l'environnement. Le microbiote devient mature entre un et deux ans, ce qui coïncide avec le passage d'une alimentation à base de lait riche en lipides, à une alimentation

solide, plutôt riche en glucides. La composition du microbiote conserve un noyau stable au cours de la vie de l'individu ([213], [302]).

Les résultats de l'étude KOALA (Kind, Ouders en gezondheid : Aandacht voor Leefstijl en Aanleg) entre autres, ont mis en évidence que le type d'alimentation (allaitement ou lait reconstitué), l'hospitalisation, la prématurité et l'administration d'antibiotiques influencent la composition du microbiote pendant l'enfance ([218], [134], [102]). Lors d'une naissance par voie basse, les enfants sont rapidement colonisés par la flore vaginale et fécale de leur mère, tandis que les enfants nés par césarienne sont quant à eux initialement colonisés par les bactéries de l'air, des vêtements et de la peau de leur mère et du personnel soignant. En conséquence, les enfants nés par césarienne ont une plus faible proportion de bifidobactéries et de *Bacteroides spp* et sont plus souvent colonisés par *Clostridium difficile* que les enfants nés par voie basse. Par ailleurs, les enfant nourris avec du lait reconstitué sont plus souvent colonisés par *Enterobacteriaceae spp.*, *C. difficile*, *Bacteroides spp.*, et *Streptococcus spp.* par rapport aux enfants allaités, qui sont eux majoritairement colonisés par *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, et *Bifidobacterium spp* ([102]).

La zone géographique dans les premiers mois/années de vie influe également sur la composition du microbiote. Le lieu est associé à des conditions environnementales différentes : les bactéries auxquelles l'enfant est exposé, l'alimentation et les conditions d'hygiène sont différentes. Ainsi, il a été constaté qu'il existe, en Europe, un gradient Nord-Sud dans la composition du microbiote d'enfants de 6 semaines : le genre *Bifidobacterium* plus abondant au Nord et la diversité bactérienne plus grande au Sud ([102]). Des différences sont aussi constatées entre les pays industrialisés et les pays en voie de développement, ce qui traduit l'influence des conditions d'hygiène. La colonisation par des entérobactéries et les bifidobactéries est plus tardive dans les pays industrialisés par rapport aux pays en voie de développement, tandis que les bactéries retrouvées sur la peau (*Staphylococcus*) sont présentes en plus grande quantité dans le microbiote des enfants nés dans des pays industrialisés ([?], [7]).

## L'alimentation

L'alimentation constituant une partie du substrat énergétique du microbiote et modulant des processus physiologiques se répercutant sur le microbiote (sécrétion d'enzymes digestives, de mucus, vitesse du transit, système immunitaire...), il est naturel de penser que l'alimentation est un des déterminants majeurs de la composition du microbiote intestinal. Malgré cela, les études visant à déterminer dans quelle mesure le régime alimentaire influe sur la composition du microbiote sont peu nombreuses à ce jour ([108]). Quelques études portent sur des changements transitoires, leurs résultats laissent penser que le microbiote d'individus ne changeant pas leur régime alimentaire est stable ([111], [67] et [299]).

L'effet de changements du régime alimentaire sont encore moins connus, il a tout de même été montré que la supplémentation en prébiotiques (ce point sera détaillé section 2.3.2)

tels que les fructo-oligosaccharides et l'inuline induisait l'augmentation des populations de certains groupes de bactéries, en particulier les espèces du genre *Bifidobacterium* et *Faecalibacterium prausnitzii* ([39]), [46] et [223]).

Il a aussi été montré que la réduction de la quantité de glucides, dans le cadre de régime amincissants, avait un effet majeur sur la composition et les fonctions métaboliques du microbiote dans le côlon. En effet, ces régimes diminuent la production de butyrate par le microbiote et les populations de *Roseburia* spp. et *Eubacterium rectale* ([94] et [95]). Toutefois, aucune modification des proportions des phyla Bacteroidetes et Firmicutes n'a été détectée excepté par Ley *et al* qui ont rapporté qu'un régime hypocalorique augmentait la proportion de Bacteroidetes aux dépens des Firmicutes ([173]). Une autre étude, a comparé l'effet d'un régime riche en lipides et pauvres et glucides avec un régime pauvre en lipides, riches en glucides et riche en fibres ([41]). Il s'est avéré qu'à apport énergétique égal, le régime pauvre en lipides et riche en glucides était associé à une plus forte proportion de bifidobactéries que le régime pauvre en glucides et riche en lipides, ce qui démontre l'influence du régime alimentaire sur la composition du microbiote. Les différences de composition sont le reflet des glucides non digérés arrivant jusqu'au côlon (polysaccharides non digestibles, amidon résistant et certains oligosaccharides). Une étude récente de Walker *et al* a étudié l'impact d'une supplémentation en amidon résistant, en polysaccharides non digestibles et d'une restriction en glucides totaux sur 10 semaines ([271]). L'analyse des séquences de l'ARN 16S a montré une modification rapide et réversible de la composition du microbiote après le changement de régime. Ce régime pauvre en lipides et riche en glucides et en fibres a entraîné l'augmentation importante de la population de *Ruminococcus bromii*, passant de 3,8% à 17% en moyenne. Des variations des populations d'*Oscillibacter* et d'*Eubacterium rectale* ont aussi été observées. Il a également été noté que la réponse du microbiote intestinal au changement de régime était dépendante de la composition initiale du microbiote.

D'autres études, réalisées sur modèle murin, montrent également que la composition de l'alimentation influe sur la composition du microbiote. Deux études ont comparé la composition du microbiote caecal de souris conventionnelles sous régime hyper-lipidique et sous régime standard par fluorescence in situ hybridisation ([54] et [46]). Il est apparu que le régime hyper-lipidique était associé à une plus faible population de *Bifidobacterium* spp., du groupe *Eubacterium rectale* - *Clostridium coccoides* et *Bacteroides* spp.

### 2.1.3 La prise d'antibiotiques

L'effet drastique des antibiotiques sur le microbiote intestinal est lui aussi de plus en plus mis en évidence, par exemple, un traitement par antibiotiques de cinq jours modifie la composition globale du microbiote jusqu'à quatre semaines, avant que celle-ci revienne à son état initial ([82]). Certaines populations bactériennes sont sensibles au point de ne pas retrouver leur niveau de population jusqu'à six mois après la fin du traitement. Une autre étude montre que l'utilisation d'antibiotiques chez les enfants est associée à une diminution

de la proportion de bifidobactéries et de *Bacteroides*, les bifidobactéries reviennent lentement à leur niveau initial tandis que la population initiale de *Bacteroides* n'est généralement pas rétablie ([218]).

### **Le génotype de l'hôte**

Le génotype de l'hôte joue lui aussi un rôle déterminant dans la mise en place du microbiote et dans la composition du microbiote à l'âge adulte. Une étude portant sur trois couples de jumeaux monozygotes et basée sur une analyse du microbiote par DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) a montré qu'après 25 ans, la composition de leur microbiote était beaucoup plus similaire que celle d'individu sans lien de parenté ([300]). Quelques années plus tard, une étude basée sur des techniques de séquençage des gènes de l'ARN 16S ont confirmé l'importance de la génétique de l'hôte ([154]).

Néanmoins, il a été montré par une étude récente, s'appuyant cette fois sur des résultats obtenus par séquençage du métagénome, c'est-à-dire de l'ensemble des gènes du microbiote intestinal, que les différences constatées entre les microbiotes de jumeaux homozygotes et ceux de jumeaux hétérozygotes étaient équivalentes ([264]). Cette étude suggère donc que l'environnement périnatal est plus important que le génotype de l'hôte. Elle confirme toutefois que les microbiotes des membres d'une même famille sont plus proches que ceux d'individus sans lien de parenté.

#### **2.1.4 Les fonctions du microbiote intestinal**

Le microbiote intestinal assure de nombreuses fonctions essentielles à la santé de son hôte, au point que le microbiote est aujourd'hui considéré comme un organe supplémentaire de l'hôte ([247]). Tout d'abord, il assure un effet barrière contre les pathogènes éventuels en empêchant leur implantation. Comme cela a déjà été évoqué, le microbiote intestinal assure la fermentation des substrats disponibles au niveau du côlon, produisant ainsi un grand nombre de métabolites absorbés et utilisés par l'hôte. Le microbiote intestinal participe également au métabolisme des xénobiotiques, comme les médicaments ou les composés produits lors de la cuisson des aliments. Il a aussi été montré que le microbiote produit des vitamines essentielles à l'hôte et qui ne sont pas présentes en quantité suffisante dans l'alimentation. Il est aussi indispensable au développement et à la maturation du système immunitaire ([180]).

L'étude de rongeurs axéniques, dépourvus de microbiote intestinal, a permis de montrer que celui-ci est indispensable au fonctionnement normal de l'organisme ([247]). Ces animaux souffrent de nombreuses anomalies physiologiques (système immunitaire immature, faible mobilité intestinale, déséquilibre osmotique, faible adiposité, structure anormale de l'épithélium colique, etc.). Toutes ces anomalies peuvent être corrigées par l'inoculation d'un microbiote complexe, en quelques semaines, voire en quelques jours.

## Développement, maturation et modulation du système immunitaire de l'hôte

L'influence du microbiote intestinal sur le système immunitaire de l'hôte a initialement été mise en évidence grâce à l'étude de rongeurs axéniques. L'étude de ces rongeurs a également permis d'élucider quelques-uns des mécanismes par lesquels le microbiote intestinal participe à la maturation et à la modulation du système immunitaire. Le système immunitaire intestinal a pour rôle de maintenir l'homéostasie intestinale ce qui implique :

- une réponse immunitaire forte contre les virus, bactéries et parasites pathogènes
- de développer une tolérance vis-à-vis des bactéries du microbiote intestinal tout en modulant la composition de ce dernier

La régulation de la composition du microbiote et la réponse contre les pathogènes met en oeuvre la sécrétion d'anticorps spécifiques des muqueuses, les IgA, qui bloquent l'adhésion des bactéries, la multiplication virale dans les cellules eucaryotes et neutralisent les entérotoxines.

Il a été également démontré que le butyrate produit par des bactéries commensales était capable de moduler la voie NF $\kappa$ B en inhibant la dégradation de son inhibiteur I $\kappa$ B. Ceci diminue la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-8, TNF- $\alpha$ ) et permet le maintien de l'homéostasie ([184]).

## Effet barrière contre les pathogènes

Le microbiote permet d'augmenter l'effet barrière de la muqueuse intestinale en colonisant les sites de fixation à la muqueuse du tractus digestif luttant ainsi contre la colonisation par des bactéries pathogènes. Il est également à l'origine d'une compétition vis-à-vis des nutriments et libère des composés anti-microbiens. Certaines espèces symbiotiques du microbiote peuvent également induire la production de composés anti-microbiens par l'hôte, en effet *Bacteroides thetaiotaomicron* induit chez l'hôte la sécrétion d'angiogénine, un composé produit par les cellules de Paneth et ayant des propriétés bactéricides ([135]).

## Physiologie du système digestif

L'étude des rongeurs axéniques a également permis de constater que le microbiote intestinal était indispensable à un fonctionnement normal du tube digestif. Par rapport aux rongeurs conventionnels, les rongeurs axéniques présentent une motilité intestinale réduite, un temps de transit allongé, des activités enzymatiques réduites et une couche de mucus plus importante ([122], [?]). Tout comme le système immunitaire, le système digestif demeure immature : l'épaisseur de la muqueuse, la taille des villosités et des bordures en brosse sont réduites. Les cryptes sont moins profondes, l'épithélium se renouvelle moins rapidement que chez des souris conventionnelles. Le nombre de cellules par crypte est d'ailleurs diminué de 20 % ([8]).

Le métabolisme des colonocytes est également anormal en l'absence de microbiote. En effet, il a été constaté que la voie d'utilisation du butyrate est réduite alors que la capacité à métaboliser la glutamine est augmentée. Le butyrate est un nutriment d'origine intestinale tandis que la glutamine est apportée par la circulation sanguine ([60]). L'action du microbiote se fait par une régulation de l'expression d'enzymes clefs du métabolisme de ces substrats. Cette étude met donc en évidence la capacité du microbiote à moduler l'expression génique de son hôte. Cette capacité a été montrée à une plus grande échelle en comparant les profils d'expression génique de l'iléon de souris axéniques et conventionnelles ([136]). Cette étude a ainsi mis en évidence que le microbiote intestinal augmentait ou diminuait l'expression d'une centaine de gènes.

### Métabolisme des glucides et des lipides

Les glucides complexes non digestibles parvenant au côlon sont majoritairement constitués d'amidon résistant aux  $\alpha$ -amylases de l'hôte, de polysaccharides végétaux (cellulose, hémicelluloses et certaines pectines) ainsi que quelques autres types de glucides (certains édulcorants, oligosides, etc.) ([70]). La fermentation de ces composés implique différents groupes bactériens aux activités enzymatiques complémentaires. Les polymères sont tout d'abord hydrolysés par certains groupes bactériens en oses ou oligosides, qui peuvent alors être assimilés par d'autres groupes bactériens ne possédant pas ces hydrolases. Les principales espèces pour lesquelles ce type d'activité hydrolytique a été mise en évidence appartiennent aux genre *Bacteroides*; *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Roseburia* ainsi que quelques espèces des genres *Enterococcus*, *Clostridium* et *Eubacterium* ([71]). Chaque type d'hydrolase (polysaccharidase, glycosidase...) peut être exprimé par des bactéries phylogénétiquement éloignées. Par exemple, des genres très différents tels que *Ruminococcus*, *Enterococcus* et *Bacteroides* possèdent tous une activité cellulosique. Cette fonction cellulosique est retrouvée chez tous les individus, de même que la capacité à dégrader le xylane. L'amidon est lui aussi utilisable comme substrat par des groupes bactériens variés : *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* et *Roseburia*. Bien que la composition du microbiote soit spécifique de l'hôte, cela illustre le haut degré de conservation des fonctions métaboliques du microbiote et la redondance du génome et du transcriptome microbien ([256]).

Les oses et oligosides libérés par l'hydrolyse des glucides complexes sont ensuite fermentés. La majorité des espèces du microbiote utilisent la glycolyse pour convertir ces glucides en pyruvate, qui est ensuite transformé en AGCCs (acides gras à chaîne courte : acétate, propionate et butyrate) selon différentes voies métaboliques. Certaines espèces libèrent des métabolites intermédiaires tels que le succinate, le lactate ou le formate qui sont métabolisés par d'autres espèces bactériennes. Les produits finaux de la fermentation sont rapidement absorbés par l'épithélium intestinal et métabolisés *in situ* ou dans d'autres organes (foie, muscles, coeur). L'équilibre entre les différentes espèces bactériennes influe sur les quantités et les proportions d'AGCC produites par la fermentation d'un même substrat. L'acétate, par

exemple, est synthétisé par la majorité des espèces dominantes du microbiote (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Fusobacterium*...). Le propionate quant à lui, est principalement produit par les espèces du genre *Bacteroides*. Les espèces productrices de butyrate ont été identifiées plus récemment et appartiennent aux genres *Eubacterium*, *Coprococcus*, *Roseburia* et *Faecalibacterium*. Le lactate est produit par ce qu'on appelle communément les bactéries lactiques : *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus*. La fermentation de ces glucides non digestibles constitue une source d'énergie non négligeable pour l'hôte, en effet, les produits de fermentation permettent à l'hôte de récupérer jusqu'à 10% d'énergie supplémentaire.

Les acides gras parvenant au côlon sont également métabolisés et subissent plusieurs transformations (hydrolyse, oxydation, réduction, hydroxylation, etc.). Plusieurs espèces du genre *Pseudomonas* expriment des lipases capables d'hydrolyser les triglycérides en glycérol et en acides gras ([144]). Il semblerait que le microbiote a la capacité de réduire les acides gras poly-insaturés de 18 carbones ou moins mais pas les acides gras de 20 ou 22 carbones [140]. Un certain nombre d'espèces Gram + expriment des phospholipases, qui produisent des diglycérides et des inositol triphosphates à partir des lipides parvenant au côlon (non digérés ou provenant des colonocytes). Ces produits de dégradation peuvent pénétrer l'épithélium et agir comme messagers intracellulaires, capables de moduler l'expression de gènes ([239]). Par ce biais, le microbiote pourrait avoir une influence non négligeable sur la physiologie de l'hôte. Une fois de plus, l'importance de la composition du microbiote et des fonctions qu'il porte, ainsi que les substrats qui lui sont offerts est soulignée.

Par ailleurs, le microbiote est capable de convertir le cholestérol en coprostanol, non absorbé au niveau intestinal et éliminé dans les fèces. Chez la majorité des individus, 70% du cholestérol est métabolisé par le microbiote, par contre, chez une minorité de personnes, celui-ci est très peu métabolisé (moins de 20%) ([278]). Il a récemment été montré que ces différences individuelles s'expliquaient par des différences de niveaux de population de bactéries capables de réduire le cholestérol ([269]).

## 2.2 Implication du microbiote intestinal dans le syndrome métabolique

### 2.2.1 Ce que nous apprennent les études sur rongeurs axéniques

Le premier élément clef démontrant l'implication du microbiote intestinal dans la régulation de l'homéostasie énergétique et donc dans l'obésité a été amené par Wostmann *et al* ([282]) en 1983, qui a constaté que des rats axéniques avaient une prise alimentaire 18% plus élevée que celle de rats conventionnels, malgré un poids identique. Le constat selon lequel les rongeurs axéniques tirent moins bien profit de leur alimentation que les rongeurs conventionnels, a été confirmé par l'équipe de Jeffrey Gordon ([25]) plus de 20 ans plus tard. Ses

travaux ont permis de constater que les souris axéniques avaient un taux de masse grasse inférieur de 40% à celui de souris conventionnelles de même âge en dépit d'une prise alimentaire supérieure de 29%. Par ailleurs, la conventionalisation de souris axéniques, c'est-à-dire leur colonisation par le microbiote d'une autre souris, entraînait une augmentation de 57% de leur masse grasse, une multiplication par 2,3 de leur concentration hépatique de triglycérides et une forte augmentation du degré d'insulino-résistance en deux semaines, et ce, en l'absence de modification de la dépense énergétique et malgré une diminution de la prise alimentaire. Quelques années plus tard, le même groupe met en évidence une partie des mécanismes liant le microbiote à l'obésité ([26]) en nourrissant des souris conventionalisées et axéniques avec un régime riche en lipides et en glucides (régime "Western"). Après 8 semaines, les souris axéniques avaient non seulement pris significativement moins de poids que les souris conventionalisées mais étaient aussi résistantes à l'intolérance au glucose et à l'insulino-résistance induites par le régime Western.

Afin de vérifier que le microbiote de souris génétiquement obèses (ob/ob) possède de meilleures capacités d'extraction d'énergie, Turnbaugh *et al* ([262]) ont transféré le microbiote de souris ob/ob (obèses) et de souris sauvages (minces) à des souris axéniques. Après deux semaines, les souris ayant reçu le microbiote d'une souris obèse ont pris significativement plus de poids que les souris ayant reçu le microbiote d'une souris mince, en dépit d'une consommation alimentaire identique. Ces différences de prises de poids sont concordantes avec des capacités d'extraction d'énergie de l'alimentation différentes.

D'autres observations réalisées par la même équipe de recherche montrent que l'efficacité alimentaire n'est pas le seul mécanisme expliquant la plus prise de poids des souris conventionalisées. En effet, le microbiote intestinal stimule le stockage des triglycérides circulants dans les adipocytes en réprimant au niveau intestinal la sécrétion d'un inhibiteur de la Lpl (lipoprotéine lipase) appelé FIAF (fasting induced adipose factor), aussi connu sous le nom d'Angptl4. De plus, les souris KO pour le gène FIAF ne voient leur masse grasse augmentée que de 10% par la conventionalisation (contre 57% pour les souris sauvages). Enfin, les souris axéniques FIAF  $^{-/-}$  ne sont pas protégées contre l'obésité induite par un régime western ([26]). L'augmentation de l'activité de la Lpl qui découle de la répression de FIAF par le microbiote a pour conséquence une augmentation de l'apport d'acides gras dans les adipocytes et de l'accumulation de triglycérides. FIAF est donc un médiateur supplémentaire de la régulation du métabolisme lipidique de l'hôte par le microbiote intestinal. L'expression de FIAF dans l'hypothalamus est régulée par plusieurs hormones régulant la prise alimentaire. FIAF médie leur effet anorexigène en inhibant l'activité d'AMPK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase) spécifiquement au niveau hypothalamique. Ainsi FIAF apparaît comme ayant un rôle majeur dans la régulation du métabolisme énergétique au niveau central ([155]).

Par ailleurs, l'activation de l'oxydation des acides gras au niveau du foie et des muscles est augmentée chez les souris axéniques, ce qui est le résultat de deux mécanismes complémentaires et indépendants : i) l'augmentation de l'activité de l'AMPK, une enzyme activant

plusieurs enzymes de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale telles que CPT1, ii) une augmentation de l'expression de PGC-1 $\alpha$  (peroxisomal proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$ ), un co-activateur transcriptionnel essentiel de récepteurs et d'enzymes impliqués dans l'oxydation des acides gras. AMPK, une enzyme très conservée chez les eucaryotes, est un senseur métabolique de la cellule. Bäckhed *et al* ont mis en évidence que chez les souris axéniques, la concentration de la forme activée d'AMPK est particulièrement élevée dans le foie et dans les muscles ([26]). Cette activation de la voie AMPK active les voies métaboliques qui produisent de l'ATP (glycolyse et oxydation des acides gras), inhibe les voies métaboliques consommant de l'ATP (synthèse d'acides gras et de triglycérides, stimulation de la sécrétion d'insuline) et augmente la sensibilité hépatique à l'insuline. Le microbiote affecte donc tous ces processus *via* AMPK. Les mécanismes exacts par lesquels le microbiote agit sur l'activation d'AMPK dans les muscles et le foie sont encore inconnus mais semblent être indépendants de FIAF étant donné que le niveau d'AMPK n'est pas affecté par l'inactivation de FIAF ([26]).

Les rongeurs axéniques ne sont pas seulement résistants à l'obésité, ils sont aussi protégés contre les effets négatifs d'un régime western ou hyper-lipidique sur le développement de l'insulino-résistance ([25], [222]). En effet, il a été constaté par deux équipes différentes, aussi bien sous régime standard que sous régime hyper-lipidique/western, que les souris axéniques présentent une glycémie à jeun, un taux d'insuline, un taux de leptine et un degré d'intolérance au glucose bien plus bas que ceux de souris possédant un microbiote intestinal (conventionnelles ou conventionnalisées) ([25], [26] et [222]). Au niveau hépatique, ce niveau de sensibilité à l'insuline plus élevé chez les souris axéniques est associé à un degré de stéatose moins élevé (30 à 60% de triglycérides hépatiques en moins par rapport aux souris conventionnelles selon les études). Ceci s'explique par une expression hépatique de gènes impliqués dans la synthèse de lipides plus faible ([25] et [222]).

En plus de modifier la sensibilité à l'insuline, l'axénie perturbe le fonctionnement normal du métabolisme du cholestérol. En effet, Rabot *et al* ont mis en évidence une augmentation de la biosynthèse du cholestérol chez les souris axéniques en comparaison avec des souris conventionnelles ([222]). Leur taux de cholestérol plasmatique était pourtant plus faible que celui des souris conventionnelles. Cette augmentation de la synthèse hépatique de cholestérol serait un mécanisme compensant une forte perte de cholestérol par les voies biliaires chez les souris axéniques. Le taux plasmatique d'acides gras libres est également diminué chez les souris axéniques sous régime western ou hyper-lipidique ([222], [26]).

Ces études sur rongeurs axéniques démontrent l'implication du microbiote intestinal dans l'obésité et les pathologies métaboliques. Elles montrent également que l'obésité de souris génétiquement obèses est transférable à des souris sauvages *via* une transplantation de microbiote intestinal. Le microbiote de souris ob/ob a donc des fonctionnalités différentes de celui de souris sauvages, minces. Or chez l'humain, une origine génétique (délétion du gène de la leptine ou de son récepteur) est retrouvé dans moins de 10% des cas d'obésité. La question qui se pose alors est : est-ce que le microbiote est aussi impliqué dans les cas

d'obésité dont l'origine n'est pas génétique ?

## 2.2.2 Une dysbiose du microbiote intestinal est associée à l'obésité

Des études basées sur des techniques de métagénomique et de métabolomique ont fourni des éléments de réponse à cette question et permis de mieux comprendre par quels mécanismes le microbiote module le métabolisme de l'hôte ([262], [264], [93]) :

- le microbiome des obèses est déplété en gènes impliqués dans la mobilité cellulaire (molécules chimiotactiques, protéines impliquées dans la mobilité telles que les protéines flagellaires par exemple) et anormalement riche en enzymes capables d'hydrolyser les polysaccharides indigestibles, en phosphotransférases impliquées dans l'import de plusieurs oses (glucose, fructose, N-acétylgalactosamine) et en enzymes permettant la fermentation de glucides en AGCC (actétate, lactate, butyrate), comme par exemple la L-fructosidase qui dégrade tous les glucides contenant du fructose ([263], [262], [264]).
- Chez une lignée particulière de souris recevant un régime hyper-lipidique, le microbiote convertirait la choline d'origine alimentaire en méthylamines, réduisant ainsi la biodisponibilité de la choline. Celle-ci étant indispensable à l'assemblage et la sécrétion des VLDLs, le microbiote pourrait ainsi induire une stéatose hépatique, une insulino-résistance et une peroxydation des lipides ([93]).
- Le microbiote intestinal pourrait moduler le métabolisme lipidique de l'hôte, aussi bien au niveau systémique qu'hépatique, en modifiant les profils de conjugaison des acides biliaires, ce qui impacte directement l'émulsification et donc l'absorption intestinale des lipides. Ces profils de conjugaison des acides biliaires auraient également un effet sur le stockage hépatique des lipides et la lipoperoxydation en activant certaines voies de signalisation ([191]).

Considérées conjointement, ces études mettent en évidence une action du microbiote intestinal à tous les niveaux de la balance énergétique : l'extraction de l'énergie des aliments et le stockage d'énergie sous forme de triglycérides et la dépense énergétique via l'oxydation des acides gras. Ceci permet de supposer voire de démontrer l'implication du microbiote intestinal dans l'obésité, l'insulino-résistance et les NAFLD.

Les études sur modèles animaux suggèrent que l'obésité est associée à une altération de la composition et des propriétés fonctionnelles du microbiote. Le développement de l'obésité chez les souris *ob/ob* coïncide avec une modification des proportions des deux phyla dominants du microbiote ([172]). En effet, ces souris *ob/ob*, nourries avec un régime standard riche en fibres, présentent une diminution de 50% de la proportion de *Bacteroidetes* et une augmentation comparable de la proportion de *Firmicutes* par rapport à des souris sauvages nourries avec le même régime.

Les liens entre régime alimentaire, microbiote intestinal et homéostasie énergétique ont été plus amplement explorés avec des modèles d'obésité non plus génétique mais induite par un régime riche en lipides et en glucides simples ([262] et [264]). Le régime western a entraîné une augmentation de la proportion de *Firmicutes*, essentiellement en raison d'une importante augmentation du pourcentage d'*Erysipelotrichi* et d'une diminution des *Bacteroidetes*. Cette modification des proportions induit un enrichissement du microbiome en gènes assurant l'extraction d'énergie. Ces modifications de la composition du microbiote et de ses propriétés fonctionnelles sont par ailleurs totalement réversibles après un retour au régime initial ([262]). Afin d'étudier plus précisément de quelle manière le régime alimentaire en lui-même affecte la composition du microbiote, indépendamment du degré d'obésité, Hildebrandt *et al* ([133]) ont étudié la modification de la composition du microbiote intestinal suite à l'administration d'un régime hyper-lipidique chez une lignée de souris résistante à l'obésité. Ces souris, KO pour le gène Resistin-like molecule (RELM), ont présenté des altérations de la composition du microbiote et donc des propriétés fonctionnelles similaires à celles observées chez des souris sauvages, démontrant ainsi que l'effet du régime alimentaire prédomine sur le phénotype obèse. Ces résultats impliquent donc que dans ce modèle la dysbiose du microbiote intestinal est indépendante de l'obésité et que c'est l'alimentation qui entraîne une altération de la composition du microbiote intestinal.

Parallèlement à cela, une autre étude menée par le groupe de Jeffrey Gordon, basée sur une analyse métagénomique chez 154 individus (comportant des jumeaux mono et hétérozygotes ainsi que leurs mères), a mis en évidence que l'obésité était associée à une forte réduction de la diversité bactérienne en plus d'une diminution de la proportion de *Bacteroidetes* et d'un enrichissement en Actinobactéries. Il a été constaté, comme chez les modèles animaux d'obésité induite par un régime, un enrichissement du microbiome en gènes de phosphotransférases et en gènes impliqués dans la digestion et l'utilisation de glucides et lipides.

D'autres études à plus petite échelle ont étudié la composition du microbiote intestinal chez des humains obèses et/ou diabétiques et l'impact d'un régime amincissant ([95], [232], [203], [295], [283], [166]). Les résultats divergent, certains vont dans le même sens que ce qui a été précédemment décrit tandis que d'autres sont partiellement ou complètement contradictoires, les discordances sont probablement à attribuer aux différences de méthodologie et à la complexité du mode de vie comparativement aux modèles animaux. En effet, chez ces derniers, la composition du régime et la quantité absorbée sont contrôlés précisément, ce qui n'est évidemment pas le cas chez l'homme. Par exemple Schwartz *et al* ont observé un enrichissement relatif des Bacteroides par rapport aux Firmicutes chez des patients obèses par rapport à des personnes saines ([241]). Une autre étude, menée sur un échantillon de 39 individus de 6 nationalités différentes, n'a trouvé aucune corrélation entre l'IMC et les proportions relatives de firmicutes et de bacteroidetes ([19]). Cependant, les auteurs ont constaté que trois biomarqueurs de l'activité du microbiote corrélaient fortement avec l'IMC. Deux de ces marqueurs sont des complexes ATPase, ce qui met en évidence une fois de plus le lien

entre l'extraction d'énergie de l'alimentation et la régulation du poids de l'hôte. Ces biomarqueurs sont plus le reflet des fonctions portées par le métagénome que de la composition du microbiote en terme d'espèces bactériennes présentes. Les fonctions du microbiote sont donc tout aussi importantes que sa composition dans l'étude des liens entre microbiote et troubles métaboliques.

De plus en plus d'éléments indiquent que les modifications de la composition du microbiote associées à des désordres métaboliques ne sont pas seulement liés aux habitudes alimentaires. La mise en place du microbiote au cours de la première année de vie semble cruciale sur le développement de l'obésité. En effet une étude prospective ([148]) a observé que des enfants obèses à l'âge de 7 ans présentaient des anomalies de la composition de leur microbiote dès leur première année. Leur pourcentage moyen de bifidobactéries était inférieur à celui d'enfants ayant par la suite maintenu un poids normal, tandis que leur niveau de *Staphylococcus aureus* était plus élevé.

Une autre étude [232], chez les adolescents cette fois, a montré que l'efficacité d'un régime amaigrissant et de l'activité physique était dépendante de la composition du microbiote avant toute intervention. Bien que ces études n'aient pas étudié la corrélation entre les habitudes alimentaires et la composition du microbiote, elles permettent de supposer que l'étude des facteurs influençant la mise en place du microbiote au cours de l'enfance permettra d'envisager une intervention durant l'enfance afin de prévenir l'obésité à l'âge adulte.

Comme cela a été évoqué précédemment (sous-section 2.1.2), les enfants nés par césarienne ont moins de bifidobactéries et de Bacteroidetes que les enfants nés par voie basse. Or ces deux groupes de bactéries sont sous-représentés chez les obèses et/ou auraient peut-être un rôle protecteur contre celle-ci. La conséquence des facteurs influençant la mise en place du microbiote sur la prédisposition à l'obésité est toutefois très mal connue à ce jour et demande des études complémentaires pour conclure à ce sujet. Ainsi que nous l'avons évoqué paragraphe 2.1.3, la prise de certains antibiotiques peut elle aussi diminuer la proportion de bifidobactéries et de Bacteroides de façon durable ([218]). Ces éléments soulignent l'importance de facteurs autres que les habitudes alimentaires sur l'interaction composition du microbiote-obésité et troubles métaboliques.

En plus de capacités d'extraction d'énergie accrues, d'autres mécanismes reliant le microbiote intestinal à l'obésité ont été proposés, comme l'inflammation chronique induite par l'endotoxémie, la régulation du métabolisme lipidique de l'hôte et l'action sur la fonction entéroendocrine.

### 2.2.3 Les mécanismes liant le microbiote intestinal aux altérations du métabolisme

#### Endotoxémie et inflammation

Le rôle de réponses inflammatoires dans la pathogenèse des maladies métaboliques est de plus en plus reconnu et étudié (voir section 1.3). Par exemple, chez des souris recevant un régime hyper-lipidique, l'activation des macrophages hépatiques résidents induit une insulino-résistance hépatique et une intolérance au glucose. La déplétion spécifique de ces cellules restaure la sensibilité à l'insuline et réduit l'accumulation de lipides, aussi bien au niveau du tissu adipeux que du foie ([205] [141]). Des travaux récents ont montré que le microbiote intestinal pouvait initier l'état inflammatoire associé à l'obésité et à l'insulino-résistance par l'intermédiaire des lipopolysaccharides (LPS). En effet, la reconnaissance des LPS par le complexe CD14-TLR-4 (CD14) présent à la surface de cellules immunitaires peut déclencher des processus inflammatoires. L'importance des voies immunitaires médiées par le TLR-4 a été confirmée par le fait que la délétion de TLR-4 prévient l'insulino-résistance induite par un régime hyper-lipidique ([244]).

Cani *et al* ([46]) ont mis en évidence chez la souris que 4 semaines de régime hyper-lipidique entraînaient une altération de la composition du microbiote (diminution des bifidobactéries et des eubactéries spp) et une multiplication par 2 à 3 de la concentration de LPS circulant. Cette augmentation de la concentration de LPS a été appelée "endotoxémie métabolique" étant donné que les concentrations mesurées restent bien en deçà de celles observées lors d'une endotoxémie associée à un choc septique. Lorsque l'endotoxémie métabolique était reproduite par une injection continue de LPS, les souris ont développé les mêmes anomalies métaboliques que celles induites par un régime hyper-lipidique : prise de poids, diminution de la tolérance au glucose, augmentation du degré de stéatose, augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans le foie, les muscles et le tissu adipeux sous-cutané et viscéral. Parallèlement à cela, des souris dont le récepteur au LPS a été inactivé (CD14-KO) se sont révélées résistantes à la fois aux effets d'un régime hyper-lipidique et de l'injection de LPS. De plus, ces souris CD14-KO se sont révélées hyper-sensibles à l'insuline quel que soit le régime, ce qui laisse penser que le récepteur CD14 influe sur la sensibilité à l'insuline y compris en conditions physiologiques. Dans une autre étude ([47]), les mêmes auteurs montrent qu'un traitement par antibiotiques diminue l'endotoxémie métabolique et la concentration cécale en LPS, ce qui a été associé à une amélioration des paramètres métaboliques à la fois chez des souris ob/ob et chez des souris sauvages recevant un régime hyper-lipidique.

Les rats Sprague-Dawley présentent généralement une sensibilité au développement de l'obésité très variable ([76]). De La Serre *et al* ont montré que lorsque ces rats sont nourris avec un régime hyper-lipidique, seuls les rats prédisposés à devenir obèses présentent une augmentation de l'expression de TLR-4 dans l'iléon et que ceci est associé à une inflammation intestinale. De plus, la perméabilité intestinale et le niveau d'endotoxémie de ces rats

sont plus élevés que ceux des rats résistants à l'obésité. Toutefois, le régime hyper-lipidique entraînait les mêmes modifications de la composition du microbiote intestinal chez les deux types de rats.

Le rôle du LPS dans l'initiation de l'inflammation systémique a aussi été évalué chez des humains sains. Anderson *et al* ([12]) ont constaté qu'une faible dose de LPS provoque une augmentation de la concentration de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 dans le tissu adipeux et du degré d'insulino-résistance. De plus un repas riche en glucides et en lipides a eu pour conséquence une augmentation significative de la concentration de LPS, accompagné d'une augmentation de l'expression de TLR-4, de NF-kB et de SOCS-3 par les leucocytes mononucléaires. Ces augmentations n'étaient pas observées après un repas validé par l'AHA (American Heart Association), riche en fibres et en fruits ([115]).

Dans l'ensemble, ces données soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'endotoxémie jouerait un rôle clef dans le développement de l'état inflammatoire associé à l'obésité et aux désordres métaboliques et que le niveau sanguin de LPS est affecté par la composition du régime alimentaire. Tous les nutriments n'ont pas la même capacité à augmenter l'endotoxémie. En effet, il a été montré qu'un régime hyper-lipidique réduisait l'expression de protéines constituant les jonctions serrées : les occludines et la ZO-1, ce qui a pour conséquence une augmentation de la perméabilité intestinale et de la concentration plasmatique en LPS. Ceci indique que l'absorption de lipides et leur sécrétion pourrait avoir un rôle prédominant dans le passage du LPS dans la circulation portale ([55]). De manière cohérente, on constate chez la souris qu'un régime hyper-lipidique entraîne une plus forte augmentation de l'endotoxémie qu'un régime isocalorique hyper-glucidique [11].

Le caractère pro-endotoxémique des lipides tend à être confirmé par une étude récente chez l'humain : la concentration de LPS plasmatique corrèle positivement avec l'apport total en énergie et en lipides sur trois jours ([11]). Dans un échantillon de 201 hommes en bonne santé, un repas riche en lipides augmente fortement l'endotoxémie, jusqu'à atteindre des concentrations plasmatiques suffisantes pour induire une réaction inflammatoire *in vitro* (sécrétion de TNF- $\alpha$  par des cellules endothéliales aortiques en culture) ([99]). Deopurkar *et al* ([79]) ont comparé l'effet chez des individus sains d'encas isocaloriques à base de crème et de sucre (riche en glucose et en acides gras saturés) ou de jus d'orange sur l'endotoxémie, les marqueurs de l'inflammation et du stress oxydatif. Seul l'encas à base de crème et de glucose a été suivi d'une augmentation de l'endotoxémie, de l'expression de TLR-4, NF-kB, SOCS3, TNF $\alpha$  et IL-1.

Le fructose a également été identifié comme nutriment à l'origine de désordres métaboliques et d'endotoxémie : des souris ayant reçu pendant 8 semaines une solution de fructose à la place de l'eau de boisson ont vu leur concentration portale de LPS multipliée par 27, associée à une augmentation significative du taux plasmatique de cytokines pro-inflammatoires, du degré de stéatose hépatique et d'insulino-résistance. Ces altérations du métabolisme ne sont pas retrouvées dans les mêmes conditions chez des souris dont le gène TLR-4 a été

inactivé, bien que leur taux portal de LPS soit équivalent à celui des souris sauvages ([250]). Le rôle capital de l'axe LPS-TLR-4 dans le développement de désordres métaboliques suite à un régime alimentaire inapproprié est donc une fois de plus mis en évidence.

L'augmentation de l'endotoxémie peut provenir de l'augmentation de la perméabilité intestinale et donc de la diffusion passive du LPS, mais aussi d'une augmentation de l'absorption. Toutefois, les mécanismes régulant l'absorption de LPS sont peu connus à l'heure actuelle. Ghoshal *et al* [116] ont montré que les endotoxines sont activement absorbées lors de la formation et de la sécrétion des chylomicrons, *in vitro* et *in vivo*. L'inhibition de la formation des chylomicrons bloque la sécrétion de LPS dans la circulation portale. Le LPS n'atteint donc pas la circulation portale uniquement par diffusion passive à travers des jonctions serrées altérées. L'inhibition de la sécrétion des chylomicrons pourrait donc être une des voies thérapeutiques à envisager pour réduire l'endotoxémie.

### **Le microbiote intestinal et la fonction entéroendocrine**

La sécrétion d'hormones par l'intestin est un autre aspect du métabolisme énergétique régulé par le microbiote intestinal ayant récemment été découvert. Comme cela a été précédemment souligné, le microbiote intestinal hydrolyse les polysaccharides complexes d'origine végétale en monosaccharides et en AGCC, comme l'acétate, le propionate et le butyrate. Ces acides gras ne constituent pas seulement une importante source de substrat pour la lipogenèse *de novo*, ils sont aussi les ligands de deux récepteurs couplés à des protéines G : Gpr41 et Gpr43 ([230]). Ces récepteurs sont retrouvés à la surface des cellules entéroendocrines. En ce liant à ces récepteurs, les AGCCs stimulent la sécrétion de PYY, qui inhibe la mobilité intestinale, ce qui a pour effet de ralentir le transit intestinal et donc améliorer l'absorption des nutriments. De manière cohérente, Samuel *et al* [230] ont montré que l'inactivation du gène codant pour Gpr41 chez des souris axéniques n'affecte pas la prise de poids. Chez les souris conventionnelles, cette inactivation entraîne une diminution de la prise de poids par rapport aux souris sauvages. Cette diminution est aussi retrouvée chez des souris axéniques colonisées avec *Bacteroides thetaiotaomicron* et *Methanobrevibacter smithii*, deux espèces bactériennes couramment rencontrées dans le microbiote intestinal et produisant des AGCC. Les souris conventionnelles et colonisées déficientes en Grp41 présentaient une forte diminution de l'expression de PYY, un transit intestinal plus rapide et un efficacité d'extraction de l'énergie à partir des aliments moindre. Il a également été montré que Gpr41 est un médiateur de la synthèse de leptine induite par les AGCC [292].

Les souris Gpr43 KO sont résistantes à l'obésité et à l'insulino-résistance induites par un régime hyper-lipidique, ceci étant au moins partiellement dû à l'action régulatrice de Gpr43 sur la dépense énergétique ([37]). De plus, la stimulation de Gpr43 par les AGCC limite l'inflammation dans des modèles de colites, d'arthrite et d'asthme ([192]). Dans ces modèles, Maslowski *et al* ont montré que les souris axéniques, n'ayant pas d'AGCC compte tenu de l'absence de fermentation dans leur système digestif, présentent des niveaux d'inflammation

comparables à ceux de souris Gpr43 KO. La voie Gpr43 semble être donc un des liens entre microbiote intestinal, régime alimentaire et système immunitaire.

Au cours des dernières années, Cani *et al* ont étudié de manière exhaustive le lien entre la voie GLP-1 et le microbiote et ont démontré que :

- La fermentation de prébiotiques par le microbiote stimule la différenciation des cellules indifférenciées en cellules L dans le côlon proximal chez le rat ([50]).
- Les mêmes prébiotiques augmentent la réponse GLP-1 après un repas chez l'humain sain([53]).
- Les prébiotiques améliorent la tolérance au glucose et la sensibilité hépatique à l'insuline uniquement si le récepteur au GLP-1 est présent [52].

Le rôle prépondérant du microbiote dans la médiation de l'effet des prébiotiques sur les voies GLP-1 et PYY est confirmé par les résultats d'une étude d'un autre groupe, qui met en évidence que la fermentation d'amidon non digestible dans le côlon et la production d'AGCC qui en résulte est associée à une augmentation de l'expression de ces deux hormones ([298])

La sécrétion de GLP-2 peut elle aussi être régulée par le microbiote intestinal, et ainsi influencer sur l'intégrité de la barrière intestinale et l'endotoxémie ([55]). Cani *et al* ont ici étudié chez des souris ob/ob l'effet d'un prébiotique, l'oligofructose, sur la composition du microbiote intestinal, la perméabilité intestinale et l'inflammation, aussi bien hépatique que systémique. Les proportions de lactobacilles et de bifidobactéries ont été augmentées par l'administration du prébiotique, sous un régime standard. L'oligofructose a par ailleurs diminué l'endotoxémie, le stress oxydatif, la perméabilité intestinale et le niveau d'inflammation. Ces effets étaient associés à une augmentation de la production intestinale de GLP-2. Ils étaient aussi inhibés par un prétraitement avec un antagoniste de GLP-2 et reproduits par l'administration d'un agoniste de GLP-2. Ceci démontre donc que l'effet de ce prébiotique est médié par GLP-2.

### **Microbiote intestinal, insulino-résistance et syndrome métabolique**

Le syndrome métabolique est le résultat de l'interaction de facteurs génétiques et environnementaux. L'interaction entre le microbiote et le système immunitaire inné est complexe et encore relativement mal connue, toutefois tout laisse à penser que cette interaction est impliquée dans les dysfonctionnements métaboliques ([48]). Comme cela a déjà été évoqué (section 1.3), le syndrome métabolique, le diabète de type 2 et l'obésité sont caractérisés par une inflammation de bas grade dans laquelle les adipokines jouent un rôle central. Une étude récente a montré que des souris ob/ob ayant subi un traitement par antibiotiques (norfloxacine et ampicilline) présentaient un niveau d'insulino-résistance, une glycémie à jeun et une tolérance au glucose meilleurs que celui de souris ob/ob non traitées ([194]). La composition du microbiote intestinal était sans surprise altérée par ce traitement. Dans une étude basée sur deux modèles murins de syndrome métabolique (modèle génétique avec des souris apoA-1<sup>-/-</sup> et modèle nutritionnel), il a été observé une diminution de la population *de*

*Bifidobacterium spp* (ayant potentiellement un effet protecteur sur la barrière intestinale) et une augmentation de *Desulfovibrionaceae*, une espèce produisant des LPS ([294]). Le régime alimentaire avait un effet plus profond sur la composition du microbiote intestinal que la modification génétique.

Tout comme dans le cas l'obésité, il a été constaté que le diabète de type 2 est associé à une dysbiose du microbiote intestinal ([283], [166]). Chez la souris le diabète de type 2 pourrait être associé avec une forte population de bactéries gram négatif, comme les *Bacteroidetes* ([54]). En effet une diminution des populations de *Bacteroides-Prevotella spp.* coïncide avec une diminution de l'endotoxémie métabolique et une diminution des marqueurs de l'inflammation systémique chez les souris diabétiques. L'oligofructose, s'est révélé capable de modifier la composition du microbiote intestinal, aboutissant à une amélioration des paramètres métaboliques.

Un article récent a révélé le rôle fondamental de TLR-5, un récepteur de l'immunité innée, sur la structuration de la composition du microbiote intestinal et dans la pathogenèse du syndrome métabolique ([270]). Les auteurs de cette étude ont montré que les souris Tlr5<sup>-/-</sup> sont obèses, insulino-résistantes, hyperlipidémiques, hypertendues et hyperphagiques. La restriction alimentaire a limité le poids de ces souris mais n'a permis d'obtenir qu'une amélioration relative des paramètres métaboliques. En effet, les souris TLR5<sup>-/-</sup> minces sont demeurées insulino-résistantes. Afin de déterminer si les altérations métaboliques observées étaient un résultat direct de l'action du système immunitaire inné sur le métabolisme ou le résultat indirect passant par l'induction d'une dysbiose du microbiote intestinal, les auteurs ont transféré le microbiote de souris TLR-5<sup>-/-</sup> à des souris axéniques sauvages. Les souris sauvages ayant reçu le microbiote d'une souris TLRlr-5<sup>-/-</sup> avaient un métabolisme plus altéré que celui des souris sauvages ayant reçu le microbiote d'une souris sauvage conventionnelle, ce qui démontre que l'action de TLR-5 sur le métabolisme est médiée par le microbiote.

La considération récente de la relation triangulaire entre le microbiote intestinal, le système immunitaire et les fonctions métaboliques ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude des pathologies métaboliques et soulève beaucoup d'interrogations : quels sont les rôles des autres TLRs ? Quelles populations et/ou fonctions bactériennes ont un rôle délétère ou protecteur sur ces pathologies ? Y a-t-il des composés microbiens ou issus du métabolisme microbien autres que le LPS et les AGCC qui interagissent avec le métabolisme, directement ou par l'intermédiaire du système immunitaire ?

## 2.3 Vers une prévention ou un traitement des pathologies métaboliques par une modulation de la composition du microbiote

Le microbiote intestinal s'avère être de composition différente chez les individus minces et obèses et il participe à la régulation de l'inflammation et du métabolisme lipidique et glucidique. Compte tenu de cela, il est une cible de choix dans la recherche de traitement contre les pathologies métaboliques. Les données actuellement disponibles laissent penser que des populations (phyla, classes ou espèces, voire souches) ou des fonctions métaboliques bactériennes auraient un effet bénéfique ou délétère sur l'obésité et les pathologies associées. Les stratégies visant à rétablir un microbiote bénéfique sont donc particulièrement prometteuses. Les pistes de recherche actuellement explorées sont essentiellement basées sur l'administration de probiotiques ou de prébiotiques, toutefois, l'idée de transfert de microbiote chez l'humain est envisagée de plus en plus sérieusement dans le cadre d'un traitement de l'obésité ou du diabète de type 2.

### 2.3.1 Intérêt potentiel des probiotiques dans le traitement des pathologies métaboliques

Les probiotiques sont définis comme des bactéries ou des levures vivantes qui, lorsqu'elles sont ingérées en quantité suffisante, ont des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. Les probiotiques sont connus pour leur intérêt dans d'autres pathologies associées à une dysbiose du microbiote intestinal (troubles digestifs, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, etc.). L'impact de l'administration de probiotiques sur l'obésité et les pathologies associées a donc commencé à être étudié peu de temps après la découverte du rôle du microbiote dans ces pathologies métaboliques.

Il a été constaté que des souris axéniques colonisées avec une souche de *Lactobacillus paracasei* présentaient une augmentation du niveau de FIAF ([18]). Cette action de *Lactobacillus paracasei* a également été observée sur des souris conventionnelles sous régime hyperlipidique. Toutefois ces effets sont très souche-spécifiques et l'action du genre *Lactobacillus* dans l'obésité n'est pas clair. En effet, une étude rapporte une corrélation positive entre la population de *Lactobacillus spp.*, la glycémie et l'IMC ([254]). Bien que cette corrélation ne puisse être considérée comme un lien de cause à effet, elle souligne le fait que le genre *Lactobacillus* ne peut être considéré a priori comme bénéfique pour l'hôte. À priori seules quelques espèces du genre *Lactobacillus*, voire quelques souches ont une action bénéfique sur le métabolisme énergétique. C'est tout du moins ce que laissent penser deux études, qui montrent que chez l'humain l'administration d'une souche de *Lactobacillus acidophilus* et d'une souche de *Lactobacillus gasseri* a respectivement amélioré l'inflammation et l'insulino-résistance d'une part, l'IMC et l'adiposité d'autre part ([13], [147]).

Le microbiote intestinal peut également moduler la composition en acides gras des différents tissus de l'hôte, en effet, les lactobacilles et les bifidobactérie ont la capacité de synthétiser, à partir de l'acide linoléique, des isomères conjugués de l'acide linoléique. Ces isomères ont des propriétés antidiabétiques, protectrices contre l'athérosclérose et l'obésité et ont une activité immunomodulatrice ([257]). La supplémentation en *Bifidobacterium breve* associée à celle d'acide linoléique a pour effet une multiplication par deux à trois de la concentration dans l'intestin, le foie et le tissu adipeux de l'acide linoléique conjugué cis-9, trans-11, de l'acide eicosapentaénoïque et de l'acide docosahexaénoïque ([272]). Cela s'accompagnait d'une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-6, IFN $\gamma$ ). La supplémentation uniquement en acide linoléique n'avait pas d'influence sur la composition en acide gras des tissus de l'hôte et sur l'inflammation.

Un essai randomisé a été mené sur l'impact de la prise de *Lactobacillus rhamnosus* avant et après l'accouchement sur le poids de l'enfant au cours de ses premières années. 159 mères ont reçu le probiotique ou un placebo pendant le dernier mois de grossesse et pendant les 6 mois qui l'ont suivie. Bien que l'administration périnatale de *L. rhamnosus* ait été associée à une prise de poids limitée pendant les 2 premières années, aucune différence entre le groupe ayant reçu le probiotique et le groupe ayant reçu le placebo n'a été constatée après 2 ans ([176]).

Les probiotiques sont donc potentiellement très intéressants dans la prévention et ou le traitement des pathologies auxquelles nous nous intéressons. Ils ne sont toutefois pas le seul moyen de moduler la composition du microbiote intestinal dans un objectif thérapeutique. En effet, l'administration de prébiotiques permet d'augmenter les populations de certains groupes bactériens considérés comme bénéfiques pour l'hôte.

### 2.3.2 Intérêt potentiel des prébiotiques dans le traitement des pathologies métaboliques

Les prébiotiques sont définis comme des composés ayant un effet bénéfique sur la santé de l'hôte *via* la stimulation des activités et/ou de la croissance de bactéries spécifiques ([225]). Il s'agit essentiellement de fibres végétales de composition en oses particulière, comme l'inuline, les fructo-oligosaccharides (aussi appelés oligofructoses ou encore fructanes), les galacto-oligosaccharides, les trans-galacto-oligosaccharides (TOS), les xylo-oligosaccharides (XOS), le lactulose, etc. Ils ne sont pas digérés ni absorbés au niveau de l'intestin grêle et sont utilisés comme substrats sélectifs de phyla/genres/espèces de bactéries capables de les métaboliser. L'action hypolipémiant et hypocholestérolémiant des fructo-oligosaccharides a été démontrée au cours des années 1990 aussi bien chez l'homme que chez l'animal ([78]). Il semble également que ces prébiotiques permettent de limiter le pic de glycémie en postprandial.

Les fructo-oligosaccharides sont utilisés comme substrat énergétique par les bactéries (dont les bifidobactéries) exprimant la fructofuranosidase et stimulent leur croissance ([83],

[54], [53]). L'administration de fructo-oligosaccharides induit une forte augmentation du nombre de *Bifidobacterium spp.* chez des souris obèses (modèle génétique et nutritionnel). Le nombre de bifidobactéries était inversement corrélé avec l'adiposité, l'endotoxémie et le niveau d'inflammation ([54]), suggérant l'effet protecteur des bifidobactéries sur les perturbations métaboliques induites par un régime hyper-lipidique. L'administration d'oligofructoses était également associée à une augmentation des populations de cellules entéroendocrines L dans le jejunum et le côlon ([50], [100]). De manière cohérente, la synthèse et la sécrétion de GLP-1 et GLP-2 étaient aussi augmentées ([49], [52], [100]). Des études du même groupe, basées sur l'inactivation des récepteurs GLP, ont montré que la diminution de la prise alimentaire, de l'adiposité et de l'insulino-résistance hépatique était médiée par GLP-1, tandis que la réduction de la perméabilité intestinale et de l'endotoxémie implique GLP-2.

Chez l'humain, il a été constaté que l'administration de fructanes (16 grammes par jour pendant 14 jours) entraînait une augmentation de la sécrétion postprandiale de GLP-1 et GIP, ce qui s'accompagnait d'une diminution de la glycémie et d'une augmentation de la sensation de satiété et une diminution de la prise alimentaire ([53], [51]). L'action de ce prébiotique sur le système endocannabinoïde a également été mise en évidence, en effet l'administration de fructo-oligosaccharides réduit l'expression du récepteur cannabinoïde 1, ce qui rétablit l'expression de l'enzyme dégradant l'anandamine, aboutissant à une baisse de la concentration de cette dernière dans l'intestin et le tissu adipeux ([199]). Cela a pour conséquence une meilleure fonction de la barrière intestinale et une diminution de l'adipogenèse. Enfin, les fructo-oligosaccharides limitent l'expression de Grp43 dans le tissu adipeux, ce qui est associé à une diminution de la différenciation et de la taille des adipocytes ([83]).

Les prébiotiques sont donc prometteurs pour prévenir et/ou traiter l'obésité et les pathologies associées. De plus, ils sont naturellement présents dans beaucoup de fruits et légumes et sont moins coûteux à produire que les probiotiques.

## 2.4 Conclusion

Un ensemble d'études réalisées sur modèle animal ont démontré que le microbiote intestinal a la capacité de réguler l'homéostasie énergétique et l'adiposité de son hôte à différents niveaux *via* :

- l'extraction d'énergie à partir de l'alimentation.
- l'induction d'une inflammation chronique par le LPS.
- la fixation des AGCC sur les protéines G (en particulier Gpr41 et Gpr43), ce qui i) contrôle la balance énergétique, par l'intermédiaire de plusieurs voies dont PYY, ii) module la réponse immunitaire.
- l'activation de TLR-5, a priori chez des cellules épithéliales ou myéloïdes, ce qui a des conséquences sur la composition du microbiote, et en conséquence régule la prise

- alimentaire, le gain de poids et la sensibilité à l'insuline via des mécanismes inconnus à l'heure actuelle.
- l'induction de la sécrétion de FIAF par les cellules épithéliales, ce qui a pour conséquence une inhibition de la Lpl et par conséquent augmente le stockage de lipides dans le tissu adipeux.
  - la phosphorylation d'AMPK par un mécanisme inconnu, ce qui régule la jauge énergétique dans le foie et les muscles squelettiques.
  - la régulation de l'expression de GLP-2 et donc de l'intégrité de la barrière intestinale, ce qui a des conséquences sur l'entrée d'antigènes tels que le LPS et donc sur l'inflammation.

Ces différentes voies sont représentées sur le schéma suivant :

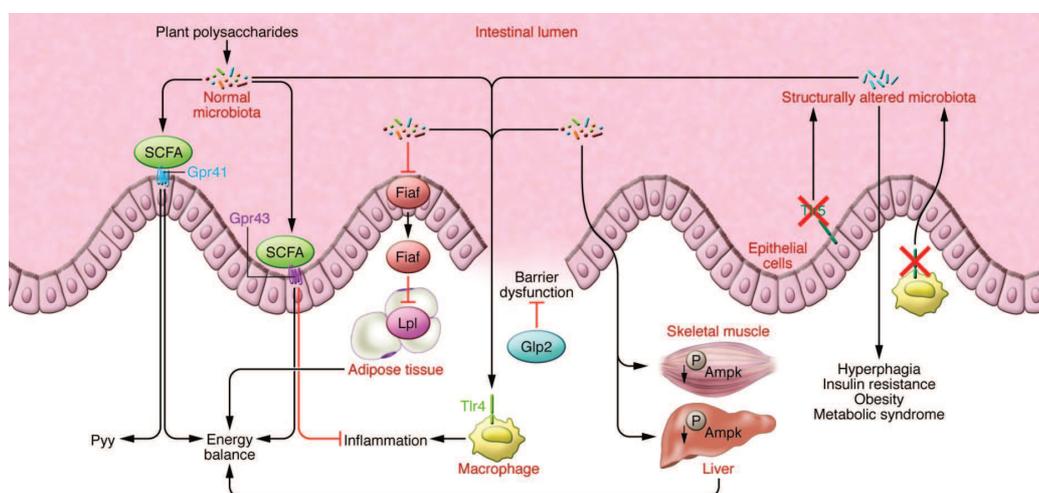


FIGURE 6 – Synthèse des mécanismes connus par lesquels le microbiote intestinal module le métabolisme énergétique de l'hôte ([258])

De nombreux résultats expérimentaux suggèrent qu'une modification de la composition du microbiote intestinal suite à l'administration d'antibiotiques ou de prébiotiques aurait un effet bénéfique sur le métabolisme glucidique et lipidique de l'hôte. Toutefois, la relation causale entre le microbiote intestinal et l'obésité ou les pathologies métaboliques associées n'est pour l'instant pas démontrée chez l'homme et de nombreuses questions restent en suspens. Est-ce que le rôle que joue le microbiote dans le développement des pathologies métaboliques est indépendant de l'obésité ? Est-ce que le microbiote agit sur le développement de toutes les pathologies associées à l'obésité ? De quelle manière l'alimentation, en lien avec le système immunitaire de l'hôte, induit-elle une dysbiose ? Quels autres facteurs conditionnent le développement de cette dysbiose associée aux pathologies métaboliques ?

Deuxième partie

Articles et résultats

# 1 L'axénie protège partiellement contre la stéatose et complètement contre l'obésité et l'insulino-résistance induites par un régime hyper-lipidique

## 1.1 Résumé

L'obésité prédispose à des pathologies sévères, dont le diabète de type 2 et les NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease). Les NAFLD, caractérisées par une accumulation de triglycérides dans les hépatocytes, sont fortement associées à des troubles métaboliques tels que l'insulino-résistance et le syndrome métabolique. Les NAFLD deviennent préoccupantes lorsqu'apparaît une inflammation hépatique, dont les facteurs déclenchant sont mal connus et indépendants du degré d'obésité. Des études indiquent que l'administration d'antibiotiques ou de probiotiques à des patient atteints de NAFLD a des effets bénéfiques sur leur pathologie. Par ailleurs, les souris axéniques sont résistantes au développement de l'obésité et de l'insulino-résistance induites pas un régime hyperlipidique ([25], [222]). Cette résistance aux effets habituellement observés d'un régime hyper-lipidique s'explique en partie par une diminution de la prise et de l'efficacité alimentaires ([222]). Il apparait donc extrêmement probable que le microbiote intestinal influe sur le développement des NAFLD induites par un régime hyper-lipidique.

L'objectif de cette étude a donc été de déterminer dans quelle mesure le développement des NAFLD induites par un régime obésogène était affecté par le microbiote intestinal. Pour cela, nous avons comparé la réponse à un régime hyper-lipidique de souris conventionnelles et axéniques de souche C57BL/6J.

24 souris conventionnelles et 12 souris axéniques ont reçu un régime hyper-lipidique constitué de 40% de beurre et 2,5% d'huile de soja pendant 16 semaines (groupes notés respectivement CV-HFD et GF-HFD). Parallèlement à cela, 24 souris conventionnelles et 12 souris axéniques ont été utilisées comme groupes contrôles et ont reçu pendant 16 semaines un régime standard, pauvre en lipides et riches en glucides complexes et en fibres (groupes notés respectivement CV-CD et GF-CD).

Sous régime contrôle, les souris axéniques avaient une prise de poids identique aux souris conventionnelles mais une glycémie, une insulïnémie, un taux de leptine, un pourcentage de tissus adipeux plus faibles. Chez les souris conventionnelles, le régime hyper-lipidique a induit le développement d'une obésité, une hyper-glycémie à jeun et un indice d'insulino-résistance (HOMA-IR) élevés. Chez les souris axéniques, le poids, la glycémie et l'insulïnémie à jeun ne sont pas statistiquement différents en fonction du régime. Ceci confirme que les souris axéniques sont effectivement résistantes à l'obésité et l'insulino-résistance induites par un régime hyper-lipidique. Chez les souris axéniques, le régime hyper-lipidique a toutefois provoqué une augmentation du pourcentage représenté par le tissu adipeux épidydimal et de la concentration plasmatique de leptine, bien que ces deux paramètres aient des valeurs bien en deçà de ce qui a été observé chez les souris conventionnelles. Le taux de résistine, une adipokine marqueur de l'inflammation connue pour son effet hyperinsulinémiant, est augmenté sous régime hyper-lipidique, aussi bien chez les souris conventionnelles que chez les souris axéniques. Certaines réponses métaboliques au régime hyper-lipidique sont donc partiellement ou totalement conditionnées par la présence de microbiote intestinal tandis que d'autres ne sont pas affectées.

Comme cela était attendu, le régime hyper-lipidique a induit chez les souris conventionnelles une stéatose massive, observable au niveau histologique et confirmée par le dosage biochimique des triglycérides hépatiques. Les souris axéniques ayant reçu le régime hyper-lipidique présentaient un niveau de stéatose intermédiaire entre les souris conventionnelles sous régime hyper-lipidique et les deux groupes de souris sous régime contrôle. Tout comme pour le taux de leptine, l'absence de microbiote intestinal ne protège donc que partiellement contre le développement d'une stéatose hépatique. Ceci indique que le microbiote intestinal influe sur une ou plusieurs voies métaboliques menant au développement de la stéatose.

L'expression de 10 gènes impliqués dans le métabolisme hépatique des lipides a été mesurée par PCR quantitative afin de mieux comprendre les altérations du métabolisme des lipides menant à des degrés de stéatose différents. Nous avons constaté que :

- Chez les souris conventionnelles, le régime hyper-lipidique induit une augmentation de l'expression de facteurs de transcription et d'enzymes impliqués dans la lipogénèse *de novo*. L'expression de CPT1a, un protéine membranaire responsable de l'étape limitante de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale, était doublée par le régime hyper-lipidique.
- Chez les souris axéniques, le régime hyper-lipidique induit une diminution de l'expression de facteurs de transcription et d'enzymes impliqués dans la lipogénèse, c'est-à-dire l'inverse de ce qui est observé chez les souris conventionnelles. Nous avons également observé une diminution de l'expression de CPT1a et MTP. L'ensemble des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides est donc réprimé par le régime hyper-lipidique chez les souris axéniques.
- Chez les souris sous régime standard, l'axénie entraîne une diminution de l'expression d'un facteur de transcription et d'une enzyme impliqués dans la lipogénèse, ainsi qu'une diminution de l'expression de deux transporteurs de lipides (CD36 et MTP),

impliqués l'un dans l'import de lipides dans les hépatocytes et l'autre dans l'export de particules lipoprotéiques.

- Chez les souris sous régime hyper-lipidique, l'axénie est à l'origine d'une diminution de l'expression de tous les facteurs de transcription étudiés (LXR, SREBP et ChREBP), de toutes les enzymes lipogéniques (ACC1, FAS, SCD1), de trois transporteurs de lipides impliqués dans l'import de lipides dans la cellule, dans les mitochondries et dans la sécrétion de VLDL (respectivement CD36, CPT1a et MTP).

Nous nous sommes ensuite intéressés au phénotype des cellules de Kupffer (KC), les macrophages hépatiques. Ces macrophages sont les cellules immunitaires les plus représentées dans le foie et leur rôle dans le développement de la stéatose hépatique et l'insulino-résistance est essentiel ([205]). Les KC ont été isolés et cultivés avec et sans stimulation au LPS, leur sécrétion de cytokines a ensuite été mesurée.

Chez les souris conventionnelles et chez les souris axéniques, la sécrétion de cytokines pro et anti-inflammatoires sans stimulation au LPS est plus importante lorsque les souris ont reçu un régime hyper-lipidique. Le régime hyper-lipidique induit donc un phénotype plutôt pro-inflammatoire des cellules de Kupffer, que les souris soient axéniques ou non.

Toutefois, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les KC de souris axéniques est globalement plus basse que celle de KC de souris conventionnelles quel que soit le régime. Ceci s'explique par le caractère immature du système immunitaire des souris axéniques.

Chez les souris conventionnelles, nous avons constaté que le LPS n'induit pas d'augmentation significative de la sécrétion de la majorité des cytokines mesurées. Les KC des souris CV-CD et CV-HFD sont donc globalement tolérants au LPS. Dans le cas d'une cytokine, RANTES, l'augmentation de la sécrétion induite par le LPS n'est observable que chez les souris sous régime contrôle. Il semble donc que le régime hyper-lipidique renforce la tolérance des KC vis-à-vis du LPS chez les souris conventionnelles. Chez les souris axéniques, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires est stimulée par le LPS quel que soit le régime. L'axénie empêche donc le développement d'une tolérance au LPS quel que soit le régime.

Comme pour la stéatose, l'activation des KC par le régime hyper-lipidique fait partie des paramètres pour lesquels l'axénie ne protège que partiellement des effets du régime hyper-lipidique. Etant donné qu'une inactivation des KC protège des conséquences au niveau hépatique d'un régime hyper-lipidique ([205]), le fait que le régime hyper-lipidique induise une augmentation de la sécrétion de cytokines par les KC est cohérent avec le développement d'une stéatose modérée. Néanmoins les mécanismes mis en jeu n'ont pas été élucidés.

Les résultats de cette étude montrent que la présence d'un microbiote intestinal conditionne fortement la réponse métabolique de l'hôte à un régime donné. Jusqu'à présent les conséquences de la présence du microbiote étaient étudiées pour un régime donné, dans cette étude nous avons étudié la réponse à un régime particulier par rapport à un régime contrôle en l'absence et en présence de microbiote intestinal. L'étude d'animaux axéniques est un

outil puissant pour démontrer l'impact du microbiote intestinal sur la physiologie de l'hôte. Toutefois, elle ne permet d'étudier que l'impact du microbiote dans sa globalité, il est difficile d'étudier un mécanisme particulier indépendamment des autres. Par ailleurs, le microbiote est considéré dans sa globalité, l'effet d'une espèce ou d'un groupe bactérien donné ou d'une fonction particulière ne peut être isolé. De même, la variabilité de la composition du microbiote d'un individu à l'autre n'est pas prise en compte.

Nous comptons soumettre cet article très prochainement à PlosOne.

## 1.2 Germ-free mice are protected against diet-induced obesity and insulin resistance but not from mild steatosis

## Germ-free mice are protected against diet-induced obesity and insulin resistance but not from mild steatosis

Tiphaine Le Roy<sup>1</sup>, Marta Llopis<sup>1</sup>, Aurélia Bruneau<sup>1</sup>, Sylvie Rabot<sup>1</sup>, Claudia Bevilacqua<sup>2</sup>, Patrice Martin<sup>2</sup>, Francine Walker<sup>3</sup>, André Bado<sup>3</sup>, Gabriel Perlemuter<sup>4,5,6</sup>, Anne-Marie Cassard-Doulcier<sup>4,5</sup>, Philippe Gérard<sup>1</sup> ‡

<sup>1</sup> INRA, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France

<sup>2</sup> INRA, UMR1313 GABI, Plateforme de Microgénomique expressionnelle "Iso Cell Express" (ICE), F-78350 Jouy-en-Josas, France

<sup>3</sup> INSERM U773, UFR de Médecine Paris Diderot, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

<sup>4</sup> INSERM, U996, IPSIT, Clamart, F-92140, France,

<sup>5</sup> Université Paris-Sud, Faculté de médecine Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre, F-94270, France,

<sup>6</sup> AP-HP, Hôpital Antoine Bécère, Service d'hépatogastroentérologie, Clamart, F-92140, France,

‡ To whom correspondence should be addressed : Address : Micalis Institute, INRA (UMR1319), Team AMIPEM, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France

email : philippe.gerard@jouy.inra.fr . Telephone : +33 (0) 134 65 24 28. Fax : +33 (0) 134 65 24 62

### 1.2.1 Abstract

**BACKGROUND & AIMS :** Obesity predisposes people to several severe pathologies, including NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease). Recent studies in mice indicate that germ-free (GF) mice are protected against diet-induced obesity. Furthermore, it has been shown that modulation of gut microbiota composition by antibiotics or probiotics administration has beneficial effects on people suffering NAFLD. The aim of this study was to determine how the absence of gut microbiota impacts the development of high-fat diet (HFD) induced insulin resistance and NAFLD.

**METHODS :** CV and GF C57BL/6J mice were fed either a HFD or a chow diet (CD) for 16 weeks. At the end of this feeding period, we evaluated the metabolic status, analysed the hepatic expression of genes involved in lipid metabolism and inflammation, studied the phenotype of the resident liver macrophages (Kupffer cells (KC)) and assessed liver histology of mice.

**RESULTS :** CV mice fed the HFD developed obesity and elevated HOMA-IR index whereas GF mice remained lean with a low HOMA-IR index (body weight :  $38.98 \pm 3.86$  vs  $32.01 \pm 2.88$  g, HOMA-IR index :  $17.32 \pm 1.74$  vs  $3.04 \pm 0.13$ ). CV mice fed the HFD developed a massive steatosis whereas GF mice fed the HFD showed an intermediary steatosis (respectively 7 et 3 times as many hepatic triglycerides than CV and GF mice on CD). The hepatic expression of several genes involved in lipids uptake and fatty acids synthesis was lower in GF than in CV mice when fed the HFD. In comparison with CD, HFD triggered an increased hepatic expression of genes involved in de novo lipogenesis whereas the inverse observation was made in GF mice. Interestingly, Il-6 levels were drastically lower in the plasma of GF mice, regardless of the diet. Coherently, hepatic expression of IL6 was lower in GF mice whereas the expression of other cytokines was not affected by the absence of the gut microbiota. The phenotyping of liver KC revealed a decreased production of cytokines by the GF mice KC compared to CV. However, GF mice KC were found more sensitive to lps-induction whatever the diet.

**CONCLUSION :** Our results confirmed the obesity resistant and insulin sensitive phenotype of GF mice fed a HFD. Nevertheless, HFD lead to a mild steatosis in GF mice despite reduced hepatic expressions of genes involved in lipogenesis, demonstrating that the absence of gut microbiota does not supply complete protection against fatty liver disease.

### 1.2.2 Introduction

Obesity is a major health concern, whose incidence is increasing dramatically in both industrialized and developing countries and predisposes individuals to a number of chronic diseases including diabetes, cardiovascular diseases, nonalcoholic fatty liver disease, cancer, and some immune-related disorders. Obesity results from complex interactions between genes

and environmental factors such as diet, food components and/or way of life, and results from a long-term positive imbalance between energy intake and expenditure with excessive increase in body fat. Recently, germ-free mice have been used to study the impact of the intestinal microbiota on obesity and metabolic disorders, identifying gut microbiota as a new environmental factor contributing to obesity and metabolic diseases ([77]). First, Bäckhed et al ([25], [26]) showed that germ-free C57BL/6J mice are resistant to sugar-rich lipid-rich diet -induced obesity, despite a greater food consumption than conventional mice. Moreover, Rabot et al ([222]) observed that GF mice receiving a high-fat diet (HFD) showed enhanced insulin sensitivity with improved glucose tolerance and reduced insulinemia when compared to their conventional counterparts. Concurrently, colonization of GF mice by a gut microbiota from conventional mice results in an increase in body fat content ([25]). Functionally, the Western diet-associated intestinal metagenome is characterized by enrichment of bacterial genes involved in the transport and fermentation of non digestible polysaccharides and host glycans, which suggests that the gut microbiota of obese mice allows a greater extraction of calories from ingested food than the microbiota of lean mice. Finally, transplantation of cecal microbiota from ob/ob mice to GF wild-type recipients led to higher fat mass gain than in mice inoculated with the gut microbiota from lean donors ([263]). All these results suggest a causal role of gut microbiota in the pathogenesis of obesity. It also implies that the gut microbiota may be involved in pathologies frequently associated with obesity, including diabetes or NAFLD ([48]).

NAFLD is considered the hepatic manifestation of metabolic syndrome and refers to a spectrum of liver damages ranging from simple steatosis to nonalcoholic steatohepatitis, advanced fibrosis, cirrhosis or even hepatocellular carcinoma. NAFLD is characterized by a disturbed hepatic lipid metabolism the first manifestation of which is an accumulation of triacylglycerol in hepatocytes, ie. steatosis. Steatosis is frequently associated with insulin resistance and low grade systemic inflammation ([127]). It turns out that the administration of antibiotics improves liver damage due to alcohol or a hyper-lipid diet ([34], [181]), which supports the hypothesis of a causal role of gut microbiota in NAFLD in the context of obesity.

The pathogenesis of NAFLD is complex, however it has been established that liver resident macrophages, named Kupffer cells, dysfunction is involved in the pathogenesis of NAFLD ([205]). As gut microbiota is known to shape the response of resident macrophages ([208]), we hypothesized that gut microbiota is involved in the pathogenesis of NAFLD through a mechanism involving KC.

In the present work, we fed germ-free and conventional mice with a chow or a high fat diet. By this way, we compared the development of diet-induced obesity, insulin resistance, NAFLD features and KC phenotype. This strategy allowed us to observe that germ-free mice are protected against obesity and insulin-resistance but are prone to develop a mild steatosis in response to high fat diet.

### 1.2.3 Material and methods

#### Animal Experimentation

Twenty-four GF male C57BL/6J mice were reared from GF breeding pairs in GF isolators at ANAXEM, the germ-free animal facilities of Micalis Institute (INRA, Jouy-en-Josas, France). In parallel, forty-eight CV male C57BL/6J mice were ordered from Janvier (Le Genest St. Isle, France). All mice received a sterile rodent chow diet (R03, SAFE, Augy, France) and water ad libitum. At 8 weeks of age, a sterilized HFD containing 40% of butter and 2,5% of soy oil (60% energy from fat, SAFE, Augy, France), sterilized by gamma-irradiation 40 K Gy was introduced for half of each group of mice for an additional 16 weeks. Body weight was measured weekly.

All mice were anaesthetized with isoflurane (Aerrane, Baxter, Maurepas, France). Liver was perfused through the portal vein with a 1X PBS solution supplemented with 5 mmol/L EDTA in order to eliminate blood and then excised. Epididymal adipose tissue was collected and weighed. Procedures were carried out in accordance with the European guidelines for the care and use of laboratory animals and with permission 78-60 of the French Veterinary Services.

#### Measurement of plasma parameters

Blood taken from the retro-orbital sinus was collected into chilled EDTA-coated tubes after 6h of fasting. Blood glucose (3  $\mu$ l of blood sample) was measured using an Accu-Check glucometer (Roche Diagnostics). The remaining blood was then centrifuged at 10 000 g for 10 minutes. Plasma was aliquoted and frozen at -80°C until analysis.

Alanine and Aspartate aminotransferases (ALT and AST, respectively) were determined using an OLYMPUS AU400 robot. Plasma insulin, leptin, resistin, MCP-1, TNF $\alpha$  and IL-6 levels were assayed using a Luminex 100 IS system (Luminex Corporation) with a MILLIPLEX MAP Mouse Serum Adipokine Panel kit (Millipore). Luminex analyses were performed by Genotoul Anexplo platform (IFR150, INSERM, Toulouse, France). Insulin resistance was evaluated using the homeostatic model assessment (HOMA-IR) : fasting serum glucose (mg/dL) x insulin (mU/L) / 405.

#### Measurement of Liver Triglycerides

Portions of frozen liver from all mice were homogenized in chloroform-methanol (2 :1) in order to extract total lipids according to Folch *et al* methodology ([109]). The organic extract was dried and reconstituted in isopropanol. Triglyceride content was measured with a triglycerides determination kit (Sigma-Aldrich, Saint-Louis MO) according to the manufacturer's instructions.

## Liver histology

Thin slices of formaldehyde-fixed, paraffin-embedded liver tissue were stained with hematoxylin and scored for severity of the steatosis and inflammation by an experienced pathologist (FW) blinded to the experiments. Steatosis was assessed according to the percentage of hepatocytes presenting macrovesicular steatosis multiplied by the intensity of the steatosis of the concerned hepatocytes (from 1 to 4).

## Gene Expression Analysis by quantitative PCR

Livers were disrupted in RNA-PLUS solution (QBiogene). Total RNA was extracted from the crude extract using an improved and simplified modification of Chomczynski's procedure ([63]). RNA concentration and purity were determined using the Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher scientific) at wavelength 260/280 nm and RNA integrity was determined with the Agilent bioanalyzer 2100 system with the RNA 6000 Nano LabChip kit. Samples with an RNA Integrity Number (RIN) ([240]) inferior to 8 on a scale ranging from 0 to 10 were eliminated.

Total RNA (2  $\mu$ g per reaction) was reverse transcribed into cDNA by using a High-Capacity cDNA Reverse transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. Thereafter, half of the product of each RT reaction was added to an equal volume of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and then loaded on a TaqMan Low Density Array (TLDA) card (Applied Biosystem). The TLDA card was centrifuged twice for 1 min at 330g before being sealed. PCR amplification was performed using an Applied Biosystems Prism 7900HT Sequence Detection System. Data were analyzed using the SDS version 2.2 software (Applied Biosystems) where baseline and threshold settings were automatically adjusted. Statistical analysis was performed using DataAssist v2.0 (Applied Biosystem). The relative gene expressions were normalized to three reference genes : 18S, gapdh and ubc2, chosen in the basis of results obtained from TaqMan Mouse Endogenous Control Arrays (Applied biosystems). The conventional - control diet group was used as a reference for relative expression of genes in the liver.

## Isolation, Culture and of Resident Liver Macrophages (Kupffer Cells)

In the first step, blood was eliminated by perfusing the liver inversely to the normal flux with 1X PBS solution supplemented with 5 mmol/L EDTA. The liver was then excised and homogenized in a solution containing 0.05% collagenase IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) buffered with 0.1 mol/L HEPES at 37°C for 15 minutes. The suspension was centrifuged at 50g at room temperature for 2 minutes to remove liver parenchymal cells. Afterwards, the non parenchymateous cells were filtered through a 70 $\mu$ m filter, and the filtrate was centrifugated at 400g at room temperature to eliminate debris. The non parenchymateous

cells were resuspended with Optiprep 22% (Axis-Shield, Scotland), layered with HBSS/5mM EDTA and centrifuged at 900g at room temperature for 20 min. The cells at the interface were pooled and washed twice by centrifugation with RPMI containing 10% FCS (PAA, Austria). Cell viability and concentration were evaluated by trypan blue exclusion before being plated in RPMI containing 10% FCS at the concentration of  $10^6$  per well, and then stimulated or not for 24hr with 100 ng/mL LPS from *E. coli* serotype O55 : B5 endotoxin free (Alexis, Switzerland) . The culture medium was collected, centrifugated and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analyzis after 24h of culture.

Culture medium  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-10}$ , RANTES and  $\text{IFN}\gamma$  levels were assayed using a Luminex 100 IS system (Luminex Corporation) with a MILLIPLEX MAP Mouse Cytokines-Chemokines Panel kit (Millipore). Luminex analyses were performed by Genotoul Anexplor platform (IFR150, INSERM, Toulouse, France).

### Statistical analyses

Results are represented as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney-Wilcoxon or Student't tests (StatView, SAS Institute Inc, Cary, USA).  $P < .05$  was considered as statistically significant.

## 1.2.4 Results

### Germ-free and conventional mice on a control diet display major metabolic differences

TAB 1 summarizes the results found on systemic parameters describing metabolic status. At the beginning of the experiment, the average weight of germ-free and conventional mice fed the control diet (CD) were not statistically different (data not shown). After 16 weeks of CD, germ-free mice weighed slightly more than conventional mice ( $32.64 \pm 2.43$  vs  $30.65 \pm 2.39$  g,  $p = 0.028$ ), which can be explained by a larger caecum ([222]) rather than by a higher adiposity. Indeed, epididymal adipose tissue was 3-fold greater in conventional mice. Germ-free mice also displayed a lower fasting glycemia ( $92.7 \pm 13.1$  vs  $132.0 \pm 21.33$  mg/dL,  $p < 0.0001$ ) and a 2-fold lower HOMA-IR index than conventional mice on the same diet. Moreover, the leptin level was 12 times lower in germ-free mice. On the other hand, the level of resistin was comparable in germ-free and conventional mice ( $1781.4 \pm 260.6$  vs  $1483.8 \pm 401.6$  pg/ml).

### Metabolic response of germ-free and conventional mice to HFD

As expected, the metabolism of conventional mice fed the HFD was strongly altered (TAB 1). In comparison with conventional mice fed the CD, these mice displayed drastically

	CV-CD	GF-CD	CV-HFD	GF-HFD
Body Weight (g)	30.65 ± 2.39 <sup>a</sup>	32.64 ± 2.43 <sup>c</sup>	38.98 ± 3.86 <sup>b</sup>	32.01 ± 2.88 <sup>c</sup>
Liver (% of BW)	4.78 ± 1.06 <sup>a</sup>	3.22 ± 0.36 <sup>c</sup>	6.47 ± 8.98 <sup>b</sup>	3.61 ± 0.27 <sup>c</sup>
Epididymal Fat	1.61 ± 0.61 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.14 <sup>c</sup>	4.69 ± 1.18 <sup>b</sup>	1.24 ± 0.17 <sup>d</sup>
Glycemia (mg/dl)	132.0 ± 21.3 <sup>a</sup>	92.7 ± 13.1 <sup>c</sup>	164.2 ± 39.1 <sup>b</sup>	100.4 ± 12.2 <sup>c</sup>
Insulinemia (pg/ml)	1020.0 ± 465.8 <sup>a</sup>	602.9 ± 383.6 <sup>c</sup>	1944.0 ± 820.0 <sup>b</sup>	558.8 ± 189.6 <sup>c</sup>
HOMA-IR	7.31 ± 0.54 <sup>a</sup>	3.03 ± 0.27 <sup>c</sup>	17.32 ± 1.74 <sup>b</sup>	3.04 ± 0.13 <sup>c</sup>
Leptin (pg/ml)	2900.4 ± 3850.9 <sup>a</sup>	235.8 ± 166.2 <sup>c</sup>	15126.7 ± 7598.7 <sup>b</sup>	667.8 ± 203.17 <sup>c</sup>
Resistin (pg/ml)	1483.8 ± 401.6 <sup>a</sup>	1781.4 ± 260.6 <sup>a</sup>	2364.0 ± 894.4 <sup>b</sup>	2458.3 ± 618.9 <sup>b</sup>

TABLE 1 – Body weight, tissue weights and plasma parameters of germ-free and conventional mice at the end of the feeding period (control diet : CD, high-fat diet : HFD). n = 22 for CV-CD, n = 24 for CV-HFD, n = 12 for CV-CD, n = 12 for GF-HFD

higher body weight ( $30.65 \pm 2.39$  vs  $38.98 \pm 3.86$  g,  $p < 0.0001$ ), epididymal fat represented  $1.61 \pm 0.61$  vs  $4.69 \pm 1.18$  % of body weight,  $p < 0.0001$ , glycemia ( $132.0 \pm 21.33$  vs  $164.2 \pm 39.1$  mg/dl,  $p = 0.0001$ ), HOMA-IR ( $7.31 \pm 0.54$  vs  $17.32 \pm 1.74$  mg/dl,  $p < 0.0001$ ), leptin level ( $2900.4 \pm 3850.9$  vs  $15126.7 \pm 7598.7$  pg/ml,  $p < 0.0001$ ) and resistin level ( $1483.8 \pm 401.6$  vs  $2364.0 \pm 894.4$  pg/ml,  $p = 0.0001$ ).

In germ-free mice, body weight, glycemia and HOMA-IR were not affected by the diet, which confirms that germ-free mice are protected against diet-induced obesity and insulin-resistance (TAB 1). Nevertheless, although adiposity and leptinemia remained lower in germ-free than in conventional mice, HFD induced a raise of these parameters : adiposity and leptinemia were 2.5 fold greater in germ-free mice fed the HFD than in germ-free mice fed the CD. Conversely, HFD significantly increased the resistin level similarly in germ-free and conventional mice.

### Comparison of the hepatic lipid metabolism of germ-free and conventional mice

The liver triacylglycerol concentration (FIG 1) and the hepatic relative expression of transcription factors (FIG 2a), cytoplasmic enzymes (FIG 2b) and membrane transport proteins (FIG 2c) were assayed in order to specifically assess the effect of both gut microbiota and HFD on hepatic lipid metabolism.

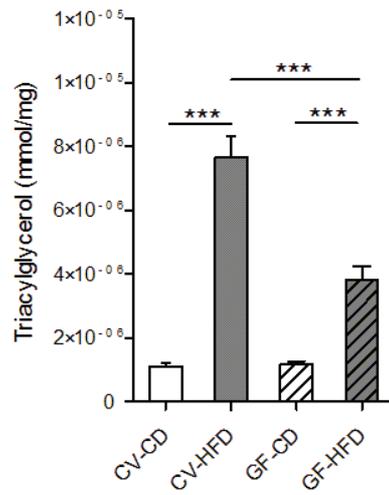
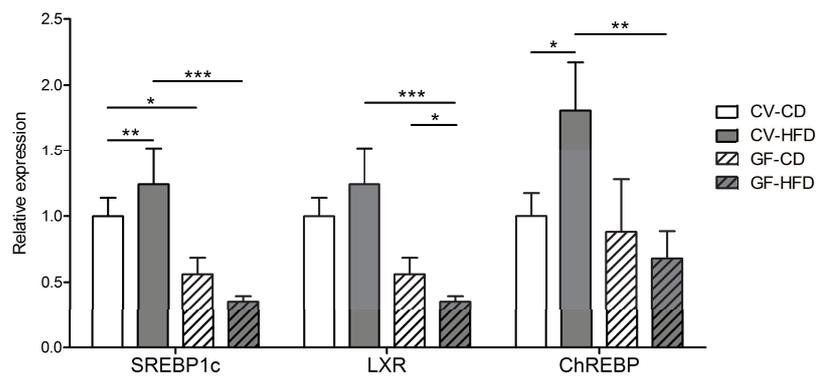
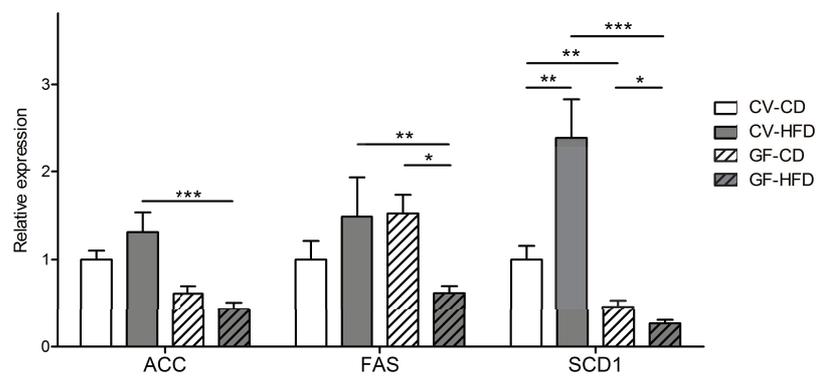


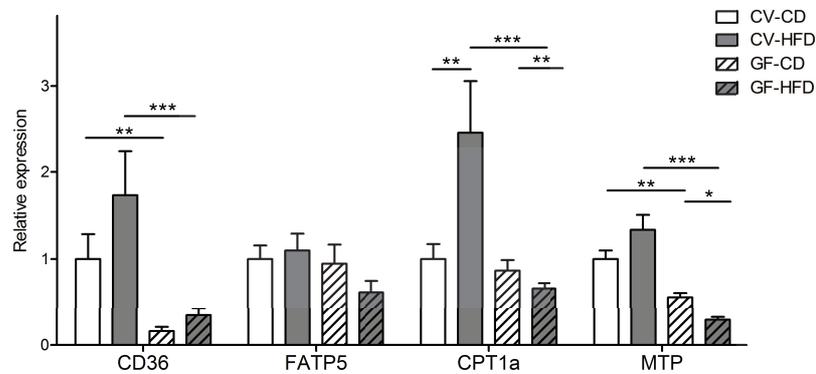
FIGURE 1 – Hepatic triglyceride concentration of conventional and germ-free mice at the end of the feeding period (control diet : CD, high-fat diet : HFD). n = 22 for CV-CD, n = 24 for CV-HFD, n = 12 for CV-CD, n = 12 for GF-HFD



(a) Transcription factors



(b) Lipogenic enzymes



(c) Lipids transporters

FIGURE 2 – Relative hepatic gene expression analyses of transcription factors (a), lipogenic enzymes (b) and lipids transporters (c). Results were normalized on the CV-CD group. Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation,  $n = 22$  for CV-CD,  $n = 24$  for CV-HFD,  $n = 12$  for CV-CD,  $n = 12$  for GF-HFD. \*  $P < .05$ ; \*\*\*  $P < .001$

Germ-free and conventional mice fed the CD both displayed a low concentration of triacylglycerol in the liver. Conventional mice fed the HFD developed a massive steatosis with a concentration of triglycerides 6 fold greater than in mice fed the CD (respectively  $1.17 \pm 0.46$  and  $1.22 \pm 0.29$  vs  $7.65 \pm 2.9$  nmol of triacylglycerol per mg of liver,  $p < 0.0001$ ).

Germ-free mice fed the HFD showed an intermediary steatosis with  $4.03 \pm 1.49$  nmol/mg.

Conventional mice fed the CD were used as a reference for relative expression of genes in the liver. The relative expression of the transcription factors SREBP1c, LXR and ChREBP is shown FIG2a. These nuclear factors are known to promote metabolic pathways contributing to steatosis ([202]). LXR and ChREBP expression was not affected by the germ-free status on CD. However, SREBP1c was slightly up-regulated in germ-free mice (1.4 fold,  $p = 0.04$ ). These 3 genes were significantly up-regulated in conventional mice when given the HFD, which was not the case in germ-free mice. LXR was even down-regulated in germ-free mice fed the HFD in comparison with germ-free mice fed the CD with a relative expression of 0.84 and 0.58 ( $p = 0.04$ ).

The relative expression of ACC, SCD1 and FAS, three lipogenic enzymes, is shown FIG2b. The expression of ACC and FAS was not affected by the germ-free status when given a CD. The expression of SCD1 is 2-fold lower in germ-free mice in comparison with conventional mice ( $p = 0.0084$ ). In CV mice fed, the HFD lead to an increase of expression of SCD1 (fold-change 2.4,  $p = 0.0055$ ). In GF mice, SCD1 and FAS were down-regulated in the HFD group compared to the CD group ( $p = 0.029$  and  $p = 0.0027$ , respectively). ACC was also less expressed, but not significantly. When compared to conventional mice fed the high fat diet, ACC, SCD1 and FAS were drastically less expressed in germ-free mice fed the HFD ( $p = 0.0006$ ,  $p = 0.0001$  and  $p = 0.022$ , respectively).

Expression data of CD36 and FATP5, two membrane transport proteins involved in the uptake of lipids, are shown FIG2c. FATP5 expression appeared not to be affected by the diet and the microbiological status. CD36 was up-regulated when conventional mice were given the HFD (fold-change 1.74,  $p = 0.04$ ). CD36 was strongly down-regulated in germ-free mice in comparison with conventional mice, whatever the diet (fold change 0.16 and 0.35, respectively,  $p = 0.0012$  and  $p = 0.0002$ ).

The relative expression of CPT1a, a transport protein which limitates mitochondrial  $\beta$ -oxydation by regulating the entry of fatty acids in the mitochondria, was drastically increased in conventional mice fed the HFD (fold-change = 2.5,  $p = 0.0043$ ) (FIG2c). Whatever the diet, CPT1a expression in germ-free mice was similar to the one of conventional mice fed the CD.

The regulation of MTP, a protein exerting a central regulatory role in lipoprotein assembly and secretion, was not significantly affected by the diet in conventional mice (FIG2c). The germ-free status induced a down-regulation of MTP, with a relative expression of 0.56 on CD ( $p = 0.0088$ ) and 0.29 on HFD ( $p = 0.0001$ ) compared to their conventional counterparts. Interestingly, the HFD triggered a down-regulation of MTP in germ-free mice ( $p = 0.026$ ).

	CV-CD	GF-CD	CV-HFD	GF-HFD
TNF $\alpha$ (pg/ml)	4.39 $\pm$ 1.78 <sup>a</sup>	6.24 $\pm$ 4.57 <sup>a</sup>	5.39 $\pm$ 4.42 <sup>a</sup>	5.63 $\pm$ 3.69 <sup>a</sup>
MCP-1 (pg/ml)	31.92 $\pm$ 24.62 <sup>a</sup>	49.6 $\pm$ 18.44 <sup>a, b</sup>	36.22 $\pm$ 47.15 <sup>b</sup>	49.53 $\pm$ 15.65 <sup>b</sup>
IL-6 (pg/ml)	490.2 $\pm$ 563.2 <sup>a</sup>	16.5 $\pm$ 10.6 <sup>b</sup>	545.4 $\pm$ 793.3 <sup>a</sup>	30.8 $\pm$ 19.6 <sup>b</sup>

TABLE 2 – Plasma inflammatory markers of conventional and germ-free mice at the end of the feeding period (control diet : CD, high-fat diet : HFD). n = 22 for CV-CD, n = 24 for CV-HFD, n = 12 for GF-CD, n = 12 for GF-HFD

### Systemic inflammation in germ-free and conventional mice

The systemic inflammation was evaluated by assaying the plasmatic level of three pro-inflammatory cytokines : TNF $\alpha$ , IL-6 and MCP-1. The concentrations of these cytokines are shown in TAB 2. Conventional mice displayed similar levels of pro-inflammatory cytokines on both diets, indicating that HFD did not induced a systemic low grade inflammation. Levels of TNF $\alpha$  were not significantly different between germ-free and conventional mice on both diets. Germ-free mice on CD showed a slightly higher level of MCP-1 than conventional mice on the same diet (31.92  $\pm$  24.62 vs 49.6  $\pm$  18.44 pg/ml, p = 0.0374), which was not found on HFD fed mice. IL-6 levels were drastically lower in germ-free mice, regardless of the diet : germ-free mice displayed levels of IL-6 of 16.5  $\pm$  10.6 (CD) and 30.8  $\pm$  19.6 (HFD) pg/ml and conventional mice displayed levels of 490.2  $\pm$  563.2 (CD) and 545.4  $\pm$  793.3 (HFD) pg/ml.

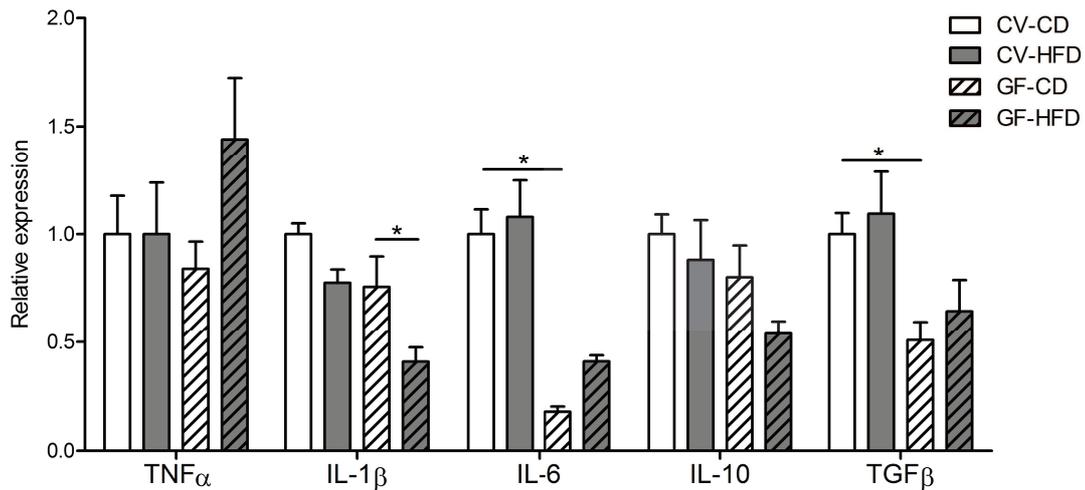
### Evaluation of the hepatic inflammation in germ-free and conventional mice

Given the fact that metabolic disorders are associated with a state of low grade inflammation and that liver inflammation is the driving force for the development of severe stages of NAFLD, we specifically studied the liver inflammation by assaying the hepatic expression of toll-like receptors and cytokines.

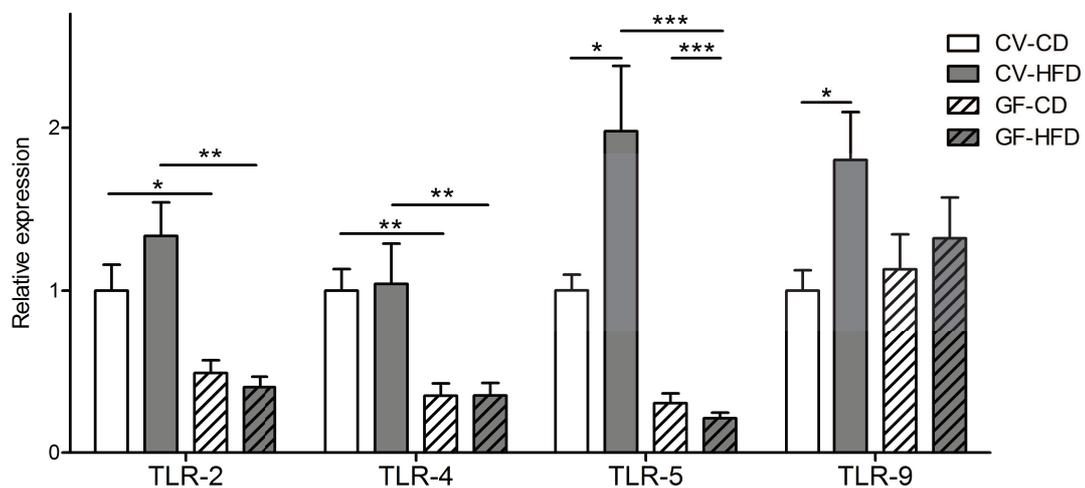
Relative expression in the liver of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TGF $\beta$  are shown FIG 3a. As before, conventional mice fed the CD were used as reference. None of these cytokines was affected by the diet in conventional mice. In comparison with conventional mice fed the control diet, germ-free mice fed the same diet displayed similar levels of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 hepatic expression but lower expression of the two pro-inflammatory cytokines IL-6 and TGF $\beta$  (fold-change 0,18 and 0,50, respectively, p = 0.045 and p = 0.012). In germ-free mice, the HFD triggered a down-regulation of IL-1 $\beta$  (fold-change 0.55, p = 0.010), the expression of the other cytokines was not statistically significantly affected. The cytokines expression levels were not different between conventional and germ-free mice fed the high fat diet.

TLR-2, TLR-4, TLR-5 and TLR-9 are known to recognize bacterial patterns. Their relative expressions in all groups of mice are represented FIG 3a. When given the CD, TLR-2, TLR-4 and TLR-5 are down-regulated in germ-free mice in comparison with conventional

mice (fold-change 0.48, 0.31 and 0.3,  $p = 0.0046$ ,  $p = 0.0022$  and  $p < 0.0001$ , respectively). The hepatic expression of TLR-9 was not affected by the germ-free status. In conventional mice, TLR-5 and TLR-9 were up-regulated when given the HFD : fold-changes were 1.98 and 1.8 ( $p = 0.0011$  and  $p = 0.0124$ ), respectively. The other TLRs were not affected by the diet in conventional mice. In germ-free mice, only TLR-5 was up-regulated by the HFD. Coherently, all TLRs except TLR-9 were down-regulated in germ-free mice in comparison with conventional mice when given the HFD.



(a) relative hepatic expression of cytokines



(b) relative hepatic expression of TLRs

FIGURE 3 – Relative hepatic gene expression analyses of cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TGF $\beta$ ) (a) and Toll-like Receptors 2, 4, 5 and 9 (b). Results were normalized on the CV-CD group.  $n = 15$  for CV-CD,  $n = 15$  for CV-HFD,  $n = 12$  for CV-CD,  $n = 12$  for GF-HFD.

## Evaluation of the phenotype of resident liver macrophages (Kupffer cells) of germ-free and conventional mice

CD68 mRNA concentration was assessed as a marker of liver macrophages (Kupffer cells) population. In conventional mice, HFD lead to an increased expression of CD68, indicating a Kupffer cells (KC) population boost (FIG. 4) (fold-change 1.54,  $p = 0.0296$ ). Relative expressions of CD68 in germ-free mice liver on both diets were similar to the one of conventional mice on CD.

A

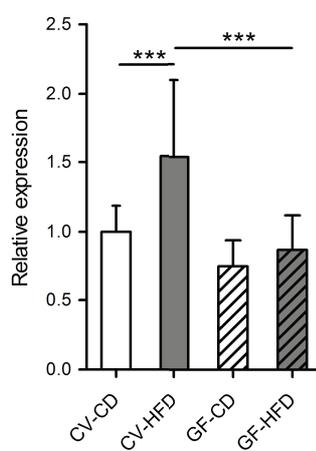


FIGURE 4 – Relative hepatic gene expression of CD68, a macrophage infiltration marker. Results were normalized on the CV-CD group.  $n = 15$  for CV-CD,  $n = 15$  for CV-HFD,  $n = 12$  for CV-CD,  $n = 12$  for GF-HFD.

Kupffer cells are the most represented immune cells in the liver and it has been established that their dysfunction is critical in the development of diet-induced insulin-resistance and NAFLD ([207], [205]). The secretion of pro and anti-inflammatory cytokines by KC of germ-free and conventional mice was therefore investigated in order to decipher if the complete or partial protection of germ-free mice against some metabolic syndrome features is associated with a particular phenotype of KC (FIG 5a to 5f).

Conventional mice' KC secreted greater quantities of  $\text{TNF}\alpha$  (FIG 5a), IL-6 (FIG 5b), IL- $1\beta$  (FIG 5c), RANTES (FIG 5e) and IL-10 (FIG 5f) when the mice were given a HFD. The HFD did not affect the secretion of IFN $\gamma$  (FIG 5d). KC of conventional mice fed the HFD developed therefore a pro-inflammatory phenotype. In conventional mice fed the CD, IL-10 and RANTES were the only cytokines which secretion by KC was significantly increased following a LPS-stimulation, suggesting that KC of conventional mice on ND are rather LPS-tolerant. RANTES secretion was no longer stimulated by LPS in contrary to IL-10 when conventional mice were given the HFD, indicating that these mice macrophages developed a tolerance to LPS despite their high basal secretion of pro-inflammatory cytokines. On the CD,

germ-free mice KC secreted similar quantities of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , RANTES and IL-10 than KC of conventional mice. Germ-free status down-regulated the secretion of IL-6 and IFN $\gamma$ , with or without LPS stimulation. However, LPS stimulation powerfully increased the secretion of all cytokines except IFN $\gamma$  in germ-free mice on CD, bringing to light the high sensitivity of germ-free mice' KC to LPS. Although the secreted levels of cytokines remained globally lower than in conventional mice, the HFD triggered a marked increase in the secretion of cytokines by germ-free-mice's KC. Moreover, LPS-stimulation triggered a drastic increase in the secretion of all cytokines, including IFN $\gamma$ . Compared to conventional mice, germ-free mice KC appear to be extremely sensitive to both HFD and LPS-stimulation, although their secretion capacity remained lower for some cytokines (IL-6, IL-1 and IFN $\gamma$ ).

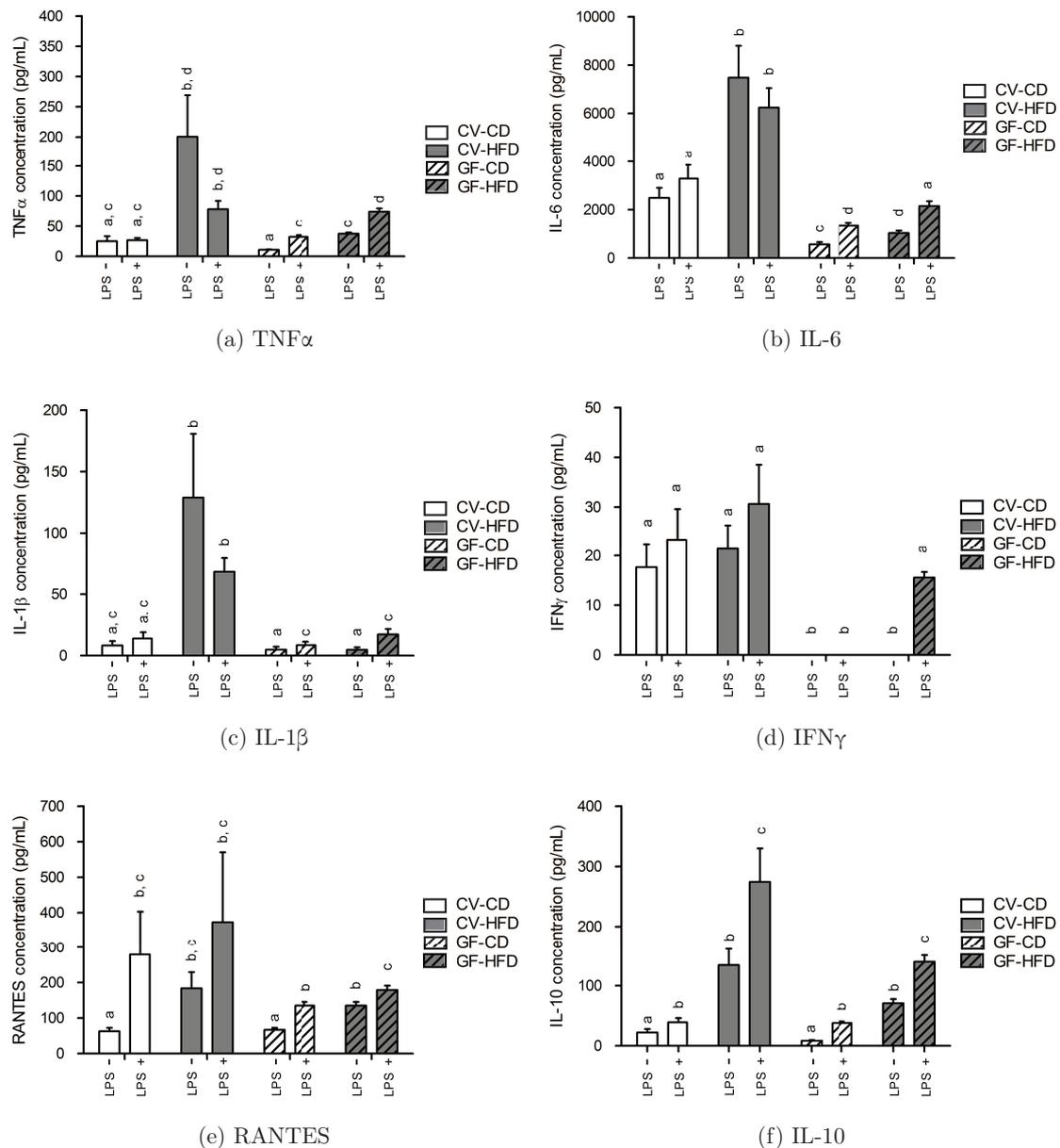


FIGURE 5 – Cytokines and chemokines secretion by isolated Kupffer cells from conventional and germ-free mice fed a control diet and a high fat diet. n = 22 for CV-CD, n = 24 for CV-HFD, n = 12 for CV-CD, n = 12 for GF-HFD.

### Germ-free mice fed the HFD exhibited features of liver dysfunction without histologic anomalies

Aspartate and alanine aminotransaminases were not elevated in HFD fed conventional mice, indicating that potential liver damage did not reach severe NAFLD stages, as expected in such model of obesity-related pathologies. AST and ALT levels were not affected by the germ-free status on control diet. AST and ALT levels of HFD fed germ-free mice were elevated

in comparison to CD fed germ-free mice, which may indicate hepatocytes lysis (FIG 6).

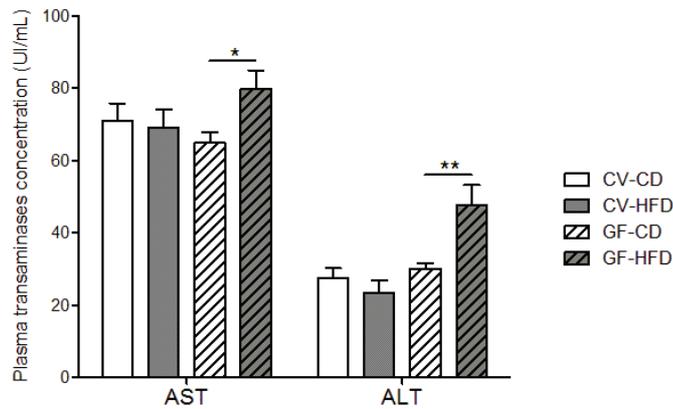


FIGURE 6 – Plasma concentration of aspartate and alanine aminotransferases in conventional and germ-free mice at the end of the feeding period (control diet : CD, high-fat diet : HFD). n = 22 for CV-CD, n = 24 for CV-HFD, n = 12 for GF-CD, n = 12 for GF-HFD.

Liver histological analysis was performed in order to decipher if transaminases elevation in GF-HFD group was associated with histologic features of NASH (FIG. 7a to 7d). The lipids droplets infiltration was coherent with the biochemical assay of liver triglycerides (FIG. 1). No mark of inflammation was detected in all groups.

The hepatic expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), a oxidative stress marker, was significantly increased by the germ-free status on the high fat diet. Moreover, HFD triggered a significant increase of iNOS hepatic expression in germ-free mice.

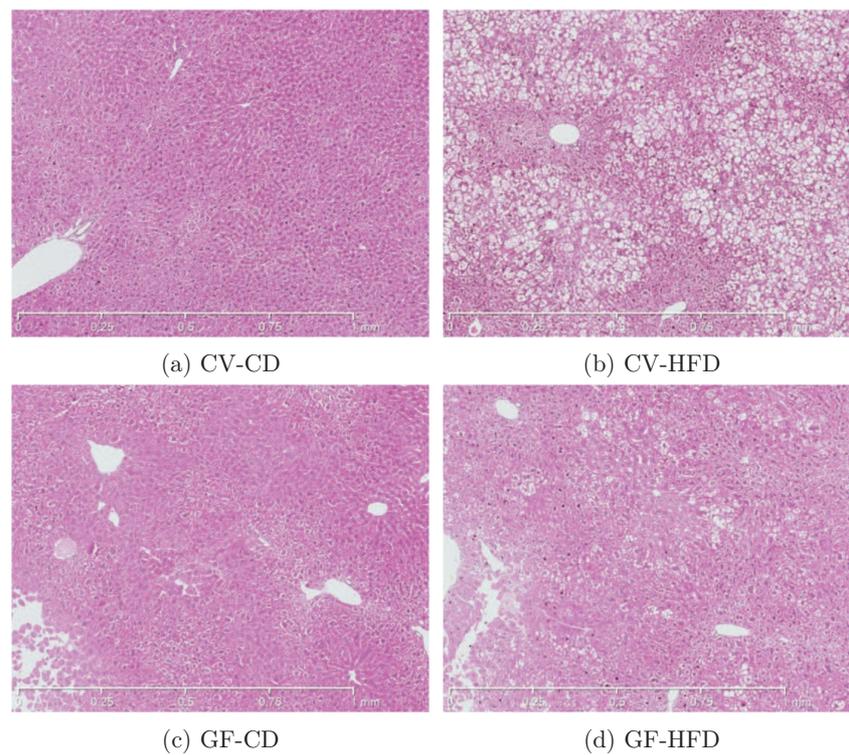


FIGURE 7 – Representative hematoxylin and eosin stains of paraformaldehyde-fixed liver sections prepared from germ-free and conventional mice’s livers at the end of the feeding period (control diet : CD, high-fat diet : HFD). n = 22 for CV-CD, n = 24 for CV-HFD, n = 12 for CV-CD, n = 12 for GF-HFD

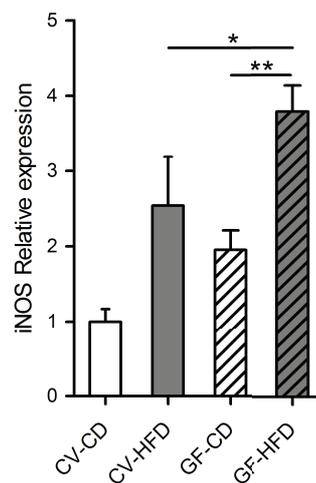


FIGURE 8 – Relative hepatic gene expression analyses of inducible NO-synthase : iNOS . Results were normalized on the CV-CD group. n = 15 for CV-CD, n = 15 for CV-HFD, n = 12 for CV-CD, n = 12 for GF-HFD.

### 1.2.5 Discussion

The primary cause of obesity in human is increased food consumption upon energy expenditure. In this study, we have used the model of high-fat diet induced-obesity in conventional and germ-free mice to provide experimental evidence that the metabolic and immune response to diet are powerfully shaped by the presence of commensal microorganisms. We first showed that germ-free mice are completely protected against diet-induced obesity and insulin-resistance and partially protected against diet-induced steatosis. The partial protection against high fat diet induced steatosis in germ-free mice was associated with an overall lower expression of genes involved in hepatic lipid metabolism. Interestingly, we demonstrated for the first time that CV and GF mice exhibit different metabolic status after a control diet period also. Indeed, GF mice displayed lower glycemia, insulinemia, leptinemia, HOMA-IR index or epididymal fat than their CV counterparts indicating that the impact of the gut microbiota on host metabolism is only partially dependent of a high-fat diet.

We found that germ-free mice are significantly leaner than conventional mice on HFD. This observation is consistent with results obtained previously in our laboratory ([222]) and by other groups ([25]) on the same mouse strain (C57BL/6J). It seems that this phenomenon is strain-dependent, in fact, it appears that axenic C3H mice develop obesity after the administration of a HFD ([106]). However, differences in the composition of the diets used make it difficult to interpret these discrepancies. Studies comparing the response of different strains of axenic mice receiving the same treatment would be necessary to state whether the absence of microbiota protects against the development of obesity regardless of the host genotype.

Here we confirm that GF mice are resistant to HF-diet-induced insulin resistance. While leanness can significantly contribute to maintain insulin sensitivity in GF mice fed a HFD, the absence of the intestinal microbiota could be an independent factor contributing to the resistance against diet-induced insulin resistance. Indeed, it is possible to normalize glucose tolerance in obese mice without weight loss by a modulation of the composition of gut microbiota by antibiotics administration ([194]). The mechanisms behind development of IR are strongly associated with those behind hepatic steatosis, and it is not yet clear if the steatosis is a cause or a consequence of insulin resistance. Therefore, we suggested that germ-free mice would be protected against diet-induced steatosis as well as they are protected against insulin resistance. It appeared that germ-free mice are only partially protected against this steatosis. This reduction of hepatic triglycerides content in GF-HFD mice was associated with a global down-regulation of the hepatic lipid metabolism (ie. import, synthesis, consumption, export) in comparison with CV-HFD mice. In germ-free mice, the HFD induced an increased of hepatic triglycerides content concomitant with a decrease in the expression of genes involved in every pathway of the lipid metabolism. Nevertheless, the level of gene expression does not necessary correlate with enzymatic activities so that an increased activity of enzymes involved in the import of lipids and in lipogenesis may explain

this observation.

The results of this study open a series of new questions regarding the mechanisms by which the gut microbiota shapes the immune system and to which extent this influence has consequences on obesity-related disorders pathogenesis. Therefore, we found that IL6 but not TNF $\alpha$  plasma levels were strongly affected by the absence of the gut microbiota. Coherently, after the HFD period, IL-6 hepatic expression was lower in GF mice than in CV mice whereas the hepatic expression of TNF $\alpha$  was found similar. Using a different high-fat diet, we previously found reduced plasma TNF $\alpha$  concentrations in GF mice, and proposed that their ability to resist diet-induced IR could be due partially to low plasma TNF $\alpha$  concentrations ([222]). In the present study, our results suggest that the influence of the gut microbiota on cytokines expression and concentration may be affected by the type of diet used and that different mechanisms may explain the resistance of GF mice to diet induced metabolic disorders.

HFD did not lead to a notable systemic inflammation despite a 16-week treatment. Nevertheless, this HFD challenge increased the hepatic expression of TLR 2, 5 and 9, and the expression of a marker of the Kupffer cell's population. This was associated with an increase of their cytokine secretion levels indicating that the liver of CV mice may incline to inflammatory responses after this HFD period. In GF mice, HFD did not lead to an increased hepatic expression of TLR, nor to KC population enlargement indicating that these effects of the diet are dependent on the presence of the gut microbiota. Conversely, KC from GF mice were found more sensitive to LPS stimulation reflecting an absence of LPS tolerance due to the naïve condition of these cells. Given that KC inactivation abolishes diet-induced steatosis ([205]), we may speculate that the increased KC'cytokines secretion induced by HFD is a link between HFD and steatosis development in GF and CV mice.

In conclusion, the results presented indicate interactions between diet, gut microbiota and host's metabolism and further underline the impact of the absence of gut microbiota on diet induced metabolic disorders. Nevertheless, future studies are needed to decipher if different gut microbiota may differently influence the metabolic responses to high-fat feeding and then contribute to pathologies associated to obesity, including type 2 diabetes and NAFLD. Indeed, transfer of different gut microbiota to GF mice could help to answer this question and demonstrate the causal role played by the gut microbiota in the development of these diseases. Finally, extrapolations of our findings to humans may be speculative and future clinical studies are required to determine if the gut microbiota may be a new therapeutic target to prevent or treat these metabolic disorders.

## 2 La susceptibilité aux troubles métaboliques engendrés par un régime hyperlipidique est transmissible *via* un transfert de microbiote intestinal

### 2.1 Résumé

Le développement de l'obésité est le résultat de l'interaction de différents facteurs : génétiques, hormonaux, physiologiques et psychosociaux. Il y a quelques années, le microbiote intestinal a été identifié comme étant un facteur environnemental supplémentaire jouant un rôle dans le développement de l'obésité.

L'obésité est à l'origine de diverses complications, dont le diabète de type 2 et les stéatopathies non alcooliques. Néanmoins, il existe une inégalité devant la survenue de ces complications qui est indépendante du degré d'obésité. Nous nous sommes posé la question du rôle du microbiote intestinal dans cette inégalité. En effet, chaque individu a un microbiote qui lui est propre et il est possible qu'il joue un rôle dans la survenue de ces complications.

Chez les souris le même constat est posé : certaines souris développent des complications en réponse au régime hyper-lipidique et pas d'autres. Nous avons donc administré un régime hyper-lipidique à des souris de souche C57BL/6J pendant 16 semaines puis nous les avons phénotypées, ce qui a permis de les classer en deux groupes : les répondeuses et les non répondeuses.

Dans l'ensemble, le régime hyper-lipidique a induit chez les souris conventionnelles une obésité, une hyper-glycémie à jeun et un indice d'insulino-résistance (HOMA-IR) élevés. Nous avons sélectionné une souris qui présentait une glycémie à jeun, un indice HOMA-IR et un taux de TNF $\alpha$  nettement supérieurs à la moyenne, cette souris sera appelée par la suite souris répondeuse. Nous avons également sélectionné une souris qui présentait une glycémie à jeun et un indice HOMA-IR inférieurs à la moyenne, et un taux de TNF $\alpha$  presque indétectable, cette souris sera appelée non répondeuse. Nous avons pris soin de sélectionner des souris de même poids, afin de s'assurer que les différences de statut métabolique n'étaient pas la

conséquence d'un degré d'obésité différent. Sachant que chaque souris possède un microbiote qui lui est propre, l'objectif de cette étude est de répondre à la question suivante : est-ce que la diversité de la composition du microbiote intestinal explique la diversité de la réponse au régime hyper-lipidique ?

Pour répondre à cette question, nous avons transféré le microbiote intestinal de ces deux souris à deux groupes de 20 souris axéniques. Pour cela, les souris axéniques ont reçu le contenu cecal des souris donneuses par gavage intra-gastrique. Cette technique permet d'implanter un microbiote intestinal complexe, ce qui permet de mettre en évidence le lien de cause à effet entre le microbiote intestinal et le développement d'une pathologie. Les souris ayant reçu les microbiotes de souris répondeuses et non répondeuses sont alors appelées souris "receveuses" : les receveuses de la répondeuse (RR) et les receveuses de la non répondeuse (RNR).

Les souris receveuses ont à leur tour reçu le régime hyper-lipidique pendant 16 semaines avant d'être phénotypées. Nous avons comme chez les souris conventionnelles suivi la prise de poids et mesuré la glycémie à jeun, l'HOMA-IR et la concentration plasmatique de TNF $\alpha$ . Nous nous sommes par ailleurs plus spécifiquement intéressés à l'éventuel développement de NAFLD, avec une étude histologique et une mesure de l'expression hépatique de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides.

Les deux groupes ont développé une obésité comparable suite au régime hyper-lipidique. A l'issue des 16 semaines de régime, les souris RNR avaient une glycémie moyenne de  $104 \pm 20,5$  mg/dl tandis que les souris RR avaient une glycémie de  $134 \pm 28,7$  mg/dl. Le taux d'insulinémie était également plus faible chez les souris RNR, l'indice HOMA-IR était donc significativement différent chez les deux groupes (2,4 fois plus élevé chez les souris RR). Le taux de leptine était également plus élevé dans le groupe RR. Autrement dit, le métabolisme des receveuses répondeuse a été plus fortement altéré par le régime hyper-lipidique que les receveuses de la non répondeuse, ce qui démontre l'implication du microbiote intestinal dans la prédisposition ou la protection à l'insulino-résistance et donc peut-être au diabète de type 2.

L'analyse anatomopathologique du foie de ces souris a révélé que les deux groupes avaient développé des types et des stades de stéatose différents. Le degré de stéatose a été gradé de 1 à 4, les souris RR présentaient un score significativement plus élevé ( $2,7 \pm 1,2$  vs  $1,7 \pm 0,9$ ). Le dosage des triglycérides hépatiques a confirmé que les souris RNR ont développé une stéatose moins sévère que les receveuses de la répondeuse ( $4,8 \text{ E}^{-06} \pm 1,7 \text{ E}^{-06}$  vs  $6,2 \text{ E}^{-06} \pm 1,7 \text{ E}^{-06}$  mmol triglycérides / mg foie).

L'expression de 10 gènes impliqués dans le métabolisme hépatique des lipides a été mesurée par PCR quantitative. Quatre gènes étaient exprimés de manière différente dans les deux groupes de receveuses :

- FATP5, un transporteur d'AG était moins exprimé chez les receveuses de la répondeuse par rapport aux souris RNR. Toutefois, CD36, un autre transporteur de lipides,

présente une expression 2,6 fois plus élevée chez les souris RR.

- ACC1, une enzyme lipogénique est 2 fois plus exprimée chez les souris RR, de même que ChREBP, un facteur de transcription régulant les voies de la lipogenèse.

Ces résultats tendent à expliquer le plus fort degré de stéatose chez les receveuses de la répondeuse.

La composition du microbiote des deux groupes de receveuses a été analysée afin d'identifier les bactéries ayant potentiellement un effet délétère et/ou bénéfique sur la physiologie de l'hôte. L'analyse du microbiote par PCR-TTGE, une technique permettant d'obtenir des profils d'espèces bactériennes à partir d'échantillons complexes, a permis de constater qu'une espèce bactérienne était présente dans le mucus colique de toutes les souris RR et absente chez toutes les souris RNR. Le séquençage de la bande de TTGE associée ne correspond à aucune bactérie cultivable, l'espèce n'a donc pas pu être identifiée, elle appartient toutefois à la famille des *Lachnospiraceae*. Il est donc possible que cette espèce bactérienne soit à l'origine de la susceptibilité aux troubles métaboliques de la souris répondeuse, des expériences complémentaires sont toutefois nécessaires pour confirmer ce point.

Le microbiote des souris receveuses a également été analysé par FISH associée à la cytométrie en flux, ce qui a permis d'obtenir les pourcentages de 12 groupes ou espèces bactériennes dans les fecès. Il est apparu que le microbiote des receveuses de la non répondeuse était significativement plus riche en *Lactobacillus-Enterococcus*, en *Bacteroides*, en *Atopobium* et en *Akkermansia muciniphila* que les souris receveuses de la répondeuse. Ceci suggère un rôle protecteur de ces bactéries contre les pathologies induites par un régime hyper-lipidique. Toutefois, là encore, des expériences complémentaires sont nécessaires avant de confirmer ce point.

Le fait que la prédisposition à développer une hyper-glycémie et un indice d'insulino-résistance élevés indépendamment du poids puisse se transférer par une transplantation de microbiote intestinal démontre que le microbiote intestinal est un facteur environnemental à l'origine de la prédisposition aux pathologies métaboliques associées à l'obésité. A plus long terme, les résultats de cette étude permettent d'envisager une amélioration des pathologies métaboliques et hépatiques par une modulation de la composition du microbiote intestinal, ce qui peut se faire par l'administration d'antibiotiques, de probiotiques ou encore de prébiotiques, voire par transplantation de microbiote chez l'homme.

Cet article est actuellement en révision à Gastroenterology.

## 2.2 Gut microbiota transplantation demonstrates its causal role in the development of insulin resistance and fatty Liver

## Gut microbiota transplantation demonstrates its causal role in the development of insulin resistance and fatty Liver

Tiphaine Le Roy<sup>1</sup>, Marta Llopis<sup>1</sup>, Aurélia Bruneau<sup>1</sup>, Sylvie Rabot<sup>1</sup>, Claudia Bevilacqua<sup>2</sup>, Patrice Martin<sup>2</sup>, Francine Walker<sup>3</sup>, André Bado<sup>3</sup>, Gabriel Perlemuter<sup>4,5,6</sup>, Anne-Marie Cassard-Doulicier<sup>4,5</sup>, Philippe Gérard<sup>1 ‡</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France

<sup>2</sup> INRA, UMR1313 GABI, Plateforme de Microgénomique expressionnelle "Iso Cell Express" (ICE), F-78350 Jouy-en-Josas, France

<sup>3</sup> INSERM U773, UFR de Médecine Paris Diderot, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

<sup>4</sup> INSERM, U996, IPSIT, Clamart, F-92140, France,

<sup>5</sup> Université Paris-Sud, Faculté de médecine Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre, F-94270, France,

<sup>6</sup> AP-HP, Hôpital Antoine Bécclère, Service d'Šhépato-gastroentérologie, Clamart, F-92140, France,

‡ To whom correspondence should be addressed : Address : Micalis Institute, INRA (UMR1319), Team AMIPEM, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France

email : philippe.gerard@jouy.inra.fr . Telephone : +33 (0) 134 65 24 28. Fax : +33 (0) 134 65 24 62

### 2.2.1 Abstract

**BACKGROUND & AIMS :** Type 2 diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) are highly prevalent in obese people. In this study, we developed a strategy based on gut microbiota transplantation from conventional to germ-free mice to demonstrate the causal role of gut microbiota in these pathologies.

**METHODS :** Two donor C57BL/6J mice were selected on the basis of their responses to a high-fat diet (HFD). Although both mice were the same weight, one, named "responder", was hyperglycemic and displayed a high plasma concentration of pro-inflammatory cytokines. The other one, named "non-responder", was normo-glycemic and displayed a lower systemic inflammation level. Two groups of germ-free mice were colonized with the gut microbiota from the donor mice and then fed the same HFD.

**RESULTS :** Both receiver groups developed comparable obesity. The responder-receiver (RR) group developed fasting hyper-glycemia and insulin resistance whereas the non-responder-receiver (NRR) group remained normo-glycemic and sensitive to insulin. In contrast to NRR mice, RR mice developed hepatic macrovesicular steatosis, which was confirmed by a higher liver concentration of triglycerides and an increased expression of genes involved in de novo lipogenesis. Fluorescent in situ hybridization analysis revealed a lower percentage of *Lactobacillus-Enterococcus*, *Bacteroides*, *Atopobium* and *Akkermansia muciniphila* in the fecal microbiota of RR mice. Conversely, a species of Lachnospiraceae was identified in the mucus of the colon of all RR mice, suggesting that this bacterium could be involved in the pathological response of these mice to the HFD.

**CONCLUSION :** These findings demonstrate that different gut microbiota lead to different responses to HFD, demonstrating a causal role of the microbiota in the development of diabetes and NAFLD independently of obesity.

### 2.2.2 Introduction

The epidemic of obesity is a critical health issue because of the numerous associated metabolic diseases such as type 2 diabetes mellitus, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and cardiovascular diseases. Although obesity and associated diseases stem from the interaction of genetic and environmental factors, their main cause is caloric intake in excess to caloric expenditure. Given the inability of most individual to comply with sustained lifestyles changes, efforts focus on identifying new therapeutic targets for the treatment and the prevention of obesity-associated metabolic disorders. An increasing body of literature has recently been generated identifying gut microbiota as a new environmental factor contributing to obesity and metabolic diseases ([77]). First, Bäckhed et al ([25], [26]) showed that germ-free (GF) C57BL/6J mice gained less weight than conventional mice when given a sugar- and lipids-rich diet despite greater food consumption. Moreover, Rabot et al ([222])

observed that GF mice receiving a high-fat diet (HFD) showed enhanced insulin sensitivity with improved glucose tolerance and reduced insulinemia. Concurrently, colonization of GF mice by a gut microbiota from conventional mice produced an increase in body fat content ([25]). These authors also found more end-products of fermentation (acetate and butyrate) and fewer calories in the feces of obese mice, suggesting that the gut microbiota of obese mice allowed the extraction of more calories from ingested food. Finally, transplantation of cecal microbiota from ob/ob mice to GF wild-type recipients led to higher fat mass gain than in mice inoculated with the gut microbiota from lean donors ([263]). These results suggest that differences in caloric extraction from the diet may be determined by the gut microbiota composition, supporting a causal role of these bacteria in the pathogenesis of obesity. It also implies that the gut microbiota may be involved in pathologies frequently associated with obesity, including diabetes or NAFLD ([48]).

The major consequences of HFD are the development of metabolic syndrome features such as obesity, insulin resistance, liver disease, dyslipidemia and hypertension. NAFLD is considered the hepatic manifestation of metabolic syndrome and refers to a spectrum of liver damages ranging from simple steatosis to nonalcoholic steatohepatitis, advanced fibrosis, cirrhosis or even hepatocellular carcinoma. NAFLD is characterized by a disturbed hepatic lipid metabolism the first manifestation of which is an accumulation of triacylglycerol in hepatocytes, ie. steatosis. Steatosis is frequently associated with insulin resistance and low grade systemic inflammation ([127]).

HFD feeding is widely used in rodents to study the onset and progression of insulin resistance and obesity. However, the HF-induced phenotype varies distinctly, even within a group of animals with the same genetic background ([145], [174]), indicating that other environmental factors are involved in the pathophysiology of obesity and diabetes. We therefore hypothesized that the variability of the composition of the gut microbiota could explain the diversity of response to HFD. Gut microbiota of humans and mice are more than 95% made up of three phyla : Firmicutes, Bacteroides and Actinobacteria. In contrast to the poor diversity at the phylum level, the species level displays a high diversity with an average human microbiota estimated at 200 prevalent bacterial species and up to 1000 less-common species ([173]). Importantly, in humans but also in mice, the bacterial species profiles are unique for each individual ([299]).

In the present work, we selected two conventional mice with opposite responses to HFD and performed gut microbiota transplantations from these two donor mice to two groups of GF mice. In this way, we demonstrated that different gut microbiota lead to different metabolic responses to a HFD and that susceptibility to diet-induced insulin resistance and steatosis are transmissible via gut microbiota transplantation.

### 2.2.3 Material and methods

#### Animal Experimentation

Stage 1 : 8-week-old conventional male C57BL/6J mice (Janvier, Le Genest St. Isle, France) were fed for 16 weeks a sterilized high-fat diet containing 40% butter and 2.5% soy oil (60% energy from fat, SAFE, Augy, France) ad libitum. Body weight was monitored weekly.

Stage 2 : germ-free (GF) male C57BL/6J mice were reared from GF breeding pairs in GF isolators at ANAXEM, the GF animal facilities of Micalis Institute (INRA, Jouy-en-Josas, France). Two groups of GF mice were colonized with the gut microbiota of two conventional mice from stage 1 according to the following procedure. The cecal content of donor mice was collected immediately after euthanasia and diluted in LCY (Liquid Casein Yeast) medium (1 :100 w/vol) in an anaerobic chamber. Colonisation was achieved by oral-gastric gavage of the diluted cecal content. GF mice were switched from chow to HFD one week before the colonization and were then fed the HFD ad libitum for an additional 16 weeks after colonization.

All mice were anaesthetized with isoflurane. Liver portions were properly collected for subsequent analysis of liver histology, quantification of gene expression and measurement of liver triglycerides. Procedures were carried out in accordance with the European guidelines for the care and use of laboratory animals and with permission 78-60 of the French Veterinary Services.

#### Measurement of plasma parameters

After 16 weeks of diet, blood taken from the retro-orbital sinus was collected into chilled heparincoated tubes after 6h of fasting. Blood glucose was measured using an Accu-Check glucometer (Roche Diagnostics). The remaining blood was then centrifuged at 10,000 g for 10 minutes. Plasma was aliquoted and frozen at -80°C until analysis.

Alanine and aspartate aminotransferases (ALT and AST, respectively) were determined using an OLYMPUS AU400 robot. Plasma insulin, leptin, resistin, chemokine ligand 2 (CCL2)/ monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukine-6 (IL6) concentrations were assayed using a Luminex 100 IS system (Luminex Corporation) with a MILLIPLEX MAP Mouse Serum Adipokine Panel kit (Millipore). Insulin resistance was assessed by homeostatic model assessment (HOMA-IR) : fasting serum glucose (mg/dL) x insulin (mU/L) / 405.

#### Measurement of Liver Triglycerides

Portions of frozen liver from receiver mice were homogenized in chloroform-methanol (2 :1) in order to extract total lipids according to Folch et al methodology ([109]). The organic extract was dried and reconstituted in isopropanol. Triglyceride content was measured

with a triglycerides determination kit (Sigma-Aldrich, Saint-Louis MO) according to the manufacturer's instructions.

### **Liver histology**

Thin slices of formaldehyde-fixed, paraffin-embedded liver tissue were stained with hematoxylin and scored for severity of the steatosis and inflammation by an experienced pathologist (FW) blinded to the experiments. Steatosis was assessed according to the percentage of hepatocytes presenting macrovesicular steatosis multiplied by the intensity of the steatosis of the concerned hepatocytes (from 1 to 4).

### **Gene Expression Analysis by quantitative PCR**

Livers of the receiver mice were disrupted in RNA-PLUS solution (QBiogene). Total RNA was extracted from the crude extract using an improved and simplified modification of Chomczynski's procedure ([63]). RNA concentration and purity were determined using the Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher scientific) at wavelength 260/280 nm and RNA integrity was determined with the Agilent bioanalyzer 2100 system with the RNA 6000 Nano LabChip kit. Samples with an RNA Integrity Number (RIN) ([240]) inferior to 8 on a scale ranging from 0 to 10 were eliminated.

Total RNA (2 µg per reaction) was reverse transcribed into cDNA by using a High-Capacity cDNA Reverse transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. Thereafter, half of the product of each RT reaction was added to an equal volume of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and then loaded on a TaqMan Low Density Array (TLDA) card (Applied Biosystem). The TLDA card was centrifuged twice for 1 min at 330g before being sealed. PCR amplification was performed using an Applied Biosystems Prism 7900HT Sequence Detection System. Data were analyzed using the SDS version 2.2 software (Applied Biosystems) where baseline and threshold settings were automatically adjusted. Statistical analysis was performed using DataAssist v2.0 (Applied Biosystem). The relative gene expressions were normalized to three reference genes : 18S, gapdh and ubc2, chosen in the basis of results obtained from TaqMan Mouse Endogenous Control Arrays (Applied biosystems). The NRR group was used as a reference for relative expression of genes in the liver.

### **Analysis of the gut microbiota composition by Fluorescent in Situ Hybridization combined with Flow Cytometry (FISH-FCM)**

After 16 weeks of HFD, fecal samples were collected from receiver mice and analyzed by FISH-FCM as previously described ([124]). The 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes used in this study are listed in TAB 1. These probes were used to assess the relative

Probe	Sequence (5' → 3')	Target	Fluorochrom	Reference
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	domain Bacteria	5'FITC	Amann <i>et al.</i> [9]
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	domain Bacteria	5'CY5	Amann <i>et al.</i> [9]
NonEub338	ACATCCTACGGGAGGC	none	5'FITC	Wallner <i>et al.</i> [274]
NonEub338	ACATCCTACGGGAGGC	none	5'CY5	Wallner <i>et al.</i> [274]
Erec482	GCTTCTTAGTCAGGTACCG	<i>Clostridium</i> <i>coccoides</i> group	5'CY5	Franks <i>et al.</i> [111]
Clep1156	GTTTTTRTCAACGGCAGTC Comp 1 GRTTTRTCAYCGG- CAGTC* Comp 2 GTVTTRTCBACGG- CAGTC*	<i>Clostridium leptum</i> sub- group	5'CY5	Saunier <i>et al.</i> [234]
Ato291	GGTCGGTCTCTCAACCC	<i>Atopobium</i> cluster	5'CY5	Harmsen <i>et al.</i> [130]
Bac303	CCAATGTGGGGGACCTT	<i>Bacteroides-Prevotella</i> group	5'CY5	Manz <i>et al.</i> [188]
Bif164	CATCCGGCATTACCACCC	<i>Bifidobacterium</i> genus	5'CY5	Langendijk <i>et al.</i> [165]
Enter1432	CTTTTGCAACCCACT	Enterobacteria	5'CY5	Sghir <i>et al.</i> [243]
Ecy1387	CGCGGCATTGCTCGTTCA	<i>Erysipelotrichi</i>	5'CY5	Harmsen <i>et al.</i> [129]
Muc1437	CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT	<i>Akkermansia mucini- phila</i>	5'CY5	Derrien <i>et al.</i> [80]
MIB661	GCATTCCGCATACTTCTC	Mouse Intestinal Bacte- ria	5'CY5	Salzmann <i>et al.</i> [229]
Lab158	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	<i>Lactobacillus- Enterococcus</i>	5'CY5	Harmsen <i>et al.</i> [128]

\*Y = C/T, R = G/A, K = G/T, M = C/A, W = A/T, B = C/G/T and V = G/C/A

TABLE 1 – Designations, sequences and targets of probes used in fluorescent in situ hybridization experiments

proportions of ten phylogenetic groups : *Clostridium coccoides*, *Bacteroides*, *Clostridium leptum*, *Atopobium*, *Enterobacteria*, *Lactobacillus-Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Akkermansia muciniphila*, *Erysipelotrichi* and Mouse Intestinal Bacteria. Results were expressed as cells hybridizing with the group probe as a proportion of the total bacteria hybridizing with the general Eub338 probe.

### Analysis of the mucosal bacterial profile by PCR-Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis (PCR-TTGE)

Colons of receiver mice were opened and meticulously washed with sterile physiological saline solution. The colonic mucosa was then scraped and frozen. Next, mucosa samples were used to extract total DNA as previously described ([119]). Afterwards the V6-V8 region of

16S rRNA gene was amplified using the HotStar Master Mix Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Amplicons were then analyzed by TTGE as previously described ([123]). Analyses of the TTGE profiles were performed using GelCompar software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). TTGE band extraction and sequencing were performed as previously described ([227]). The sequences obtained were compared to publically available 16S rDNA sequences by nucleotide BLAST (GenBank, NCBI).

### Statistical analyses

Results are represented as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney-Wilcoxon or Student t tests (StatView, SAS Institute Inc, Cary, USA).  $P < .05$  was considered as statistically significant.

## 2.2.4 Results

### Selection of the responder and non-responder donor mice

Conventional mice of the strain C57BL/6J were fed a HFD ad libitum for 16 weeks. HFD treatment led to varying body weights ranging from 33.6 to 47.0 g, with an average final body weight of  $39.0 \pm 3.9$  g (TAB 2). Similarly, fasting glycemia, fasting insulinemia and plasma TNF $\alpha$  and IL-6 levels were found to be disparate among the cohort (TAB 2). Therefore, only several mice developed insulin resistance and systemic inflammation whereas other remained insulin sensitive and did not display systemic inflammation. Interestingly, this susceptibility to develop diet-induced metabolic disorders was not correlated to the body weight. In order to determine whether the diversity of the composition of the gut microbiota explained this diversity of responses to HFD, we selected from this cohort one responder mouse with high levels of insulin-resistance and pro-inflammatory cytokines and one non-responder mouse with low levels of insulin-resistance and pro-inflammatory cytokines (TAB 2). The chosen donor mice were of similar weights to make sure that the differences of metabolic parameters were not the consequence of a different weight.

### The two groups of receiver mice developed comparable obesity but different metabolic statuses

Two groups of GF male C57BL/6J mice were colonized by gavage with the inocula prepared from the two selected donor mice (conventionalization). The two conventionalized groups were then named non-responder receivers (NRR) and responder-receivers (RR) and were subsequently maintained in isolators. After 16-week HFD feeding, both groups showed similar body weight gains and final body weights (FIG. 1a). Conversely, they displayed significantly different fasting glycemia ( $104.4 \pm 26.6$  mg/dL for NRR vs  $134 \pm 34.1$  mg/dL

	body weight gain	final body weight	fasting glycemia	fasting insulinemia	HOMA-IR	MCP-1	TNF- $\alpha$
	(g)	(g)	(mg/dL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)
Mean among the cohort	15.3 $\pm$ 3.3	39 $\pm$ 3.9	164 $\pm$ 39	1944 $\pm$ 820	19.46 $\pm$ 9.58	36.2 $\pm$ 47.1	5.4 $\pm$ 4.4
Responder donor	17.6	40.2	191	3673	42.94	199	13.1
Non Responder donor	15.7	39.4	90	2054	11.31	4	3.5

TABLE 2 – Metabolic status of conventional and donor mice fed the high fat diet

for RR) (FIG. 1b). Concurrently, the fasting insulinemia was lower in NRR mice than in RR mice ( $665.2 \pm 358.9$  g/mL vs  $1072.4 \pm 469.4$  pg/ml) (FIG. 1c). The HOMA-IR index (FIG. 1d) was coherently 2.4 fold greater in the RR group than in the NRR group, indicating that the two groups developed different levels of insulin resistance. The leptinemia (FIG. 1e) was 75% higher in RR than in NRR mice, whereas the level of resistin was not significantly different in the two groups (data not shown).

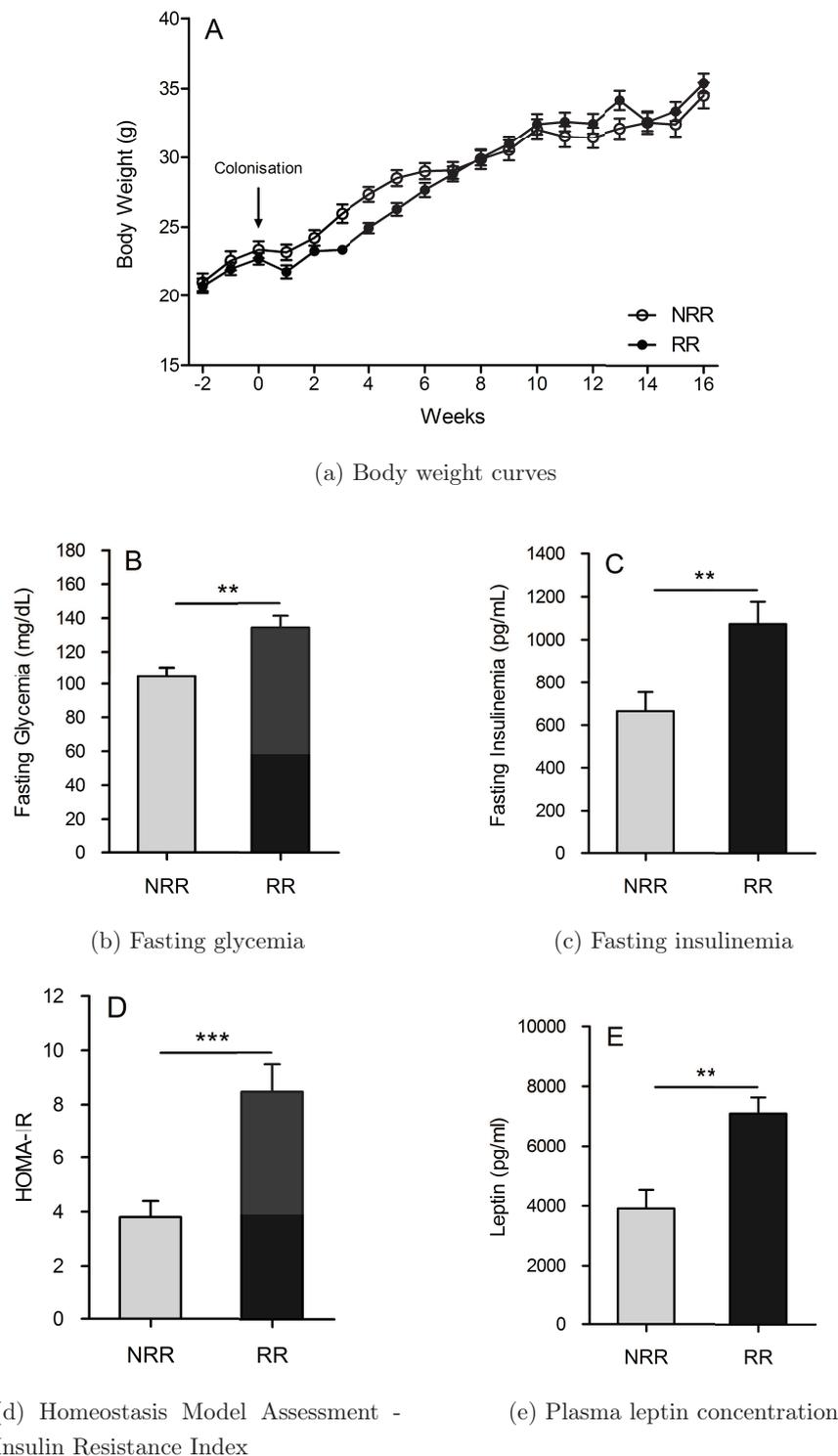


FIGURE 1 – Metabolic responses to HFD of Non Responder Receiver (NRR) and Responder Receiver (RR) mice. All mice were fasted for 6h before blood sampling. Data are mean  $\pm$  standard deviation, n=18 for NRR and n=22 for RR mice. \*\* P < .01; \*\*\* P < .001 (Student's t test)

	Triglycerides (g/L)	Total Cholesterol (g/L)	HDL-cholesterol (g/L)	IL-6 (pg/mL)	TNF $\alpha$ (pg/mL)
Non Responder Receivers	1.10 $\pm$ 0.26	4.5 $\pm$ 1.2	3.2 $\pm$ 0.8	8.8 $\pm$ 2.2	1.1 $\pm$ 1.5
Responder Receivers	1.04 $\pm$ 0.25	4.9 $\pm$ 1.1	3.4 $\pm$ 0.8	15.5 $\pm$ 12.9	1.4 $\pm$ 1.9

TABLE 3 – Plasma lipid and pro-inflammatory cytokines concentration in receiver mice after 16 weeks of high fat diet

The AST plasma concentration was 3 times higher in RR mice than in NRR mice ( $433.0 \pm 201.2$  vs  $135.9 \pm 73.7$  UI/l,  $P = .0058$ ), whereas the difference did not achieve statistical significance ( $68.5 \pm 56.8$  vs  $38.1 \pm 34.4$  UI/l,  $P = .0786$ ) for ALT concentrations. Fasting plasma concentrations of cholesterol and high density lipoproteins were similar in the two groups (TAB 3).

### Responder-receiver mice accumulated more triglycerides in the liver than non-responder receiver mice

As shown in figure 2a to 2d, liver histological analysis showed that the NRR group developed a slight to mild steatosis (FIG. 2a) whereas the RR group developed a marked mixed or macrovesicular steatosis (FIG. 2b). The steatosis score was found to be higher in RR than in NRR mice ( $3.00 \pm 0.87$  vs  $1.50 \pm 0.61$ ) (FIG. 2c). Consistent with the morphological changes in the lipid deposition, the liver triacylglycerol concentration was 30% higher in RR than in NRR mice (FIG. 2d). No inflammatory infiltrate was observed.

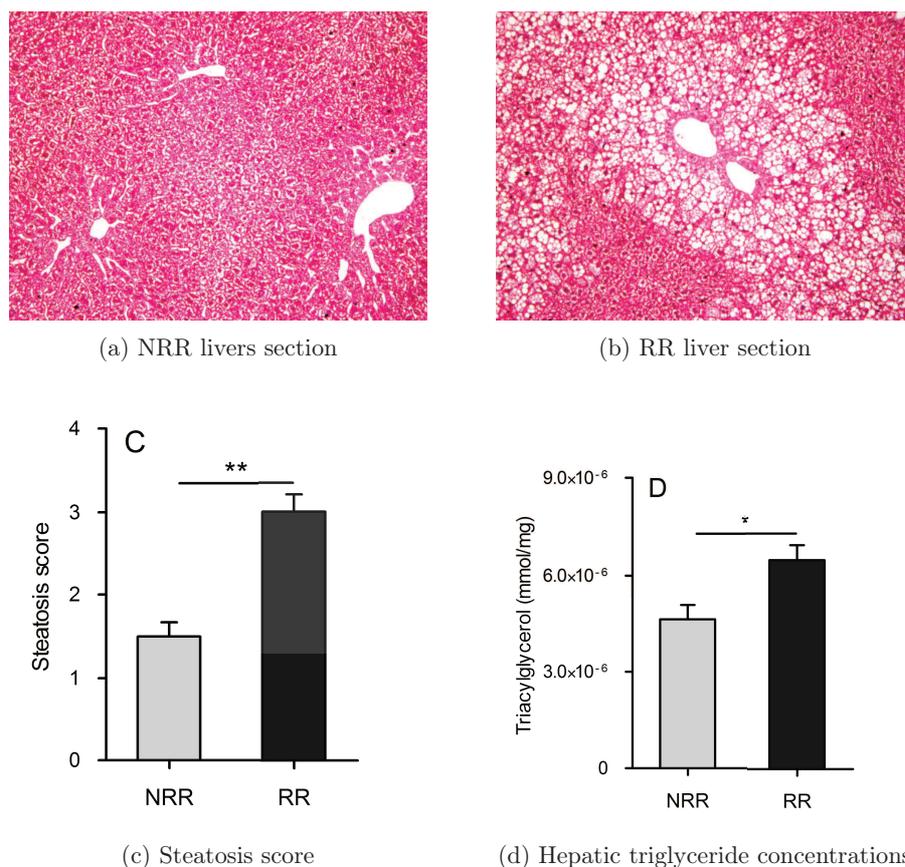


FIGURE 2 – Representative hematoxylin and eosin stains of paraformaldehyde-fixed liver sections prepared from NRR (a) and RR mice (b). The steatosis score corresponds to the percentage of hepatocytes presenting macrovesicular steatosis multiplied by the intensity of the steatosis of the concerned hepatocytes (c) and hepatic triglyceride concentrations (mmol of triglycerides per mg of liver) (d). Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation, n=18 for NRR and n=22 for RR mice. \*  $P < .05$ ; \*\*  $P < .01$  (Student's t test)

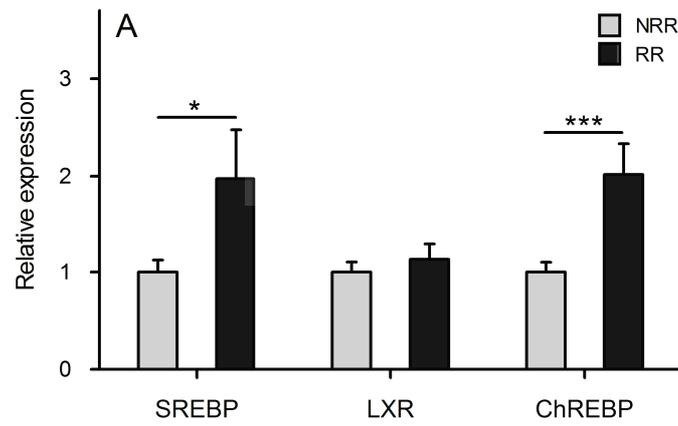
### Responder-receiver mice displayed a steatosis-prone hepatic metabolism in contrast to non-responder-receiver mice

We analyzed hepatic expression of genes involved in lipid uptake, lipogenesis, fatty acid catabolism and very-low-density lipoprotein (VLDL) export. The relative expressions of the transcription factors SREBP1c (Sterol Regulatory Binding Protein 1c), LXR (Liver X Receptor) and ChREBP (Carbohydrate Response Element Binding protein) are shown FIG. 3a. These nuclear factors are known to promote de novo lipogenesis<sup>19</sup>. The expression of SREBP1c and ChREBP was 1.97 and 2.02 greater in the RR group than in the NRR group, whereas no difference was found in the expression of LXR in the two groups of mice.

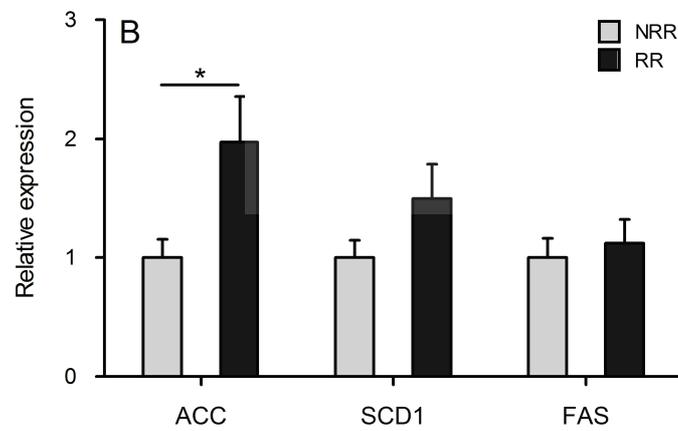
The relative expressions of three lipogenic enzymes (Acetyl-CoA Carboxylase 1 (ACC1), Stearoyl- CoA desaturase 1 (SCD1) and Fatty Acid Synthase (FAS)) are shown in FIG. 3b. SCD1 and FAS were not differently expressed in the two groups of mice. Conversely, ACC1

appeared to be upregulated in RR mice (fold-change 1.97).

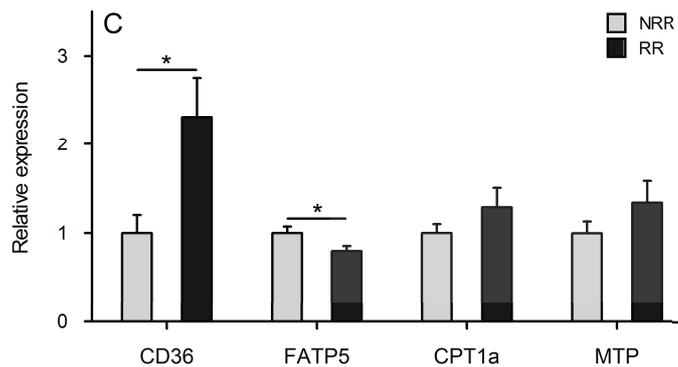
CD36, which imports a large variety of lipids and lipoproteins, was more highly expressed in RR than in NRR mice (fold-change 2.32). On the contrary, FATP5 (Fatty Acid Transport Protein 5), which essentially transports long chain fatty acids, was slightly but significantly down-regulated (fold-change 0.80). No differences were found between the two groups of mice in the mRNA levels of CPT1a (Carnitine PalmytoTransferase 1a), a transport protein which regulates mitochondrial  $\beta$ -oxidation, and MTP (Membrane Transport Protein), a protein exerting a central regulatory role in lipoprotein assembly and secretion (FIG. 3c).



(a) Transcription factors



(b) Lipogenic enzymes

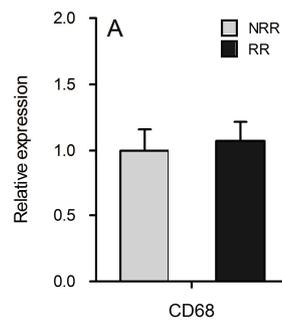


(c) Lipids transporters

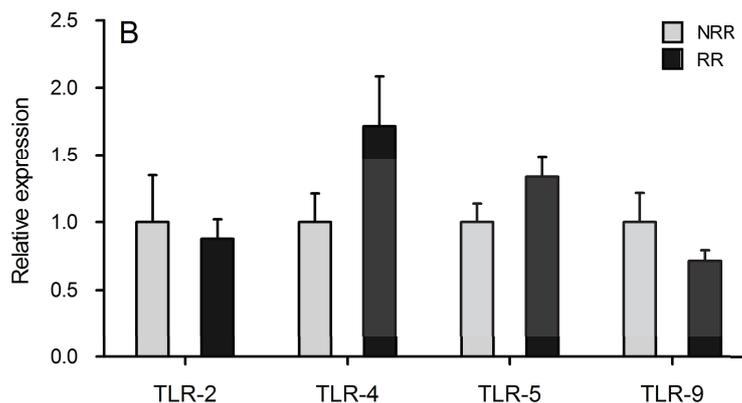
FIGURE 3 – Relative hepatic gene expression analyses of transcription factors (a), lipogenic enzymes (b) and lipids transporters (c). Results were normalized on the NRR group. Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation, n=14 for NRR and n=16 for RR mice. \* P < .05; \*\*\* P < .001

**No major differences in systemic and hepatic inflammations were detected between the two groups of receiver mice**

Systemic inflammation was evaluated by assaying the plasma concentration of two pro-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$  and IL-6), whose levels were notably higher in responder donor mouse than in nonresponder donor mouse. Although RR mice displayed higher plasma concentrations of these cytokines than NRR mice, differences did not reach statistical significance (TAB 3). We then focused specifically on liver inflammation by assaying the hepatic expression of cytokines, markers of liver macrophages and toll-like receptors (TLRs). The relative expression of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TGF $\beta$  were found to be similar in the two groups of mice (TAB 4). Likewise, expressions of CD68 (a marker of macrophages), and TLRs (TLR-2, TLR-4, TLR-5 and TLR-9) which play a central role in innate immune system by recognizing bacterial components leading to activation of immune response, appeared to be equivalent in NRR and RR mice (FIG. 4a et 4b). Altogether these results indicate that systemic and hepatic inflammations were similar in RR and NRR mice.



(a) relative hepatic expression of CD68



(b) relative hepatic expression of TLRs

FIGURE 4 – Relative hepatic gene expression analyses of a macrophage infiltration marker : CD68 (a), and Toll-like Receptors 2, 4, 5 and 9 (b). Results were normalized on the NRR group. Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation, n=14 for NRR and n=16 for RR mice.

	TNF $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-10	TGF $\beta$
Non Responder Receivers	1.00 $\pm$ 0.69	1.00 $\pm$ 0.49	1.00 $\pm$ 0.87	1.00 $\pm$ 0.44	1.00 $\pm$ 0.34
Responder Receivers	0.59 $\pm$ 0.32	1.12 $\pm$ 0.61	1.35 $\pm$ 1.08	0.73 $\pm$ 0.35	1.38 $\pm$ 0.62

TABLE 4 – Hepatic relative expression of cytokines in receiver mice

***Bacteroides*, *Atopobium*, *Lactobacillus-Enterococcus* and *Akkermansia muciniphila* are under-represented in receiver-responder mice**

At the end of the HFD period, composition of the fecal microbiota of the receiver mice was analyzed by FISH-FCM using a panel of probes targeting 10 bacterial groups of the gut microbiota (Supplementary table 1). The probe panel used allowed the detection of 87.91  $\pm$  8.82% (NRR) and 81.93  $\pm$  9.89% (RR) of total bacteria detected by the probe Eub338. Four bacterial groups were found significantly underrepresented in the RR group, suggesting these bacterial groups may exert a protective effect against development of metabolic disorders. The NRR group harbored significantly more *Lactobacillus-Enterococcus* than the RR group (31.3  $\pm$  22.3% vs 22.3  $\pm$  8.3%) (FIG. 5a). NRR mice also harbored more *Atopobium* (4.8  $\pm$  4.3% vs 1.4  $\pm$  1.1%) (FIG. 5b), *Bacteroides-Prevotella* (4.7  $\pm$  1.3% vs 2.7  $\pm$  2.0%) (FIG. 5c), and a three-fold higher percentage of *Akkermansia muciniphila* than RR mice (0.18  $\pm$  0.08% vs 0.06  $\pm$  0.04%) (FIG. 5d). No differences between the two groups of mice were found for the six other targeted groups (*Bifidobacteria*, *Clostridium coccoides*, *Clostridium leptum*, *Enterobacteria*, *Erysipelotrichi* and Mouse Intestinal Bacteria) (TAB 5).

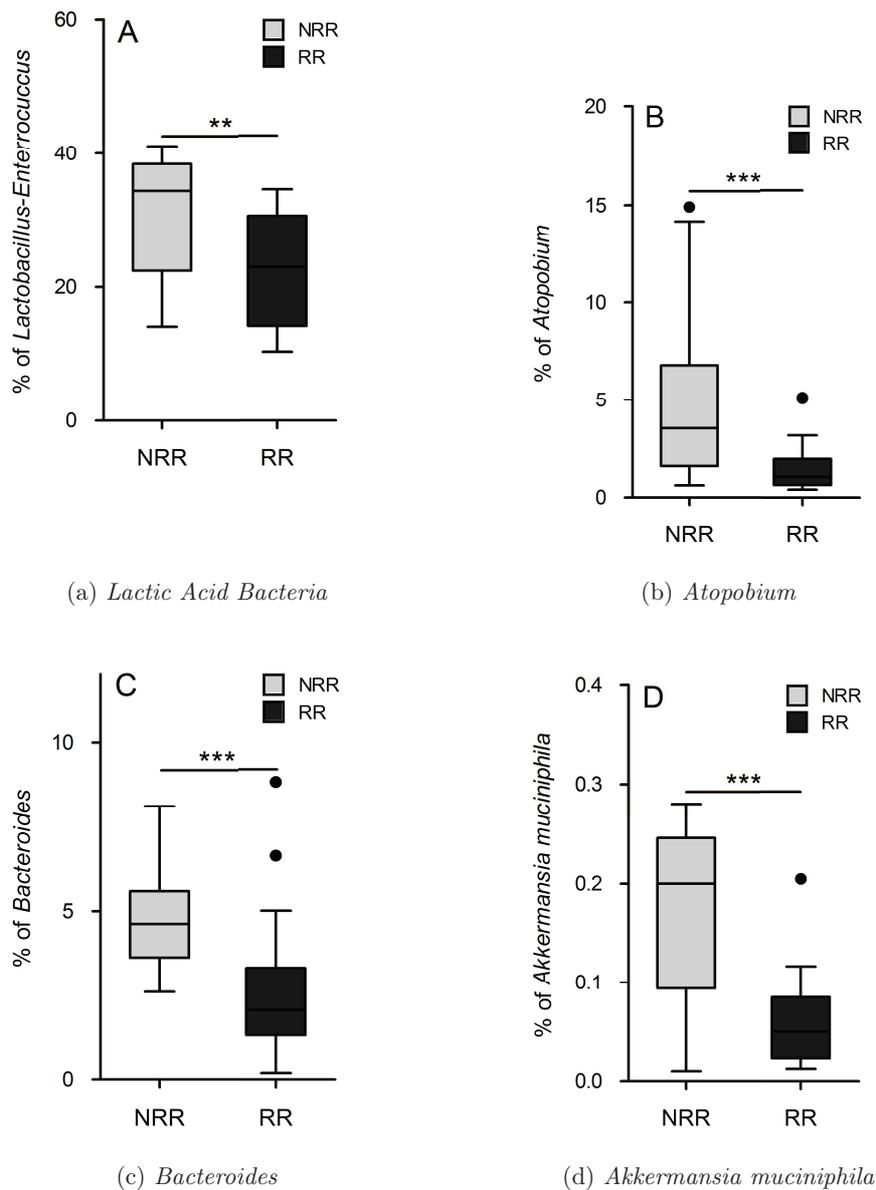


FIGURE 5 – Composition of the fecal microbiota of NRR and RR mice based on FISH analysis. Results are expressed as percentages of the total cells detected by the bacterial domain probe Eub338. *Lactic Acid Bacteria* (a), *Atopobium* (b), *Bacteroides* (c) and *Akkermansia muciniphila* (d). Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation, n=18 for NRR mice and n=22 for RR mice. \*\* P < .01; \*\*\* P < .001 (Mann-Whitney test)

## TTGE

In order to identify bacterial species associated with the responder or non-responder phenotypes, we performed TTGE analysis on the colonic mucosa of NRR and RR mice. All mice displayed similar bacterial diversity (FIG. 6). A band was systematically detected in

	<i>Bifidobacteria</i> (%)	<i>Clostridium</i> <i>coccoides</i> (%)		<i>Clostridium</i> <i>leptum</i> (%)	<i>Entero-</i> <i>bacteria</i> (%)	<i>Erysipe-</i> <i>lotrichi</i> (%)	<i>Mouse</i> <i>Intestinal</i> <i>Bacteria</i> (%)
Non Respon- der Receivers	0.67 ± 0.40	29.55 6.65	±	3.42 ± 0.95	0.01 ± 0.01	1.00 ± 0.34	0.25 ± 0.11
Responder Receivers	0.59 ± 0.32	30.22 7.69	±	3.88 ± 1.18	0.02 ± 0.02	1.38 ± 0.62	0.32 ± 0.15

TABLE 5 – Composition of the fecal microbiota of NRR and RR mice based on FISH analysis.

all RR mice but not in NRR mice. This band was isolated from three different lanes, DNA was extracted and amplified. Sequence analysis of amplicons from these bands revealed that they all contained the same sequence corresponding to an unclassified *Lachnospiraceae*, the closest isolate relative being *Clostridium scindens* and *Clostridium glycyrrhizinilyticum* (90% and 89% identity, respectively). The sequence has been deposited in the GenBank database under accession number JN648380.

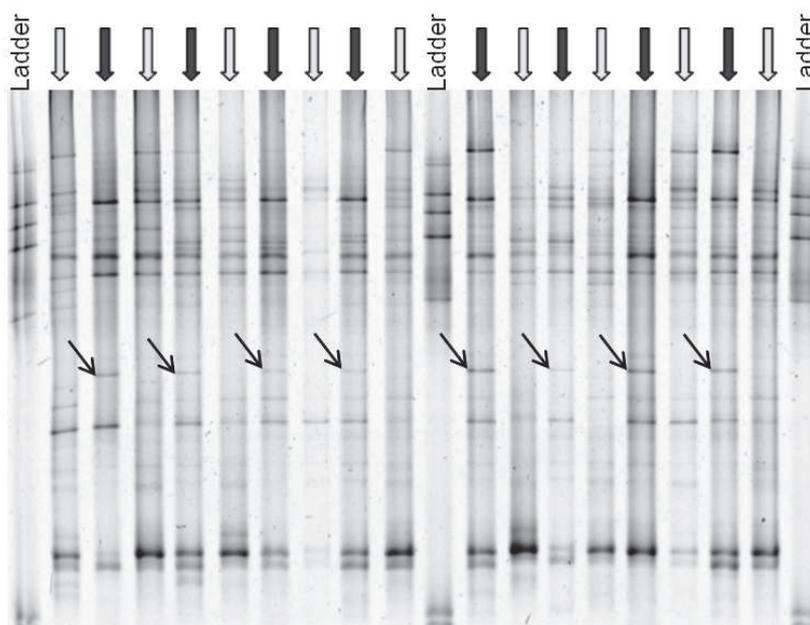


FIGURE 6 – TTGE fingerprint patterns of the colonic mucus microbial community of NRR (light grey arrows) and RR mice (dark grey arrows). The TTGE profiles were obtained using primers targeting all bacteria. Thin arrows (→) indicate the band corresponding to the RR-specific species. n=8 for NRR and n=8 for RR mice

## 2.2.5 Discussion

HFD feeding is extensively used in rodents for developing the obese phenotype and associated metabolic disorders. In fact, these models are considered more relevant to human metabolic diseases than models of gene inactivation ([104]). Nevertheless, wide variations in

the susceptibility to develop HFD-associated features have been observed ([145], [174]) and the factors that make some rodents susceptible and others resistant to metabolic disorders induced by HFD are still indefinite. Using GF animal models, we and others have previously demonstrated that mice devoid of gut microbiota are resistant to diet-induced obesity and insulin resistance ([25], [222]). Like humans, each conventional mouse harbors a unique gut microbiota which means that different catalogues of genes are present in the intestine of different mice. Therefore, we hypothesized that differences in gut microbiota composition may contribute to the resistance or susceptibility to HFD-induced metabolic disorders. In the present study, we first submitted mice of a common biological lineage to the same HFD and laboratory environment and obtained, as expected, heterogeneous responses including variable weight gain, insulin resistance and systemic inflammation levels. In order to study the link between gut microbiota variability and metabolic responses variability, we inoculated two groups of GF mice with the caecal microbiota of two mice the responses of which to HFD challenge were discrepant. The outcomes of HFD feeding were found to be different in these two groups of mice associated with distinct microbiota, demonstrating the causal role of the gut microbiota in the susceptibility to develop metabolic disorders.

We characterized the microbial community of the receiver mice using two culture-independent techniques. FISH analyses allowed us to assess nearly the whole gut microbiota composition. Interestingly, the *Lactobacillus-Enterococcus* and *Bacteroides* groups, as well as *Atopobium* and *Akkermansia muciniphila* were found overrepresented in the NRR mice suggesting that these bacteria may exert protective effects against metabolic disorder development. Our results further imply that a dysbiosis, characterized by the absence of bacterial species exerting beneficial effects, may favour the occurrence of pathologies as previously proposed for Crohn's disease ([249]). The only significant difference observed in the gut microbiota of human adults with type 2 diabetes compared to non-diabetic subjects was a reduction of *Clostridia* ([166]). Alternatively, a dysbiosis may also enable the colonisation of the gut by a pathogen-like bacterial species. Further investigations are still needed to identify bacterial species, components or metabolites required to maintain homeostasis.

Several studies have revealed that the mucosa-associated microbiota differs from the faecal communities in humans and rodents and is stable along the distal digestive tract ([170], [268], [303]). Moreover, bacterial species with adherence properties may expose the host to bacterial components such as metabolites and antigens, and therefore have a greater potential to influence host health via crosstalk with gut epithelial and immune cells ([85]). Indeed, the elective capacity of segmented filamentous bacteria to adhere to the ileal mucosa accounts for their key role in the development of adaptive immune responses ([112]). Here, we have identified a yet uncultured *Lachnospiraceae* species that was systematically present in the colonic mucus layer of RR mice and absent in NRR mice. Interestingly, Blast analyses revealed that the same sequence had previously been obtained in gut microbiota transplantation experiments, in the cecal contents of the ob/ob donor and wild-type recipients associated with increased body fat ([263]). This finding strongly supports our hypothesis, suggesting

that this bacterial species could be a player in the yet undefined mechanisms linking the gut microbiota to the development of metabolic diseases.

We have demonstrated that GF mice are resistant to diet induced insulin resistance ([222]). In the present study, we further reveal that insulin resistance is a transmissible feature via gut microbiota transplantation demonstrating that distinct gut microbiota differently impact the host glycemic metabolism. We also observed that NRR and RR mice displayed similar body and fat pad weights but differences in glycemic status indicating that insulin resistance is likely to result from separate mechanisms from those responsible for obesity. This observation highlights the existence of additional mechanisms to the "LPS hypothesis" in which gut bacterial lipopolysaccharides would be a triggering factor of both obesity and insulin resistance ([112]). These authors demonstrated that HFD-fed mice developed insulin resistance and inflammation by a mechanism directly dependent on LPS. In our study, different microbiota lead to different IR levels whereas inflammation status was found similar in NRR and RR mice. Therefore, our results rather suggest that, besides LPS, other factors may link gut microbiota to metabolic diseases and that the gut microbiota impacts more than one node within the metabolic network controlling host energy metabolism. Our results further indicate that gut microbiota is a contributing factor to insulin resistance independently of obesity and inflammation. This confirms a previous study demonstrating that modulation of gut microbiota using antibiotics in a diet-induced obesity mice model showed a significant improvement of fasting glycemia and insulin resistance independently of food intake or adiposity ([194]). Additionally, improved insulin sensitivity was found to correlate with reduced hepatic lipogenesis and steatosis in these antibiotics treated mice ([194]), implying that the influence of the gut microbiota on host metabolism may be a consequence of its impact on liver functions and activities.

Mice lacking TNF $\alpha$  or TNF receptors have improved insulin sensitivity in both dietary and genetic models of obesity ([267]), suggesting a causal role of TNF $\alpha$  in insulin resistance. Moreover, as GF mice fed a HFD were previously shown to display reduced plasma TNF $\alpha$  concentrations than their conventional counterparts, it was proposed that their ability to resist diet-induced IR could be due partially to low plasma TNF $\alpha$  concentrations ([222]). Our results, showing different IR levels but similar TNF $\alpha$  plasma concentrations and hepatic expression levels indicate rather that the impact of our two different transplanted microbiota is independent of TNF $\alpha$ . Overall, all parameters related to inflammation were similar in the two receiver groups in our study and were then unaffected by transplantation of different gut microbiota. This indicates that in our conditions the gut microbiota affects host metabolism via mechanisms that may be independent of the immune system. This finding opens new perspectives in the field indicating that gut communities are able to drive host metabolism by cross-talk mechanisms still unknown that seem to be independent of a systemic proinflammatory state.

Dysregulation of hepatic metabolism has been implicated in the development of NAFLD. Nevertheless, a high-fat diet, which causes increased influx of fatty acids without pri-

mary impairment of VLDL export, induced merely steatosis, but not liver inflammation.<sup>31</sup> Fatty acid accumulation in the liver is a consequence of the inhibition of fatty acid oxidation, increased de novo lipogenesis, increased lipid uptake, or reduced lipid export via VLDL. Previous studies have demonstrated that GF mice display increased fatty acid oxidation and decreased lipogenesis ([25], [26], [222]). Our results from gene expression in the liver indicate that the increased steatosis observed in the liver of RR mice results mainly from increased lipid uptake and de novo lipogenesis. The increased processing of energy metabolites in the liver may reflect increased energy availability due to higher energy harvest from the diet in the RR gut microbiota, as was previously demonstrated for the gut microbiota from ob/ob mice ([263]). Indeed, the RR microbiota could lead to increased substrate influx to the liver in the form of short-chain fatty acids (SCFA) from the colon ([29]) which are known to stimulate de novo synthesis of triglycerides in the liver. Similarly, the gut microbiota of obese individuals has increased fermentation capacity resulting in elevated SCFA production ([241]). Otherwise, high glycemia due to RR microbiota may also explain the increased de novo lipogenesis via activation of the transcription factor CHREBP, a protein that controls transcription of lipogenic enzyme genes. Therefore, the influence of the gut microbiota on glucose levels may constitute a possible new mechanism explaining the impact of this microbiota on steatosis. Our results raise the possibility that the RR gut microbiota not only facilitates transfer of calories from the diet to the host but also impacts host metabolism of absorbed calories.

This study, showing the feasibility of transferring a host metabolic phenotype (metabotype) via the gut microbiota, further underlines the power of gnotobiotic models to decipher the involvement of the gut microbiota in health and disease. It has recently been demonstrated that human gut microbiota can be transferred to GF mice with remarkable preservation of structure and diversity and previous studies established that specific enzymatic activities of the human gut microbiota can be transmitted to GF rodents upon colonization with a fecal sample ([40], [123]). This opens possibilities to transfer human gut microbiota from humans suffering from pathologies to GF mice to create humanized gnotobiotic mice and conduct preclinical studies to define the impact of an unbalanced human microbiome on host physiology.

Finally, our results demonstrate that gut microbiota influences whole body glucose homeostasis and liver lipid metabolism. They support the idea that targeting the gut microbiota could be a new prevention or therapeutic approach for improving diabetes and NAFLD.

## Troisième partie

### Discussion et perspectives

L'obésité est la conséquence de l'interaction de facteurs génétiques, psychosociaux et environnementaux. Le microbiote intestinal a été identifié il y a quelques années comme étant un facteur environnemental supplémentaire associé au développement de l'obésité ([25], [26], [46], [222], [263]). L'obésité est un problème de santé public mondial du fait des complications qui lui sont associées. Ces complications, souvent regroupées sous le nom de syndrome métabolique, comportent entre autres le diabète de type 2, les NAFLD et l'athérosclérose. Ces complications de l'obésité ne sont pas systématiques, elles ne touchent qu'une proportion plus ou moins grande de la population d'obèses. Ces pathologies touchent également une proportion non négligeable des personnes simplement en surpoids ou même minces. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'implication du microbiote intestinal dans la survenue de ces complications.

L'objectif de mon travail de thèse était donc i) d'étudier dans quelle mesure le microbiote intestinal est impliqué dans le développement de l'insulinorésistance et des pathologies hépatiques liées à l'obésité, ii) de déterminer si la diversité de la composition du microbiote intestinal était, du moins partiellement, à l'origine de la prédisposition aux troubles métaboliques associés à l'obésité.

## 1 Stratégies expérimentales

Une première étape de ce projet a consisté à définir les stratégies expérimentales adaptées afin de répondre à notre problématique. Différentes stratégies expérimentales sont utilisées pour étudier l'interaction entre l'hôte, son alimentation et son microbiote intestinal. Chez l'homme, une des approches utilisées est la comparaison de la composition du microbiote intestinal de deux groupes d'individus ou la corrélation entre un paramètre physiologique et la population d'un groupe ou d'une espèce de bactéries. Cette technique a été utilisée par Ley *et al* et leur a permis de constater que les individus obèses étudiés avaient un microbiote en moyenne plus riche en Firmicutes et plus pauvre en Bacteroidetes que des personnes minces ([173]). De la même manière, Larsen *et al* ont observé une plus faible population de Firmicutes et une plus forte population de *Betaproteobacteria* dans le microbiote de diabétiques par rapport à des individus non diabétiques ([166]). Ces études, si elles indiquent les phyla/familles/espèces potentiellement associées à une pathologie, ne démontrent aucun lien de cause à effet. De plus, l'effectif des groupes peut être considéré comme faible compte tenu de la variabilité de la composition du microbiote d'un individu à l'autre.

Toujours chez l'humain, le lien de cause à effet entre le microbiote et les pathologies étudiées peut être approché en intervenant de manière à modifier la composition du microbiote intestinal. Cela peut se faire par exemple par l'administration de prébiotiques, il a ainsi été montré que l'administration de prébiotiques permettait de perdre du poids ([215]), de diminuer le taux d'insuline chez des patients atteints de NASH ([74]) ou de limiter l'augmentation de l'IMC chez des adolescents [2]. Néanmoins, les modifications de la composition du

microbiote associées à l'administration de prébiotiques n'ont pas été étudiées, il n'est donc pas possible de conclure sur l'effet du microbiote dans ces études.

Les stratégies de recherche applicables à l'homme sont pour le moment limitées et ne permettent pas de mettre en évidence le lien causal du microbiote dans l'obésité et les pathologies associées. Les modèles animaux rendent possible des interventions permettant de mieux mettre en évidence le rôle du microbiote et les mécanismes en jeux. Les rongeurs axéniques, tout particulièrement, permettent :

- d'observer les conséquences de l'absence de microbiote sur le métabolisme de l'hôte. Il est ainsi possible d'affirmer l'implication du microbiote dans la régulation de n'importe quel paramètre biologique dès que celui-ci est différent chez des animaux axéniques et conventionnels élevés dans les mêmes conditions ([26], [40], [222])
- de coloniser ces rongeurs avec une espèce bactérienne ou un microbiote complexe afin d'étudier l'impact de cette espèce ou de ce microbiote sur la physiologie de l'hôte, ce qui démontre alors son effet causal ([25], [270]).

L'inactivation d'un gène et donc de la voie dont fait partie la protéine qu'il code, peut permettre de déterminer si cette voie est un des liens entre le microbiote intestinal et le métabolisme de l'hôte. Par exemple, Vijay-Kumar *et al* ont démontré que le TLR-5 était indispensable au maintien de l'homéostasie intestinale, et que la dysbiose occasionnée par l'inactivation de TLR-5 causait directement le développement d'un syndrome métabolique ([270]).

Sachant cela, nous avons choisi d'étudier l'implication du microbiote intestinal dans le développement des NAFLD en comparant le développement des NAFLD chez des souris conventionnelles et axéniques. Plus spécifiquement, nous avons étudié les perturbations métaboliques induites par un régime hyper-lipidique par rapport à un régime contrôle avec et sans microbiote intestinal, ce qui, à notre connaissance, n'a pas été étudié jusqu'à présent.

Afin de démontrer le lien de cause à effet entre des différences de composition du microbiote et des différences de réponse à un régime obésogène, nous avons transféré le microbiote intestinal d'une souris répondeuse et d'une souris non répondeuse à deux groupes de souris axéniques. Cette transplantation de microbiote nous a permis d'obtenir deux groupes de souris ayant des microbiotes homogènes, auxquels nous avons administré un régime hyper-lipidique.

## 2 Implication du microbiote intestinal dans l'obésité et l'insulino-résistance

Nous avons constaté que les souris axéniques prennent significativement moins de poids que les souris conventionnelles sous régime hyper-lipidique. Ceci concorde avec des résultats obtenus précédemment dans notre laboratoire ([222]) ainsi que par d'autres groupes ([25])

sur la même souche de souris (C57BL/6J). Il semble toutefois que ce phénomène soit souche-dépendant, en effet, il s'avère que les souris axéniques de souche C3H développent une obésité suite à l'administration d'un régime hyper-lipidique ([106]). Toutefois, les différences de composition des régimes utilisés rendent difficile l'interprétation de ces discordances. Des études comparant la réponse de différentes souches de souris axéniques recevant le même régime seraient nécessaires pour pouvoir affirmer que l'absence de microbiote protège contre le développement de l'obésité quel que soit le génotype de l'hôte.

Les études comparant la composition du microbiote chez des individus minces et obèses divergent. Par exemple, le groupe de J. Gordon constate que le microbiote d'obèses est proportionnellement plus riche en Firmicutes et plus pauvre en Bacteroidetes que celui d'individus minces, ce que Schwartz *et al* n'a pas constaté ([241]). Une autre étude, menée sur un échantillon de 39 individus de 6 nationalités différentes, n'a trouvé aucune corrélation entre l'IMC et les proportions relatives de Firmicutes et de Bacteroidetes ([19]). Les divergences de ces études peuvent s'expliquer de nombreuses manières, tout d'abord la faiblesse des effectifs considérés, ensuite les différences de techniques d'analyse de la composition du microbiote et enfin des différences de composition du microbiote dues à l'environnement et à la composition de l'alimentation. Il n'est donc pas possible de s'appuyer sur les études visant à corréler la composition du microbiote intestinal avec l'IMC pour avancer que le microbiote intestinal est impliqué dans la régulation du poids.

Deux études rapportent l'induction de l'obésité par un transfert de microbiote. La première, compare la prise de poids de souris axéniques sauvages colonisées avec le microbiote d'une souris ob/ob ou avec le microbiote d'une souris mince (sauvage) ([263]). La colonisation par le microbiote de la souris ob/ob a induit une augmentation de l'adiposité plus forte que la colonisation par le microbiote de la souris non obèse. Le microbiote de la souris ob/ob induirait donc le développement de l'obésité. En effet, le microbiote "obésogène" de cette souris ob/ob présente des capacités d'extraction d'énergie accrues par rapport à un microbiote de souris sauvage. L'obésité serait donc une conséquence d'une dysbiose du microbiote intestinal menant l'hôte à récupérer plus d'énergie à partir de l'alimentation. Il se pose alors la question de l'origine de cette dysbiose. La délétion du gène de la leptine provoque une diminution, voire disparition de la sensation de satiété, les souris ob/ob ont donc une prise alimentaire beaucoup plus importante que les souris sauvages. Il semble donc possible que cet afflux de substrats énergétiques dans le colon ait pour conséquence une adaptation du microbiote, en terme de composition et de capacités métaboliques bien que la composition de l'aliment soit la même. Les capacités d'extraction accrues et donc le caractère obésogène du microbiote des souris ob/ob serait donc le reflet de l'adaptation de ce microbiote intestinal à un afflux énergétique abondant. Cette hypothèse impliquerait donc qu'il n'est pas possible d'extrapoler les résultats de cette étude au développement de l'obésité chez l'homme.

La seconde étude ayant mis en évidence une transmission de l'obésité via un transfert de microbiote s'appuie également sur un modèle de souris génétiquement modifiées ([270]). Par une procédure similaire à Ley *et al*, Vijay-Kumar *et al* ont montré que la colonisation

de souris axéniques sauvages par le microbiote d'une souris TLR-5  $^{-/-}$  induisait une plus forte prise de poids que la colonisation par un microbiote de souris sauvage. Cette mutation induit donc une dysbiose du microbiote intestinal qui elle-même induit le développement de l'obésité. Cette dysbiose consiste en une modification de la proportion de 116 phylotypes sans modification de la proportion de Firmicutes et de Bacteroidetes. Les mécanismes menant à une modification de la composition du microbiote suite à cette mutation ne sont pas connus, il n'est donc pas possible de savoir si le même type de dysbiose peut se développer chez l'homme et expliquer le développement de l'obésité.

L'état des connaissances actuel ne permet donc pas de confirmer ou d'infirmer le rôle causal du microbiote intestinal dans le développement de l'obésité. Toutefois, la démonstration de ce rôle du microbiote ne faisait pas partie des objectifs initiaux de ma thèse. Le rôle du microbiote dans le développement des pathologies métaboliques dans le contexte de l'obésité a plus retenu notre attention. Ceci explique pourquoi les deux souris donneuses de microbiote que nous avons sélectionnées dans la deuxième partie de cette étude (article 2) avaient un poids similaire et des niveaux de glycémie à jeun et d'insulino-résistance différents. En effet, il était nécessaire que ces souris aient un degré d'obésité similaire pour que les différences de niveaux d'insulino-résistance observées ne puissent pas s'expliquer comme la conséquence d'un degré d'obésité différent. Nous avons transféré le microbiote de ces souris à deux groupes de souris axéniques, alors appelées RR (receveuses de la répondeuse) et RNR (receveuses de la non répondeuse). Le groupe RNR est demeuré normo-glycémique malgré le régime hyper-lipidique tandis que le groupe RR est devenu légèrement hyper-glycémique. L'analyse de la composition du microbiote des souris receveuses a montré que les microbiotes des deux groupes diffèrent à plusieurs niveaux : proportions des différents phyla/groupes et profils d'espèces. Ceci démontre que deux microbiotes de composition différentes induisent des différences de prédisposition ou de susceptibilité à l'insulino-résistance induite par un régime hyper-lipidique. Associé au fait que les souris axéniques sont protégées contre le développement de cette insulino-résistance, cela démontre le rôle causal du microbiote intestinal dans l'insulino-résistance.

Nos résultats vont donc dans le même sens que ce qui a précédemment été observé, c'est-à-dire que la modulation de la composition du microbiote intestinal par des antibiotiques chez des souris rendues obèses par un régime hyper-lipidique permet d'améliorer la glycémie à jeun et l'insulino-résistance indépendamment de la prise alimentaire et de l'adiposité ([194]). La modulation de la composition du microbiote par l'administration de prébiotiques (oligofructose) a également un effet hypoglycémiant et améliore la tolérance au glucose ([51], [46], [47]). L'effet protecteur de l'absence de microbiote sur l'insulino-résistance induite par un régime hyper-lipidique ou western a également été observé à plusieurs reprises sur cette souche de souris ([26], [222]). Bien qu'il soit souhaitable que ces données soient complétées par des études sur d'autres souches de souris, l'état des connaissances actuelles montre que le microbiote intestinal est un des éléments majeurs intervenant dans la régulation de la glycémie et de la sensibilité à l'insuline chez les souris. Le point fort de notre étude est que l'effet

délétère du microbiote de la souris donneuse répondeuse et/ou l'effet protecteur du microbiote de la souris donneuse non répondeuse ne sont pas la conséquence d'une dysbiose induite par un traitement particulier ou une mutation. Ces propriétés sont donc intrinsèques à ces communautés microbiennes. La conclusion de cette étude, c'est-à-dire que la composition du microbiote conditionne la résistance ou la prédisposition à l'insulino-résistance associée à l'obésité, est donc vraisemblablement transposable à l'homme. Ceci tend à être confirmé par Larsen *et al*, qui observent que la composition du microbiote de personnes diabétiques diffère de celui de personnes non diabétiques indépendamment de l'IMC. De plus, la proportion relative de plusieurs groupes bactériens est positivement corrélée avec la glycémie à jeun ([166]). Naturellement, des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer ce lien entre microbiote et insulino-résistance et de mieux comprendre les mécanismes en jeu.

L'insulino-résistance est évidemment associée au développement du diabète de type 2, mais également aux stéatopathies non alcooliques. Ces dernières sont parfois considérées comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique et touchent une assez forte proportion d'obèses. Comme cela a déjà été souligné précédemment, ces pathologies sont sévères, c'est pourquoi nous nous sommes également intéressés au rôle du microbiote dans le développement de ces pathologies.

### 3 Métabolisme hépatique des lipides

Le premier stade des NAFLD consiste en une accumulation de triglycérides dans les hépatocytes. Ce stade est généralement considéré comme bénin par les médecins, pourtant il constitue une forte prédisposition au développement de NASH, caractérisée par une forte inflammation hépatique. La NASH peut survenir plusieurs mois ou années après l'apparition de la stéatose chez une partie des obèses atteints de NAFLD. Différents modèles animaux sont utilisés pour étudier la physiopathologie des NAFLD ([15]) :

- des modèles génétiques hyperphagiques : les lignées ob/ob (déficientes en leptine) ou db/db (déficientes en récepteur de la leptine) et Ay (Yellow-obese agouti) en particulier développent spontanément une stéatose puis éventuellement une NASH.
- des modèles nutritionnels, en particulier le régime déficient en méthionine et choline (MCD).

Nous n'avons pas retenu ces modèles pour différentes raisons. Le modèle MCD induit une stéatose, une inflammation et une fibrose en l'absence d'insulino-résistance, les mécanismes en jeu sont donc différents de ceux qui nous intéressent. Les modèles génétiques n'ont pas été retenus non plus pour les raisons évoquées au paragraphe précédent. La NASH peut également être induite chez la souris en associant un régime hyper-lipidique à l'injection de LPS. Une augmentation de l'endotoxémie est un des mécanismes par lesquels le microbiote provoque une insulino-résistance et une inflammation à bas bruit ([47]), l'utilisation de ce modèle reviendrait à masquer un des effets du microbiote intestinal chez les souris

conventionnelles, c'est pourquoi nous n'avons pas utilisé ce modèle non plus. Les modèles nutritionnels à base de régimes riches en lipides (hyper-lipidique et western) induisent le développement d'une stéatose mais pas d'une NASH. Nous nous en sommes donc tenus à l'étude du développement de la stéatose et de l'inflammation à bas bruit.

Le développement de la stéatose résultant d'un déséquilibre entre l'apport de lipides (apport *via* la circulation sanguine ou synthèse *de novo*) et leur élimination (sécrétion de particules lipoprotéiques ou oxydation des acides gras), nous avons étudié l'expression de ces différentes voies par PCR quantitative chez les souris conventionnelles et axéniques ainsi que chez les deux groupes de souris conventionnalisées.

Sous régime hyper-lipidique, l'expression hépatique de tous les gènes impliqués dans le métabolisme des lipides est diminuée chez les souris axéniques en comparaison avec les souris conventionnelles. L'ensemble du métabolisme lipidique est donc moins actif en l'absence de microbiote. Ceci est associé à un niveau de stéatose plus faible chez les souris axéniques. Ceci confirme les résultats précédemment obtenus, c'est-à-dire une plus faible expression de gènes impliqués dans la lipogenèse et un plus faible taux de lipides dans le foie de souris axéniques sous régime hyper-lipidique ([222]). Sous régime contrôle, les niveaux d'expression de gènes sont différents chez les souris axéniques et conventionnelles mais la concentration hépatique en triglycéride n'est pas significativement différente. L'impact de l'absence de microbiote sur le degré de stéatose ne s'exprime donc que sous régime hyper-lipidique.

La protection partielle des souris axéniques contre le développement d'une stéatose par un régime hyper-lipidique indique une implication du microbiote intestinal. Par ailleurs, il a auparavant été montré que le degré de stéatose de souris recevant un régime hyper-lipidique pouvait être diminué par l'administration d'antibiotiques ([194]). Un prébiotique extrait de champignons, le chitine-glucane, a lui aussi la propriété de diminuer le degré de stéatose, ainsi que de nombreux autres paramètres métaboliques, chez des souris sous régime hyper-lipidique [206].

Nous avons constaté que l'expression hépatique de gènes impliqués dans la lipogenèse est plus élevée chez les souris ayant reçu le microbiote de la souris répondeuse que chez les souris ayant reçu le microbiote de la souris non répondeuse. Il en était de même pour un gène impliqué dans l'import de lipides dans les hépatocytes. Les gènes des voies participant à l'élimination des lipides étaient exprimés à des niveaux équivalents dans les deux groupes de souris receveuses. Dans notre étude, la composition du microbiote influe donc sur l'induction des voies de la lipogenèse hépatique. Les souris RR présentaient un plus fort degré de stéatose que les souris RNR, ce qui démontre pour la première fois que la colonisation par deux microbiotes différents aboutit à des degrés de stéatose différents. De même que pour l'insulino-résistance, ces résultats suggèrent que le microbiote intestinal est un facteur contribuant à la prédisposition ou la résistance au développement de la stéatose dans un contexte d'obésité.

L'obésité, l'insulino-résistance et les NAFLD sont associées à un état inflammatoire systémique à bas bruit. Le LPS provenant des bactéries du microbiote intestinal est au moins un des facteurs contribuant à cette inflammation ([54]).

## 4 Implication du microbiote intestinal dans l'inflammation

Les souris obèses (modèle génétique ou nutritionnel) dont le gène du TNF $\alpha$  ou du récepteur au TNF $\alpha$  a été inactivé ont une meilleure sensibilité à l'insuline ([267]), ce qui indique un rôle causal du TNF $\alpha$  et donc de l'inflammation dans la résistance à l'insuline. De plus, il a été démontré que sous régime hyper-lipidique, les souris axéniques ont un taux de TNF $\alpha$  plus faible que celui de souris conventionnelles, il a donc été avancé que la résistance des souris axéniques à l'insulino-résistance induite par un régime hyper-lipidique serait en partie due à un faible taux de TNF $\alpha$  ([222]). Nos résultats vont à l'encontre de cette hypothèse. En effet, nous n'avons pas observé de différences de concentration de TNF $\alpha$ , ni de MCP-1 entre les souris axéniques et les souris conventionnelles, quel que soit le régime considéré. Il est d'ailleurs à noter que chez les souris conventionnelles le régime hyper-lipidique n'a pas induit d'inflammation systémique à bas bruit contrairement à ce que nous attendions. Plusieurs répétitions de l'expérience sur souris conventionnelles a mis en évidence des difficultés de répétitions de l'induction d'une inflammation. Il semblerait qu'une variation des propriétés du régime hyper-lipidique selon les lots soit à mettre en cause. Il est à supposer que la composition en acides gras et en composés anti-oxydants des matières grasses d'origine animale utilisées pour fabriquer ces aliments explique en grande partie les différences de propriétés des lots.

Néanmoins, les concentrations plasmatiques d'IL-6, une autre cytokine pro-inflammatoire, sont significativement plus faibles chez les souris axéniques quel que soit le régime. Tout comme dans le cas du TNF $\alpha$ , une diminution de la concentration d'IL-6 est associée à la perte de poids et à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline ([160]). Il est donc plausible que la capacité des souris axéniques à résister à l'induction de l'insulino-résistance puisse en partie découler de leur faible taux d'IL-6. Bien qu'une des caractéristiques principales des souris axéniques soit l'immaturité de leur système immunitaire et donc de leurs réponses immunitaires lorsqu'elles ont lieu, cet aspect de la protection des souris axéniques contre l'obésité et l'IR a peu été étudié à l'heure actuelle. Il existe donc assez peu de données à mettre en regard de nos résultats afin de mieux les interpréter. Il semble que le microbiote joue sur certaines voies de l'inflammation mais pas sur d'autres, une étude plus détaillée est donc nécessaire.

Cette absence de différence d'inflammation au niveau systémique entre souris axéniques et conventionnelles n'implique pas nécessairement que le microbiote n'a pas d'influence sur la réponse inflammatoire localement. Nous avons étudié le développement de l'inflammation

chez les souris axéniques et conventionnelles au niveau hépatique. L'expression hépatique de cytokines n'est pas augmentée par le régime hyper-lipidique chez les souris conventionnelles. Les différences entre souris conventionnelles et axéniques sont peu flagrantes à ce niveau : seules certaines cytokines sont moins exprimées chez les souris axéniques, et dans aucun cas sous les deux régimes. L'expression d'IL-6 chez les souris axéniques sous régime contrôle est néanmoins beaucoup plus faible que celles des souris conventionnelles comme nous l'avons constaté au niveau systémique.

Une dysfonction des cellules de Kupffer (KC), les macrophages résidents du foie, contribue à la pathogenèse de l'insulino-résistance, de la stéatose et de l'inflammation hépatiques, en lien avec l'endotoxémie ([86], [205], [286]). Les résultats d'expression hépatique de cytokines n'étant pas concluants, nous avons caractérisé plus en profondeur la réponse immunitaire au niveau hépatique en étudiant la sécrétion de cytokines par les KC. Nous avons cette fois constaté un effet très clairement pro-inflammatoire du régime hyper-lipidique chez les souris conventionnelles. La forte sécrétion de cytokines par cette population de cellules n'était pas révélée par l'étude de l'expression de gènes au niveau du tissu. Ceci peut s'expliquer par le fait que cette population de cellules est très réduite : seulement quelques millions par foie de souris, l'expression de gènes par ces cellules est donc gommée par l'expression de gènes des hépatocytes et des cellules endothéliales. Cela n'empêche pas une action forte des KC sur l'inflammation, la stéatose hépatique et l'insulino-résistance au niveau local.

La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les KC de souris axéniques est globalement plus basse que celle de KC de souris conventionnelles quel que soit le régime. Ceci s'explique par le caractère immature du système immunitaire des souris axéniques du fait de l'absence de stimulation continue par des composés microbiens. Etant donné le rôle majeur des KC, la plus faible sécrétion de cytokines chez les souris axéniques est probablement une des raisons du plus faible degré de stéatose et d'insulino-résistance observé chez les souris axéniques sous régime hyper-lipidique.

Le régime hyper-lipidique induit une augmentation de la sécrétion de cytokines par les KC en dépit du statut axénique des souris. Une explication reconnue du développement de l'inflammation chez les souris sous régime hyper-lipidique est l'augmentation de l'endotoxémie résultant de l'altération de la barrière intestinale provoquée par le régime hyper-lipidique. Les souris axéniques étant exposées à des quantités négligeables de LPS quel que soit leur régime alimentaire, cela semble une hypothèse peu probable pour expliquer cette réponse des KC de souris axéniques au régime hyper-lipidique. Bien que nous n'ayons pas étudié ce mécanisme, il est plausible que l'augmentation de la sécrétion de cytokines par les KC des souris axéniques aussi bien que conventionnelles aient été partiellement ou totalement induites par les lipides. En effet, il a été démontré, en particulier dans le cas de l'athérosclérose, que les macrophages pouvaient être activés par la reconnaissance de composés non microbiens, comme des lipoprotéines glyquées ou oxydées et des diacylglycérols ([220], [6]). Cet éventuel mécanisme d'activation des cellules de Kupffer par les lipides est d'ailleurs un des sujets d'étude de nos partenaires INSERM.

Chez les souris conventionnelles, nous avons constaté que le LPS n'induit pas d'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, y compris sous régime hyper-lipidique. Des modèles *in vitro* et *in vivo* ont depuis longtemps permis d'observer que la stimulation répétée par de faibles quantités de LPS entraînait une incapacité à déclencher une réponse immunitaire forte lors d'expositions ultérieures à de plus fortes quantités de LPS ([35]). Les macrophages et les monocytes sont les principaux effecteurs de cette tolérance ([56]). Il est donc possible de supposer que, dans le cas de cette étude, l'augmentation modérée de l'endotoxémie soit la cause de cette tolérance. Chez les souris axéniques, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires est stimulée par le LPS quel que soit le régime. L'axénie empêche donc le développement d'une tolérance au LPS par le régime hyper-lipidique, ce qui est tout à fait cohérent avec l'hypothèse selon laquelle l'activation des KC par le régime hyper-lipidique se fait *via* des lipides immunogènes.

Les résultats que nous avons obtenus sur l'impact du microbiote intestinal sur l'inflammation associée à l'insulino-résistance et aux NAFLD sont donc nouveaux mais nécessitent d'être complétés pour confirmer ou infirmer les hypothèses évoquées. Il est cependant indiscutable que le système immunitaire est une composante majeure du lien entre microbiote intestinal et métabolisme, le taux de TNF $\alpha$  et de MCP-1 a donc été un des critères de sélection des souris donneuses dans l'étude du caractère transférable des atteintes métaboliques. Bien que nous ayons sélectionné deux souris donneuses avec des taux systémiques différents de cytokines pro-inflammatoires, nous n'avons pas observé de différences chez les souris receveuses. En ce qui concerne l'atteinte hépatique, l'expression hépatique de cytokines et la sécrétion de cytokines par les KC (résultats non présentés) n'est pas significativement différente entre les deux groupes. Les niveaux d'insulino-résistance et de stéatose sont donc différents alors que la totalité des paramètres liés à l'inflammation étudiés sont identiques. Ceci indique donc que l'impact des microbiotes transférés sur l'insulino-résistance se fait par des mécanismes a priori indépendants de l'inflammation.

Les différences de niveaux d'inflammation systémiques n'ont pas été transférables par le microbiote intestinal dans nos conditions expérimentales. Les paramètres inflammatoires affectés par la présence ou l'absence de microbiote intestinal ont également été similaires chez les deux groupes de souris receveuses. Cela peut signifier que certains paramètres dépendent uniquement de la présence d'un microbiote intestinal, quelle que soit sa composition. Une autre interprétation est que les deux microbiotes sélectionnés n'ont pas eu d'influence différente sur ces paramètres mais que cela aurait pu être le cas si nous avions sélectionnés deux autres microbiotes. En effet, les résultats obtenus ne sont valables que dans le cas de ces deux microbiotes, de composition unique. Un paramètre identique chez les deux groupes de receveuses indiquerait seulement que les deux microbiotes sélectionnés n'induisaient pas de différence sur ce paramètre, pas que le microbiote n'affecte pas ce paramètre. Enfin, les souris donneuses ont été sélectionnées sur des paramètres mesurables du vivant des souris. En effet, lors du transfert, la technique de conservation du microbiote permettant d'implanter un microbiote intestinal plusieurs jours ou semaines après le sacrifice des souris donneuses n'avait

pas encore été optimisée par le laboratoire. Il était donc nécessaire de coloniser les souris axéniques le plus rapidement possible après le sacrifice des souris donneuses, nous avons donc sélectionné les souris donneuses uniquement sur des paramètres sanguins. L'état inflammatoire des souris donneuses était donc analysé de manière grossière, il s'est d'ailleurs avéré que les différences d'expression hépatique de cytokines pro-inflammatoires et de sécrétion de cytokines par les KC entre les deux souris donneuses n'étaient pas flagrantes compte tenu de la variabilité observée dans le groupe de souris conventionnelles sous régime hyper-lipidique. Idéalement, cette expérimentation devrait être réalisée une nouvelle fois en étudiant plus finement l'inflammation locale avant de sélectionner les souris donneuses, maintenant qu'il nous est possible de conserver les microbiotes avant de les implanter. Il serait alors possible de mieux étudier le caractère transférable de l'inflammation par le microbiote intestinal.

## 5 Perspectives et pistes de recherche

Nous avons mis en évidence que la composition du microbiote des souris RR et des souris RNR différaient, ce qui permet de supposer que ces différences de composition sont à l'origine des différences de réponse au régime hyper-lipidique. Cependant, les techniques d'analyse de la composition du microbiote ne nous ont permis que de constater des différences de pourcentage de quelques groupes bactériens et la présence systématique d'une espèce chez les RR. Cette caractérisation de la composition du microbiote est insuffisante, ce qui a d'ailleurs été pointé par les reviewers de l'article correspondant. Nous allons donc effectuer à court terme une analyse par pyroséquençage des gènes de l'ARN 16S des microbiotes des souris donneuses et receveuses. Idéalement, il serait intéressant de séquencer le métagénome de ces échantillons afin de ne pas seulement avoir accès à l'identification des espèces bactériennes et de leur abondance mais aussi aux fonctions qu'elles portent.

La présence d'une espèce de *Lachnospiraceae* dans le mucus colique de toutes les souris RR et son absence chez toutes les souris RNR laisse suspecter l'effet délétère de cette bactérie sur le métabolisme de l'hôte. La démonstration de cet effet ne pourrait cependant se faire qu'en colonisant des souris axéniques avec cette espèce, ce qui nous aussi été demandé par les reviewers de l'article en question. L'espèce bactérienne correspondant à la séquence que nous avons obtenue n'a jamais été isolée. La famille des *Lachnospiraceae* compte très peu de représentants d'espèces cultivables dans les banques de souches et l'espèce cultivable la plus proche de l'espèce que nous avons détectée, *Clostridium scindens*, n'a que 90% d'homologie avec cette dernière. Il n'y aurait donc aucun intérêt à étudier des souris mono-associées avec *Clostridium scindens*. En l'état actuel des choses, il n'est malheureusement pas possible d'aller plus loin dans cette voie.

Une meilleure caractérisation de la réponse métabolique de l'hôte serait également souhaitable pour mettre à jour les mécanismes en jeu. Pour cela, il serait intéressant d'étudier le transcriptome du tissu adipeux (mésentérique en particulier) et de l'intestin (aussi bien

l'intestin grêle que le côlon). Une étude du métabolome de l'hôte pourrait également nous éclairer sur les métabolites associés à différents microbiotes et régimes.

Par ailleurs, l'étude de la réponse à un régime western ou hyper-lipidique de souris ob/ob ou TLR-5<sup>-/-</sup> axéniques permettrait de déterminer si les différences observées entre les souris sauvages et les souris mutées ne s'expriment qu'en présence d'un microbiote, ce qui signifierait que l'impact de la mutation sur le métabolisme de l'hôte passe par le microbiote intestinal.

Notre étude de transfert de microbiote de souris à souris a permis de montrer le rôle causal du microbiote intestinal dans l'insulino-résistance et la stéatose hépatique. Pour étendre ces résultats à l'homme, il serait particulièrement intéressant de transférer le microbiote de patients obèses diabétiques et non diabétiques à des souris. Une des difficultés principales à surmonter dans l'étude du rôle du microbiote dans une pathologie est de déterminer si les dysbioses observées chez ces patients sont les causes ou les conséquences de la pathologie. Le modèle de transfert de microbiote que dont nous disposons grâce à la plateforme Anaxem de Micalis constitue un modèle unique permettant de démontrer le rôle causal du microbiote intestinal. Ainsi, en associant différents microbiotes issus de patients humains à des rongeurs axéniques, nous pouvons déterminer les conséquences physiologiques d'une dysbiose et mettre en évidence des mécanismes liant microbiote intestinal et développement d'une pathologie.

La découverte du rôle causal du microbiote dans l'insulino-résistance ouvre de nouvelles pistes de recherches dans le traitement du diabète de type 2. Ainsi, de futures études devraient déboucher sur des stratégies thérapeutiques basées sur la modulation de la composition du microbiote intestinal, visant un groupe bactérien donné ou une fonction portée par le microbiote. Cette modulation du microbiote pourrait se faire par l'administration de prébiotiques, de probiotiques ou d'antibiotiques. Une autre stratégie prometteuse pour corriger durablement une dysbiose du microbiote intestinal est la transplantation de microbiote intestinal d'humain à humain, comme cela se fait déjà avec succès pour les pathologies gastro-intestinales associées à une infection à *Clostridium difficile* ([164]).

## Valorisation des résultats de la thèse

### Communications orales

Le Roy T, Llopis M, Bruneau A, Godis V, Ribes S, Perlemuter G, Rabot S, Cassard-Doulcier AM, Gérard P. *La susceptibilité aux troubles métaboliques engendrés par un régime hyperlipidique est transmissible via un transfert de microbiote intestinal*. 7<sup>es</sup> Journées Francophones de Nutrition. 8 au 10 décembre 2010, Lille.

Le Roy T, Llopis M, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, Martin P, Perlemuter G, Cassard-Doulcier AM, Gérard P. *Metabolic disorders induced by a high fat diet can be transferred by a transplantation of gut microbiota*. International Scientific Conference on Gastro-Intestinal Microbial Ecology. 9<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> November 2010, Kosice, Slovaquie.

Le Roy T, Llopis M, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, Martin P, Perlemuter G, Cassard-Doulcier AM, Gérard P. *Metabolic disorders induced by a high fat diet can be transferred by a transplantation of gut microbiota*. First international symposium on Microbial resource management in biotechnology. June 30<sup>th</sup> - July 1<sup>st</sup> 2011, Ghent, Belgium.

Le Roy T, Llopis M, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, Martin P, Bado A, Perlemuter G, Cassard-Doulcier AM, Gérard P. *La susceptibilité aux troubles métaboliques induits par un régime hyper-lipidique est transmissible par un transfert de microbiote intestinal*. 69<sup>èmes</sup> journées de l'Association Française d'Etude du Foie. 28 septembre au 1<sup>er</sup> octobre 2011, Paris.

Le Roy T, Llopis M, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, Martin P, Perlemuter G, Cassard-Doulcier AM, Gérard P. *Metabolic disorders induced by a high fat diet can be transferred by a transplantation of gut microbiota*. Microbes For Health, 2<sup>nd</sup> International Symposium. December 1-2, Paris.

### Communications affichées

Le Roy T, Llopis M, Godis V, Perlemuter G, Gérard P, Cassard-Doulcier AM. *Corrélation entre la composition du microbiote intestinal et la sévérité des atteintes hépatiques induites par un régime hyper-lipidique*. 6<sup>es</sup> Journées Francophones de Nutrition. 8 au 10 décembre 2009, Montpellier.

Le Roy T, Llopis M, Godis V, Perlemuter G, Gérard P, Cassard-Doulcier AM. *Corrélation entre la composition du microbiote intestinal et la sévérité des atteintes hépatiques induites par un régime hyper-lipidique*. 27<sup>ème</sup> réunion de l'Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité. 21 et 22 Janvier 2010, Paris.

Le Roy T, Llopis M, Godis V, Ribes S, Perlemuter G, Cassard-Doulcier AM, Gérard P. *Implication du microbiote intestinal dans les pathologies hépatiques liées à l'obésité*. Journées des microbiologistes de l'Inra 2010. 5 au 7 mai 2010, Poitiers.

Le Roy T, Llopis M, Bruneau A, Godis V, Ribes S, Perlemuter G, Rabot S, Cassard-Doulcier AM, Gérard P. *L'absence de microbiote intestinal protège contre les désordres métaboliques et hépatiques induits par un régime hyper-lipidique*. 7<sup>es</sup> Journées Francophones de Nutrition. 8 au 10 décembre 2010, Lille.

Le Roy T, Llopis M, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, Martin P, Perlemuter G, Cassard-Doulcier AM, Gérard P. *Absence of gut microbiota protects against diet-induced obesity and insulin-resistance but predisposes to liver failure*. 19<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week. 22-26 October 2011 Stockholm, Sweden.

# Bibliographie

- [1] S. Abiru, K. Migita, Y. Maeda, M. Daikoku, M. Ito, K. Ohata, S. Nagaoka, T. Matsumoto, Y. Takii, K. Kusumoto, M. Nakamura, A. Komori, K. Yano, H. Yatsushashi, K. Eguchi, and H. Ishibashi. Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver International*, 26(1) :39–45, 2006.
- [2] S. A. Abrams, I. J. Griffin, K. M. Hawthorne, and K. J. Ellis. Effect of prebiotic supplementation and calcium intake on body mass index. *The Journal of pediatrics*, 151(3) :293–298, 2007.
- [3] L. Abu-Elheiga, W. R. Brinkley, L. Zhong, S. S. Chirala, G. Woldegiorgis, and S. J. Wakil. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(4) :1444–1449, 2000.
- [4] L. Abu-Elheiga, M. M. Matzuk, K. A. Abo-Hashema, and S. J. Wakil. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science*, 291(5513) :2613–2616, 2001.
- [5] L. Abu-Elheiga, M. M. Matzuk, P. Kordari, W. Oh, T. Shaikenov, Z. Gu, and S. J. Wakil. Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(34) :12011–12016, 2005.
- [6] S. Adamson and N. Leitinger. Phenotypic modulation of macrophages in response to plaque lipids. *Current Opinion in Lipidology*, 22(5) :335–342, 2011.
- [7] I. Adlerberth and A. Wold. Establishment of the gut microbiota in western infants. *Acta Paediatrica*, 98(2) :229–238, 2009.
- [8] M. Alam, T. Midtvedt, and A. Uribe. Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. *Scand J Gastroenterol*, 29(5) :455–451, 1994.
- [9] R. I. Amann, B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6) :1919–1925, 1990.
- [10] R. I. Amann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1) :143–69, 1995.

- [11] J. Amar, R. Burcelin, J. B. Ruidavets, P. D. Cani, J. Fauvel, M. C. Alessi, B. Chantoin, and J. Ferrières. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(5) :1219–1223, 2008.
- [12] P. D. Anderson, N. N. Mehta, M. L. Wolfe, C. C. Hinkle, L. Pruscino, L. L. Comiskey, J. Tabita-Martinez, K. F. Sellers, M. R. Rickels, R. S. Ahima, and M. P. Reilly. Innate Immunity Modulates Adipokines in Humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(6) :2272–2279, 2007.
- [13] A. S. Andreasen, N. Larsen, T. Pedersen-Skovsgaard, R. M. G. Berg, K. Møller, K. D. Svendsen, M. Jakobsen, and B. K. Pedersen. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *The British journal of nutrition*, 104(12) :1831–1838, 2010.
- [14] P. Angulo. Nonalcoholic fatty liver disease. *New England Journal of Medicine*, 346(16) :1221–1231, 2002.
- [15] Q. M. Anstee and R. D. Goldin. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *International Journal of Experimental Pathology*, 87(1) :1–16, 2006.
- [16] Y. Arita, S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. ichiro Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K. Miyaoka, H. Kuriyama, M. Nishida, S. Yamashita, K. Okubo, K. Matsubara, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257(1) :79 – 83, 1999.
- [17] M. C. Arkan, A. L. Hevener, F. R. Greten, S. Maeda, Z.-W. Li, J. M. Long, A. Wynshaw-Boris, G. Poli, J. Olefsky, and M. Karin. IKK- $\beta$  links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature Medicine*, 11(2) :191–198, 2005.
- [18] L. Aronsson, Y. Huang, P. Parini, M. Korach-André, J. Håkansson, J.-k. Gustafsson, S. Pettersson, V. Arulampalam, and J. Rafter. Decreased Fat Storage by *Lactobacillus paracasei* Is Associated with Increased Levels of Angiopoietin-Like 4 Protein (ANGPTL4). *PLoS ONE*, 5(9) :e13087, 09 2010.
- [19] M. Arumugam, J. Raes, E. Pelletier, D. Le Paslier, T. Yamada, D. R. Mende, G. R. Fernandes, J. Tap, T. Bruls, J.-M. Batto, M. Bertalan, N. Borrueal, F. Casellas, L. Fernandez, L. Gautier, T. Hansen, M. Hattori, T. Hayashi, M. Kleerebezem, K. Kurokawa, M. Leclerc, F. Levenez, C. Manichanh, H. B. Nielsen, T. Nielsen, N. Pons, J. Poulain, J. Qin, T. Sicheritz-Ponten, S. Tims, D. Torrents, E. Ugarte, E. G. Zoetendal, J. Wang, F. Guarner, O. Pedersen, W. M. de Vos, S. Brunak, J. Dore, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich, and P. Bork. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346) :174–180, 2011.
- [20] A. Asakawa, A. Inui, H. Yuzuriha, N. Ueno, G. Katsuura, M. Fujimiya, M. A. Fujino, A. Nijimañ, M. M. Meguid, and M. Kasuga. Characterization of the effects of pancrea-

- tic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology*, 124(5) :1325–1336, 2003.
- [21] R. Barbuio, M. Milanski, M. B. Bertolo, M. J. Saad, and L. A. Velloso. Infiximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *Journal of Endocrinology*, 194(3) :539–550, 2007.
- [22] R. L. Batterham, M. A. Cohen, S. M. Ellis, C. W. Le Roux, D. J. Withers, G. S. Frost, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. Inhibition of Food Intake in Obese Subjects by Peptide YY3-36. *New England Journal of Medicine*, 349(10) :941–948, 2003.
- [23] R. L. Batterham, M. A. Cowley, C. J. Small, H. Herzog, M. A. Cohen, C. L. Dakin, A. M. Wren, A. E. Brynes, M. J. Low, M. A. Ghatei, R. D. Cone, and S. R. Bloom. Gut hormone PYY3-36 physiologically inhibits food intake. *Nature*, 418(6898) :650–654, 2002.
- [24] R. L. Batterham, H. Heffron, S. Kapoor, J. E. Chivers, K. Chandarana, H. Herzog, C. W. Le Roux, E. L. Thomas, J. D. Bell, and D. J. Withers. Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell metabolism*, 4(3) :223–233, 2006.
- [25] F. Bäckhed, H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich, and J. I. Gordon. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44) :15718–15723, 2004.
- [26] F. Bäckhed, J. K. Manchester, C. F. Semenkovich, and J. I. Gordon. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3) :979–984, 2007.
- [27] M. A. Benjamin, D. M. McKay, P.-C. Yang, H. Cameron, and M. H. Perdue. Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse. *Gut*, 47(1) :112–119, 2000.
- [28] A. H. Berg, T. P. Combs, and P. E. Scherer. ACRP30/adiponectin : an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 13(2) :84–89, 2002.
- [29] E. N. Bergman. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, 70(2) :567–590, 1990.
- [30] L. E. Bernstein, J. Berry, S. Kim, B. Canavan, and S. K. Grinspoon. Effects of Etorcept in Patients With the Metabolic Syndrome. *Arch Intern Med*, 166(8) :902–908, 2006.
- [31] A. Berrington de Gonzalez, P. Hartge, J. R. Cerhan, A. J. Flint, L. Hannan, R. J. MacInnis, S. C. Moore, G. S. Tobias, H. Anton-Culver, L. B. Freeman, W. L. Beeson, S. L. Clipp, D. R. English, A. R. Folsom, D. M. Freedman, G. Giles, N. Hakansson, K. D. Henderson, J. Hoffman-Bolton, J. A. Hoppin, K. L. Koenig, I.-M. Lee, M. S.

- Linnet, Y. Park, G. Pocobelli, A. Schatzkin, H. D. Sesso, E. Weiderpass, B. J. Willcox, A. Wolk, A. Zeleniuch-Jacquotte, W. C. Willett, and M. J. Thun. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *New England Journal of Medicine*, 363(23) :2211–2219, 2010.
- [32] A. Berson, V. De Beco, P. Lettéron, M. A. Robin, C. Moreau, J. E. Kahwaji, N. Verthier, G. Feldmann, B. Fromenty, and D. Pessayre. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology*, 114(4) :764–774, 2000.
- [33] S. B. Biddinger and C. R. Kahn. From Mice to Men : Insights into the Insulin Resistance Syndromes. *Annual Review of Physiology*, 68(1) :123–158, 2006.
- [34] A. E. Bigorgne, L. Bouchet-Delbos, S. Naveau, I. Dagher, S. Prévot, I. Durand-Gasselín, J. Couderc, P. Valet, D. Emilie, and G. Perlemuter. Obesity-induced lymphocyte hyperresponsiveness to chemokines : A new mechanism of fatty liver inflammation in obese mice. *Gastroenterology*, 134(5) :1459–1469, 2008.
- [35] S. K. Biswas and E. Lopez-Collazo. Endotoxin tolerance : new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in Immunology*, 30(10) :475 – 487, 2009.
- [36] E. Björnsson and P. Angulo. Non-alcoholic fatty liver disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 42(9) :1023–1030, 2007.
- [37] M. Bjursell, T. Admyre, M. Göransson, A. E. Marley, D. M. Smith, J. Oscarsson, and M. Bohlooly-Y. Improved glucose control and reduced body fat mass in free fatty acid receptor 2 (Ffar2) deficient mice fed a high fat diet. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, pages E211–E220, 2010.
- [38] K. M. Botham, X. Zheng, M. Napolitano, M. Avella, C. Cavallari, R. Rivabene, and E. Bravo. The Effects of Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Delivered in Chylomicron Remnants on the Transcription of Genes Regulating Synthesis and Secretion of Very-Low-Density Lipoprotein by the Liver : Modulation by Cellular Oxidative State. *Experimental Biology and Medicine*, 228(2) :143–151, 2003.
- [39] Y. Bouhnik, L. Raskine, G. Simoneau, E. Vicaut, C. Neut, B. Flourié, F. Brouns, and F. R. Bornet. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans : a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(6) :1658–1664, 2004.
- [40] E. Bowey, H. Adlercreutz, and I. Rowland. Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora : a study in germ-free and human flora associated rats. *Food and Chemical Toxicology*, 41(5) :631 – 636, 2003.
- [41] G. D. Brinkworth, M. Noakes, P. M. Clifton, and A. R. Bird. Comparative effects of very low-carbohydrate, high-fat and high-carbohydrate, low-fat weight-loss diets on bowel habit and faecal short-chain fatty acids and bacterial populations. *British Journal of Nutrition*, 101 :1493–1502, 2009.

- [42] R. Buettner, I. Ottinger, J. Schölmerich, and L. C. Bollheimer. Preserved direct hepatic insulin action in rats with diet-induced hepatic steatosis. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 286(5) :E828–E833, 2004.
- [43] E. Bugianesi, U. Pagotto, R. Manini, E. Vanni, A. Gastaldelli, R. de Iasio, E. Gentilecore, S. Natale, M. Cassader, M. Rizzetto, R. Pasquali, and G. Marchesini. Plasma Adiponectin in Nonalcoholic Fatty Liver Is Related to Hepatic Insulin Resistance and Hepatic Fat Content, Not to Liver Disease Severity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(6) :3498–3504, 2005.
- [44] D. Cai, M. Yuan, D. F. Frantz, P. A. Melendez, L. Hansen, J. Lee, and S. E. Shoelson. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- $\beta$  and NF- $\kappa$ B. *Nature Medicine*, 11(2) :183–190, 2005.
- [45] H. L. Cameron and M. H. Perdue. Stress Impairs Murine Intestinal Barrier Function : Improvement by Glucagon-Like Peptide-2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(1) :214–220, 2005.
- [46] P. D. Cani, J. Amar, M. A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A. M. Neyrinck, F. Fava, K. M. Tuohy, C. Chabo, A. Waget, E. Delmée, B. Cousin, T. Sulpice, B. Chamontin, J. Ferrières, J.-F. Tanti, G. R. Gibson, L. Casteilla, N. M. Delzenne, M. C. Alessi, and R. Burcelin. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*, 56(7) :1761–1772, 2007.
- [47] P. D. Cani, R. Bibiloni, C. Knauf, A. Waget, A. M. Neyrinck, N. M. Delzenne, and R. Burcelin. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, pages 1470–1481, 2008.
- [48] P. D. Cani and N. M. Delzenne. Interplay between obesity and associated metabolic disorders : new insights into the gut microbiota. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(6) :737 – 743, 2009. Gastrointestinal/Endocrine and metabolic diseases.
- [49] P. D. Cani, C. Dewever, and N. M. Delzenne. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *The British journal of nutrition*, 92(3) :521–526, 2004.
- [50] P. D. Cani, S. Hoste, Y. Guiot, and N. M. Delzenne. Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. *The British journal of nutrition*, 98(1) :32–37, 2007.
- [51] P. D. Cani, E. Joly, Y. Horsmans, and N. M. Delzenne. Oligofructose promotes satiety in healthy human : a pilot study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60(5) :567–572, 2006.
- [52] P. D. Cani, C. Knauf, M. A. Iglesias, D. J. Drucker, N. M. Delzenne, and R. Burcelin. Improvement of Glucose Tolerance and Hepatic Insulin Sensitivity by Oligofructose Requires a Functional Glucagon-Like Peptide 1 Receptor. *Diabetes*, 55(5) :1484–1490, May 2006.

- [53] P. D. Cani, E. Lecourt, E. M. Dewulf, F. M. Sohet, B. D. Pachikian, D. Naslain, F. De Backer, A. M. Neyrinck, and N. M. Delzenne. Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(5) :1236–1243, 2009.
- [54] P. D. Cani, A. Neyrinck, F. Fava, C. Knauf, R. Burcelin, K. Tuohy, G. Gibson, and N. Delzenne. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, 50 :2374–2383, 2007.
- [55] P. D. Cani, S. Possemiers, T. Van de Wiele, Y. Guiot, A. Everard, O. Rottier, L. Geurts, D. Naslain, A. M. Neyrinck, D. M. Lambert, G. G. Muccioli, and N. M. Delzenne. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, pages 1091–1103, 2009.
- [56] J.-M. Cavaillon and M. Adib-Conquy. Bench-to-bedside review : Endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Critical Care*, 10(5) :233, 2006.
- [57] M. V. Chakravarthy, Z. Pan, Y. Zhu, K. Tordjman, J. G. Schneider, T. Coleman, J. Turk, and C. F. Semenkovich. "New" hepatic fat activates PPAR $\alpha$  to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell metabolism*, 1(5) :309–322, 2005.
- [58] P. K. Chelikani, A. C. Haver, and R. D. Reidelberger. Intermittent intraperitoneal infusion of peptide YY(3-36) reduces daily food intake and adiposity in obese rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(1) :R39–R46, 2007.
- [59] G. Chen, G. Liang, J. Ou, J. L. Goldstein, and M. S. Brown. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(31) :11245–11250, 2004.
- [60] C. Cherbuy, C. Andrieux, E. Honvo-Houeto, M. Thomas, C. Ide, N. Druesne, C. Chaumontet, B. Darcy-Vrillon, and P.-H. Duée. Expression of mitochondrial HMGCoA synthase and glutaminase in the colonic mucosa is modulated by bacterial species. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 271(1) :87–95, 2004.
- [61] S. Chitturi, G. Farrell, L. Frost, A. Kriketos, R. Lin, C. Liddle, D. Samarasinghe, and J. George. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis : A manifestation of lipotoxicity ? *Hepatology*, 36(2) :403–409, 2002.
- [62] C. S. Choi, D. B. Savage, A. Kulkarni, X. X. Yu, Z.-X. Liu, K. Morino, S. Kim, A. Distefano, V. T. Samuel, S. Neschen, D. Zhang, A. Wang, X.-M. Zhang, M. Kahn, G. W. Cline, S. K. Pandey, J. G. Geisler, S. Bhanot, B. P. Monia, and G. I. Shulman. Suppression of Diacylglycerol Acyltransferase-2 (DGAT2), but Not DGAT1, with Antisense Oligonucleotides Reverses Diet-induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31) :22678–22688, 2007.

- [63] P. Chomczynski and N. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1) :156 – 159, 1987.
- [64] Z.-L. Chu, C. Carroll, J. Alfonso, V. Gutierrez, H. He, A. Lucman, M. Pedraza, H. Mondala, H. Gao, D. Bagnol, R. Chen, R. M. Jones, D. P. Behan, and J. Leonard. A Role for Intestinal Endocrine Cell-Expressed G Protein-Coupled Receptor 119 in Glycemic Control by Enhancing Glucagon-Like Peptide-1 and Glucose-Dependent Insulinotropic Peptide Release. *Endocrinology*, 149(5) :2038–2047, 2008.
- [65] P. Cohen, M. Miyazaki, N. D. Socci, A. Hagge-Greenberg, W. Liedtke, A. A. Soukas, R. Sharma, L. C. Hudgins, J. M. Ntambi, and J. M. Friedman. Role for Stearoyl-CoA Desaturase-1 in Leptin-Mediated Weight Loss. *Science*, 297(5579) :240–243, 2002.
- [66] H. Cortez-Pinto, H. Zhi Lin, S. Qi Yang, S. Odwin Da Costa, and A. Diehl. Lipids up-regulate uncoupling protein 2 expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology*, 116(5) :1184–1193, 1999.
- [67] E. K. Costello, C. L. Lauber, M. Hamady, N. Fierer, J. I. Gordon, and R. Knight. Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science*, 326(5960) :1694–1697, 2009.
- [68] J. Crespo, A. Cayón, P. Fernández-Gil, M. Hernández-Guerra, M. Mayorga, A. Domínguez-Díez, J. C. Fernández-Escalante, and F. Pons-Romero. Gene expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*, 34(6) :1158–1163, 2001.
- [69] M. Cuchel, L. T. Bloedon, P. O. Szapary, D. M. Kolansky, M. L. Wolfe, A. Sarkis, J. S. Millar, K. Ikewaki, E. S. Siegelman, R. E. Gregg, and D. J. Rader. Inhibition of Microsomal Triglyceride Transfer Protein in Familial Hypercholesterolemia. *New England Journal of Medicine*, 356(2) :148–156, 2007.
- [70] J. Cummings and G. Macfarlane. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Microbiology*, 70(6) :443–459, 1991.
- [71] J. H. Cummings and G. T. Macfarlane. Colonic microflora : Nutrition and health. *Nutrition*, 13(5) :476–478, 1997.
- [72] S. Dam-Larsen, M. Franzmann, I. B. Andersen, P. Christoffersen, L. B. Jensen, T. I. A. Sorensen, U. Becker, and F. Bendtsen. Long term prognosis of fatty liver : risk of chronic liver disease and death. *Gut*, 53(5) :750–755, 2004.
- [73] P. Dandona, R. Weinstock, K. Thusu, E. Abdel-Rahman, A. Aljada, and T. Wadden. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Sera of Obese Patients : Fall with Weight Loss. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(8) :2907–2910, 1998.
- [74] C. A. Daubioul, Y. Horsmans, P. Lambert, E. Danse, and N. M. Delzenne. Effects of oligofructose on glucose and lipid metabolism in patients with nonalcoholic steatohepatitis : results of a pilot study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59(5) :723–726, 2005.

- [75] M. F. De La Cochetière, T. Durand, P. Lepage, A. Bourreille, J. P. Galmiche, and J. Doré. Resilience of the Dominant Human Fecal Microbiota upon Short-Course Antibiotic Challenge. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11) :5588–5592, 2005.
- [76] C. B. de La Serre, C. L. Ellis, J. Lee, A. L. Hartman, J. C. Rutledge, and H. E. Raybould. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(2) :G440–G448, 2010.
- [77] N. M. Delzenne and P. Cani. Interaction between obesity and the gut microbiota : Relevance in nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 31(1) :15–31, 2011.
- [78] N. M. Delzenne and N. Kok. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2) :456S–458S, 2001.
- [79] R. Deopurkar, H. Ghanim, J. Friedman, S. Abuaysheh, C. L. Sia, P. Mohanty, P. Viswanathan, A. Chaudhuri, and P. Dandona. Differential Effects of Cream, Glucose and Orange Juice on Inflammation, Endotoxin and the Expression of Toll Like Receptor-4 and Suppressor of Cytokine Signaling-3. *Diabetes Care*, pages 991–997, 2010.
- [80] M. Derrien, M. C. Collado, K. Ben-Amor, S. Salminen, and W. M. de Vos. The Mucin Degradier *Akkermansia muciniphila* Is an Abundant Resident of the Human Intestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5) :1646–1648, March 1, 2008.
- [81] J.-P. Desprès, I. Lemieux, J. Bergeron, P. Pibarot, P. Mathieu, E. Larose, J. Rodés-Cabau, O. F. Bertrand, and P. Poirier. Abdominal Obesity and the Metabolic Syndrome : Contribution to Global Cardiometabolic Risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(6) :1039–1049, 2008.
- [82] L. Dethlefsen, S. Huse, M. L. Sogin, and D. A. Relman. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLoS Biol*, 6(11) :e280, 11 2008.
- [83] E. M. Dewulf, P. D. Cani, A. M. Neyrinck, S. Possemiers, A. V. Holle, G. G. Muccioli, L. Deldicque, L. B. Bindels, B. D. Pachikian, F. M. Sohet, E. Mignolet, M. Francaux, Y. Larondelle, and N. M. Delzenne. Inulin-type fructans with prebiotic properties counteract GPR43 overexpression and PPAR $\gamma$ -related adipogenesis in the white adipose tissue of high-fat diet-fed mice. 22(8) :712–722, 2011.
- [84] G. B. Di Gregorio, L. Hensley, T. Lu, G. Ranganathan, and P. A. Kern. Lipid and carbohydrate metabolism in mice with a targeted mutation in the il-6 gene : absence of development of age-related obesity. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 287(1) :E182–E187, 2004.
- [85] A. Didierlaurent, M. Simonet, and J.-C. Sirard. Intestinal epithelial barrier and mucosal immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62 :1285–1287, 2005.
- [86] A. Diehl. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines. *AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 10 :G1–G5, 2002.

- [87] J. Diez and P. Iglesias. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *European Journal of Endocrinology*, 148(3) :293–300, 2003.
- [88] P. Dobrzyn, A. Dobrzyn, M. Miyazaki, P. Cohen, E. Asilmaz, D. G. Hardie, J. M. Friedman, and J. M. Ntambi. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(17) :6409–6414, 2004.
- [89] H. Doege, R. A. Baillie, A. M. Ortegon, B. Tsang, Q. Wu, S. Punreddy, D. Hirsch, N. Watson, R. E. Gimeno, and A. Stahl. Targeted Deletion of FATP5 Reveals Multiple Functions in Liver Metabolism : Alterations in Hepatic Lipid Homeostasis. *Gastroenterology*, 130(4) :1245 – 1258, 2006.
- [90] K. L. Donnelly, C. I. Smith, S. J. Schwarzenberg, J. Jessurun, M. D. Boldt, and E. J. Parks. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(5) :1343–1351, 5 2005.
- [91] P. E. Dubé and P. L. Brubaker. Frontiers in glucagon-like peptide-2 : multiple actions, multiple mediators. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 293(2) :E460–E465, 2007.
- [92] P. E. Dubé, K. J. Rowland, and P. L. Brubaker. Glucagon-Like Peptide-2 Activates  $\beta$ -Catenin Signaling in the Mouse Intestinal Crypt : Role of Insulin-Like Growth Factor-I. *Endocrinology*, 149(1) :291–301, 2008.
- [93] M.-E. Dumas, R. H. Barton, A. Toye, O. Cloarec, C. Blancher, A. Rothwell, J. Fearnside, R. Tatoud, V. Blanc, J. C. Lindon, S. C. Mitchell, E. Holmes, M. I. McCarthy, J. Scott, D. Gauguier, and J. K. Nicholson. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33) :12511–12516, 2006.
- [94] S. H. Duncan, A. Belenguer, G. Holtrop, A. M. Johnstone, H. J. Flint, and G. E. Lobley. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4) :1073–1078, 2007.
- [95] S. H. Duncan, G. E. Lobley, G. Holtrop, J. Ince, A. M. Johnstone, P. Louis, and H. J. Flint. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Current Pharmaceutical Design*, 32(11) :1720–1724, 2008.
- [96] P. B. Eckburg, E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, and D. A. Relman. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728) :1635–1638, 2005.
- [97] M. Ekstedt, L. E. Franzén, U. L. Mathiesen, L. Thorelius, M. Holmqvist, G. Bodemar, and S. Kechagias. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*, 44(4) :865–873, 2006.

- [98] J. Eng, W. A. Kleinman, L. Singh, G. Singh, and J. P. Raufman. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from heloderma suspectum venom. further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *Journal of Biological Chemistry*, 267(11) :7402–5, 1992.
- [99] C. Erridge, T. Attina, C. M. Spickett, and D. J. Webb. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia : evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr*, 86(5) :1286–1292, 2007.
- [100] A. Everard, V. Lazarevic, M. Derrien, M. Girard, G. G. Muccioli, A. M. Neyrinck, S. Possemiers, A. Van Holle, P. FranÅgois, W. M. de Vos, N. M. Delzenne, J. Schrenzel, and P. D. Cani. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes*, 60(11) :2775–2786, 2011.
- [101] E. Fabbrini, S. Mohammed, F. Magkos, K. M. Korenblat, B. W. Patterson, and S. Klein. Alterations in Adipose Tissue and Hepatic Lipid Kinetics in Obese Men and Women With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 134(2) :424–431, 2008.
- [102] M. Fallani, D. Young, J. Scott, E. Norin, S. Amarri, R. Adam, M. Aguilera, S. Khanna, A. Gil, C. A. Edwards, J. Doré, and O. M. of the INFABIO Team. Intestinal Microbiota of 6-week-old Infants Across Europe : Geographic Influence Beyond Delivery Mode, Breast-feeding, and Antibiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 51(1) :77–84, 2010.
- [103] G. Fantuzzi and R. Faggioni. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *Journal of Leukocyte Biology*, 68(4) :437–446, 2000.
- [104] J. F. Fearnside, M.-E. Dumas, A. R. Rothwell, S. P. Wilder, O. Cloarec, A. Toye, C. Blancher, E. Holmes, R. Tatoud, R. H. Barton, J. Scott, J. K. Nicholson, and D. Gauguier. Phylometabonomic patterns of adaptation to high fat diet feeding in inbred mice. *PLoS ONE*, 3(2) :e1668, 02 2008.
- [105] E. A. Fisher, M. Pan, X. Chen, X. Wu, H. Wang, H. Jamil, J. D. Sparks, and K. J. Williams. The Triple Threat to Nascent Apolipoprotein B. *Journal of Biological Chemistry*, 276(30) :27855–27863, 2001.
- [106] C. K. Fleissner, N. Huebel, M. M. Abd El-Bary, G. Loh, S. Klaus, and M. Blaut. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. *British Journal of Nutrition*, 104 :919–929, 2010.
- [107] A. Flint, A. Raben, A. Astrup, and J. J. Holst. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *Journal of Clinical investigation*, 101(3) :515–520, 1998.
- [108] H. J. Flint, S. H. Duncan, K. P. Scott, and P. Louis. Interactions and competition within the microbial community of the human colon : links between diet and health. *Environmental Microbiology*, 9(5) :1101–1111, 2007.

- [109] J. Folch, M. Lees, and G. H. S. Stanley. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1) :497–509, 1957.
- [110] L. Fontana, J. C. Eagon, M. E. Trujillo, P. E. Scherer, and S. Klein. Visceral Fat Adipokine Secretion Is Associated With Systemic Inflammation in Obese Humans. *Diabetes*, 56(4) :1010–1013, 2007.
- [111] A. H. Franks, H. J. M. Harmsen, G. C. Raangs, G. J. Jansen, F. Schut, and G. W. Welling. Variations of Bacterial Populations in Human Feces Measured by Fluorescent In Situ Hybridization with Group-Specific 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9) :3336–3345, 1998.
- [112] V. Gaboriau-Routhiau, S. Rakotobe, E. Lécuyer, I. Mulder, A. Lan, C. Bridonneau, V. Rochet, A. Pisi, M. De Paepe, G. Brandi, G. Eberl, J. Snel, D. Kelly, and N. Cerf-Bensussan. The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. *Immunity*, 31(4) :677–689, 2009.
- [113] S. S. H. Gan, M. L. Talbot, and J. O. Jorgensen. Efficacy of surgery in the management of obesity-related type 2 diabetes mellitus. *ANZ Journal of Surgery*, 77(11) :958–962, 2007.
- [114] C. Gerald, M. W. Walker, L. Criscione, E. L. Gustafson, C. Batzl-Hartmann, K. E. Smith, , P. Vaysse, M. M. Durkin, T. M. Laz, D. L. Linemeyer, A. O. Schaffhauer, S. Whitebread, K. G. Hofbauer, R. I. Taber, T. A. Branchek, and R. L. Weinschenk. A receptor subtype involved in neuropeptide-y-induced food intake. *Nature*, 382(6587) :168–171, 1996.
- [115] H. Ghanim, S. Abuaysheh, C. L. Sia, K. Korzeniewski, A. Chaudhuri, J. M. Fernandez-Real, and P. Dandona. Increase in Plasma Endotoxin Concentrations and the Expression of Toll-Like Receptors and Suppressor of Cytokine Signaling-3 in Mononuclear Cells After a High-Fat, High-Carbohydrate Meal. *Diabetes Care*, 32(12) :2281–2287, 2009.
- [116] S. Ghoshal, J. Witta, J. Zhong, W. de Villiers, and E. Eckhardt. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J. Lipid Res.*, 50(1) :90–97, 2009.
- [117] E. Giannini, F. Botta, A. Cataldi, G. L. Tenconi, P. Ceppa, T. Barreca, and R. Testa. Leptin levels in nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis c. *Hepatogastroenterology*, 46(28) :2422–2425, 1999.
- [118] S. R. Gill, M. Pop, R. T. DeBoy, P. B. Eckburg, P. J. Turnbaugh, B. S. Samuel, J. I. Gordon, D. A. Relman, C. M. Fraser-Liggett, and K. E. Nelson. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science*, 312(5778) :1355–1359, 2006.
- [119] J. J. Godon, E. Zumstein, P. Dabert, F. Habouzit, and R. Moletta. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. 63(7) :2802–13, 1997.

- [120] J. R. Goudriaan, V. E. H. Dahlmans, B. Teusink, D. M. Ouwens, M. Febbraio, J. A. Maassen, J. A. Romijn, L. M. Havekes, and P. J. Voshol. CD36 deficiency increases insulin sensitivity in muscle, but induces insulin resistance in the liver in mice. *J. Lipid Res.*, 44(12) :2270–2277, 2003.
- [121] D. Grandt, M. Schimiczek, C. Beglinger, P. Layer, H. Goebell, V. Eysselein, and J. R. Jr. Two molecular forms of Peptide YY (PYY) are abundant in human blood : characterization of a radioimmunoassay recognizing PYY 1-36 and PYY 3-36. *Regulatory Peptides*, 51(2) :151 – 159, 1994.
- [122] P. Gérard and A. Bernalier-Donadille. Les fonctions majeures du microbiote intestinal. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42(2) :28–36, 2007.
- [123] P. Gérard, F. Béguet, P. Lepercq, L. Rigottier-Gois, V. Rochet, C. Andrieux, and C. Juste. Gnotobiotic rats harboring human intestinal microbiota as a model for studying cholesterol-to-coprostanol conversion. *FEMS Microbiology Ecology*, 47(3) :337–343, 2004.
- [124] P. Gérard, C. Brézillon, F. Quéré, A. Salmon, and S. Rabot. Characterization of cecal microbiota and response to an orally administered lactobacillus probiotic strain in the broiler chicken. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14(1-3) :115–122, 2008.
- [125] D. Greco, A. Kotronen, J. Westerbacka, O. Puig, P. Arkkila, T. Kiviluoto, S. Laitinen, M. Kolak, R. M. Fisher, A. Hamsten, P. Auvinen, and H. Yki-Jarvinen. Gene expression in human NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294(5) :G1281–1287, 2008.
- [126] A. Grefhorst, T. H. van Dijk, A. Hammer, F. H. van der Sluijs, R. Havinga, L. M. Havekes, J. A. Romijn, P. H. Groot, D.-J. Reijngoud, and F. Kuipers. Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289(5) :E829–838, 2005.
- [127] M. F. Gregor and G. S. Hotamisligil. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual Review of Immunology*, 29(1) :415–445, 2011.
- [128] H. J. M. Harmsen, P. Elfferich, F. Schut, and G. W. Welling. A 16S rRNA-targeted Probe for Detection of Lactobacilli and Enterococci in Faecal Samples by Fluorescent In Situ Hybridization. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11(1) :3–12, 1999.
- [129] H. J. M. Harmsen, G. C. Raangs, T. He, J. E. Degener, and G. W. Welling. Extensive Set of 16S rRNA-Based Probes for Detection of Bacteria in Human Feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6) :2982–2990, 2002.
- [130] H. J. M. Harmsen, A. C. M. Wildeboer-Veloo, J. Grijpstra, J. Knol, J. E. Degener, and G. W. Welling. Development of 16S rRNA-Based Probes for the *Coriobacterium* Group and the Atopobium Cluster and Their Application for Enumeration of *Coriobacteriaceae* in Human Feces from Volunteers of Different Age Groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10) :4523–4527, 2000.

- [131] J. W. Haukeland, J. K. Damås, Z. Konopski, E. M. Løberg, T. Haaland, I. Goverud, P. A. Torjesen, K. Birkeland, K. Bjøro, and P. Aukrust. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *Journal of hepatology*, 44(6) :1167–1174, 2006.
- [132] S. B. Heymsfield, A. S. Greenberg, K. Fujioka, R. M. Dixon, R. Kushner, T. Hunt, J. A. Lubina, J. Patane, B. Self, P. Hunt, and M. McCamish. Recombinant Leptin for Weight Loss in Obese and Lean Adults. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 282(16) :1568–1575, 1999.
- [133] M. A. Hildebrandt, C. Hoffmann, S. A. Sherrill-Mix, S. A. Keilbaugh, M. Hamady, Y.-Y. Chen, R. Knight, R. S. Ahima, F. Bushman, and G. D. Wu. High-Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity. *Gastroenterology*, 137(5) :1716 – 1724.e2, 2009.
- [134] M. Hällström, E. Eerola, R. Vuento, M. Janas, and O. Tammela. Effects of mode of delivery and necrotising enterocolitis on the intestinal microflora in preterm infants. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23 :463–470, 2004. 10.1007/s10096-004-1146-0.
- [135] L. V. Hooper, T. S. Stappenbeck, C. V. Hong, and J. I. Gordon. Angiogenins : a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nature Immunology*, 4(3) :269–273, 2003.
- [136] L. V. Hooper, M. H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P. G. Falk, and J. I. Gordon. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, 291(5505) :881–884, 2001.
- [137] J. D. Horton, Y. Bashmakov, I. Shimomura, and H. Shimano. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11) :5987–5992, 1998.
- [138] G. Hotamisligil, N. Shargill, and B. Spiegelman. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259(5091) :87–91, 1993.
- [139] G. S. Hotamisligil. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121) :860–867, 2006.
- [140] F. A. C. Howard and C. Henderson. Hydrogenation of polyunsaturated fatty acids by human colonic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 29(3) :193–196, 1999.
- [141] W. Huang, A. Metlakunta, N. Dedousis, P. Zhang, I. Sipula, J. J. Dube, D. K. Scott, and R. M. O’Doherty. Depletion of Liver Kupffer Cells Prevents the Development of Diet-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *Diabetes*, 59(2) :347–357, 2010.
- [142] J. M. Hui, A. Hodge, G. C. Farrell, J. G. Kench, A. Kriketos, and J. George. Beyond insulin resistance in NASH : TNF- $\alpha$  or adiponectin ? *Hepatology*, 40(1) :46–54, 2004.

- [143] K. Iizuka, R. K. Bruick, G. Liang, J. D. Horton, and K. Uyeda. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(19) :7281–7286, 2004.
- [144] K. Jaeger, B. Dijkstra, C. Colson, M. van Heuvel, and O. Misset. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev.*, 15(1) :29–63, 1994.
- [145] I. Jang, D. Hwang, J. Lee, K. Chae, Y. Kim, T. Kang, C. Kim, D. Shin, J. , Hwang, Y. Huh, and J. Cho. Physiological Difference between Dietary Obesity-Susceptible and Obesity-Resistant Sprague Dawley Rats in Response to Moderate High Fat Diet. *Experimental Animals*, 52(2) :99–107, 2003.
- [146] G. Jiang, Z. Li, F. Liu, K. Ellsworth, Q. Dallas-Yang, M. Wu, J. Ronan, C. Esau, C. Murphy, D. Szalkowski, R. Bergeron, T. Doebber, and B. B. Zhang. Prevention of obesity in mice by antisense oligonucleotide inhibitors of stearyl-CoA desaturase-1. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(4) :1030–1038, 4 2005.
- [147] Y. Kadooka, M. Sato, K. Imaizumi, A. Ogawa, K. Ikuyama, Y. Akai, M. Okano, M. Kagoshima, and T. Tsuchida. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr*, 64(6) :636–643, 2010.
- [148] M. Kalliomäki, M. Carmen Collado, S. Salminen, and E. Isolauri. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(3) :534–538, 2008.
- [149] S. Kaser, A. Moschen, A. Cayon, A. Kaser, J. Crespo, F. Pons-Romero, C. F. Ebenbichler, J. R. Patsch, and H. Tilg. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*, 54(1) :117–121, 2005.
- [150] D. Kawanami, K. Maemura, N. Takeda, T. Harada, T. Nojiri, Y. Imai, I. Manabe, K. Utsunomiya, and R. Nagai. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells : a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(2) :415 – 419, 2004.
- [151] J. M. Kellum, J. F. Kuemmerle, T. M. O’Dorisio, P. Rayford, D. Martin, K. Engle, L. Wolf, and H. J. Sugerman. Gastrointestinal hormone responses to meals before and after gastric bypass and vertical banded gastroplasty. *Annals of Surgery*, 211(6) :763–771, 1990.
- [152] D. M. Kendall, M. C. Riddle, J. Rosenstock, D. Zhuang, D. D. Kim, M. S. Fineman, and A. D. Baron. Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in patients with type 2 diabetes treated with metformin and a sulfonylurea. *Diabetes Care*, 28(5) :1083–1091, 2005.

- [153] H. Kenler, R. Brolin, and R. Cody. Changes in eating behavior after horizontal gastropasty and roux-en-y gastric bypass. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 52(1) :87–92, 1990.
- [154] Z. A. Khachatryan, Z. A. Ktsoyan, G. P. Manukyan, D. Kelly, K. A. Ghazaryan, and R. I. Aminov. Predominant role of host genetics in controlling the composition of gut microbiota. *PLoS ONE*, 3(8) :e3064, 08 2008.
- [155] H.-K. Kim, B.-S. Youn, M.-S. Shin, C. Namkoong, K. H. Park, J. H. Baik, J. B. Kim, J.-Y. Park, K.-U. Lee, Y.-B. Kim, and M.-S. Kim. Hypothalamic Angptl4/Fiaf is a Novel Regulator of Food Intake and Body Weight. pages 2772–2780, 2010.
- [156] J.-Y. Kim, E. van de Wall, M. Laplante, A. Azzara, M. E. Trujillo, S. M. Hofmann, T. Schraw, J. L. Durand, H. Li, G. Li, L. A. Jelicks, M. F. Mehler, D. Y. Hui, Y. Deshaies, G. I. Shulman, G. J. Schwartz, and P. E. Scherer. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(9) :2621–2637, 9 2007.
- [157] K.-H. Kim, K. Lee, Y. S. Moon, and H. S. Sul. A Cysteine-rich Adipose Tissue-specific Secretory Factor Inhibits Adipocyte Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14) :11252–11256, 2001.
- [158] P. J. Klover, A. H. Clementi, and R. A. Mooney. Interleukin-6 Depletion Selectively Improves Hepatic Insulin Action in Obesity. *Endocrinology*, 146(8) :3417–3427, 2005.
- [159] D. P. Koonen, R. L. Jacobs, M. Febbraio, M. E. Young, C.-L. M. Soltys, H. Ong, D. E. Vance, and J. R. Dyck. Increased Hepatic CD36 Expression Contributes to Dyslipidemia Associated With Diet-Induced Obesity. *Diabetes*, 56(12) :2863–2871, December 2007.
- [160] H. Kopp, C. Kopp, A. Festa, K. Krzyzanowska, S. Kriwanek, E. Minar, R. Roka, and G. Schernthaner. Impact of Weight Loss on Inflammatory Proteins and Their Association With the Insulin Resistance Syndrome in Morbidly Obese Patients. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(6) :1042–1047, 2003.
- [161] A. Kotronen and H. Yki-Jarvinen. Fatty liver. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(1) :27–38, 2008.
- [162] N. Kubota, Y. Terauchi, T. Yamauchi, T. Kubota, M. Moroi, J. Matsui, K. Eto, T. Yamashita, J. Kamon, H. Satoh, W. Yano, P. Froguel, R. Nagai, S. Kimura, T. Kadowaki, and T. Noda. Disruption of Adiponectin Causes Insulin Resistance and Neointimal Formation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29) :25863–25866, 2002.
- [163] C. M. Kusminski, P. G. McTernan, and S. Kumar. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin. Sci.*, 109(3) :243–256, 2005.
- [164] J. Landy, H. O. Al-Hassi, S. D. McLaughlin, A. W. Walker, P. J. Ciclitira, R. J. Nicholls, S. K. Clark, and A. L. Hart. Review article : faecal transplantation therapy for gastrointestinal disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 34(4) :409–415, 2011.

- [165] P. S. Langendijk, F. Schut, G. J. Jansen, G. C. Raangs, G. R. Kamphuis, M. H. Wilkinson, and G. W. Welling. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium spp.* with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8) :3069–75, 1995.
- [166] N. Larsen, F. K. Vogensen, F. W. J. van den Berg, D. S. Nielsen, A. S. Andreasen, B. K. Pedersen, W. A. Al-Soud, S. J. Sørensen, L. H. Hansen, and M. Jakobsen. Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLoS ONE*, 5(2) :e9085, 02 2010.
- [167] C. Le May, M. Caüzac, C. Diradourian, D. Perdereau, J. Girard, A.-F. Burnol, and J.-P. Pégrier. Fatty Acids Induce L-CPT I Gene Expression through a PPAR $\alpha$ -Independent Mechanism in Rat Hepatoma Cells. *The Journal of Nutrition*, 135(10) :2313–2319, 2005.
- [168] C. W. Le Roux, S. J. B. Aylwin, R. L. Batterham, C. M. Borg, F. Coyle, V. Prasad, S. Shurey, M. A. Ghatei, A. G. Patel, and S. R. Bloom. Gut Hormone Profiles Following Bariatric Surgery Favor an Anorectic State, Facilitate Weight Loss, and Improve Metabolic Parameters. *Annals of Surgery*, 243(1) :108–114, 2006.
- [169] I. A. Leclercq, A. D. S. Morais, B. Schroyen, N. V. Hul, and A. Geerts. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells : Mechanisms and consequences. *Journal of Hepatology*, 47(1) :142 – 156, 2007.
- [170] P. Lepage, P. Seksik, M. Sutren, M.-F. de la Cochetière, R. Jian, P. Marteau, and J. Doré. Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with ibd. *Inflammatory Bowel Diseases*, 11(5) :473–480, 2005.
- [171] P. Letteron, A. Sutton, A. Mansouri, B. Fromenty, and D. Pessayre. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein : Another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology*, 38(1) :133–140, 2003.
- [172] R. E. Ley, F. Bäckhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight, and J. I. Gordon. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31) :11070–11075, 2005.
- [173] R. E. Ley, P. J. Turnbaugh, S. Klein, and J. I. Gordon. Microbial ecology : Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122) :1022–1023, 2006.
- [174] H. Li, Z. Xie, J. Lin, H. Song, Q. Wang, K. Wang, M. Su, Y. Qiu, T. Zhao, K. Song, X. Wang, M. Zhou, P. Liu, G. Zhao, Q. Zhang, and W. Jia. Transcriptomic and Metabonomic Profiling of Obesity-Prone and Obesity-Resistant Rats under High Fat Diet. *Journal of Proteome Research*, 7(11) :4775–4783, 2008.
- [175] L. L. Listenberger, X. Han, S. E. Lewis, S. Cases, R. V. Farese, D. S. Ory, and J. E. Schaffer. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6) :3077–3082, 2003.

- [176] R. Luoto, M. Kalliomaki, K. Laitinen, and E. Isolauri. The impact of perinatal probiotic intervention on the development of overweight and obesity : follow-up study from birth to 10 years. *Int J Obes*, 34(10) :1531–1537, 2010.
- [177] G. Lutchman, A. Modi, D. E. Kleiner, K. Promrat, T. Heller, M. Ghany, B. Borg, R. Loomba, T. J. Liang, A. Premkumar, and J. H. Hoofnagle. The effects of discontinuing pioglitazone in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 46(2) :424–429, 2007.
- [178] K. Ma, A. Cabrero, P. K. Saha, H. Kojima, L. Li, B. H.-J. Chang, A. Paul, and L. Chan. Increased  $\beta$ -Oxidation but No Insulin Resistance or Glucose Intolerance in Mice Lacking Adiponectin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38) :34658–34661, 2002.
- [179] G. A. MacDonald and J. B. Prins. Peroxisomal fatty acid metabolism, peroxisomal proliferator-activated receptors and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 19(12) :1335–1337, 2004.
- [180] A. J. Macpherson and N. L. Harris. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 4(6) :478 – 485, 2004.
- [181] A. M. Madrid, C. Hurtado, M. Venegas, F. Cumsille, and C. Defilippi. Long-term treatment with cisapride and antibiotics in liver cirrhosis : effect on small intestinal motility, bacterial overgrowth, and liver function. *Am J Gastroenterol*, 96(4) :1251–1255, 2001.
- [182] S. Madsbad, O. Schmitz, J. Ranstam, G. Jakobsen, and D. R. Matthews. Improved glycemic control with no weight increase in patients with type 2 diabetes after once-daily treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 analog liraglutide (nn2211). *Diabetes Care*, 27(6) :1335–1342, 2004.
- [183] N. Maeda, I. Shimomura, K. Kishida, H. Nishizawa, M. Matsuda, H. Nagaretani, N. Furuyama, H. Kondo, M. Takahashi, Y. Arita, R. Komuro, N. Ouchi, S. Kihara, Y. Tochino, K. Okutomi, M. Horie, S. Takeda, T. Aoyama, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nature Medicine*, 8(7) :731–737, 2002.
- [184] J. G. Magalhaes, I. Tattoli, and S. E. Girardin. The intestinal epithelial barrier : How to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Seminars in Immunology*, 19(2) :106–115, 2007. The armed truce between the intestinal microflora and host mucosal immunity.
- [185] H. Malhi, S. F. Bronk, N. W. Werneburg, and G. J. Gores. Free Fatty Acids Induce JNK-dependent Hepatocyte Lipoapoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(17) :12093–12101, 2006.
- [186] M. Manco, M. Marcellini, G. Giannone, and V. Nobili. Correlation of Serum TNF- $\alpha$  Levels and Histologic Liver Injury Scores in Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *American Journal of Clinical Pathology*, 127(6) :954–960, 2007.

- [187] C. Manichanh, L. Rigottier-Gois, E. Bonnaud, K. Gloux, E. Pelletier, L. Frangeul, R. Nalin, C. Jarrin, P. Chardon, P. Marteau, J. Roca, and J. Dore. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, 55(2) :205–211, 2006.
- [188] W. Manz, R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt, and K.-H. Schleifer. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology*, 142(5) :1097–1106, 1996.
- [189] G. Marchesini and G. Forlani. NASH : From liver diseases to metabolic disorders and back to clinical hepatology. *Hepatology*, 35(2) :497–499, 2002.
- [190] S. Margetic, C. Gazzola, G. G. Pegg, and R. A. Hill. Leptin : a review of its peripheral actions and interactions. *International journal of obesity and related metabolic disorders journal of the International Association for the Study of Obesity*, 26(11) :1407–1433, 2002.
- [191] F.-P. J. Martin, Y. Wang, N. Sprenger, I. K. S. Yap, T. Lundstedt, P. Lek, S. Rezzi, Z. Ramadan, P. van Bladeren, L. B. Fay, S. Kochhar, Lindon, E. Holmes, and J. K. Nicholson. Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Molecular Systems Biology*, 4(157) :1–15, 2008.
- [192] K. M. Maslowski, A. T. Vieira, A. Ng, J. Kranich, F. Sierro, D. Yu, H. C. Schilter, M. S. Rolph, F. Mackay, D. Artis, R. J. Xavier, M. M. Teixeira, and C. R. Mackay. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43 . *Nature*, 461(7268) :1282 – 1286, 2009.
- [193] T. Matsuki, R. Horai, K. Sudo, and Y. Iwakura. IL-1 Plays an Important Role in Lipid Metabolism by Regulating Insulin Levels under Physiological Conditions. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(6) :877–888, 2003.
- [194] M. Membrez, F. Blancher, M. Jaquet, R. Bibiloni, P. D. Cani, R. G. Burcelin, I. Cortesy, K. Macé, and C. J. Chou. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *The FASEB Journal*, 22(7) :2416–2426, 2008.
- [195] M. Miyazaki, M. T. Flowers, H. Sampath, K. Chu, C. Otzelberger, X. Liu, and J. M. Ntambi. Hepatic Stearoyl-CoA Desaturase-1 Deficiency Protects Mice from Carbohydrate-Induced Adiposity and Hepatic Steatosis. *Cell metabolism*, 6(6) :484–496, 2007.
- [196] M. Miyazaki, M. Kato, K. Tanaka, M. Tanaka, M. Kohjima, K. Nakamura, M. Enjoji, M. Nakamuta, K. Kotoh, and R. Takayanagi. Increased hepatic expression of dipeptidyl peptidase-4 in non-alcoholic fatty liver disease and its association with insulin resistance and glucose metabolism. *Molecular Medicine Reports*, 5(3) :729–733, 2012.

- [197] M. Miyazaki, Y.-C. Kim, and J. M. Ntambi. A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-coa desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. *Journal of Lipid Research*, 42(7) :1018–1024, 2001.
- [198] M. Monetti, M. C. Levin, M. J. Watt, M. P. Sajan, S. Marmor, B. K. Hubbard, R. Stevens, J. R. Bain, C. B. Newgard, R. V. Farese, A. L. Hevener, and R. V. Farese. Dissociation of Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice Overexpressing DGAT in the Liver. *Cell metabolism*, 6(1) :69–78, 2007.
- [199] G. G. Muccioli, D. Naslain, F. Bäckhed, C. Reigstad, N. Lambert, N. M. Delzenne, and P. D. Cani. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Molecular Systems Biology*, 6(392) :712–722, 2010.
- [200] E. D. Muse, T. K. Lam, P. E. Scherer, and L. Rossetti. Hypothalamic resistin induces hepatic insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(6) :1670–1678, 6 2007.
- [201] G. Musso, R. Gambino, G. Biroli, M. Carello, E. Faga, G. Pacini, F. De Michieli, M. Cassader, M. Durazzo, M. Rizzetto, and G. Pagano. Hypoadiponectinemia Predicts the Severity of Hepatic Fibrosis and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Nondiabetic Nonobese Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*, 100(11) :46–54, 2005.
- [202] G. Musso, R. Gambino, and M. Cassader. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Progress in Lipid Research*, 48(1) :1 – 26, 2009.
- [203] I. Nadal, A. Santacruz, A. Marcos, J. Warnberg, M. Garagorri, L. A. Moreno, M. Martin-Matillas, C. Campoy, A. Marti, A. Molerés, M. Delgado, O. L. Veiga, M. Garcia-Fuentes, C. G. Redondo, and Y. Sanz. Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. 17(10).
- [204] K. Nakao, K. Nakata, N. Ohtsubo, M. Maeda, T. Moriuchi, T. Ichikawa, K. Hamasaki, Y. Kato, K. Eguchi, K. Yukawa, and N. Ishii. Association between nonalcoholic fatty liver, markers of obesity, and serum leptin level in young adults. *The American Journal of Gastroenterology*, 97(7) :1796 – 1801, 2002.
- [205] A. M. Neyrinck, P. D. Cani, E. M. Dewulf, F. D. Backer, L. B. Bindels, and N. M. Delzenne. Critical role of Kupffer cells in the management of diet-induced diabetes and obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385(3) :351 – 356, 2009.
- [206] A. M. Neyrinck, S. Possemiers, W. Verstraete, F. De Backer, P. Cani, and N. M. Delzenne. Dietary modulation of clostridial cluster XIVa gut bacteria (*Roseburia* spp.) by chitin-glucan fiber improves host metabolic alterations induced by high-fat diet in mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23(1) :51–59, 2012.

- [207] A. M. Neyrinck, H. S. Taper, V. Gevers, B. Declerck, and N. M. Delzenne. Inhibition of Kupffer cell activity induces hepatic triglyceride synthesis in fasted rats, independent of lipopolysaccharide challenge. *Journal of hepatology*, 36(4) :466–473, 2002.
- [208] P. Nicaise, A. Gleizes, F. Forestier, A. M. Quéro, and C. Labarre. Influence of intestinal bacterial flora on cytokine (IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$ ) production by mouse peritoneal macrophages. *European Cytokine Network*, 4(2) :133–138, 1993.
- [209] C. Orskov, L. Rabenhøj, A. Wettergren, H. Kofod, and J. J. Holst. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide i in humans. *Diabetes*, 43(4) :535–539, 1994.
- [210] N. Ouchi, S. Kihara, Y. Arita, K. Maeda, H. Kuriyama, Y. Okamoto, K. Hotta, M. Nishida, M. Takahashi, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. Novel Modulator for Endothelial Adhesion Molecules : Adipocyte-Derived Plasma Protein Adiponectin. *Circulation*, 100(25) :2473–2476, 1999.
- [211] C. Pagano, G. Soardo, W. Esposito, F. Fallo, L. Basan, D. Donnini, G. Federspil, L. A. Sechi, and R. Vettor. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. *European Journal of Endocrinology*, 152(1) :113–118, 2005.
- [212] C. Pagano, G. Soardo, C. Pilon, C. Milocco, L. Basan, G. Milan, D. Donnini, D. Faggian, M. Mussap, M. Plebani, C. Avellini, G. Federspil, L. A. Sechi, and R. Vettor. Increased Serum Resistin in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Related to Liver Disease Severity and Not to Insulin Resistance. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(3) :1081–1086, 2006.
- [213] C. Palmer, E. M. Bik, D. B. DiGiulio, D. A. Relman, and P. O. Brown. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol*, 5(7) :e177, 06 2007.
- [214] M. Pan, A. I. Cederbaum, Y.-L. Zhang, H. N. Ginsberg, K. J. Williams, and E. A. Fisher. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(9) :1277–1287, 2004.
- [215] J. A. Parnell and R. A. Reimer. Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(6) :1751–1759, 2009.
- [216] K. Paz, R. Hemi, D. LeRoith, A. Karasik, E. Elhanany, H. Kanety, and Y. Zick. A Molecular Basis for Insulin Resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 272(47) :29911–29918, 1997.
- [217] M. Pellemounter, M. Cullen, M. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone, and F. Collins. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 269(5223) :540–543, 1995.
- [218] J. Penders, C. Thijs, C. Vink, F. F. Stelma, B. Snijders, I. Kummeling, P. A. van den Brandt, and E. E. Stobberingh. Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. *Pediatrics*, 118(2) :511–521, August 2006.

- [219] J. Poniachik, A. Csendes, J. C. Diaz, J. Rojas, P. Burdiles, F. Maluenda, G. Smok, R. Rodrigo, and L. A. Videla. Increased production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in lipopolysaccharide-stimulated blood from obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine*, 33(5) :252 – 257, 2006.
- [220] X. Prieur, T. Roszer, and M. Ricote. Lipotoxicity in macrophages : evidence from diseases associated with the metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(3) :327 – 337, 2010.
- [221] J. Qin, R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K. S. Burgdorf, C. Manichanh, , T. Nielsen, N. Pons, F. Levenez, T. Yamada, D. R. Mende, J. Li, J. Xu, S. Li, D. Li, J. Cao, B. Wang, H. Liang, H. Zheng, Y. Xie, J. Tap, P. Lepage, M. Bertalan, J.-M. Batto, T. Hansen, D. Le Paslier, A. Linneberg, H. B. Nielsen, E. Pelletier, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, K. Turner, H. Zhu, C. Yu, S. Li, M. Jian, Y. Zhou, Y. Li, X. Zhang, S. Li, N. Qin, H. Yang, J. Wang, S. Brunak, J. Dore, F. Guarner, K. Kristiansen, O. Pedersen, J. Parkhill, J. Weissenbach, P. Bork, S. D. Ehrlich, and J. Wang. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285) :59–65, 2010.
- [222] S. Rabot, M. Membrez, A. Bruneau, P. GÃ¼rard, T. Harach, M. Moser, F. Raymond, R. Mansourian, and C. J. Chou. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *The FASEB Journal*, 24(12) :4948–4959, 2010.
- [223] C. Ramirez-Farias, K. Slezak, Z. Fuller, A. Duncan, G. Holtrop, and P. Louis. Effect of inulin on the human gut microbiota : stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *British Journal of Nutrition*, 101 :541–550, 2009.
- [224] B. Ravikumar, P. E. Carey, J. E. M. Snaar, D. K. Deelchand, D. B. Cook, R. D. G. Neely, P. T. English, M. J. Firbank, P. G. Morris, and R. Taylor. Real-time assessment of postprandial fat storage in liver and skeletal muscle in health and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288(4) :E789–797, 2005.
- [225] M. Roberfroid, G. R. Gibson, L. Hoyles, A. L. McCartney, R. Rastall, I. Rowland, D. Wolvers, B. Watzl, H. Szajewska, B. Stahl, F. Guarner, F. Respondek, K. Whelan, V. Coxam, M.-J. Davicco, L. L  otoing, Y. Wittrant, N. M. Delzenne, P. D. Cani, A. M. Neyrinck, and A. Meheust. Prebiotic effects : metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104 :S1–S63, 2010.
- [226] A. S. Rocca and P. L. Brubaker. Role of the Vagus Nerve in Mediating Proximal Nutrient-Induced Glucagon-Like Peptide-1 Secretion. *Endocrinology*, 140(4) :1687–1694, 1999.
- [227] C. Rousseau, F. Levenez, C. Fouqueray, J. Doré, A. Collignon, and P. Lepage. *Clostridium difficile* Colonization in Early Infancy Is Accompanied by Changes in Intestinal Microbiota Composition. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3) :858–865, 2011.

- [228] G. Sabio, M. Das, A. Mora, Z. Zhang, J. Y. Jun, H. J. Ko, T. Barrett, J. K. Kim, and R. J. Davis. A Stress Signaling Pathway in Adipose Tissue Regulates Hepatic Insulin Resistance. *Science*, 322(5907) :1539–1543, 2008.
- [229] N. H. Salzman, H. de Jong, Y. Paterson, H. J. M. Harmsen, G. W. Welling, and N. A. Bos. Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. *Microbiology*, 148(11) :3651–3660, 2002.
- [230] B. S. Samuel, A. Shaito, T. Motoike, F. E. Rey, F. Backhed, J. K. Manchester, R. E. Hammer, S. C. Williams, J. Crowley, M. Yanagisawa, and J. I. Gordon. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43) :16767–16772, 2008.
- [231] V. T. Samuel, Z.-X. Liu, A. Wang, S. A. Beddow, J. G. Geisler, M. Kahn, X.-m. Zhang, B. P. Monia, S. Bhanot, and G. I. Shulman. Inhibition of protein kinase Ce prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(3) :739–745, 3 2007.
- [232] A. Santacruz, A. Marcos, J. Warnberg, A. Marti, M. Martin-Matillas, C. Campoy, L. A. Moreno, O. Veiga, C. Redondo-Figuero, J. M. Garagorri, C. Azcona, M. Delgado, M. Garcia-Fuentes, M. C. Collado, and Y. Sanz. Interplay Between Weight Loss and Gut Microbiota Composition in Overweight Adolescents. *Obesity*, 17(10) :1906–1915, 2009.
- [233] J. Santos-Alvarez, R. Goberna, and V. Sanchez-Margalet. Human Leptin Stimulates Proliferation and Activation of Human Circulating Monocytes. *Cellular Immunology*, 194(1) :6 – 11, 1999.
- [234] K. Saunier, C. Rougé, C. Lay, L. Rigottier-Gois, and J. Doré. Enumeration of bacteria from the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota using Clep1156 16S rRNA probe in combination with helper and competitor oligonucleotides. *Systematic and applied microbiology*, 28(5) :454–464, 2005.
- [235] D. Savage. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Review of Microbiology*, 31 :107–133, 1977.
- [236] D. B. Savage, C. S. Choi, V. T. Samuel, Z.-X. Liu, D. Zhang, A. Wang, X.-M. Zhang, G. W. Cline, X. Y. Xian, J. G. Geisler, S. Bhanot, B. P. Monia, and G. I. Shulman. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(3) :817–824, 3 2006.
- [237] W. T. Schaiff, I. Bildirici, M. Cheong, P. L. Chern, D. M. Nelson, and Y. Sadovsky. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  and Retinoid X Receptor Signaling Regulate Fatty Acid Uptake by Primary Human Placental Trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(7) :4267–4275, 2005.

- [238] A. Scheen and F. Luyckx. Obesity and liver disease. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 16(4) :703–716, 2002.
- [239] D. H. Schmiel and V. L. Miller. Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes and Infection*, 1(13) :1103 – 1112, 1999.
- [240] A. Schroeder, O. Mueller, S. Stocker, R. Salowsky, M. Leiber, M. Gassmann, S. Lightfoot, W. Menzel, M. Granzow, and T. Ragg. The RIN : an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7(1) :3, 2006.
- [241] A. Schwartz, D. Taras, K. Schafer, S. Beijer, N. A. Bos, C. Donus, and P. D. Hardt. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity*, 18(1) :190–1905, 2009.
- [242] M. Sekiya, N. Yahagi, T. Matsuzaka, Y. Najima, M. Nakakuki, R. Nagai, S. Ishibashi, J.-i. Osuga, N. Yamada, and H. Shimano. Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology*, 38(6) :1529 – 1539, 2003.
- [243] A. Sghir, G. Gramet, A. Suau, V. Rochet, P. Pochart, and J. Doré. Quantification of Bacterial Groups within Human Fecal Flora by Oligonucleotide Probe Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5) :2263–2266, 2000.
- [244] H. Shi, M. V. Kokoeva, K. Inouye, I. Tzameli, H. Yin, and J. S. Flier. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 116(11) :3015–3025, 2006.
- [245] I. Shimomura, Y. Bashmakov, and J. D. Horton. Increased Levels of Nuclear SREBP-1c Associated with Fatty Livers in Two Mouse Models of Diabetes Mellitus. *Journal of Biological Chemistry*, 274(42) :30028–30032, 1999.
- [246] E. Slack, S. Hapfelmeier, B. Stecher, Y. Velykoredko, M. Stoel, M. A. E. Lawson, M. B. Geuking, B. Beutler, T. F. Tedder, W.-D. Hardt, P. Bercik, E. F. Verdu, K. D. McCoy, and A. J. Macpherson. Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science*, 325(5940) :617–620, 2009.
- [247] K. Smith, K. D. McCoy, and A. J. Macpherson. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Seminars in Immunology*, 19(2) :59 – 69, 2007. The armed truce between the intestinal microflora and host mucosal immunity.
- [248] J. A. Sánchez-Alcázar, E. Schneider, M. A. Martiñez, P. Carmona, I. Henandez-Muoz, E. Siles, P. De la Torre, J. Ruiz-Cabello, I. GarciAa, and J. A. Solis-Herruzo. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Increases the Steady-state Reduction of Cytochrome b of the Mitochondrial Respiratory Chain in Metabolically Inhibited L929 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18) :13353–13361, 2000.
- [249] H. Sokol, B. Pigneur, L. Watterlot, O. Lakhdari, L. G. Bermudez, J.-J. Gratadoux, S. Blugeon, C. Bridonneau, J.-P. Furet, G. Corthier, C. Grangette, N. Vasquez, P. Po-

- chart, G. Trugnan, G. Thomas, H. M. Blottière, J. Doré, P. Marteau, P. Seksik, and P. Langella. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. pages 16731–16736, 2008.
- [250] A. Spruss, G. Kanuri, S. Wagnerberger, S. Haub, S. C. Bischoff, and I. Bergheim. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*, 50(4) :1094–1104, 2009.
- [251] A. Stahl. A current review of fatty acid transport proteins (SLC27) . *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 5 :722 – 727, 2003.
- [252] C. M. Steppan, S. T. Bailey, S. Bhat, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahima, and M. A. Lazar. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409(6818) :307 – 312, 2004.
- [253] W. Stremmel, J. Pohl, A. Ring, and T. Herrmann. A new concept of cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids. *Lipids*, 36 :981–989, 2001.
- [254] J. Stsepetova, E. Sepp, H. Kolk, K. Loivukene, E. Songisepp, and M. Mikelsaar. Diversity and metabolic impact of intestinal *Lactobacillus* species in healthy adults and the elderly. *The British journal of nutrition*, 105(8) :1235–1244, 2011.
- [255] A. Suau, R. Bonnet, M. Sutren, J.-J. Godon, G. R. Gibson, M. D. Collins, and J. Doré. Direct Analysis of Genes Encoding 16S rRNA from Complex Communities Reveals Many Novel Molecular Species within the Human Gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11) :4799–4807, 1999.
- [256] J. Tap, S. Mondot, F. Levenez, E. Pelletier, C. Caron, J.-P. Furet, E. Ugarte, R. Muñoz-Tamayo, D. L. E. Paslier, R. Nalin, J. Dore, and M. Leclerc. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology*, 11(10) :2574–2584, 2009.
- [257] A. H. Terpstra. Effect of conjugated linoleic acid on body composition and plasma lipids in humans : an overview of the literature. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(3) :352–361, 2004.
- [258] H. Tilg. The Role of Cytokines in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Digestive Diseases*, 28(1) :179–185, 2010.
- [259] H. Tilg and A. R. Moschen. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends in Endocrinology amp ; Metabolism*, 19(10) :371 – 379, 2008.
- [260] M. T. Timlin and E. J. Parks. Temporal pattern of de novo lipogenesis in the post-prandial state in healthy men. *Am J Clin Nutr*, 81(1) :35–42, 2005.
- [261] K. Tomita, G. Tamiya, S. Ando, K. Ohsumi, T. Chiyo, A. Mizutani, N. Kitamura, K. Toda, T. Kaneko, Y. Horie, J.-Y. Han, S. Kato, M. Shimoda, Y. Oike, M. Tomizawa, S. Makino, T. Ohkura, H. Saito, N. Kumagai, H. Nagata, H. Ishii, and T. Hibi. Tumour necrosis factor  $\alpha$  signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut*, 55(3) :415–424, 2006.

- [262] P. J. Turnbaugh, F. Bäckhed, L. Fulton, and J. I. Gordon. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*, 17(4) :213 – 23, 2008.
- [263] P. J. Turnbaugh, R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis, and J. I. Gordon. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444 :1027–1031, 2006.
- [264] P. J. Turnbaugh, V. K. Ridaura, J. J. Faith, F. E. Rey, R. Knight, and J. I. Gordon. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome : A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Science Translational Medicine*, 1(6) :6ra14, 2009.
- [265] N. Ueno, A. Inui, M. Iwamoto, T. Kaga, A. Asakawa, M. Okita, M. Fujimiya, Y. Nakajima, Y. Ohmoto, M. Ohnaka, Y. Nakaya, J.-I. Miyazaki, and M. Kasuga. Decreased food intake and body weight in pancreatic polypeptide-overexpressing mice. *Gastroenterology*, 117(6) :1427–1432, 1999.
- [266] K. Uyeda and J. J. Repa. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metabolism*, 4(2) :107 – 110, 2006.
- [267] K. Uysal, S. Wiesbrock, M. Marino, and G. Hotamisligil. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature*, 389(6651) :610–614, 1993.
- [268] P. Van den Abbeele, P. Gérard, S. Rabot, A. Bruneau, S. El Aidy, M. Derrien, M. Kleerebezem, E. G. Zoetendal, H. Smidt, W. Verstraete, T. Van de Wiele, and S. Possemiers. Arabinoxylans and inulin differentially modulate the mucosal and luminal gut microbiota and mucin-degradation in humanized rats. *Environmental Microbiology*, 13(10) :2667–2680, 2011.
- [269] P. Veiga, C. Juste, P. Lepercq, K. Saunier, F. Béguet, and P. Gérard. Correlation between faecal microbial community structure and cholesterol-to-coprostanol conversion in the human gut. *FEMS Microbiology Letters*, 242(1) :81–86, 2005.
- [270] M. Vijay-Kumar, J. D. Aitken, F. A. Carvalho, T. C. Cullender, S. Mwangi, S. Srinivasan, S. V. Sitaraman, R. Knight, R. E. Ley, and A. T. Gewirtz. Metabolic Syndrome and Altered Gut Microbiota in Mice Lacking Toll-Like Receptor 5. *Science*, 328(5975) :228–231, 2010.
- [271] A. W. Walker, J. Ince, S. H. Duncan, L. M. Webster, G. Holtrop, X. Ze, D. Brown, M. D. Stares, P. Scott, A. Bergerat, P. Louis, F. McIntosh, A. M. Johnstone, G. E. Lobley, J. Parkhill, and H. J. Flint. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J*, 5(2) :220–230, 2011.
- [272] R. Wall, R. P. Ross, F. Shanahan, L. O’Mahony, C. O’Mahony, M. Coakley, O. Hart, P. Lawlor, E. M. Quigley, B. Kiely, G. F. Fitzgerald, and C. Stanton. Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine

- liver and adipose tissues. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(5) :1393–1401, 2009.
- [273] V. Wallenius, K. Wallenius, B. Ahren, M. Rudling, H. Carlsten, S. L. Dickson, C. Ohlsson, and J.-O. Jansson. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Endocrinology*, 8(1) :75–79, 2002.
- [274] G. Wallner, R. Amann, and W. Beisker. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, 14(2) :136–143, 1993.
- [275] Y. Wei, R. S. Rector, J. P. Thyfault, and J. A. Ibdah. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World Journal of Gastroenterology*, 14(2) :193–199, 2008.
- [276] K. E. Wellen and G. S. Hotamisligil. Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(5) :1111–1119, 5 2005.
- [277] A. Wieckowska, B. G. Papouchado, Z. Li, R. Lopez, N. N. Zein, and A. E. Feldstein. Increased Hepatic and Circulating Interleukin-6 Levels in Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *The American College of Gastroenterology*, 103(6) :1372–1379, 2008.
- [278] T. D. Wilkins and A. S. Hackman. Two patterns of neutral steroid conversion in the feces of normal north americans. *Cancer Research*, 34(9) :2250–2254, 1974.
- [279] K. H. Wilson, J. S. Ikeda, and R. B. Blitchington. Phylogenetic placement of community members of human colonic biota. *Clinical Infectious Diseases*, 25(Supplement 2) :S114–S116, 1997.
- [280] C. R. Woese, O. Kandler, and M. L. Wheelis. Towards a natural system of organisms : proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12) :4576–4579, 1990.
- [281] V. W. Wong, A. Y. Hui, S. W. Tsang, J. L. Chan, A. M. Tse, K. Chan, W. So, A. Y. Cheng, W. Ng, G. L. Wong, J. J. Sung, and H. L. Chan. Metabolic and Adipokine Profile of Chinese Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clinical gastroenterology and hepatology*, 4(9) :1154–1161, 2006.
- [282] B. Wostmann, C. Larkin, A. Moriarty, and E. Bruckner-Kardoss. Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats. *Lab Anim Sci*, 33(1) :46–50, 1983.
- [283] X. Wu, C. Ma, L. Han, M. Nawaz, F. Gao, X. Zhang, P. Yu, C. Zhao, L. Li, A. Zhou, J. Wang, J. Moore, B. Cherie Millar, and J. Xu. Molecular Characterisation of the Faecal Microbiota in Patients with Type II Diabetes. *Current Microbiology*, 61 :69–78, 2010.
- [284] K. Yamaguchi, L. Yang, S. McCall, J. Huang, X. X. Yu, S. K. Pandey, S. Bhanot, B. P. Monia, Y.-X. Li, and A. M. Diehl. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 45(6) :1366–1374, 2007.

- [285] T. Yamauchi, Y. Nio, T. Maki, M. Kobayashi, T. Takazawa, M. Iwabu, M. Okada-Iwabu, S. Kawamoto, N. Kubota, T. Kubota, Y. Ito, J. Kamon, A. Tsuchida, K. Kumagai, H. Kozono, Y. Hada, H. Ogata, K. Tokuyama, M. Tsunoda, T. Ide, K. Murakami, M. Awazawa, I. Takamoto, P. Froguel, K. Hara, K. Tobe, R. Nagai, K. Ueki, and T. Kadowaki. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nature Medicine*, 13(3) :332–339, 2007.
- [286] S. Yang, H. Lin, M. Lane, M. Clemens, and A. Diehl. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury : implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 :2557–2562, 1997.
- [287] M. M. Yeh and E. M. Brunt. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *American Journal of Clinical Pathology*, 128(5) :837–847, 2007.
- [288] Z. Younossi, M. Jarrar, C. Nugent, M. Randhawa, M. Afendy, M. Stepanova, N. Rafiq, Z. Goodman, V. Chandhoke, and A. Baranova. A Novel Diagnostic Biomarker Panel for Obesity-related Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *Obesity Surgery*, 18 :1430–1437, 2008.
- [289] C. Yu, Y. Chen, G. W. Cline, D. Zhang, H. Zong, Y. Wang, R. Bergeron, J. K. Kim, S. W. Cushman, G. J. Cooney, B. Atcheson, M. F. White, E. W. Kraegen, and G. I. Shulman. Mechanism by Which Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)-associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52) :50230–50236, 2002.
- [290] X. X. Yu, S. F. Murray, S. K. Pandey, S. L. Booten, D. Bao, X.-Z. Song, S. Kelly, S. Chen, R. McKay, B. P. Monia, and S. Bhanot. Antisense oligonucleotide reduction of DGAT2 expression improves hepatic steatosis and hyperlipidemia in obese mice. *Hepatology*, 42(2) :362–371, 2005.
- [291] M. Yuan, N. Konstantopoulos, J. Lee, L. Hansen, Z.-W. Li, M. Karin, and S. E. Shoelson. Reversal of Obesity- and Diet-Induced Insulin Resistance with Salicylates or Targeted Disruption of IKK $\beta$  . *Science*, 293(5535) :1673–1677, 2001.
- [292] M. S. Zaibi, C. J. Stocker, J. O’Dowd, A. Davies, M. Bellahcene, M. A. Cawthorne, A. J. Brown, D. M. Smith, and J. R. Arch. Roles of GPR41 and GPR43 in leptin secretory responses of murine adipocytes to short chain fatty acids. *FEBS Letters*, 584(11) :2381 – 2386, 2010.
- [293] M. Zander, S. Madsbad, J. L. Madsen, and J. J. Holst. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and  $\beta$ -cell function in type 2 diabetes : a parallel-group study. *The Lancet*, 359(9309) :824–830, 2002.
- [294] C. Zhang, M. Zhang, S. Wang, R. Han, Y. Cao, W. Hua, Y. Mao, X. Zhang, X. Pang, C. Wei, G. Zhao, Y. Chen, and L. Zhao. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J*, 4(2) :232–241, 2010.

- [295] H. Zhang, J. K. DiBaise, A. Zuccolo, D. Kudrna, M. Braidotti, Y. Yu, P. Parameswaran, M. D. Crowell, R. Wing, B. E. Rittmann, and R. Krajmalnik-Brown. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009.
- [296] Y.-L. Zhang, A. Hernandez-Ono, C. Ko, K. Yasunaga, L.-S. Huang, and H. N. Ginsberg. Regulation of Hepatic Apolipoprotein B-lipoprotein Assembly and Secretion by the Availability of Fatty Acids. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18) :19362–19374, 2004.
- [297] J. Zhou, M. Febbraio, T. Wada, Y. Zhai, R. Kuruba, J. He, J. H. Lee, S. Khadem, S. Ren, S. Li, R. L. Silverstein, and W. Xie. Hepatic Fatty Acid Transporter Cd36 Is a Common Target of LXR, PXR, and PPAR $\gamma$  in Promoting Steatosis. *Gastroenterology*, 134(2) :556 – 567.e1, 2008.
- [298] J. Zhou, R. J. Martin, R. T. Tulley, A. M. Raggio, K. L. McCutcheon, L. Shen, S. C. Danna, S. Tripathy, M. Hegsted, and M. J. Keenan. Dietary resistant starch upregulates total glp-1 and ppy in a sustained day-long manner through fermentation in rodents. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 295(5) :E1160–E1166, 2008.
- [299] E. G. Zoetendal, A. D. Akkermans, and W. M. De Vos. Temperature Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S rRNA from Human Fecal Samples Reveals Stable and Host-Specific Communities of Active Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(10) :3854–3859, 1998.
- [300] E. G. Zoetendal, A. D. L. Akkermans, W. M. Akkermans-van Vliet, J. A. G. M. de Visser, and W. M. de Vos. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 13(3) :129–134, 2001.
- [301] E. G. Zoetendal, C. T. Collier, S. Koike, R. I. Mackie, and H. R. Gaskins. Molecular Ecological Analysis of the Gastrointestinal Microbiota : A Review. *The Journal of Nutrition*, 134(2) :465–472, 2004.
- [302] E. G. Zoetendal, E. E. Vaughan, and W. M. De Vos. A microbial world within us. *Molecular Microbiology*, 59(6) :1639–1650, 2006.
- [303] E. G. Zoetendal, A. von Wright, T. Vilpponen-Salmela, K. Ben-Amor, A. D. L. Akkermans, and W. M. de Vos. Mucosa-Associated Bacteria in the Human Gastrointestinal Tract Are Uniformly Distributed along the Colon and Differ from the Community Recovered from Feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7) :3401–3407, 2002.
- [304] C. C. Zou, L. Liang, F. Hong, J. F. Fu, and Z. Y. Zhao. Serum Adiponectin, Resistin Levels and Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Obese Children. *Endocrine Journal*, 52(5) :519–524, 2005.