



THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : *l'université Toulouse III – Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Physiopathologie cellulaire, moléculaire et intégrée*

Présentée et soutenue par *Elodie LUCHE*
Le 16 novembre 2011

Titre : *RÔLE DE L'ENDOTOXEMIE METABOLIQUE SUR LE TISSU ADIPEUX BLANC AU COURS DU DEVELOPPEMENT DES MALADIES METABOLIQUES*

JURY
Pr Pierre GOURDY
Dr Catherine POSTIC
Dr Jean-Philippe BASTARD
Dr Christian DANI
Dr Rémy BURCELIN

Ecole doctorale : *Biologie, Santé et Biotechnologie*
Unité de recherche : *INSERM U1048*
Directeur(s) de Thèse : *Dr Rémy BURCELIN*
Rapporteurs : *Dr Catherine POSTIC, Dr Jean-Philippe BASTARD, Dr Christian DANI*

RESUME

Les maladies métaboliques telles que le diabète de type 2 et l'obésité sont associées à une inflammation de basse intensité. Cette inflammation, retrouvée notamment au niveau du tissu adipeux, a été décrite comme délétère au cours de l'insulino-résistance. Le facteur moléculaire et initiateur de ce processus inflammatoire reste inconnu. Nous avons précédemment montré qu'un régime riche en gras induisait une augmentation de la concentration en lipopolysaccharides (LPS) dans le sang circulant (endotoxémie). Le but de cette étude a donc été de mieux appréhender l'impact d'un facteur bactérien d'origine intestinale comme les LPS sur le tissu adipeux blanc afin de savoir s'il pouvait cibler directement le tissu adipeux et initier le développement de l'inflammation. Exclusivement basée sur l'étude de modèles animaux in vivo, notre approche expérimentale nous a permis de démontrer que les LPS d'origine nutritionnelle pouvaient être initiateurs des maladies métaboliques en agissant de façon directe sur le tissu adipeux.

En effet les LPS sont capables d'agir directement sur les cellules du tissu adipeux en initiant l'inflammation et l'hyperplasie de ce tissu favorisant son développement et l'apparition de maladies métaboliques.

Nous avons également mis en évidence le rôle des cellules myéloïdes en réponse au LPS au cours du développement du diabète de type 2.

Ainsi limiter l'action du LPS sur le tissu adipeux en diminuant les concentrations plasmatiques pourrait être une stratégie efficace pour réduire l'impact délétère des modes alimentaires hyperlipidiques.

SOMMAIRE

PROBLEMATIQUE DE RECHERCHE

INTRODUCTION	10
I. TISSU ADIPEUX (TA) : ORGANE CLE DES MALADIES METABOLIQUES ?	11
I.1 Définition, Index de mesure et Epidémiologie de l'obésité	11
I.2 Evolution du tissu adipeux au cours des maladies métaboliques associées à l'obésité	13
I.2.1 Généralités	13
I.2.2 Développement du TA	16
I.2.3 Distribution anatomique des TA	19
I.2.4 Modifications du TA au cours des maladies métaboliques associées à l'obésité	23
I.2.4.1 Métabolisme du TA	23
I.2.4.1.1 La synthèse des triglycérides	23
I.2.4.1.1.1 Captage des acides gras exogènes	24
I.2.4.1.1.2 Synthèse des acides gras	24
I.2.4.1.1.3 Estérification des acides gras	26
I. 2.4.1.2 Hydrolyse des triglycérides : la lipolyse	28
I. 2.4.1.3 Contrôle hormonal du métabolisme adipeux	28
I. 2.4.1.3.1 Contrôle des acides gras exogènes	29
I. 2.4.1.3.2 Contrôle de la lipogenèse <i>de novo</i>	29
I. 2.4.1.3.3 Contrôle de l'estérification des acides gras	29
I. 2.4.1.3.4 Contrôle de la lipolyse	30
I.2.4.2 Plasticité du TA	33
I.2.4.2.1 Le rôle de la vascularisation du TA dans son développement	33
I.2.4.2.1.1 Rôle dans la formation du TA	33
I.2.4.2.1.2 Rôle dans le développement du TA	34
I.2.4.2.2 La plasticité de l'adipocyte : avantage ou inconvénient	34
I.2.4.2.3 Le préadipocyte : un réservoir d'adipocyte ?	36
I.2.4.3 Sécrétion et inflammation du TA	38
I.2.4.3.1 Sécrétion	38
I.2.4.3.2 Inflammation	39
I.2.4.3.2.1 Les effecteurs cellulaires	40
➤ <i>Les macrophages</i>	41
➤ <i>Les lymphocytes</i>	47
I.2.4.3.2.2 Les effecteurs humoraux	50

➤ <i>Le TNF alpha</i>	50
➤ <i>L'interleukine-6</i>	51
➤ <i>L'interleukine-1</i>	52
I.2.4.4 Conséquences des modifications fonctionnelles du TA	54
I.2.4.4.1 Les acides gras à l'origine du phénomène de lipotoxicité	55
I.2.4.4.2 Hypothèse portale	56
I.2.4.4.3 Accumulation ectopique de lipides dans les tissus non adipeux	58
I.2.4.4.4 Les adipokines	59
II. BACTERIES ET HÔTES	60
II.1 La flore intestinale	60
II.1.1 Le développement de la flore intestinale	61
II.1.2 Caractéristiques de la flore intestinale	62
II.2 Flore intestinale et pathologies associées	64
II.2.1 Maladies inflammatoires intestinales : Maladie de Crohn et colite ulcéreuse	64
II.2.2 Diabète de type 1	65
II.2.3 Maladies métaboliques et insulino-résistante	66
II.2.3.1 Lien entre les maladies métaboliques et la flore intestinale	66
II.2.3.2 Changement de flore : cause ou conséquences des maladies métaboliques	67
II.2.3.3 Comment la flore peut-elle modifier l'homéostasie énergétique	69
II.2.3.3.1 Les bactéries intestinales régulent le stockage de l'énergie chez leur hôte	69
II.2.3.3.2 Les bactéries intestinales pourraient-elles être à l'origine de l'inflammation des maladies métaboliques	72
II.2.3.3.2.1 Les lipopolysaccharides	72
➤ <i>Généralités : Structure du LPS</i>	72
➤ <i>Entrée du LPS : Passage de la barrière intestinale</i>	73
➤ <i>Transport sanguin du LPS : Lipoprotéine et LBP (LPS Binding Protein)</i>	74
➤ <i>Signalisation du LPS</i>	75
II.2.3.3.2.2 Relation entre le LPS et les maladies métaboliques	76
➤ <i>L'endotoxémie métabolique</i>	76
➤ <i>LPS, prise de poids, insulino-résistance et inflammation</i>	77
➤ <i>Signalisation de l'insuline</i>	80
II.2.3.3.2.3 Les bactéries intestinales dans le développement de la stéatose hépatique non alcoolique	82
II.2.3.3.3 Le microbiote intestinal : future cible thérapeutique ?	83
III. OBJECTIFS	86
IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS	88

IV.1 Article	90
IV.1.1 Résumé	91
IV.1.2 Article	93
IV.1.3 Discussion article	132
IV.1.3.1 Le tissu adipeux : organe cible direct de l'endotoxémie métabolique	132
IV.1.3.2 Cellules de dépôts adipeux responsables de l'inflammation	135
IV.1.3.3 Hyperplasie et inflammation	138
IV.1.3.4 Développement du dépôt adipeux et perturbation métabolique	140
IV.2 Résultats complémentaires 1	141
IV.3 Résultats complémentaires 2	151
V. CONCLUSION	152
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	156
ANNEXES	170



PROBLEMATIQUE DE RECHERCHE

L'organisme doit utiliser continuellement des substrats énergétiques pour maintenir en permanence ses fonctions vitales alors que la fourniture de ces substrats par l'alimentation est périodique. Il est donc nécessaire de stocker cette énergie afin qu'elle puisse être mise à disposition en période interprandiale. De nombreux mécanismes de régulation précis et coordonnés entre eux existent afin de maintenir l'homéostasie énergétique ou balance énergétique. **L'homéostasie énergétique est définie comme un état d'équilibre entre les apports d'énergie dans le sang d'une part et l'utilisation/stockage par les tissus d'autre part. Un déséquilibre de cette balance entraîne alors une augmentation ou diminution de la glycémie.** L'hyperglycémie répétée et prolongée entraîne des effets délétères qui se manifestent à long terme et ont de nombreuses conséquences sur l'individu : rétinopathie, néphropathie et maladies cardiovasculaires. Ces complications engendrent de lourdes dépenses de santé qui ne cessent de croître et représentent un véritable problème de santé publique. Les différentes stratégies thérapeutiques utilisées pour agir sur les symptômes de cette maladie, développées depuis 1960, ne sont pas suffisantes à enrayer cette véritable épidémie. De nouvelles cibles doivent donc être envisagées. Un nouvel axe d'action consistant à agir sur les facteurs de risques du diabète de type 2 par de simple mesure de prévention hygiéno-diététique semble prometteur. La génétique, le stress, le tabac ou encore l'alcool représentent de multiples facteurs de risques de cette maladie. Au cours de ce manuscrit nous allons développer le rôle de 2 facteurs, largement associés, que sont **une alimentation trop riche** ainsi que **l'obésité**. **Nous verrons alors l'émergence d'un nouveau facteur de risque, la flore intestinale, capable d'établir le lien entre une alimentation trop riche et l'obésité**

INTRODUCTION



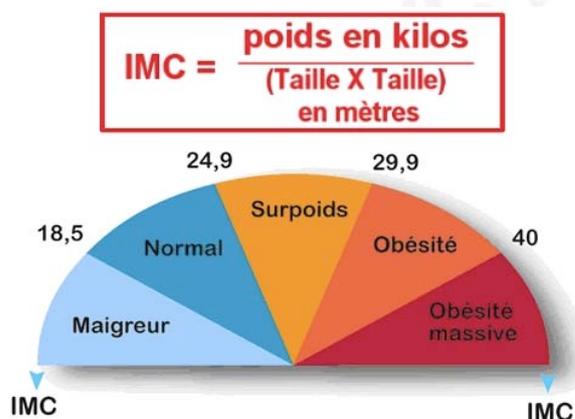
I : Tissu Adipeux : Organe clé des Maladies

Métaboliques ?

I.1 Définition, Index de mesure et Epidémiologie de l'obésité.

L'obésité est reconnue comme maladie chronique depuis 1997 par l'OMS. Cette organisation définit « **le surpoids et l'obésité comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé** ». Le principal indicateur de mesure utilisé est **l'indice de masse corporelle (IMC)**. Pour les adultes, l'indice de masse corporelle est égal à la masse (exprimée en kilogrammes) divisée par le carré de la taille de la personne (en mètre) :

- * Un IMC entre 18,5 et 25 est considéré comme normal chez un adulte.
- * Au-delà de 30, on parle d'obésité.
- * De 35 à 40, on parle d'obésité sévère et, au-delà de 40, d'obésité morbide.



Les limites de cette mesure résident dans le fait que l'IMC se base principalement sur une population de type européenne et surtout ne tient pas compte de la répartition des graisses dans l'organisme alors que cela peut être la cause de certaines pathologies associées à l'obésité. On peut également déterminer l'adiposité d'un individu en mesurant simplement le tour de taille ou en calculant le ratio tour de taille/tour de hanches (Hamdy, Porramatikul et al. 2006; Ness-Abramof and Apovian 2008; Ross, Berentzen et al. 2008). Cette mesure ne permet toujours pas de caractériser la localisation des dépôts adipeux mais renseigne sur un développement anormal du tissu adipeux.

Une autre alternative à ces mesures est l'indice de masse graisseuse qui ne tient pas compte de la taille et du poids mais simplement du taux de graisse et de muscle contenu dans le corps de l'individu. Cette mesure fine de l'obésité via la quantification des dépôts adipeux peut se faire par tomodensitométrie (CT-scan) ou par imagerie à résonance magnétique (IRM). Un taux normal de graisse se situe entre 17% et 22%. Ces méthodes basées sur l'utilisation des rayons X permettent de localiser et de quantifier précisément le tissu adipeux au sein de l'organisme (Shen, Wang et al. 2003).

Aujourd'hui l'obésité est la première maladie non infectieuse de l'Histoire. Le World Health Organization (WHO) prédit qu'il y aura 2,3 milliards d'adultes en surpoids dont 700 millions d'obèses en 2015. Les chiffres étaient de 1,6 milliards d'adultes en surpoids dont 400 millions d'obèses en 2006. L'obésité est actuellement un véritable problème de santé publique encore inconnu il y a 50 ans et frappant aussi bien les pays industrialisés que les pays en voie de développement.

Les causes de l'obésité sont complexes puisque cette pathologie fait intervenir des déterminants d'ordre génétique, biologique, psychologique mais implique aussi les comportements individuels et les facteurs économiques et sociaux. Plusieurs expériences sur

des paires de jumeaux ont montré que la ressemblance en matière de corpulence est étroitement liée aux gènes en commun. L'absence de différence de BMI chez des jumeaux homozygotes séparés ou élevés ensemble confirme l'influence essentielle des facteurs génétiques (Stunkard, Harris et al. 1990). La découverte de gènes responsables de l'obésité constitue également une preuve du déterminisme génétique de cette maladie. Cependant la génétique seule ne peut être responsable de l'obésité. En effet, alors que le patrimoine génétique demeure relativement stable au cours des siècles, nous venons de voir que la prévalence de l'obésité explosait au cours des dernières décennies. Il semble donc que l'interaction entre des gènes prédisposant à l'obésité et un environnement délétère participent au développement de l'obésité. Il est intéressant de rappeler que 22 gènes de prédisposition à l'obésité et 37 pour le diabète ont été identifiés. La cause fondamentale de l'obésité et du surpoids est donc la résultante d'un déséquilibre énergétique dû à une alimentation de plus en plus riche en graisse d'une part et une augmentation de la sédentarité d'autre part.

L'interaction entre les facteurs environnementaux et les facteurs génétiques semble donc déterminante dans le développement de l'obésité.

I.2 Evolution du tissu adipeux au cours des maladies métaboliques associées à l'obésité

I.2.1- Généralités

Il existe deux types de TA chez la plupart des mammifères (Himms-Hagen 1997) : le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. Le plus abondant chez l'homme est le tissu adipeux blanc. Le TA blanc est le « lieu » de stockage de l'énergie par excellence mais il est depuis quelques années aussi considéré comme un organe endocrine à part entière pouvant participer à la régulation de différents processus physiologiques et pathologiques (Fruhbeck 2008) .

Le tissu adipeux brun (TA brun) est peu présent chez l'homme adulte alors qu'il est essentiel chez le rongeur. Le principal rôle de ce tissu est de maintenir une température constante chez le petit animal grâce au phénomène de thermogénèse. Jusqu'à récemment, il était admis que le TA brun humain était présent et actif uniquement chez le nouveau-né. Cependant, des études de tomodensitométrie ont permis d'identifier que ce tissu était aussi retrouvé chez certains adultes (10% de la population) au niveau cervical, supraclaviculaire, paravertébral, médiastinal, paraaortique et suprarénal. Cette nouvelle cartographie du TA brun a même permis d'envisager un rôle de ce tissu dans la régulation de la balance énergétique (Nedergaard, Bengtsson et al. 2007). De plus en plus d'intérêt est porté à ce tissu depuis que de nouvelles propriétés le rapprochant du tissu musculaire ont été démontrées chez l'adulte. En effet, le TA brun semble être assez proche du muscle squelettique: ces deux tissus utilisent la phosphorylation oxydative pour consommer de l'énergie, ils possèdent de nombreuses mitochondries et sont capables de faire la thermogénèse adaptative pour produire de la chaleur. Une étude faite par Seale et ses collaborateurs (Seale, Bjork et al. 2008) a montré que le TA brun et le muscle possédaient une cellule progénitrice commune exprimant le facteur de transcription Myf5 que l'on ne retrouve pas dans le TAB. Dans cette étude, les auteurs montrent également que le régulateur transcriptionnel PRDM16 permet d'orienter ce progéniteur commun vers un phénotype d'adipocyte brun alors que son invalidation conduit à une augmentation de l'expression de gènes caractéristiques du phénotype musculaire. Réciproquement, la surexpression de PRDM16 dans des myotubes murins en culture primaire conduite à une augmentation de l'expression des gènes marqueurs des adipocytes bruns (Seale, Bjork et al. 2008). La récente étude de Seale et ses collaborateurs (Seale, Conroe et al. 2011) ont identifié la présence du facteur transcriptionnel PRDM16 au niveau du TASC et pourrait ainsi ouvrir de nombreuses possibilités thérapeutiques de par la quantité de ce tissu et l'accessibilité. En effet il est tentant de spéculer que des approches permettant de stimuler et/ou réactiver la fonction « brune » pourrait présenter un intérêt thérapeutique pour limiter l'obésité (Ricquier 1988).

Le TA blanc présente une grande hétérogénéité cellulaire. Les cellules du TA blanc peuvent être séparées (après digestion à la collagénase et centrifugation) en deux grandes populations: les adipocytes matures et la fraction stroma-vasculaire (FSV).

Les deux fractions sont séparées par flottaison, grâce à la différence de densité entre les adipocytes et les autres types cellulaires. Les adipocytes gorgés de lipides remontent à la surface à l'inverse des autres types cellulaires qui sédimentent (Rodbell 1964). La FSV contient des préadipocytes, des cellules endothéliales, des cellules hématopoïétiques (macrophages, lymphocytes,...), des cellules précurseurs ainsi que des cellules nerveuses. Martin Rodbell, en 1964, est le premier à proposer une méthode permettant de séparer les adipocytes matures des cellules de la FSV basée sur une digestion à la collagénase (Rodbell 1964). Aujourd'hui l'approche utilisée pour définir les différentes cellules composant le TA se base sur des analyses en cytométrie en flux permettant de caractériser à l'aide de marqueurs membranaires les populations cellulaires de la FSV fraîchement isolée. Différentes combinaisons de marqueurs sont utilisés en fonction des laboratoires. On retrouve notamment

- CD34 ou Mucosialine qui est exprimé à la surface des cellules souches hématopoïétiques, des cellules endothéliales progénitrices et des cellules endothéliales des capillaires sanguins.

- CD31 ou PECAM (platelet endothelial cell adhesion molecule) qui est fortement exprimé à la surface des cellules endothéliales de tout type et de manière plus diffuse sur les cellules de la lignée monocytaire et les plaquettes

- CD11b est exprimé à la surface des cellules de la lignée monocytaire et impliqué dans le système immunitaire inné.

L'utilisation combinée d'anticorps dirigés contre ces trois marqueurs couplés à des fluorochromes différents, permet, en combinaison avec les données obtenues sur la taille et la granularité des cellules, d'identifier au sein de la FSV, des populations cellulaires distinctes.

Ainsi on distingue :

- les cellules CD34+/CD31+ : cellules endothéliales capillaires
- les cellules CD11b+/ CD31+ : macrophages
- les cellules CD34+/ CD31- : cellules progénitrices.

I.2.2- Développement du tissu adipeux

Chez les rongeurs, le TAB se met en place dès la naissance. Chez l'homme les premières ébauches apparaissent dès 16 semaines de gestation mais leur développement commence réellement à 23 semaines.

Chez les mammifères, le tissu adipeux ainsi que la moelle osseuse et les os sont localisés dans des sites différents mais dérivent du feuillet mésodermique (Gesta, Tseng et al. 2007). Il existe un précurseur commun appelé cellule souche mésenchymateuse (CSM) capable de donner des cellules précurseurs du tissu osseux, du muscle ou de tissu adipeux.

Chez l'adulte, l'origine des précurseurs adipocytaires donne lieu à plusieurs hypothèses. En effet, certaines études proposent une origine endogène au tissu et plus particulièrement perivasculaire (Rodeheffer, Birsoy et al. 2008; Tang, Zevce et al. 2008). D'autres suggèrent une origine médullaire (Crossno, Majka et al. 2006); mais celle-ci reste controversée dans la mesure où dans certains modèles, des cellules de moelle osseuse ne produisent pas d'adipocytes (Koh, Kang et al. 2007; Tomiyama, Murase et al. 2008). Le tissu adipeux n'est pas considéré comme un tissu qui se renouvelle rapidement à la différence d'autres tissus. Cependant une étude récente basée sur la quantification du carbone 14 dans le tissu adipeux de personnes exposées à une source radioactive accidentelle de ^{14}C a mis en évidence que les cellules du TA présentent un renouvellement d'environ 10% par an (Spalding, Arner et al. 2008).

Ces cellules souches vont alors pouvoir être orientées par l'environnement et différents facteurs moléculaires pour entrer dans le processus de la détermination puis de la différenciation adipocytaire (**Fig 1**).

En effet, la détermination adipocytaire correspond à l'orientation d'une cellule précurseur, d'origine mésenchymateuse vers la lignée adipocytaire (**Fig. 1**). Bien que les mécanismes impliqués dans ce processus soient encore peu connus, certains facteurs tels que les BMP (Bone Morphogenic Protein) ou la voie des Wnt ont été déterminés.

La **différenciation adipocytaire** nécessite l'existence d'un précurseur adipocytaire et correspond au passage du préadipocytes à l'adipocytes mature. L'étude de la différenciation adipocytaire de lignées de préadipocytes immortalisés comme 3T3-L1 et 3T3-F442A, a permis de montrer que la transition du préadipocyte à l'adipocyte nécessite 4 phases qui sont : arrêt de croissance, expansion clonale, différenciation précoce et différenciation tardive (Ailhaud, Grimaldi et al. 1992; Rosen, Walkey et al. 2000). La figure 1 montre en détails les différentes étapes permettant le passage de la cellule souche vers l'adipocyte différencié. Ainsi, après une phase exponentielle de croissance, les préadipocytes marquent un arrêt de croissance à confluence et expriment des marqueurs précoces de différenciation tels que la chaîne $\alpha 2$ du collagène (A2COL6) ou la lipoprotéine lipase (LPL) (Ailhaud, Grimaldi et al. 1992). L'engagement du préadipocyte dans la différenciation précoce nécessite le remodelage de la matrice extra-cellulaire. Les préadipocytes présentent une allure fibroblastique mais n'ont pas été bien caractérisés, le seul marqueur spécifique de cette population est le facteur **Pref-1**. Ce facteur est largement exprimé à ce stade et son expression diminue au cours de la différenciation (Villena, Kim et al. 2002). Ensuite vient **la phase d'expansion clonale nécessaire à la différenciation terminale**. La différenciation terminale conduit à l'acquisition par le préadipocyte de marqueurs de différenciation adipocytaire et à l'accumulation de gouttelettes lipidiques. Parmi les facteurs de différenciation, **l'adipocyte binding protein (aP2)**, transporteur d'acide gras, le **transporteur de glucose GLUT4** et la **lipase hormono-sensible**

(LHS) sont à citer (Rosen, Walkey et al. 2000). Dès lors l'accumulation de gouttelettes lipidiques engendre des modifications morphologiques avec la perte de l'allure fibroblastique et l'apparition d'un adipocyte uniloculaire (une seule vacuole lipidique). Parmi les marqueurs de différenciation les plus tardifs, les adipocytes vont exprimer la **phosphoenolpyruvate carboxylase** (PEPCK) la **leptine** et l'**adiposine** (Ailhaud, Grimaldi et al. 1992). Toutes ces étapes sont orchestrées par des facteurs de transcription dont les principaux sont le récepteur nucléaire PPAR γ et les membres de la famille des c/EBPs (Farmer 2006). PPAR γ joue un rôle important et est nécessaire et suffisant à la différenciation adipocytaire (Rosen and MacDougald 2006). Il est requis aussi dans les stades terminaux de différenciation de l'adipocyte. En effet, l'expression du dominant négatif PPAR γ induit une dé-différenciation des adipocytes caractérisée par la perte des gouttelettes lipidiques. L'expression séquentielle des facteurs de transcription de la famille des C/EBP est observée pendant les différents stades de différenciation adipocytaire.



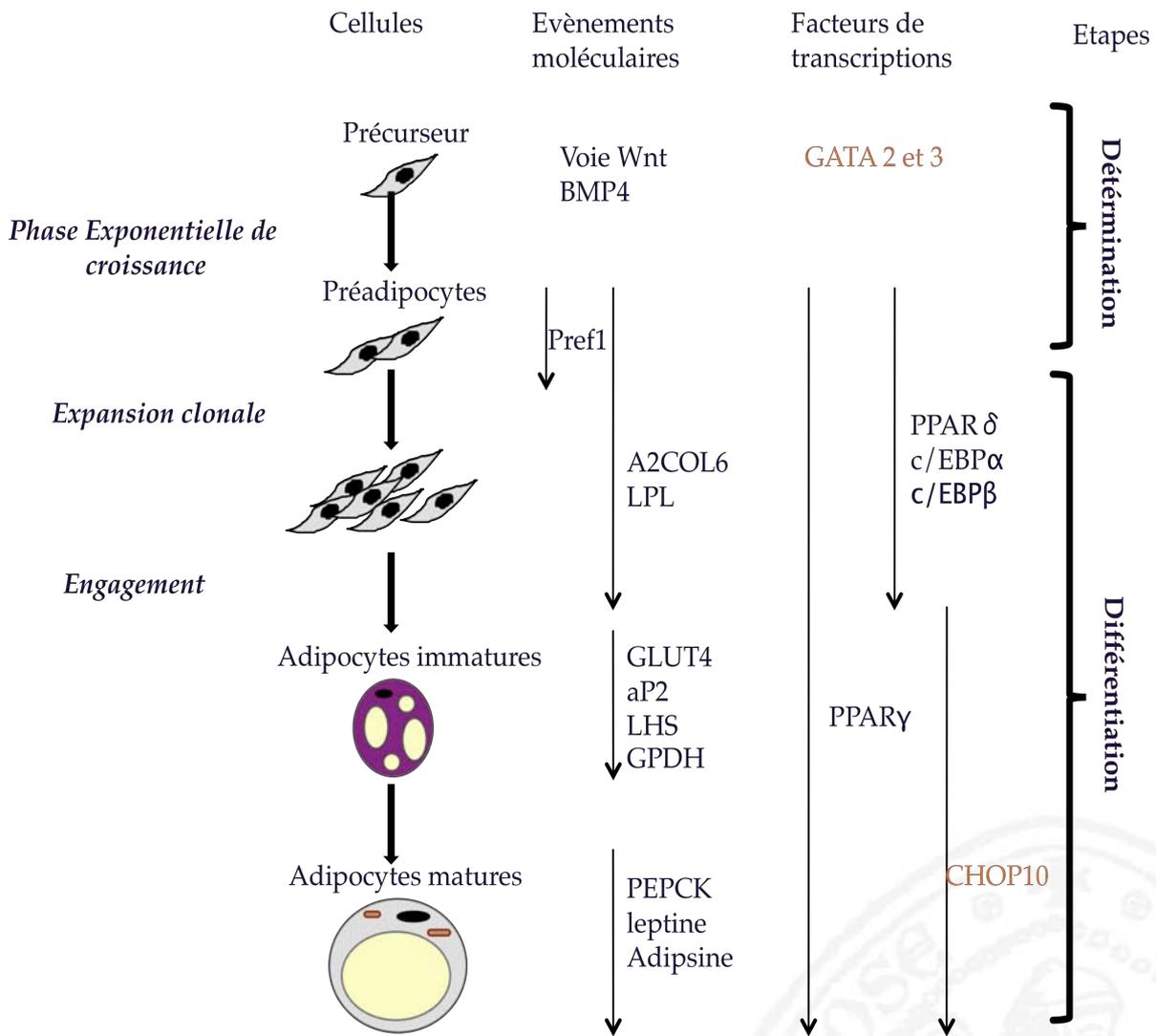


Fig 1. Détermination et différenciation adipocytaire. En orange sont les facteurs qui inhibent la différenciation. CHOP (C/EBP homologous protein) ; C/EBPs (CCAAT/enhancer binding proteins) ; PPAR (peroxysome proliferator activated receptor) ; A2COL6 (la chaîne alpha2 du collagène) ; LHS (lipase hormono sensible) PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxylase) ; l'aP2 (adipocyte binding protein) ; BMP (Bone Morphogenic Protein) D'après Ailhaud, 1992 ; Cornelius, 1994 ; Grégoire, 1998.

II.C- Distribution anatomique des TA

Chez l'homme normopondéral, le TA blanc est divisé en deux types de tissus possédant des caractéristiques propres : le TA blanc sous cutané (TASC) et le tissu adipeux blanc viscéral (TAV).

Comme son nom l'indique, le TASC est une couche de gras localisée entre les muscles et la peau mais aussi entre les fascias musculaires. D'un point de vue anatomique, ce tissu représente plus de 80% du TA de l'organisme d'un individu sain et il est localisé au niveau du tronc, de la zone glutéo-fémorale, de la poitrine mais aussi au niveau de la face.

Le TAV est un tissu profond qui va entourer les viscères. Ainsi, ce TA interne sera surtout retrouvé au niveau péritonéal (ommental, mésentérique), rétro-péritonéal

(periaortique, perirénal,...) mais également intrapelvien (gonadique et urogénital). Un deuxième type de TA profond mais non viscéral pourra être localisé au niveau péri- ou intramusculaire ainsi qu'au niveau du cœur. Ce troisième type de dépôt adipeux a été peu étudié jusqu'à présent mais de plus en plus de travaux récents montrent aujourd'hui l'implication de ce TA dans la genèse de certaines pathologies associées à l'obésité (Unger and Orci 2000).

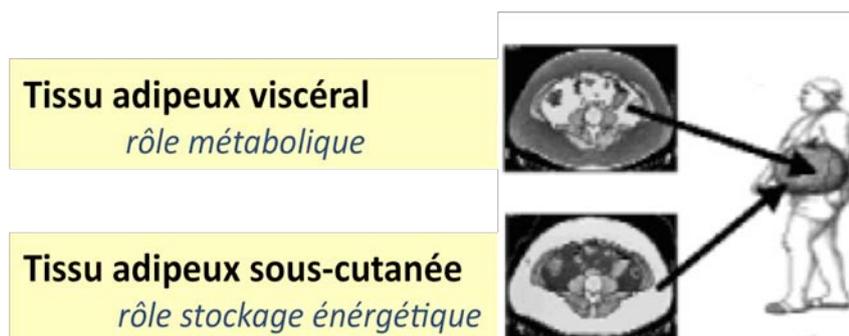


Fig 2. Différentes localisations du tissu adipeux.

Le TA de l'homme sain ou obèse possède des caractéristiques propres à sa localisation anatomique qui sont influencées par l'âge et le sexe de l'individu. Le dimorphisme sexuel observé lors de différentes études a permis d'introduire les termes de distribution androïde ou gynoïde de la masse grasse. Chez la femme possédant un poids normal, le TASC est surtout localisé au niveau de la zone glutéo-fémorale ainsi qu'au niveau de la poitrine. Chez l'homme normopondéral, les dépôts adipeux superficiels se retrouvent au niveau de la nuque, d'une zone allant des muscles deltoïdes aux triceps ainsi qu'au niveau de la région lombaire. En

revanche, chez les deux sexes (plus marqué chez les hommes), le TAV se retrouve surtout au niveau de l'omentum, du mésentère et de la zone rétropéritonéale.

Alors que le tissu adipeux viscéral ne représente que 5 à 10% du tissu adipeux total plusieurs études ont mis en évidence que l'accumulation de TAV est fortement associé à la perturbation de l'homéostasie glucidique, une augmentation de triglycérides (TG) plasmatiques, et une baisse de la fraction du cholestérol contenue dans les lipoprotéines de haute densité. **Ce tissu constitue ainsi à lui seul un facteur de risque pour le diabète de type II (DT2) et les maladies cardio-vasculaires.** Ceci s'explique d'une part par le fait que le TAV est un tissu particulièrement actif (Fox, Massaro et al. 2007). En effet il n'est pas un tissu de stockage préférentiel et sa capacité de prolifération est faible par rapport au tissu adipeux, sous-cutané, cependant son innervation et sa vascularisation sont plus importantes. De plus, le tissu adipeux viscéral est le siège d'une lipolyse intense, avec un renouvellement très rapide des acides gras qu'il stocke. Les adipocytes viscéraux sont plus résistants à l'action anti-lipolytique de l'insuline (**Cf chapitre I-2.4**) (Meek, Nair et al. 1999). Toute production de ce tissu va être déversée dans la veine porte et sera donc directement délivrée au niveau du foie (Fig.3). Ces diverses productions vont affecter les fonctions des hépatocytes et des cellules immunitaires présentes dans le foie. Ce phénomène appelé également l'hypothèse portale sera discuté à la fin de cette partie.

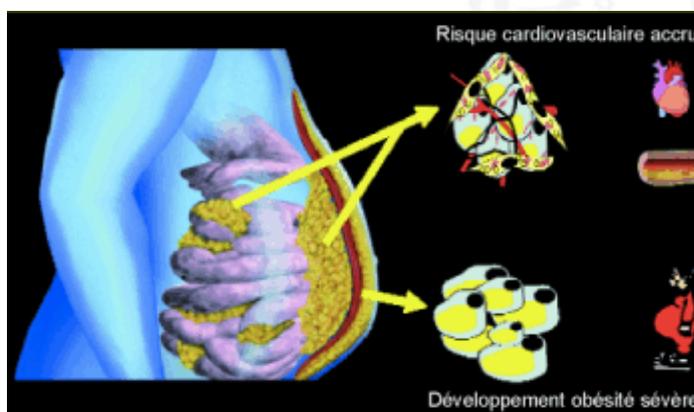


Fig 3. Risques associés au TAV. Le TAV présente une vascularisation et une innervation plus importante que le tissu adipeux sous-cutané. Sa morphologie est plus irrégulière avec une grande variété cellulaire. Cette localisation est extrêmement active sur le plan métabolique et liée à un risque cardiovasculaire accru.

Le tissu adipeux sous-cutané est métaboliquement plus stable que le tissu adipeux viscéral. Il possède une grande capacité de stockage de graisse sous forme de triglycérides, et en cas de balance énergétique positive, les adipocytes vont s'adapter en s'hypertrophiant puis s'en suivra une multiplication des cellules précurseurs, phénomène d'hyperplasie. A l'inverse donc du TAV, une augmentation du TASC semble améliorer la sensibilité à l'insuline chez l'homme comme chez la souris (Zeidler, Mau et al. 1992; Kim, van de Wall et al. 2007; Porter, Massaro et al. 2009). En accord avec ces notions, une omentectomie (opération chirurgicale consistant à retirer le TA viscéral) entraîne une baisse de l'insuline et du glucose au niveau plasmatique (Thorne, Lonqvist et al. 2002) alors que suite à une liposuction (où l'on retire du TASC) aucun changement métabolique n'est observé (Klein, Fontana et al. 2004).

Chez le rongeur de telles différences sont également retrouvées. Chez la souris, qui est le modèle animal utilisé au cours de mes travaux de thèse, le tissu adipeux blanc peut être également divisé en sous-cutané et interne (ou viscéral). Le tissu adipeux sous cutané est surtout localisé au niveau inguinal entre le péritoine et la peau ainsi qu'au niveau des pattes postérieures alors que le TA viscéral est divisé entre le mésentérique retrouvé le long de l'intestin et le périgonadique essentiellement concentré autour des gonades et des reins (Gesta, Tseng et al. 2007). Une implantation de TASC dans la cavité péritonéale de souris est responsable d'une amélioration du métabolisme alors qu'aucun bénéfice n'est observé en greffant du TA viscéral (Tran, Yamamoto et al. 2008). Ceci suggère donc que le TASC possède des propriétés intrinsèques différentes de celle du TA Viscéral capablen d'améliorer le métabolisme de l'organisme (Rodbell 1964). Une étude récente consistant à greffer des dépôts adipeux, issus de différentes localisation, dans la région portale de la cavité viscérale a mis en

évidence que les propriétés des dépôts adipeux n'étaient pas du à la localisation mais a des caractéristiques intrinsèques au dépôt (Foster, Shi et al.).

I-2.4.1 Modifications du TA au cours des maladies métaboliques associées à l'obésité

I-2.4.1.1 -Métabolisme du TA

L'adipocyte représente le type cellulaire majoritaire au sein du TA. Il est aussi le siège de l'activité métabolique du TA. Ainsi, l'adipocyte est capable de stocker le surplus d'énergie circulante sous forme de lipides à l'intérieur d'une vacuole mais il représente aussi une réserve énergétique quasiment inépuisable au sein du TA. Ainsi, l'adipocyte est perpétuellement en balance entre stockage (sous forme de TG suite à un apport alimentaire) et production sous forme d'acides gras (AG) en situation de jeûne, d'exercice ou de stress.

Les deux voies métaboliques majeures de cette cellule sont donc la synthèse de TG (lipogenèse, captage des AG circulants, estérification) et l'hydrolyse des TG (lipolyse). Ces phénomènes mettent en jeu différents mécanismes que nous allons décrire ici.

I-2.4.1.1 La synthèse de triglycérides

On distingue deux mécanismes différents pour parvenir à la synthèse de triglycérides au sein de l'adipocyte: le captage des acides gras provenant de la circulation et la synthèse d'acides gras à partir de précurseurs glucidiques appelée lipogenèse *de novo*. Dans les deux cas, s'en suit une réaction d'estérification aboutissant à la formation de triglycérides par la greffe de trois molécules d'acides gras sur un squelette glycérol.

I-2.4.1.1.1 Utilisation des AG exogènes

En situation post-prandiale, les triglycérides circulent sous forme de vésicules lipidiques produites par l'intestin (chylomicrons) ou par le foie après remodelage (lipoprotéines de très faible densité (VLDL)). Les triglycérides des lipoprotéines sont ensuite hydrolysés au niveau de l'adipocyte par l'intermédiaire d'une enzyme, la lipoprotéine lipase (LPL) (Rodbell 1964). Cette enzyme synthétisée par l'adipocyte est sécrétée pour atteindre la surface luminale des capillaires sanguins du tissu adipeux où elle pourra exercer son action (Frayn, Fielding et al. 1996). Elle est ancrée à l'héparan sulfate des chaînes de glycosaminoglycans qui forment le glycocalyx des cellules endothéliales. Après reconnaissance des lipoprotéines circulantes, elle hydrolyse les triglycérides en acides gras qui sont alors captés par l'adipocyte soit par diffusion passive pour les acides gras les plus courts, ou soit par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques de la famille des FATP (fatty acid transport protein), pour les acides gras à longue chaîne (**Fig 4.**).

I-2.4.1.1.2 Synthèse des acides gras (lipogénèse *de novo*)

Le concept suggérant que les lipides stockés dans l'organisme ne proviennent pas uniquement d'une source lipidique date d'il y a bien longtemps. Il y a déjà plus de cent ans, on avait montré que, chez l'animal, l'augmentation de la masse grasse pouvait parfois largement dépasser la part de lipides contenue dans la ration alimentaire (auteurs inconnus, Science 1886). Même si l'origine de cette synthèse lipidique a longtemps été controversée (une synthèse de lipides à partir de protéines a longtemps été évoquée), on sait maintenant que l'essentiel de la néosynthèse des acides gras provient des carbohydrates. Elle est réalisée à partir de l'acétyl-CoA provenant principalement de la dégradation du glucose par la voie de la glycolyse. Le métabolisme du glucose représente donc une part importante du métabolisme

adipocytaire. Le glucose pénètre dans l'adipocyte en fonction du gradient de concentration à l'aide de transporteurs spécifiques : les GLUT (Mueckler, Caruso et al. 1985; Mueckler 1990). Le transporteur GLUT 1 dont l'expression est ubiquitaire, permet une diffusion constitutive du glucose. GLUT 4 est quant à lui exprimé uniquement dans les tissus dits insulinosensibles tels que le tissu adipeux et le muscle (James, Brown et al. 1988). Très peu présent à la surface de la membrane plasmique adipocytaire dans des conditions basales, il subit une translocation d'une réserve de vésicules intracellulaires jusqu'à la membrane plasmique sous l'action de l'insuline (James, Strube et al. 1989). Le glucose incorporé sous l'action de l'insuline est métabolisé en pyruvate lors de la glycolyse. Le pyruvate est alors transformé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH), puis en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). Le complexe multienzymatique de la fatty acid synthase (FAS) permet ensuite l'allongement du malonyl-CoA par addition successive de plusieurs molécules d'acétyl-CoA pour donner des acides gras de longueur variable (**Fig 4**).

Même si aujourd'hui il ne fait plus aucun doute de l'importance de cette voie chez l'animal, le débat reste encore ouvert quant à sa pertinence physiologique chez l'Homme (Hellerstein 1999). Il semblerait que quel que soit le lieu, la lipogénèse *de novo* chez l'Homme soit un phénomène quantitativement faible (Bjorntorp and Sjostrom 1978; Acheson, Schutz et al. 1984; Guo, Cella et al. 2000). Toutefois, dans certains cas, la lipogénèse hépatique peut être largement modifiée: une augmentation de l'apport énergétique, de la proportion en carbohydrates ou une modification des taux de glucose et /ou d'insuline augmente de façon non négligeable la lipogénèse *de novo* hépatique (Schwarz, Neese et al. 1995; Aarsland, Chinkes et al. 1997; Parks 2002; Parks 2002; Diraison, Yankah et al. 2003). Cette augmentation permettrait lorsque les apports énergétiques en carbohydrates sont importants, de stocker sous forme de lipides l'excédent d'énergie ne pouvant être stocké sous forme de glycogène. Cependant, un régime hautement énergétique riche en carbohydrates ne provoque pas les mêmes régulations sur la lipogénèse adipocytaire (Diraison, Yankah et al. 2003). La lipogénèse

de novo adipocytaire chez l'homme, bien qu'active, contribuerait peu à la régulation de la masse grasse.

I-2.4.1.1.3 Esterification des acides gras (AG)

Une fois les acides gras néoformés ou captés de la circulation, une dernière étape d'estérification permet de lier 3 acides gras libres sur un squelette glycérol pour former un triglycéride (**Fig 4**). Cette étape nécessite la synthèse de glycérol 3-phosphate à partir de glucose lors de la glycolyse. En effet, l'adipocyte ne possédant qu'une très faible activité glycérokinase, il se sert peu du glycérol intracellulaire pour former du glycérol 3-P. Le dihydroxyacétone phosphate formé lors de la glycolyse est transformé en glycérol 3-phosphate grâce à l'action de la glycérol 3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) (Schlossman and Bell 1976). Deux acides gras sont ensuite greffés en position 1 puis 2 par l'intermédiaire de la glycérol 3-phosphate acyltransférase pour donner de l'acide lysophosphatidique (LPA) et de l'acide phosphatidique (PA) respectivement. Le PA est alors déphosphorylé par une phosphatidase en diacyl-glycérol (DAG). La dernière réaction est catalysée par une diacyl-glycérol transférase au cours de laquelle un troisième acide gras se fixe en position 3 pour former un triacyl-glycérol ou triglycéride.

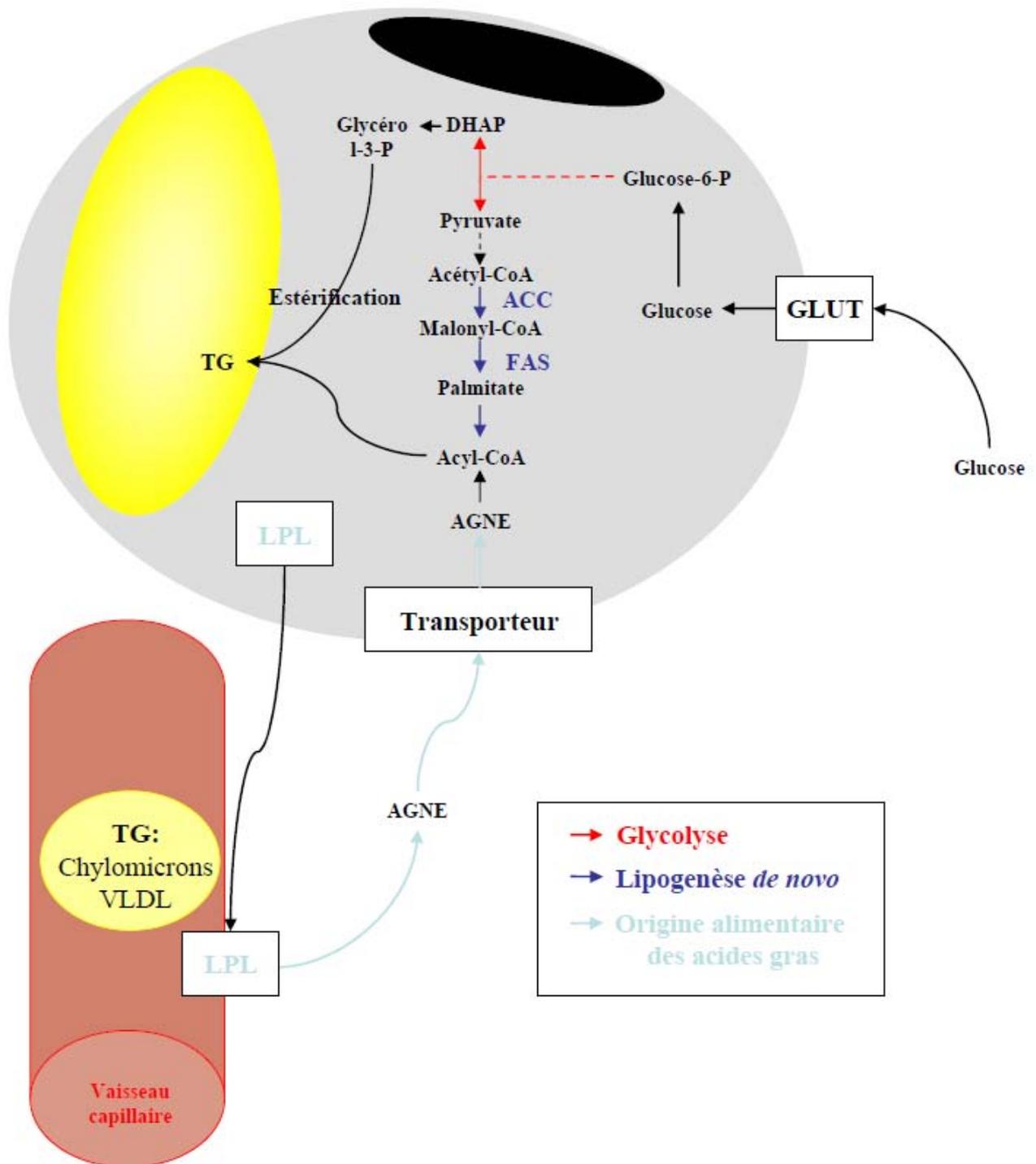


Fig 4. Lipogénèse et synthèse des triglycérides . GLUT: glucose transporter; DHAP: dihydroxyacétone phosphate; TG: triglycérides; ACC:acétyl Coenzyme A (CoA) carboxylase; FAS: fatty acid synthase; AGNE: acide gras non estérifié; LPL: lipoprotéine lipase; VLDL: very low density lipoprotein. D'après Fève B., 2003

I-2.4.1.2_Hydrolyse des triglycérides : la lipolyse

La lipolyse assure la dégradation des TG contenus dans la vacuole lipidique de l'adipocyte en glycérol et acides gras non estérifiés. Plusieurs lipases interviennent de façon séquentielle dans cette hydrolyse des réserves lipidiques (**fig 5**). La lipase hormonosensible (LHS) hydrolyse les triglycérides en 1,2-diacylglycérol et 2-monoacylglycérol (Vaughan 1962; Vaughan and Steinberg 1963; Rizack 1964; Strand, Vaughan et al. 1964; Langin, Holm et al. 1996) La lipase des monoglycérides (LMG) dégrade ensuite les monoglycérides en acide gras non estérifiés et glycérol (**fig 5**). Cependant les souris déficientes pour la LHS ne développent pas de phénotype obèse et montrent une accumulation de diacylglycérol et non de triglycérides. Ceci suggérait donc l'existence d'une nouvelle lipase dans les adipocytes. En 2004 Trois laboratoires différents ont identifié une nouvelle lipase dénommée *adipocyte triacylglycerol lipase* (ATGL) (Jenkins, Mancuso et al. 2004; Villena, Roy et al. 2004; Zimmermann, Strauss et al. 2004). L'ATGL présente une spécificité de substrat pour les TG dix fois supérieure à son affinité pour les DG ainsi qu'à l'affinité de la LHS pour les TG (Zechner, Kienesberger et al. 2009). Elle joue donc un rôle limitant dans la première étape de la lipolyse basale tandis que la LHS est limitante pour l'hydrolyse des DG (Zechner, Kienesberger et al. 2009).

I-2.4.1.3 Contrôle hormonal du métabolisme adipocytaire

L'activité métabolique du tissu adipeux est régulée par de nombreuses hormones. Au centre de ces facteurs régulateurs, **l'insuline** joue un rôle crucial. Hormone de la mise en réserve par excellence, elle active la synthèse des triglycérides en stimulant à la fois le captage exogène des acides gras et la lipogénèse *de novo*, et inhibe la mobilisation lipidique de manière puissante (Froesch, Burgi et al. 1965).

I-2.4.1.3.1 Contrôle du captage des acides gras exogènes

Le captage des acides gras se faisant par l'intermédiaire de la LPL, l'essentiel de la régulation de ce processus porte sur la régulation de cette enzyme. L'insuline stimule la transcription de la LPL (Raynolds, Awald et al. 1990), mais également le transport d'une forme active de l'enzyme de l'adipocyte jusqu'à la cellule endothéliale, ainsi que son activité. A l'inverse, la plupart des cytokines inflammatoires telles que le TNF- α ou les interleukines inhibent l'activité de la LPL.

I-2.4.1.3.2 Contrôle de la lipogénèse *de novo*

La lipogénèse *de novo* nécessite une production importante d'acétyl-CoA à partir de glucose. Le transport de glucose dans l'adipocyte est donc une étape importante du contrôle de cette néo synthèse. Sous l'action de l'insuline, le transporteur GLUT4 voit son nombre fortement augmenté à la surface de l'adipocyte, ceci permettant une entrée rapide et massive du glucose sanguin. De même, on peut noter une action positive de l'insuline sur de nombreuses étapes de la transformation du glucose en acétyl- ou malonyl-CoA (activation de la glucokinase, phosphofructokinase, pyruvate kinase, pyruvate déshydrogénase et acétyl- CoA carboxylase). Enfin, l'insuline augmente l'expression de la FAS qui catalyse la formation des acides gras à partir de l'acétyl-CoA (Paulauskis and Sul 1988). Parmi les autres régulateurs hormonaux de la lipogénèse *de novo*, on peut noter le glucagon qui contrôle de manière opposée la plupart des enzymes stimulées par l'insuline. Enfin, un contrôle nutritionnel de certaines enzymes et notamment de la FAS a également été mis en évidence : un régime riche en glucides entraîne une augmentation des taux de FAS alors qu'un régime riche en lipides les diminue (Sul and Wang 1998).

I-2.4.1.3.3 Contrôle de l'estérification des acides gras

L'estérification des acides gras dépend des taux intracellulaires de glycérol 3-P. Celui-ci provient de la transformation du dihydroxyacétone phosphate dont le précurseur est le glucose. La stimulation du transport de glucose par l'insuline favorise donc à la fois la lipogénèse *de novo*, mais également l'estérification des acides gras en augmentant les stocks de glycérol 3-P. Alors que l'insuline a longtemps été considérée comme la seule hormone régulant la synthèse des triglycérides, l'acylation stimulating protein (ASP) est également capable de stimuler l'estérification des acides gras.

I-2.4.1.3.4 Contrôle de la lipolyse

Le contrôle de la lipolyse se fait essentiellement par la régulation de l'activité de la LHS bien décrites dans la littérature et présentés dans la **Figure 5** (Lafontan 2005). L'activité de cette lipase dépend spécifiquement de sa phosphorylation réversible par une kinase dépendante de l'AMPc (PKA) (Holm 2003) ou du GMP c (PKG) (Sengenès, Bouloumie et al. 2003). La phosphorylation de la LHS active l'enzyme, en démasquant son site catalytique. Par ailleurs, cette phosphorylation permet une redistribution de la lipase du cytoplasme vers la vacuole lipidique. Les périlipines, protéines abondamment exprimées à la surface des gouttelettes lipidiques, interviennent dans la localisation et la stabilisation de la LHS à la surface des vacuoles. La phosphorylation des périlipines par la PKA et la PKG réduit leur ancrage à la gouttelette lipidique et favorise ainsi l'accès de la LHS à ses substrats lipidiques (Ahmadian, Wang et al.). La régulation de l'ATGL est moins connue, elle est présente à la surface des vésicules lipidiques à des quantités comparables à l'état basal comme activé (Zimmermann, Strauss et al. 2004), et son activité est fortement augmentée par ABHD5/CGI58 (alpha, beta hydrolase domain containing protein 5/ comparative gene identification 58 (Lass, Zimmermann et al. 2006). Il semble que lorsque les adipocytes ne sont pas stimulés, CGI58 soit lié à la

pérlipine A et incapable d'activer l'ATGL. Lorsque les adipocytes sont stimulés, les pérlipines sont phosphorylées, entraînant la dissociation de CGI58 qui va interagir avec l'ATGL et activer l'hydrolyse des TG (Subramanian, Rothenberg et al. 2004; Granneman, Moore et al. 2007). Une fois dans la circulation, les acides gras libres (AGL) vont être véhiculés par l'albumine et vont servir de carburant pour les tissus métaboliquement actifs via leur oxydation et la synthèse d'ATP. L'oxydation qui génère de l'ATP et des acétyl coenzyme A à partir des acides gras est le procédé le plus important qu'utilisent les cellules pour obtenir de l'énergie à partir des AGL. Le glycérol généré par l'hydrolyse des AGL est converti par la glycérol kinase du foie et va ainsi fournir la fraction de glycérol nécessaire pour la synthèse des TG (Avram, Avram et al. 2005)



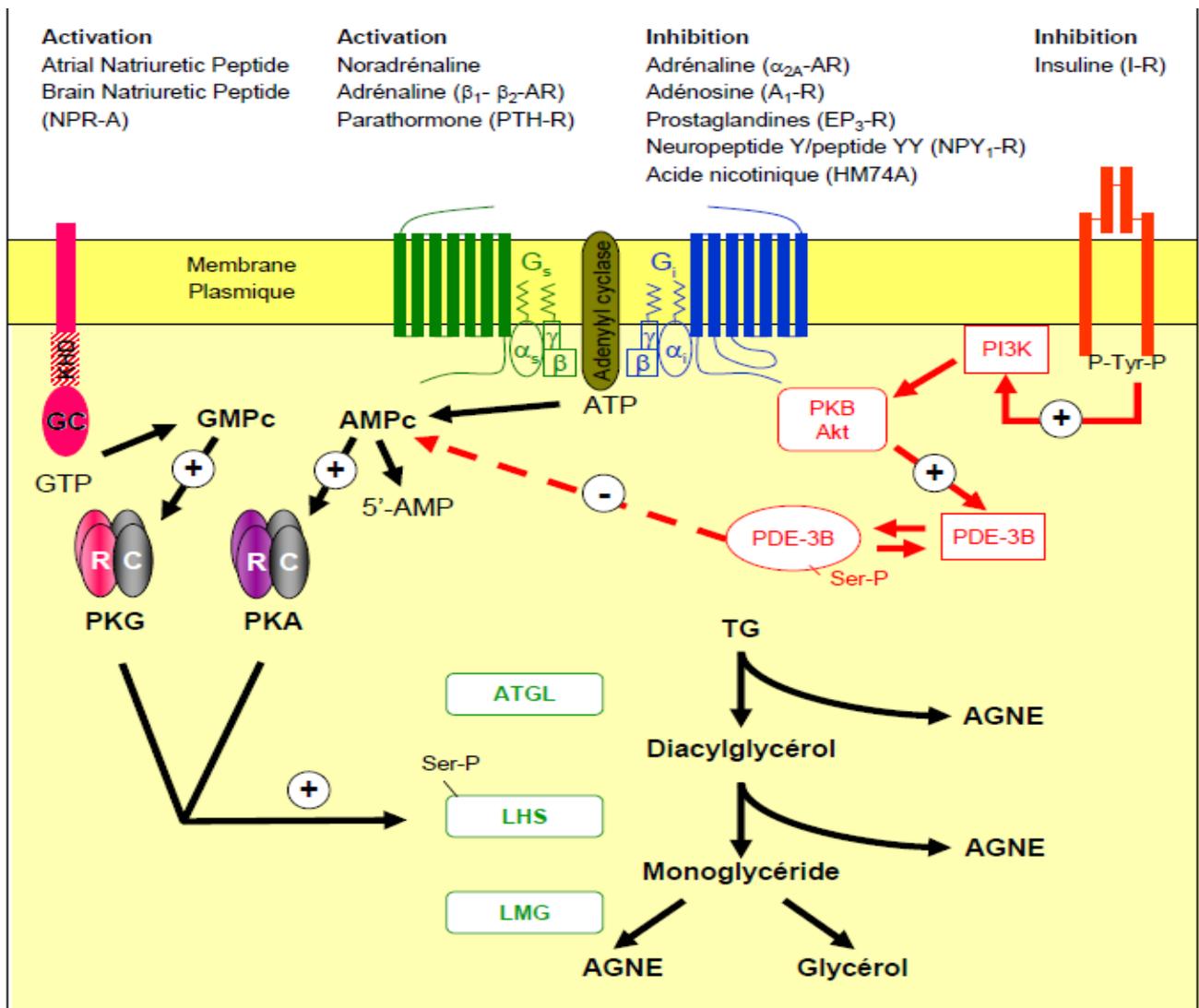


Figure 5 Les différentes voies de contrôle du métabolisme adipocytaire. Les catécholamines activent les récepteurs α₂-adrénergiques (α₂-AR) et β_{1/2/3}-adrénergiques (β_{1/2/3}-AR) modulant négativement et positivement l'activité de l'adénylyl-cyclase (AC) respectivement. Outre le récepteur α₂-AR, de nombreux autres récepteurs sont couplés négativement à l'AC. C'est notamment le cas des récepteurs à l'adénosine (A₁-R), aux prostaglandines (EP 3-R), au neuropeptide Y (NPY-Y1-R) et à l'acide nicotinique (HM74A). L'AC produit de l'AMPc qui va activer une protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). L'insuline possède une action antilipolytique. Son mécanisme d'action implique la phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI3-K), la protéine kinase B (PKB/Akt) et la phosphodiésterase-3Bb (PDE-3B) qui diminue les taux intracellulaires d'AMPc transformé en 5'-AMP. L'ANP et le BNP stimulent le NPR-A dont l'activité guanylyl-cyclase (GC) génère du GMPc. Le GMPc stimule une protéine kinase dépendante du GMPc (PKG ou cGK-1). La PKA et la PKG activent par phosphorylation les périlipines et la lipase hormono-sensible (LHS) qui va transloquer à la vacuole lipidique et participer, avec l'adipocyte triacylglycérol lipase (ATGL) et la monoglycéride lipase (LMG), à l'hydrolyse des triglycérides (TG) en glycérol et acides gras non estérifiés (AGNE)

I-2.4.2 Plasticité du TA

I-2.4.2.1 Le rôle de la vascularisation du TA dans son développement

Le rôle de l'endothélium dans le développement du TA est reconnu depuis longtemps. Cependant peu d'étude concerne cette composante du TA par le fait que ce tissu est généralement considéré comme peu vascularisé. Cette faible vascularisation apparente est en fait due à la taille élevée des adipocytes. En effet, le jeûne chez l'animal qui s'accompagne d'une diminution de la taille des adipocytes, permet de mettre en évidence un réseau capillaire important autour de chaque adipocyte. Ainsi quand on prend en compte le « volume maigre » de l'adipocyte et la surface capillaire, le réseau vasculaire dans le TA blanc est aussi élevé que celui du muscle squelettique.

I-2.4.2.1.1 Rôle dans la formation du TA

Au cours du développement du TA embryonnaire, les analyses histologiques montrent une relation étroite entre le développement des vaisseaux sanguins et celui des adipocytes (Crandall, Hausman et al. 1997). Récemment, des études réalisées par Neels et ses collaborateurs, (Neels, Thinnes et al. 2004) ou des cellules de la lignée préadipocytaire 3T3F442A ont été injectées en sous-cutané chez la souris, ont clairement associés l'apparition des marqueurs de l'adipogénèse à ceux des marqueurs endothéliaux. De plus Fukumura et al. montrent qu'en bloquant l'adipogénèse de préadipocytes par la transfection d'un dominant négatif de PPAR γ , l'angiogénèse est alors inhibée. En parallèle, l'inhibition de l'angiogénèse par un anticorps neutralisant anti-VEGFR2 inhibe l'adipogénèse (Fukumura, Ushiyama et al. 2003). L'adipogénèse et l'angiogénèse semblent donc être deux processus étroitement liés et complémentaires au sein du TA.

I-2.4.2.1.2 Rôle dans le développement du TA

Les analyses en cytométrie de flux du tissu adipeux montrent que le pourcentage des cellules endothéliales est proportionnel à l'augmentation du volume du TA (Miranville, Heeschen et al. 2004). L'administration de facteurs antiangiogéniques chez la souris a permis de mettre en évidence la dépendance du TA vis à vis de son réseau vasculaire (Brakenhielm, Cao et al. 2004). En effet l'apoptose des cellules endothéliales induite par ce traitement conduit à une prévention mais également à une régression du développement du TA. L'endothélium joue donc un rôle déterminant dans la croissance et dans le maintien de la masse grasse.

I-2.4.2.2 La plasticité de l'adipocyte : avantage ou inconvénient ?

La plasticité du TA provient de la grande capacité de stockage des adipocytes qui peuvent stocker l'énergie sous forme de TG dans une vacuole lipidique unique pouvant représenter 95% du volume cytoplasmique. Les adipocytes sont capables d'augmenter considérablement leur volume afin d'assurer le rôle de tampon en cas de déséquilibre de l'homéostasie énergétique en faveur des apports. On parle alors d'hypertrophie adipocytaire. Ainsi, l'adipocyte gorgé de lipides, peut voir son diamètre atteindre 100 μm ou plus. Cependant, cette cellule ne peut pas stocker à l'infini l'excès de substrat énergétique de l'organisme. Peu d'études ont été faites concernant la phase de transition qui va voir un adipocyte très actif devenir quasiment quiescent en terme d'activité métabolique (Ravussin and Smith 2002). Les hypothèses que l'on peut formuler aujourd'hui reposent sur des travaux montrant que l'adipocyte sécrète des substances en fonction de la quantité de lipides qu'il contient (Friedman and Halaas 1998). Par exemple la leptine et d'autres adipokines sont sécrétées différenciellement selon la taille de la vacuole lipidique (Sethi and Hotamisligil 1999; Steppan, Bailey et al. 2001; Berg, Combs et al. 2002). Ce contrôle précis apporte la preuve qu'il existe des mécanismes intracellulaires de

signalisation pouvant informer l'adipocyte sur le statut de ses réserves intracytoplasmiques. Ce processus de détection des réserves lipidiques est un élément clé et certaines données récentes de la littérature montrent que la gouttelette lipidique pourrait être impliquée dans ce phénomène. Les études sur les périlipines montrent qu'il existe un lien entre la concentration de ces protéines à la surface de la gouttelette lipidique et la régulation de la production de sécrétions adipocytaires. Ainsi, dans des adipocytes provenant de rongeurs ou d'individus obèses, un déficit en périlipine a été rapporté et corrélé avec une augmentation de la lipolyse et un dérèglement de la sécrétion de facteurs protéiques (adipokines) (Wang, Sullivan et al. 2003).

Depuis de nombreuses années, plusieurs théories ont mis en avant le fait que cet accroissement de volume adipocytaire n'était pas indéfini et qu'au cours de l'obésité, l'augmentation de la masse du TA pouvait résulter d'une hypertrophie adipocytaire suivie d'une augmentation du nombre d'adipocytes ou hyperplasie (Faust, Johnson et al. 1978) (Lemonnier 1972). Cette théorie est aujourd'hui remise en cause par une récente étude menée par l'équipe de P. Arner au cours de laquelle les auteurs montrent que s'il existe bien une corrélation positive entre la taille des adipocytes et la prise de poids, il n'en est pas de même avec le nombre d'adipocytes pour un même individu (Arner, Westermark et al. 2010). En effet, ils suggèrent que le nombre d'adipocytes soit constitué au cours de l'enfance et de l'adolescence puis reste stable au cours de la vie adulte avec un renouvellement adipocytaire d'environ 10% par an. L'originalité de cette étude réside dans le fait que les auteurs se sont appuyés sur l'accumulation de carbone 14 présent dans l'atmosphère pour dater l'âge des adipocytes au cours d'une vie d'un individu alors que les travaux précédents ne comparaient que des individus sains et obèses à un instant déterminé (Arner, Westermark et al. 2010). Le TA constituerait donc un système de flux constant, entre le taux de nouveaux adipocytes et la mort de ceux-ci.

Cependant chez la souris, une étude concernant la plasticité du TA avait montré que l'expansion de ce tissu pouvait être corrélée à la mort cellulaire adipocytaire (Strissel, Stancheva et al. 2007). En effet, au cours de la mise en régime gras des animaux, Strissel et ses collaborateurs ont pu observer une mort cellulaire importante des adipocytes permettant une hypertrophie des adipocytes restants.

En conclusion, même si ces dernières découvertes semblent montrer que le rôle de réservoir énergétique que joue le TA est surtout symbolisé par la capacité de ses adipocytes à s'hypertrophier; il semble de plus en plus intéressant de porter notre attention sur les phases précoces du développement du TA chez l'enfant et l'adolescent. En effet, si le nombre d'adipocytes est "programmé" durant ces phases par des facteurs génétiques et environnementaux, ces périodes de vie doivent être plus étudiées. Ceci permettrait de mieux appréhender les déterminants qui induisent la prolifération des futurs adipocytes et pourquoi pas de développer de nouvelles stratégies de lutte contre l'obésité adulte.

I-2.4.2.3. Le préadipocyte : un réservoir d'adipocyte ?

L'augmentation du nombre d'adipocytes qui peut être observée au sein du TA est due à la différenciation d'une cellule présente dans la FSV et nommée préadipocyte. Le pré-adipocyte est un type cellulaire relativement immature qui peut se différencier en adipocyte. En 2005, Sengenès et ses collaborateurs ont mis en évidence que les cellules CD34+/CD31- présentaient la capacité de se différencier en adipocytes lorsqu'elles sont cultivées en milieu adipogénique. Elles expriment alors des gènes adipocytaires (LPL, LHS, aP2 et FAS) et développent progressivement les activités métaboliques adipocytaires que sont la lipolyse et la lipogénèse (Sengenès, Lolmede et al. 2005). Cependant ces cellules sont bipotentes car elles

peuvent aussi se différencier en cellules endothéliales lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu de différenciation approprié pour ce type cellulaire.

L'hyperplasie décrite dans le processus de l'obésité fait donc intervenir de nouveaux précurseurs adipocytaires. Plusieurs études se sont donc intéressées à ce pool de précurseurs au sein du TA lors de l'obésité. Ainsi des analyses de cytométrie de flux ont permis d'identifier une population de précurseur adipocytaire en prolifération grâce aux marqueurs C/EBP couplé à KI67, spécifique des cellules en cycle. Cette prolifération de préadipocyte est augmentée chez des souris génétiquement obèses (*ob/ob*) (Rigamonti, Brennand et al.). Une élégante étude du groupe de Rossi a ensuite déterminé que le régime gras était responsable d'une prolifération de précurseurs adipocytaires au sein de TASC de souris. Ils ont également démontré en microscopie électronique que ces précurseurs étaient capables de se différencier en adipocytes puisque des noyaux BrdU positifs ont été retrouvés dans des cellules à grosse vacuole lipidique. Cette augmentation de prolifération des préadipocytes en réponse à un régime gras n'est pas retrouvé dans le TAV. En effet l'augmentation du TAV induit par un régime gras est associée à une hypertrophie alors que celle du TASC est décrite par une hyperplasie (Joe, Yi et al. 2009).

Ainsi il serait intéressant de mieux comprendre quels sont les signaux capables de réguler cette population de préadipocytes impliqués dans l'axe adipogénique au cours de l'obésité. Très récemment, l'activine A, produite par les préadipocytes, a été impliquée dans la prolifération de ceux-ci via un effet autocrine. De plus cette protéine a été montrée comme étant augmentée chez des patients obèses.

I.2.4.3 Sécrétions et Inflammation du TA

I-2.4.3.1 Sécrétion

Les principaux produits de sécrétion des adipocytes sont les acides gras libres issus de la lipolyse et libérés dans la circulation sanguine (Trayhurn and Beattie 2001). Cependant le tissu adipeux est également capable de synthétiser et de sécréter une multitude de facteurs qui agissent localement ou de façon endocrine (**Fig 6**). La première protéine décrite sécrétée par le TA est la lipoprotéine lipase (LPL). Mais c'est la découverte de la leptine, hormone synthétisée notamment par le TA et intervenant dans la prise alimentaire qui a permis au TA d'acquérir la fonction de tissu endocrine (Stephens and Caro 1998). Suite à cette découverte d'autres facteurs produits et sécrétés par le TA ont été révélés. Actuellement plus d'une cinquantaine sont dénombrés et possèdent des fonctions physiologiques diverses comme le métabolisme, l'inflammation, ou l'angiogénèse (**Fig 6**). De nombreuses études ont porté sur les variations de sécrétions de ces protéines au cours de l'obésité et des conséquences de ces changements sur le métabolisme (Ouchi, Parker et al.).



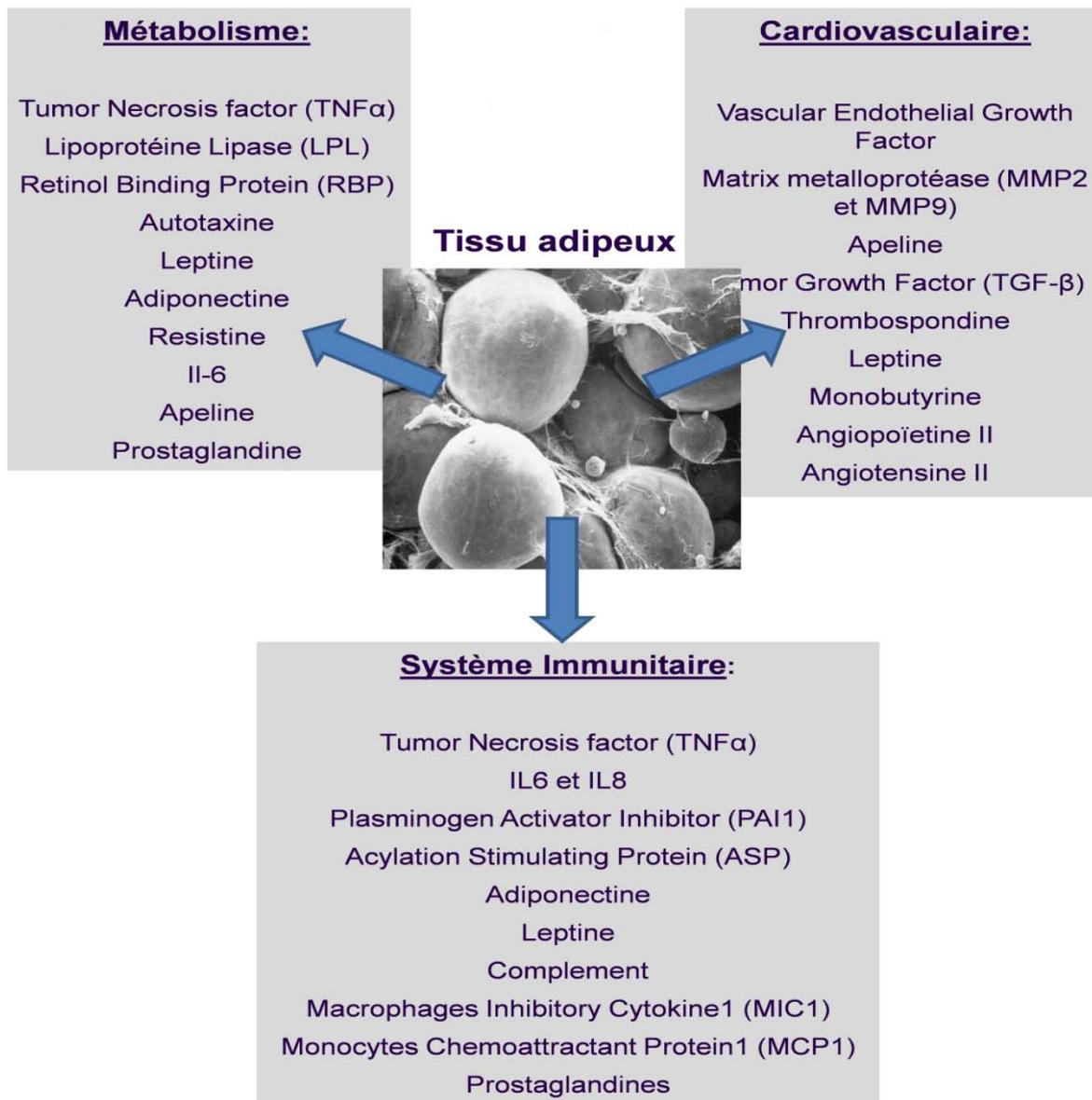


Fig 6. Les sécrétions du tissu adipeux

I-2.4.3.1 Inflammation

Au cours de ces dernières années, l'inflammation métabolique, décrite au niveau du TA, a été suggérée comme étant un événement déterminant dans l'apparition des maladies métaboliques. Le tissu adipeux semble être une source majeure de cette inflammation. Une accumulation des cellules immunitaires dans le TA au cours de l'obésité, notamment de macrophages, a été largement observée chez des modèles murins et chez l'homme (Weisberg, McCann et al. 2003; Xu, Barnes et al. 2003). Ainsi, le TA est le siège et la cible d'une réaction inflammatoire de basse intensité au cours des maladies métaboliques. Cette inflammation est

délétère vis à vis de la voie de signalisation de l'insuline et participerait ainsi à l'initiation de maladies métaboliques.

En effet il y a déjà plus d'un siècle, des études faisaient le lien entre l'inflammation et le diabète. Il a d'abord été démontré que l'administration de fortes doses de salicylate de sodium (5.0-7.5 g/j) diminuait la glycosurie de patients diabétiques (Shoelson, Lee et al. 2006). Plus tard, des études examinant le rôle de l'inflammation dans l'insulino-résistance montrèrent l'action hypoglycémiantes des salicylates et identifièrent l'axe I κ B kinase- β (IKK β) / NF- κ B comme cible moléculaire (Yuan, Konstantopoulos et al. 2001; Hundal, Petersen et al. 2002; Shoelson, Lee et al. 2003). Des études ont ensuite mis en évidence une corrélation positive entre l'incidence de diabète de type 2 et l'augmentation du niveau de marqueurs et de médiateurs de l'inflammation (Pickup and Crook 1998; Pickup 2004). De nombreux éléments ont révélé que l'activation chronique de voies pro-inflammatoires dans des cellules cibles de l'insuline peut favoriser l'obésité et la résistance à l'insuline. Des niveaux élevés de cytokines ou molécules inflammatoires comme le TNF- α ou l'IL-6 ont été retrouvés chez des sujets insulino-résistants et diabétique de type 2 (Shoelson, Herrero et al. 2007; de Luca and Olefsky 2008). En outre les taux de TNF- α sont élevés dans le TA et le sang de rongeurs obèses, et la neutralisation du TNF- α améliore la sensibilité à l'insuline chez ces animaux (Hotamisligil, Shargill et al. 1993). Les cytokines inflammatoires mais également les acides gras ou le stress du réticulum endoplasmique peuvent initier des réponses pro-inflammatoires par l'activation des voies de signalisation JNK / activateur protéin 1 (AP1) et IKK β / NF- κ B. Ces sérines kinases phosphorylent les facteurs de transcription AP1 (c-jun/Fos) et NF- κ B, ce qui active la transcription d'une série de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, aboutissant à une diminution de la sensibilité à l'insuline (**fig. 7**). En effet la déficience ou l'inhibition de JNK1 ou IKK β prévient la résistance à l'insuline dans différents modèles murins.

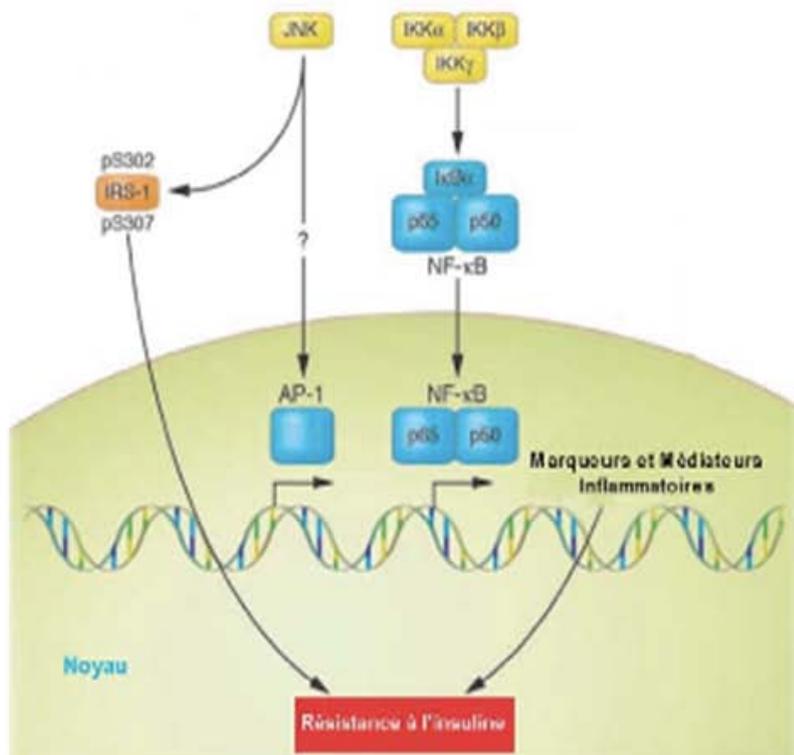


Fig 7. Les médiateurs inflammatoires (produits notamment au niveau du TA) participent à la mise en place d'une insulino-résistance. Modifié d'après Shoelson et al. 2006

I-2.4.3.2.1 Les effecteurs cellulaires

Les cellules responsables de cette inflammation au niveau du TA semblent être en grande partie **les macrophages** du TA. En effet, il y a une forte augmentation de cette population au cours de l'obésité puisque les macrophages peuvent constituer jusqu'à 60% des cellules du TA lors de cette pathologie contre 5 à 10% chez un homme sain (Cancello, Henegar et al. 2005).

-Les Macrophages

Les macrophages sont des cellules très hétérogènes, présents dans de nombreux tissus et dérivant de monocytes circulants.

Recrutement des monocytes vers le TA

L'augmentation du nombre de macrophages au sein du tissu adipeux peut être la résultante de plusieurs phénomènes. Cela peut provenir d'une meilleure survie et prolifération des macrophages résidents au sein du TA ou bien d'une augmentation de l'entrée de ces cellules dans le TA. Des études de transplantation de moelle osseuse (Weisberg, Hunter et al. 2006) ainsi que des marquages *in vivo* de monocytes (Lumeng, Deyoung et al. 2007) ont mis en évidence l'origine monocyttaire des macrophages retrouvés dans le TA au cours des maladies métaboliques. Cette infiltration met en jeu de nombreux acteurs tels que des molécules d'adhésion ou des facteurs chimioattractants qui ont pu être identifiés récemment grâce à l'utilisation de modèles animaux génétiquement modifiés (Dalmas, Clement et al.). (tableau 1).

Mécanismes	Protéine étudiée	Macrophages du TA chez des souris obèses	Polarisation des macrophages du TA
Diapédèse	MGL1 (CD301)	↓	↓ M1 ↑ M2
	α4 integrine	↓	ND
Chimiotactisme	MCP-1	↔	ND
	MCP-1	↓	ND
	CCR2	↓	↓ M1 ↔ M2
	CXCL14	↓	ND
	Osteopontine	↓	ND
	MIF	↔	ND
Transcription	PPAR-δ	↓	↑ M1 ↓ M2

Tableau 1 : Liste non exhaustive de modèles animaux génétiquement modifiés avec une altération des macrophages du TA

Les événements à l'origine de cette infiltration sont mal connus. L'hypoxie a été suggérée comme impliquée dans le recrutement des macrophages du TA. En effet, les macrophages du TA sont préférentiellement localisés dans des zones hypoxiques de la masse grasse de souris

obèses (Rausch, Weisberg et al. 2008). De plus, l'hypoxie est connue pour moduler la production de cytokines et de chimokines par le TA (Trayhurn, Wang et al. 2008; Wang, Wood et al. 2008) (Ye 2009) favorisant alors le recrutement des macrophages au sein du TA. Les causes responsables de l'hypoxie pourraient être une diminution de la capacité de perfusion du tissu engendrée par une hypertrophie des adipocytes comme déjà évoqué dans ce manuscrit (Hosogai, Fukuhara et al. 2007; Ye 2009).

Une nouvelle hypothèse proposée est que l'augmentation de la lipolyse puisse être responsable d'un recrutement de macrophage au sein du TA (Kosteli, Sugaru et al. 2010). En effet les auteurs ont observé qu'une restriction calorique chez des souris était responsable d'une forte augmentation de macrophages dans le tissu adipeux au cours de la première semaine alors que le nombre de cellules inflammatoires est finalement diminué 21 jours après le début de la restriction. Cette augmentation de macrophages corrèle avec la concentration d'acide gras dans le sang. Afin de déterminer si la lipolyse et le relargage des acides gras pouvaient constituer le signal responsable de l'infiltration de ces macrophages les auteurs ont administré un agent lipolytique afin de mimer les effets de la restriction et ont décrit une augmentation des cellules inflammatoires après 24 h. Les acides gras semblent donc être un signal capable d'induire une infiltration rapide des macrophages dans le TA (Kosteli, Sugaru et al. 2010). D'autre part, Cinti et ses collaborateurs ont également proposé que la mort d'adipocytes provoquée par une hypertrophie puisse être à l'origine du recrutement des cellules inflammatoires (Cinti, Mitchell et al. 2005). Cependant il a été démontré que le taux d'adipocytes en nécrose n'était pas augmenté chez des individus obèses (Spalding, Arner et al. 2008).

Transdifférenciation des préadipocytes

Une hypothèse propose qu'il existe une conversion de préadipocytes en macrophages. En effet, deux études mettent en avant que des préadipocytes activés développent des

fonctionnalités et des caractères antigéniques similaires aux macrophages. De plus, le groupe de Casteilla a démontré que les préadipocytes étaient capables d'acquérir une activité phagocytaire après leur injection dans la cavité péritonéale de souris. Ils ont également mis en évidence que les préadipocytes exprimaient des marqueurs de macrophages tels que F4/80, Mac-1, CD80, CD86 et CD45. Ainsi, les préadipocytes pourraient être à l'initiation de l'inflammation. Cependant des expériences de greffe utilisant des cellules CD45.1 de moelle osseuse injectées dans une souris receveuse CD45.2 démontre que près de 85% des cellules présentant le marqueur inflammatoire F4/80 dérivent de la souris donneuse alors que seulement 14% ont le même génotype que la receveuse. Ceci suggère donc que la plus part des macrophages du TA proviennent de l'infiltration de cellules issues de la moelle osseuse. Cependant le phénomène de la transdifférenciation des préadipocytes en macrophages pourrait être une étape initiatrice de l'inflammation et du recrutement des macrophages du TA. Des études supplémentaires afin de déterminer quels sont les facteurs responsables de ce changement de phénotypes seraient utiles afin de mieux comprendre leur rôle dans l'inflammation du TA.

Phénotype des macrophages dans le TA.

Les macrophages sont classés en deux phénotypes fonctionnels de leur mode d'activation: M1 (ou activation classique) ou M2 (ou activation alternative). L'activation de type M1 a lieu en réponse à une stimulation de type bactérienne, pouvant être induite par du LPS (lipopolysaccharide) et stimulée en présence d'IFN- γ . Le macrophage, alors hautement inflammatoire avec une activité phagocytaire et anti-microbienne importante, joue un rôle dans les dommages tissulaires. L'activation de type M2 a lieu dans un contexte parasitaire, stimulé par les cytokines IL-4 et IL-13, avec une activité d'endocytose et également impliqué dans la réparation et le remodelage tissulaire (Gordon 2003).

Grace à l'utilisation de différents marqueurs membranaires un changement de phénotype des macrophages du TA a été décrit au cours de l'obésité (Li, Lu et al. 2010). Chez des souris contrôles ce sont des macrophages n'exprimant pas le marqueur CD11c mais l'arginase1 ainsi que des cytokines anti-inflammatoires comme Il-10 qui ont été décrit dans le TA. Après 12 semaines de régime gras, c'est une population de macrophages CD11c positif exprimant des cytokines pro-inflammatoires telle que IL-6 qui a été identifié dans le TA de souris (Li, Lu et al. 2010). Une question pertinente a été de comprendre si ce changement de phénotype était la résultante de l'infiltration de nouveaux macrophages M1 ou la repolarisation des macrophages résidants M2. L'injection chez la souris d'un produit fluorescent phagocyté par les macrophages, le PKH26, a permis d'observer que l'accumulation de macrophages du TA au cours de l'obésité était négatif pour le marquage PKH26. Les monocytes étant incapables de phagocyter ce produit fluorescent, il a donc été conclu que les macrophages du TA étaient recrutés à partir de monocytes circulants. Ces macrophages négatifs pour le PKH26 expriment les marqueurs de polarisation M1. Ainsi le changement de polarisation semble être la résultante d'une infiltration de macrophages au sein du tissu et non d'un changement de polarité de macrophages résidants du TA.

Relation Macrophages – Adipocytes

Lumeng et al. suggèrent que des facteurs sécrétés par les macrophages pourraient induire la lipolyse des adipocytes de façon directe ou indirecte via l'inhibition de l'action anti-lipolytique de l'insuline (Lumeng, Deyoung et al. 2007). Les AG alors sécrétés par les adipocytes pourraient induire l'activation des macrophages et une polarisation M1 tous deux délétères au métabolisme du TA (Suganami and Ogawa 2010). Cependant aucun effet paracrine des macrophages n'a pu être mis en évidence sur la lipolyse d'adipocytes humains (Duffaut, Zakaroff-Girard et al. 2009).

Une autre hypothèse est que les macrophages du TA auraient un effet protecteur en jouant un rôle de tampon en phagocytant les adipocytes nécrotiques ou les AG libérés par le tissu (Kosteli, Sugaru et al. 2010). Les facteurs responsables du recrutement rapide de ces macrophages lors de restriction calorique sévère restent encore à élucider. Cependant il a été décrit que le TA pouvait constituer un véritable réservoir d'agents pathogènes qui serait alors libérés lors de la lipolyse. Ceci pourrait constituer le signal de recrutement des cellules immunitaires lors de la lipolyse du TA (Bechah, Paddock et al. ; Neyrolles, Hernandez-Pando et al. 2006).

Relation macrophages- cellules de la FSV

Les macrophages semblent jouer un rôle important lors du remodelage du TA au cours de l'obésité de par ses actions sur la FSV. En effet, les macrophages ont des effets sur les progéniteurs adipocytaires. Ainsi, des préadipocytes humains traités avec du milieu conditionné de macrophages montrent une moindre augmentation du stockage de lipides et des marqueurs lipogéniques traduisant donc une diminution de l'adipogénèse (Lacasa, Taleb et al. 2007). Dans cette même étude, le milieu conditionné obtenu avec des macrophages stimulés par du lipopolysaccharide est responsable d'une augmentation de la prolifération des préadipocytes humains in vitro (Lacasa, Taleb et al. 2007) alors que dans l'étude réalisée par Maumus et ses collaborateurs, le milieu conditionné de macrophage avec du LPS diminue la prolifération de préadipocytes humains (Maumus, Sengenès et al. 2008). Ceci peut s'expliquer par des différences de phénotypes des cellules au moment du traitement dues à des protocoles différents notamment en ce qui concerne l'obtention de ces cellules. Zaragosi et al viennent de mettre en évidence un effet paracrine des macrophages sur les préadipocytes (Zaragosi, Wdziekonski et al. 2010).

Ainsi, des facteurs sécrétés par les macrophages du TA stimulerait les précurseurs adipocytaires et augmenterait la prolifération de ces cellules tout en inhibant leur différenciation en adipocyte (Zaragosi, Wdziekonski et al. 2010). Il reste donc à déterminer quel(s) facteur(s) est (sont) impliqué(s) dans ces mécanismes et des caractériser son (leurs) évolution au cours de maladies métaboliques.

-Les Lymphocytes

Les lymphocytes sont des cellules immunitaires issues d'un progéniteur lymphoïde commun aux différents sous-types cellulaires : natural killer (NK), natural killer T (NKT) et lymphocytes. Nous nous intéresserons ici seulement aux lymphocytes.

Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont retrouvés de façon précoce dans le TA et ceci avant tout changement de poids d'une souris sous régime gras (Duffaut, Galitzky et al. 2009). Une étude très récente menée par Winer et al. a confirmé l'accumulation de cellules B dans le TAV dès 4 semaines de régime gras. De plus, par une expérience de transfert d'immunoglobulines G chez des souris déficientes en lymphocytes B ils ont pu montrer un rôle des immunoglobulines dans la production par les LT de cytokines inflammatoires. Ces immunoglobulines favoriseraient aussi la polarisation de macrophage vers le phénotype M1 du TAV. De plus, une neutralisation des cellules B par l'utilisation d'anticorps permet de protéger les animaux des effets métaboliques du régime gras. Ces cellules B semblent donc jouer un rôle délétère dans la pathogénèse de l'insulino-résistance (Winer, Winer et al. 2011).

Lymphocytes T

Ces dernières années quelques études se sont intéressées au rôle des lymphocytes T dans le développement des maladies métaboliques (Wu, Ghosh et al. 2007; Kintscher, Hartge et al. 2008). Plusieurs groupes ont démontré une augmentation des cellules T dans le TA après mise sous régime gras des animaux et ceci avant l'infiltration des macrophages (Wu, Ghosh et al. 2007; Kintscher, Hartge et al. 2008). A l'image des macrophages, le nombre de lymphocytes T est corrélé positivement avec l'adiposité (Duffaut, Zakaroff-Girard et al. 2009).

Recrutement des lymphocytes T dans le TA

La production de cytokines et chemokines par le tissu adipeux est le régulateur du recrutement des lymphocytes T dans le TA. On peut citer entre autre le facteur SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) ou CCL5/RANTES qui sont décrits comme promoteurs de l'accumulation de lymphocytes T via leurs récepteurs respectifs CXCR4 et CCR5 (Bour, Caspar-Bauguil et al. 2009).

-Lymphocytes T CD4+

Il existe 2 phénotypes de cellules CD4+ qui sont appelés Th1 et Th2. Les cellules Th1 sont connues pour sécréter des cytokines proinflammatoires telles que l'interféron γ (INF γ). Les cellules de types Th2 sont décrites comme anti-inflammatoires et secrètent des cytokines telles que l'IL-4 et l'IL-13. Winer et al. ont établi que chez des souris saines une proportion équivalente de cellules Th1 et Th2 est retrouvé dans le TA, alors que la mise sous régime gras est responsable d'une forte augmentation du nombre de cellules Th1 alors que les Th2 ne varient pas (Winer, Chan et al. 2009). Ceci est en accord avec des études précédentes ayant mis en exergue que l'augmentation d'INF γ était corrélée avec l'adiposité (Kintscher, Hartge et al. 2008; Rocha, Folco et al. 2008). Dans cette étude Winner réalise un transfert de cellules CD4 dans des souris déficientes pour RAG et donc ne produisant aucunes cellules B et T. Il décrit un rôle protecteur des CD4 puisque les souris ayant reçues ces cellules CD4 ont une meilleure sensibilité à l'insuline et une perte de poids dès 2 semaines après le transfert (Winer,

Chan et al. 2009). Cette amélioration serait due à un effet Th2. Cependant cette conclusion est à prendre avec précaution car la perte de poids pourrait être la résultante d'un aspect non mentionné par les auteurs à savoir une colite (Cipolletta, Kolodin et al.). En effet le transfert de cellules CD4 dans des souris déficientes en Treg est un modèle de colite induite très utilisé (Powrie, Leach et al. 1994). Ainsi cette perte de poids des souris déficientes pour RAG et repeuplées par les lymphocytes T CD4 pourrait être la principale origine de l'amélioration des paramètres métaboliques.

-Lymphocytes T CD4+ régulateurs

En plus de favoriser une réponse de type Th1, l'obésité est également associée à une diminution des cellules Treg (identifié par CD4+ /Foxp3+/CD25+) au niveau du TA (Feuerer, Herrero et al. 2009). Chez des souris obèses un traitement avec un anticorps anti-CD3+ augmente le nombre de Treg dans le TA avec une diminution de l'inflammation et une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Winer, Chan et al. 2009; Ilan, Maron et al. 2010). Une déplétion en Treg est associée à une augmentation de l'inflammation et une diminution de la sensibilité à l'insuline (Feuerer, Herrero et al. 2009). Une étude reporte une forte baisse de l'expression de Foxp3 chez des individus avec un BMI supérieur à 30 par rapport à des individus minces (Deiuliis, Shah et al. 2011).

-Lymphocytes T CD8+

Tout comme les CD4+, les cellules TCD8+ semblent s'accumuler au cours de l'obésité (Rausch, Weisberg et al. 2008; Rocha, Folco et al. 2008) bien qu'une étude démontre l'inverse (Kintscher, Hartge et al. 2008). Les lymphocytes T CD8+ appelées cytotoxiques sont impliqués dans la reconnaissance et l'élimination de cellules défailtantes. Dans des modèles de souris obèses, une déplétion des cellules CD8 par une approche génétique (déficientes pour le CD8) ou immunologique (traitement par anticorps anti-CD8) amène à une réduction du nombre de

macrophages dans le TA, une diminution de l'inflammation du TA et augmente la sensibilité à l'insuline, alors qu'un transfert de cellules CD8 dans des souris déficientes pour ce type cellulaire reverse tous les effets précédents (Nishimura, Manabe et al. 2009). Chez l'homme, une seule étude a mis en évidence une accumulation de cellules CD8+ dans le TA de patients obèses (Duffaut, Zakaroff-Girard et al. 2009).

Rôle des LT dans le TA

-LT et métabolisme adipocytaire

Via le CD40 ligand des lymphocytes et le CD40 des adipocytes, les lymphocytes peuvent moduler la sécrétion d'adipokines (Poggi, Jager et al. 2009). De plus le milieu conditionné de lymphocytes du TA inhibe la stimulation par l'insuline de 2 enzymes lipogéniques, la lipoprotéine lipase (LPL) et la fatty acid synthase (FAS) sur des adipocytes humains (Duffaut, Zakaroff-Girard et al. 2009).

-LT et recrutement macrophagique dans le TA

Différentes équipes ont montré que l'accumulation de lymphocytes T dans le TA était un événement précoce qui précédait le recrutement des macrophages au sein du TA (Kintscher, Hartge et al. 2008; Duffaut, Galitzky et al. 2009; Nishimura, Manabe et al. 2009). Ainsi des souris obèses déficientes pour l'INF γ ont une diminution de l'expression de gènes inflammatoires tels que TNF α et MCP1 ainsi qu'une diminution de cellules inflammatoires dans le TA comparées au souris contrôles (Rocha, Folco et al. 2008).

I-2.4.3.2.2 Effecteurs humoraux

Le TNF alpha

Le TNF α , cytokine pro-inflammatoire principalement sécrétée par les monocytes et les

macrophages, exerce de nombreux effets biologiques sur le métabolisme lipidique, la coagulation ou encore la fonction endothéliale. L'activation du récepteur du TNF α entraîne la stimulation de plusieurs voies de signalisation comme celle de NF κ B via I κ B, ou encore celles des MAP kinases JNK et ERK. L'activation de ces kinases en réponse au TNF α active la phosphorylation de IRS1 (**Fig 8**). Des expériences réalisées *in vitro* ont démontré qu'en activant I κ B, la stimulation par le TNF α conduit à la phosphorylation de résidus sérine de IRS1, ce qui atténue sa capacité à transmettre les événements cellulaires médiés par l'insuline (Hotamisligil *et al.* 1996). Les souris déficientes en TNF α ou pour le gène codant son récepteur TNFR1 (*Tnfr1*) ne développent pas de résistance à l'insuline lorsqu'elles sont confrontées à une alimentation riche en matières grasses ou à l'obésité (Uysal, Wiesbrock *et al.* 1997). Le TNF α peut aussi affecter la signalisation de l'insuline indépendamment de IRS1. Ainsi, le traitement par TNF α d'adipocytes 3T3-L1 en culture réduit l'expression des gènes du récepteur de l'insuline, de IRS1 et de Glut4, et diminue l'absorption du glucose en réponse à l'insuline (Stephens, Lee *et al.* 1997).

L'interleukine-6

L'interleukine-6 est une cytokine produite par de nombreuses cellules (fibroblastes, cellules endothéliales, monocytes), et également par la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux. Il est maintenant bien établi que la quantité d'IL-6 produite par le tissu adipeux, surtout viscéral, est augmentée en cas d'obésité (Bastard, Maachi *et al.* 2002). Des études récentes suggèrent que l'IL-6 pourrait être impliquée dans l'insulinorésistance et ses complications. La voie de signalisation de l'IL-6 fait intervenir l'activation des Janus Kinases (JAK), entraînant la phosphorylation des facteurs de transcription STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) pour modifier l'expression de gènes cibles (Ihle and Kerr 1995). Il existe des interactions entre les voies de signalisation des cytokines et celles de l'insuline qui conduisent en général à une diminution de la signalisation de l'insuline en présence de cytokines (**Fig 8**).

Les mécanismes en cause pourraient faire intervenir l'activation de tyrosine phosphatases et l'interaction des SOCS (*Suppressor Of Cytokine Signalling*) avec le récepteur de l'insuline. En effet, des études ont mis en évidence qu'un taux élevé d'IL-6 inhibe la signalisation de l'insuline dans les hépatocytes en diminuant la phosphorylation des tyrosines de IRS-1 et l'association de IRS-1 à la sous unité p85 de la Pi3-Kinase (Senn, Klover et al. 2002). Cet effet négatif de l'IL-6 sur la voie de signalisation du récepteur à l'insuline serait médié par l'activation de SOCS-3 (Senn, Klover et al. 2003).

L'interleukine-1

L'interleukine-1 β est l'une des cytokines pro-inflammatoires majeures produites par les monocytes et les macrophages. IL-1 β exerce sa fonction biologique en se fixant au récepteur IL-1 de type 1, provoquant alors l'activation de la voie de signalisation IKK/NF- κ B et des trois types de MAP kinases ERK, JNF et p38MAPK (Fig 8). De récentes études suggèrent que l'IL-1 β pourrait être impliquée dans la résistance à l'insuline. En effet, dans une étude cas/contrôle, les individus caractérisés par des taux circulants d'IL-1 β détectables et d'IL-6 élevés présentaient un risque accru de développer un diabète de type 2 par comparaison aux individus avec un taux d'IL-1 β non détectable (Spranger, Kroke et al. 2003). De plus, l'expression de l'IL-1 β et de son récepteur est augmentée dans le tissu adipeux viscéral de patients obèses (Juge-Aubry, Somm et al. 2004). En effet, une étude récente met en évidence que l'IL-1 β diminue le transport de glucose induit par l'insuline dans les adipocytes, principalement en inhibant l'expression d'IRS-1 via la réduction de la quantité d'ARNm d'IRS-1. Cette inhibition est dépendante de la voie d'activation des ERK. Ainsi, l'IL-1 β , sécrétée par les macrophages présents dans le tissu adipeux, peut agir en synergie avec le TNF α et l'IL-6 pour altérer le métabolisme des adipocytes, ce qui est un facteur important dans le développement de la résistance à l'insuline (Jager, Gremeaux et al. 2007). L'implication de l'IL-1 β dans ce phénomène est renforcée par les récentes conclusions de l'équipe de Roche, qui démontre

l'atténuation de l'inflammation et des voies liées au stress cellulaire chez les souris déficientes pour le récepteur de l'IL-1 de type 1 sous régime riche en graisse. Indépendamment de l'obésité, ces souris sont protégées contre la résistance à l'insuline en réponse à ce régime (de Roos, Rungapamestry et al. 2009).

D'autre part, il a été constaté que dans les îlots pancréatiques de patients diabétiques de type 2, l'expression de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 est réduite, et que de fortes concentrations de glucose induisent la production d'IL-1 β dans les cellules humaines, conduisant à une diminution de la sécrétion d'insuline, de la prolifération de ces cellules et à une apoptose. Une étude en double aveugle et randomisée, concernant des patients diabétiques de type 2 recevant ou non 100 mg d'anakinra (un recombinant humain de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1) en sous-cutané une fois par jour pendant 13 semaines, met en évidence que le blocage de l'IL-1 β par l'anakinra améliore la glycémie ainsi que la fonction sécrétrice des cellules β , tout en réduisant les taux de marqueurs de l'inflammation tels que l'IL-6 et la CRP (Larsen, Faulenbach et al. 2007)



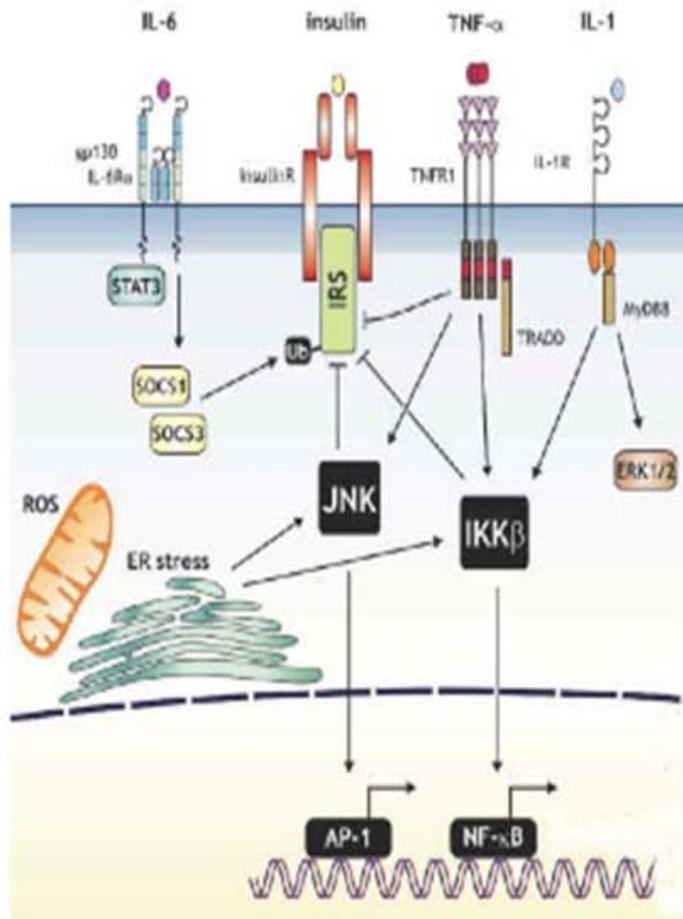


Fig. 8 : Implications des cytokines pro-inflammatoires dans la dérégulation de la voie de signalisation de l'insuline (modifié d'après Tilg et al. 2008)

I-2.4.4. Conséquences des modifications fonctionnelles du tissu adipeux

Nous avons vu plus haut que le tissu adipeux était un organe central dans l'homéostasie énergétique de part son rôle dans le stockage et le relargage de l'énergie mais également par ses nombreuses protéines sécrétées. Un dérèglement de ces phénomènes (**Fig 9**) aboutit à de profonds changements dans l'homéostasie énergétique de l'organisme en perturbant dans un premier lieu la sensibilité à l'insuline du TA lui même mais également d'autres organes tels que le foie et le muscle et le pancréas. Ainsi il participe fortement à la mise en place du syndrome métabolique.

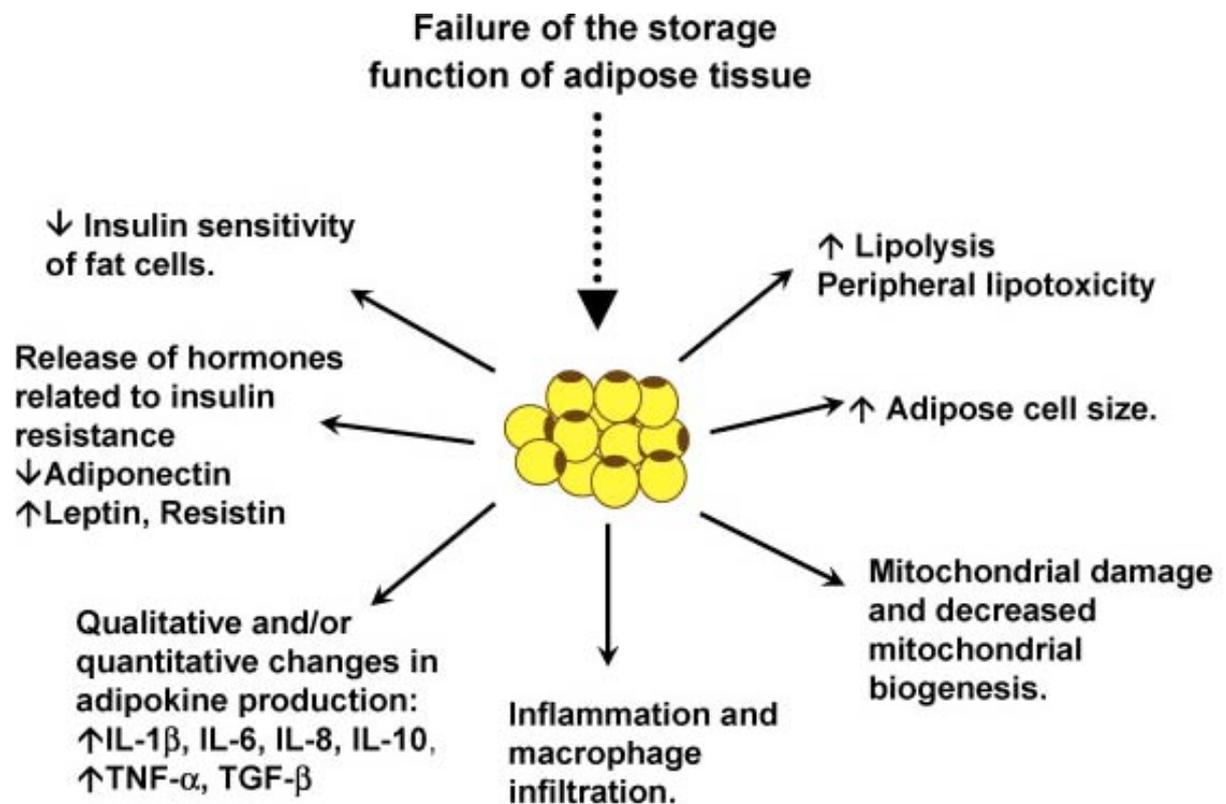


Fig 9. Modifications fonctionnelles du TA au cours des maladies métaboliques. (D'après Gastaldelli)

I-2.4.4.1 Les acides gras à l'origine du phénomène de lipotoxicité

Les acides gras et le glucose constituent les principales sources d'énergie utilisées par le muscle squelettique. L'hypothèse selon laquelle une importante oxydation des AG inhiberait la glycolyse et l'oxydation du glucose a d'abord été formulée par Randle en 1963 sous le terme de «cycle glucose-acide gras». Les travaux de Randle ont pu mettre en évidence que lorsque l'organisme était exposé à de fortes concentrations de lipides (AG et cétones) comme c'est le cas dans les situations d'obésité, l'oxydation des AG se faisait en priorité. Par conséquent, le métabolisme glucidique était ralenti voir inhibé. Au niveau moléculaire, ces études ont montré que les lipides pouvaient inhiber l'activité de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme, diminue le contenu en TG du pancréas et simultanément restorer une sécrétion glucidique comme l'hexokinase, la phosphofruktokinase et la pyruvate déshydrogénase mais pouvaient également induire l'expression de différents isoformes des PKC (PKC α , θ ou ζ) impliqués dans l'insulino-résistance. Physiologiquement, ces acides gras libres sont la

principale source d'énergie chez les sujets à jeun. Avec l'obésité, le flux circulant excède les besoins des différents tissus. L'importance du rôle des acides gras dans la résistance à l'insuline explique en grande partie la relation entre l'obésité abdominale et le risque de diabète. Le TA viscéral, plus résistant à l'action de l'insuline que le TA sous-cutané, produit d'avantage d'acides gras.

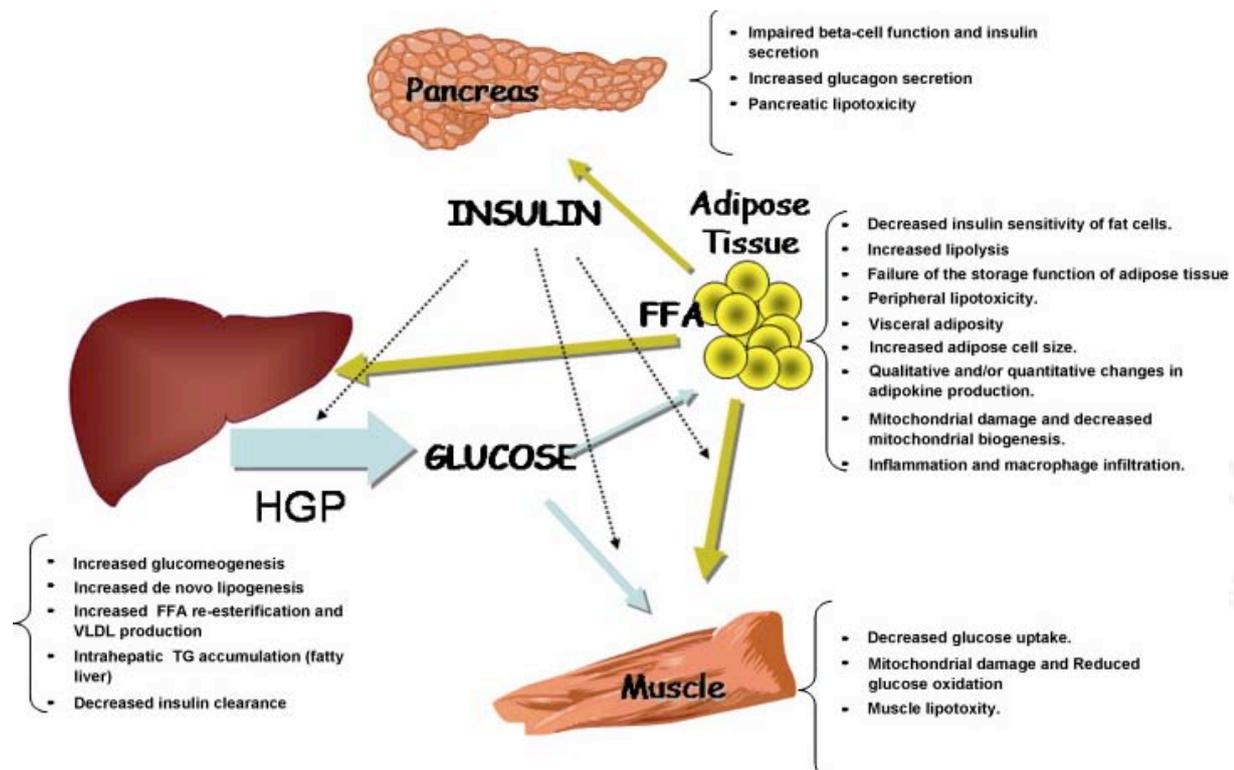


Fig 10. Effets des acides gras ou lipotoxicité au cours des maladies métaboliques.

I-2.4.4.2 Hypothèse portale

Nous avons vu qu'au cours de l'obésité, une distribution viscérale du TA est corrélée avec le développement du syndrome métabolique. Plusieurs études ont émis l'hypothèse d'une implication de la localisation anatomique des dépôts adipeux dans le développement de maladies métaboliques. Lebovitz et ses collaborateurs ont pu corrélérer le volume du TA viscéral à l'insulino-résistance (de l'organisme) et certains ont pu faire état d'une amélioration de la

sensibilité à l'insuline en réponse à une perte de poids significativement corrélée à la diminution du TA viscéral (Lebovitz and Banerji 2005). L'ensemble de ces résultats montre donc que le TA viscéral est au centre des complications associées à l'obésité et plusieurs hypothèses ont émergées pour expliquer cette particularité. A la fin des années 90, l'équipe de P. Arner a pu montrer que la graisse viscérale était plus résistante à l'action de l'insuline que la graisse sous-cutanée. Par conséquent, la production d'AG à partir du TA viscéral est plus prononcée qu'à partir d'autres dépôts adipeux. De plus, même s'il ne représente jamais plus de 20% du TA total, le TA viscéral de part sa localisation et sa vascularisation lui donnant un accès direct à la circulation portale, possède un rôle extrêmement important dans la genèse de pathologies métaboliques. L'hypothèse portale soutient que le flux important d'AGL issu du TA viscéral et qui arrive au foie par la veine porte induit un dérèglement du métabolisme hépatique.

Au niveau du foie, l'accumulation de triglycérides provoque une insulino-résistance comme elle le fait dans le muscle. L'inhibition de l'action de l'insuline stimule la néoglucogénèse hépatique et la sortie hépatique de glucose. De plus, les acides gras fournissent également les cofacteurs nécessaires à la néoglucogénèse hépatique.

L'accumulation de lipides hépatiques entraîne aussi une dyslipoprotéïnémie caractéristique du syndrome métabolique et du DT2: hypertriglycéridémie, diminution des HDL, accumulation de LDL petites et denses.

I-2.4.4.3 Accumulation ectopique de lipides dans les tissus non-adipeux.

Quand les capacités de stockage du tissu adipeux se trouvent altérées ou dépassées, les lipides peuvent alors se déposer dans des régions ectopiques comme les muscles, le foie, le

pancréas et le cœur. On parle alors de « débordement lipidique » (Despres and Lemieux 2006) qui participe fortement au du syndrome métabolique (Fig 11).

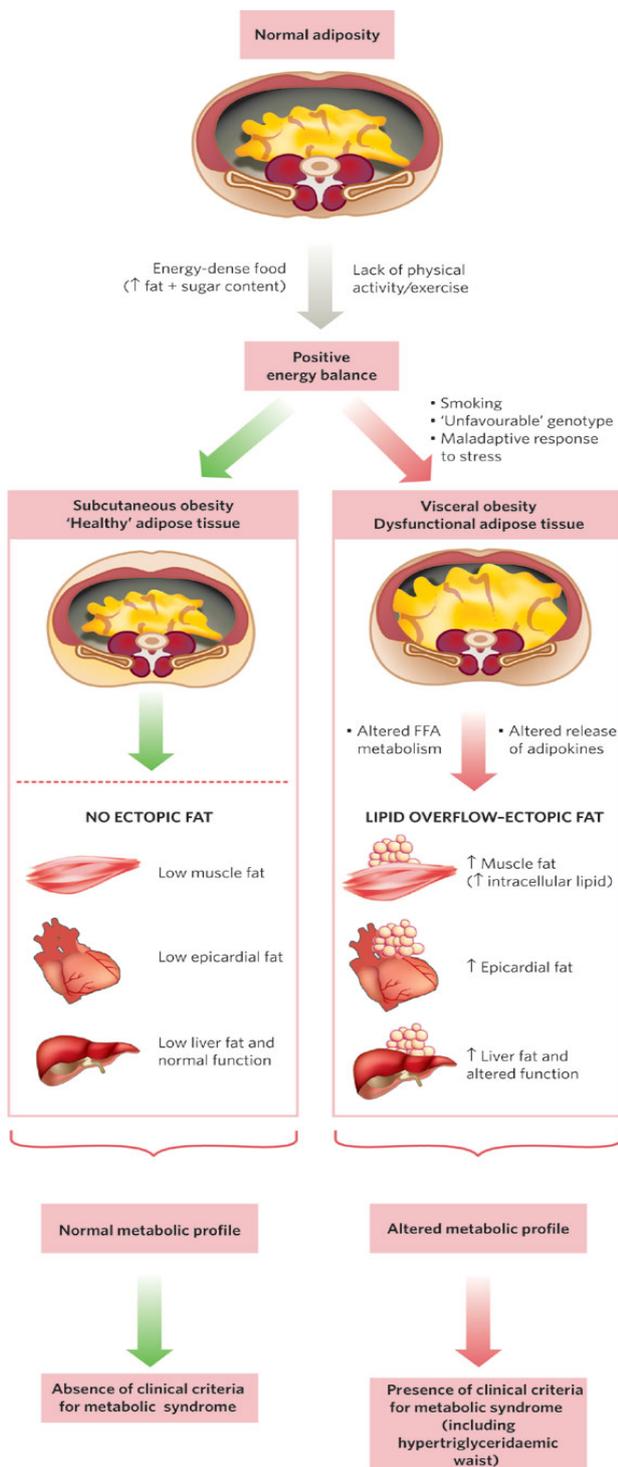


Fig 11. L'hypothèse du débordement lipidique.

Lors d'une balance énergétique positive, l'excédent énergétique est préférentiellement stocké au niveau du TASC ayant un effet protecteur sur le développement du syndrome métabolique. Lorsque le TA est absent, déficient ou insulino-résistant, l'excès de TG sera stocké dans des zones ectopiques telles que le foie, le muscle, le cœur. Les conséquences de ce débordement lipidiques seraient un profil métabolique altéré (D'après Despres, et Lemieux 2006)

I-2.4.4.4 Les adipokines

Les sécrétions du TA ne se limitent pas aux AG. D'autres molécules, d'origine peptidique ou protéique, seront produites et sécrétées par le TA. Il s'agit des adipokines. Compte tenu de la

place importante que peut prendre le TA chez l'obèse, une production ou une sécrétion modifiée n'est pas sans conséquence sur les pathologies associées à l'obésité comme l'insulino-résistance.

Il est donc essentiel de connaître les facteurs capables de cibler le TA et de générer des perturbations physiologiques de cet organe, organe clé dans l'homéostasie énergétique.



II : Bactéries et Hôte

Les maladies métaboliques sont multifactorielles et semblent être la résultante de facteurs génétiques, environnementaux et nutritionnels. Nous avons vu qu'elles sont caractérisées par une inflammation de faible intensité et les marqueurs de cette inflammation sont bien connus. Cependant, les facteurs responsables de l'initiation et du maintien de cette inflammation restent à déterminer. Récemment, la flore intestinale a été proposée comme pouvant être un facteur impliqué dans le développement des maladies métaboliques.

II-1.La flore intestinale.

Le nombre de cellules procaryotes qui habitent notre intestin est 10 fois supérieur au nombre totale de cellules eucaryotes composant notre organisme (Hooper and Gordon 2001). Nos intestins abritent 100 trillions de microorganismes avec une concentration moyenne de 10^{14} par ml et représentant 1,5kg. La diversité génétique est également largement supérieure à la nôtre puisque celle-ci est estimée à 300 000 gènes alors que notre organisme n'en comprend que 30 000 (Turnbaugh, Ley et al. 2007). La grande majorité des espèces bactériennes présentes dans l'intestin ne sont pas détectées par des techniques classiques basées sur la culture de bactéries. Récemment, les informations concernant la diversité et les aspects fonctionnels des microorganismes présents au sein du biotope intestinal ont pu être révélées grâce à des nouvelles techniques d'analyse basées sur l'étude de l'ARN 16S des bactéries. Ceci a donc permis de mieux connaître ce microbiote que l'on abrite et pouvant être considéré comme un organe à part entière.

II-1.1 Le développement de la flore intestinale.

Les êtres humains, comme l'ensemble des mammifères, naissent stériles de toute flore. Celle-ci se met en place dès les premières heures de la vie. En effet, lors de l'accouchement par voie naturelle le nouveau-né est colonisé immédiatement par la flore vaginale et anale de la mère (Fanaro, Chierici et al. 2003 ; Palmer, Bik et al. 2007). Puis lors des heures et jours qui suivent la naissance l'intestin acquiert une flore composée de germes issus de l'environnement tels que ceux issus de l'hôpital, de la famille, puis de l'habitat (Dethlefsen, Eckburg et al. 2006). L'alimentation, initialement le lait maternel ainsi que la nourriture semi solide puis solide, permettent l'évolution de la flore intestinale et sa mise en place définitive dans les deux premières années de la vie du nouveau-né (**Fig 12**). Certes les changements hormonaux, ainsi que les changements d'habitude de vie, peuvent influencer la flore intestinale en reprogrammant l'équilibre écologique qui la compose. Cependant, un profil de flore intestinale propre à chaque individu perdurera tout au long de la vie (Palmer, Bik et al. 2007).



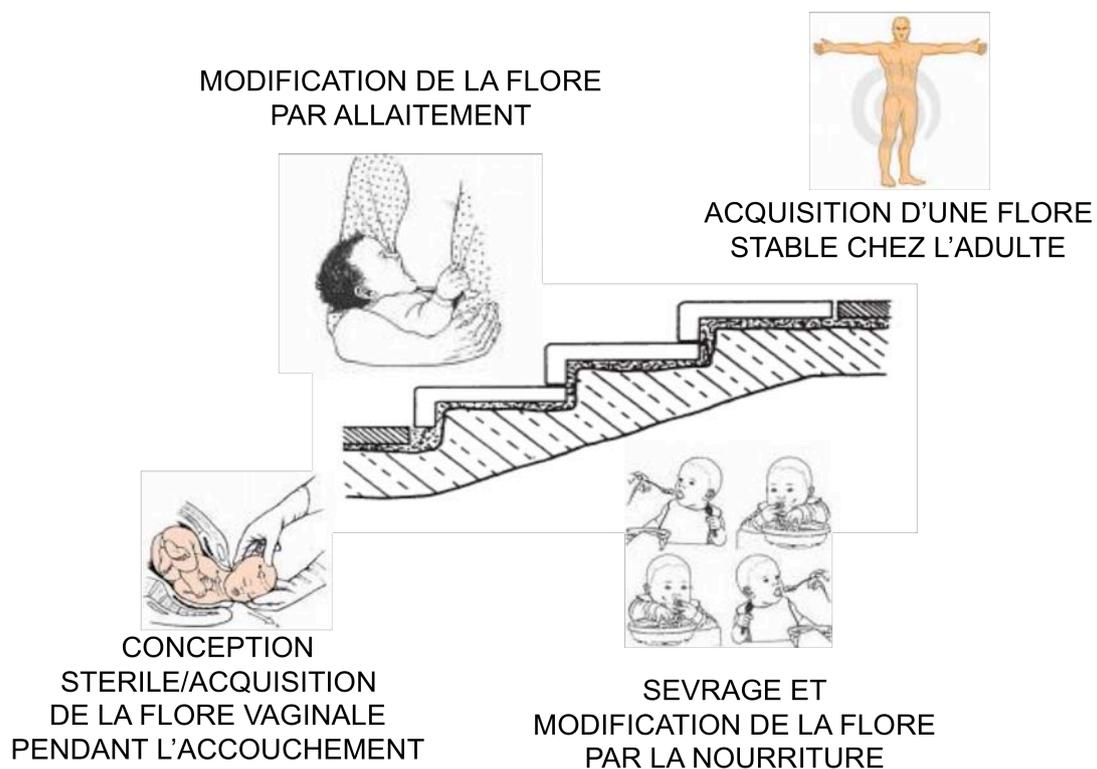


Fig. 12. Etape déterminant pour la mise en place de la flore intestinale.

II-1.2 Caractéristiques de la flore intestinale.

Notre corps est ainsi composé plusieurs milliards de bactéries dont 90% résident dans l'intestin. Les caractéristiques taxonomiques de la flore d'un individu définissent un consensus qui est partagé par l'ensemble des membres d'une famille. Des études chez les jumeaux montrent que la flore bactérienne est partagée par les membres d'une même famille (Turnbaugh, Hamady et al. 2009). Il existe un certain degré de diversité qui peut être indépendant du phénotype métabolique mais propre à l'individu. Une des caractéristiques métagénomiques (le génome de la flore) est que la flore intestinale possède un consensus entre les individus qui est constitué par le métagénome exprimé plutôt que par les taxons présents. Ainsi, au-delà du consensus il existe aussi une diversité idiotypique caractérisant chaque individu et chaque changement périodique de sa vie (Xu and Gordon 2003; Gill, Pop et al. 2006; Turnbaugh, Ley et al. 2007). Chez l'adulte, le microbiote est décrit comme étant relativement stable (Zoetendal, Akkermans et al. 1998) et vit en parfaite symbiose avec son hôte. En effet les bactéries du tractus digestif jouent des rôles essentiels pour la santé et le

bien-être de l'hôte. Les bactéries intestinales vont permettre la digestion de composé alimentaire que l'homme ne peut digérer. Ainsi, la flore intestinale est capable de digérer des carbohydrates végétaux inutilisables tels quels par l'homme et de synthétiser des vitamines comme l'acide folique, la vitamine K et la biotine (O'Hara and Shanahan 2006; Zoetendal, Vaughan et al. 2006). Certaines bactéries, *les lactobacillus species*, présentes dans la flore, sont capables de convertir les protéines du lait en acide lactique (Gorbach 1990). La flore va également jouer un rôle d'inhibition par compétition sur l'établissement de bactéries pathogènes. Le microbiote a également des effets bénéfiques directs pour l'hôte comme son rôle essentiel sur l'éducation du système immunitaire, sur le renforcement de la barrière mucoale, l'angiogénèse, la modulation de la motilité du tractus gastrointestinal, l'homéostasie et la maturation intestinale (Abrams and Bishop 1967; Ouwehand, Isolauri et al. 2002; Backhed, Ley et al. 2005).

La plupart des bactéries de la flore intestinale ne sont pas cultivables et ne représentent que 10-20% de la diversité. Le développement des analyses moléculaires a donc permis de découvrir cette diversité. Le séquençage des ADN codants pour les ARN ribosomiques a permis une classification plus fine des familles, genres, et espèces bactériennes qui constituent la flore intestinale (Turnbaugh, Ley et al. 2007; Zaneveld, Turnbaugh et al. 2008; Mahowald, Rey et al. 2009). Ainsi, il existe une multitude d'organismes commensaux qui sont organisés en quatre grands royaumes microbiens : Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria et Proteobacteria, et plusieurs mineurs (Chlamydiae, Cyanobacteria, Deferribacteres, Deinococcus–Thermus, Fusobacteria, Spirochaetes, Verrucomicrobia) (**Fig 13**). Ces espèces très majoritairement commensales ne jouent pas de rôles pathogènes.

Cependant, d'autres organismes pathogènes peuvent également se trouver dans l'intestin mais sans y jouer véritablement de rôle délétère. Lors d'une baisse de vigilance du système immunitaire, il est envisageable que certaines bactéries pathogènes « dormantes » ou commensales puissent se multiplier en conditions inhabituelles et devenir alors délétères pour

l'organisme. De telles situations peuvent survenir en cas de stress associé à une diminution des défenses de l'organisme.

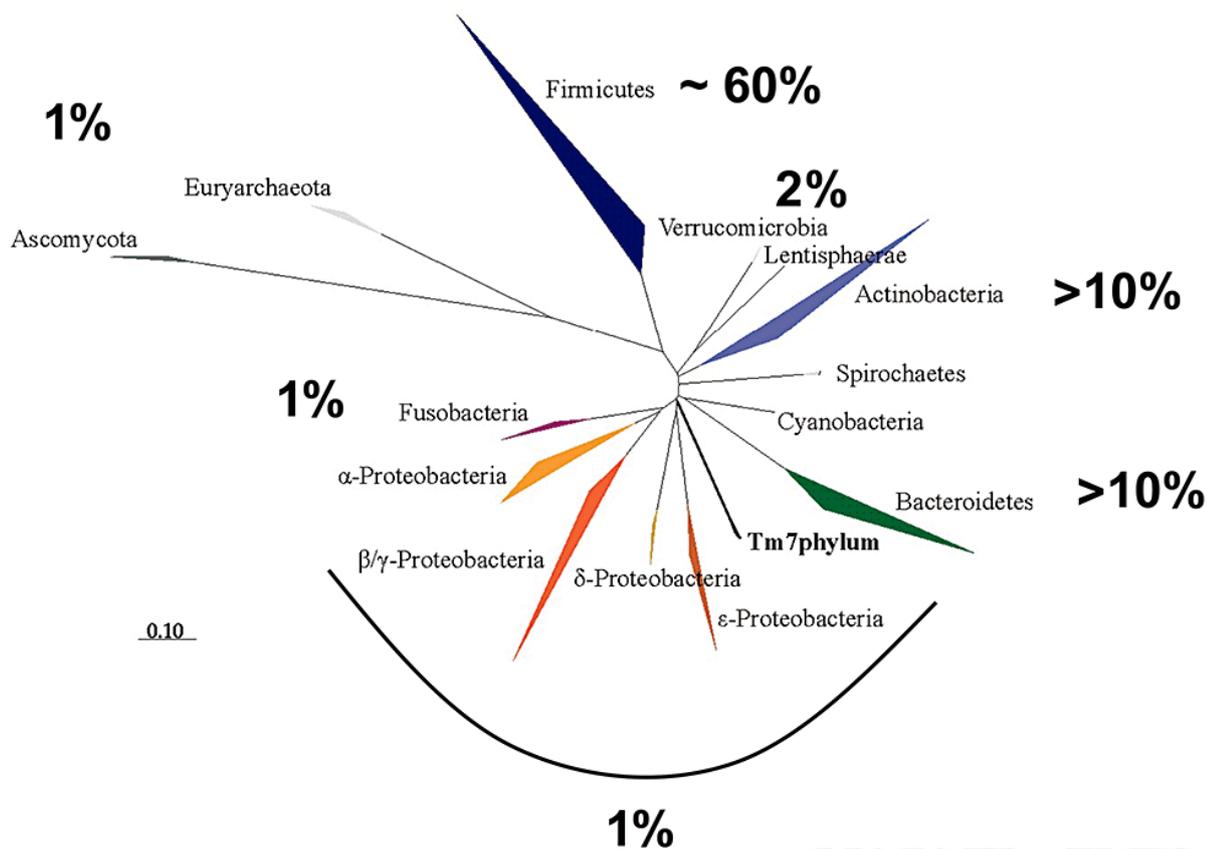


Fig 13. Arbre phylogénétique des principaux phyla du tractus intestinal humain et leur présence relative chez des européens adulte en bonne santé. D'après Diamant M 2010.

II.2-Flore intestinale et pathologies associées.

II-2.1 Maladies inflammatoires intestinales : Maladie de Crohn (MC) et Colite

Ulcérante (CU).

Les maladies inflammatoires telles que la maladie de Crohn (MC) et la colite ulcéreuse (CU) sont la conséquence d'une réponse immunitaire aberrante au niveau du tractus intestinal.

La maladie de Crohn est associée à une production excessive d'IL-12, IL-23 et IFN- γ au niveau de l'intestin grêle et aboutissant très souvent à la formation de granulome (Podolsky 2002).

La colite ulcéreuse est associée à une production excessive d'IL-13 affectant dans un premier temps le colon puis se développant souvent jusqu'au rectum.

De nombreuses études cliniques, expérimentales et thérapeutiques ont suggéré un rôle important de la flore dans le développement des maladies intestinales inflammatoires. Le premier argument en cette faveur est que la MC et la CU se développent au niveau du colon et de l'iléum distal qui sont les zones renfermant les plus fortes concentrations en bactéries. Sokol et ses collaborateurs ont mis en évidence une diminution de la biodiversité dans le microbiote fécal lors de la MC (Seksik, Sokol et al. 2006). Ceci s'explique par une forte diminution de la diversité des firmicutes et en particulier du groupe *Clostridium leptum*. De plus une analyse par FISH combiné à une technique de cytométrie en flux a permis de confirmer une réduction des bactéries du groupe *C. leptum* chez des patients atteints de MC comparés à des sujets sains (Sokol, Seksik et al. 2006). L'utilisation de modèles animaux développant une inflammation intestinale (induite ou spontanée) à ensuite permis d'établir fortement le lien entre la flore et les maladies intestinales inflammatoires. En effet des souris axéniques, dépourvues de toute flore, sans aucun signe d'inflammation ou d'activation immunitaire vont développer ces pathologies intestinales après colonisation par des bactéries entériques spécifiques et dépourvues de pathogènes (Sokol, Seksik et al. 2006).

II-2.2 Diabète de type I

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune résultant de la destruction des cellules beta pancréatiques productrices d'insuline. L'absence d'insuline est alors responsable de l'augmentation de la glycémie chez les malades et provoque de nombreux effets délétères. Le diabète de type I (DT1) est également appelé diabète insulino-dépendant. Différentes études ont

été menées concernant cette pathologie et les plus récentes font état d'une participation potentielle de la flore intestinale sur le dérèglement immunitaire observé.

Ainsi, les premières études suggérant que le microbiote intestinal pourrait moduler le risque de DT1 ont été réalisées chez des souris non-obèses diabétiques (NOD). Chez ces souris la protection du développement du DT1 après un traitement aux antibiotiques ou probiotiques était associée à un changement de la composition du microbiote, une diminution de l'expression de protéines caractéristiques d'un stress oxydatif au sein de la muqueuse intestinale ainsi qu'à une diminution de nombreux marqueurs pro-inflammatoires (Sadelain, Qin et al. 1990; McInerney, Pek et al. 1991).

Récemment l'interaction entre la flore intestinale et le système immunitaire inné a été proposé comme un facteur prédisposant au DT1 (Wen, Ley et al. 2008). En effet dans cet élégant article, les auteurs ont décrit que des souris non obèses et diabétiques (NOD) déficientes pour la protéine Myd88 (acteur clé dans l'activation du système immunitaire par un stimulus microbien) résistent au développement du DT1. Les auteurs ont mis en évidence que cet effet était dépendant des bactéries commensales puisque les souris axéniques NOD délétées pour MyD88 développaient un DT1 sévère alors que les mêmes souris colonisées avec un consortium bactériens démontraient une diminution des symptômes du DT1. De plus ils ont également relevé que l'absence de MyD88 est capable de modifier la flore intestinale en diminuant le ratio firmicutes/bactéroidetes et en privilégiant d'autres familles bactériennes telles que les *Lactobacillaceae* dans le contenu du caecum.

II-2.3 Maladies métaboliques et insulino-résistance.

II-2.3.1 Lien entre les maladies métaboliques et la flore intestinale

L'existence d'un lien entre la flore intestinale et l'obésité est connue depuis plus de 50 ans. En effet suite à une perte de poids consécutive à une intervention chirurgicale (la technique du

bypass) ou bien suite à une augmentation de poids provoquée par lésion du noyau hypothalamique, un changement de flore était observé. Cette relation entre le poids et des changements de flore ont été décrits plus tard chez des souris obèses. En effet le contenu caecal de souris ob/ob génétiquement obèses (déficientes pour la leptine) a été séquencé et comparé à celui de souris saines hétérozygotes ob/+ ou sauvages. Les souris ob/ob ont une diminution de près de 50% du nombre de bactéries de la famille des Bactéroidetes et une augmentation de la proportion des Firmicutes (Ley, Backhed et al. 2005).

Des travaux issus de notre laboratoire et d'autres montrent également qu'un changement de régime alimentaire notamment riche en graisses est associé à des modifications de la flore intestinale (Cani, Amar et al. 2007; Cani, Delzenne et al. 2008 ; Turnbaugh, Ridaura et al. 2009). Ce lien entre l'adiposité et la flore intestinale apparaît également vrai chez l'homme. En effet, 12 volontaires obèses ont été soumis à un régime hypocalorique appauvri en lipides ou en glucides. Le séquençage des gènes bactériens dans les selles des sujets a permis de retrouver une forte diminution du rapport Firmicutes/Bactéroidetes quasi similaire à celui observé chez des sujets sains (Ley, Turnbaugh et al. 2006). Ainsi, sur la durée de l'expérience ont observé une augmentation des Bactéroidetes et ce de façon proportionnelle à la perte de poids. Ces données suggèrent que le poids corporel en soi, indépendamment de la nature du régime alimentaire, intervient dans la gestion du profil des bactéries intestinales

Si les résultats obtenus chez l'homme et chez l'animal suggèrent que l'obésité altère la composition de la flore intestinale, cela ne prouve en rien que la différence relative de distribution bactérienne explique la différence de poids corporel.

II-2.3.2 Changement de flore : cause ou conséquence des maladies métaboliques ?

Un premier argument en faveur d'un rôle causatif de la flore sur le développement de l'obésité réside dans une étude prospective réalisée sur des enfants. Ainsi les enfants devenus obèses à l'âge de 7 ans avaient une proportion de Bacteroidetes plus faibles dans leur enfance par rapport aux enfants normo-pondéraux (Kalliomaki, Collado et al. 2008). Afin d'incriminer ou non le rôle de l'adiposité, des chercheurs ont utilisé des souris RELM- β KO (resistin-like molécule β knockout) qui sont résistantes à l'obésité lorsqu'elles sont nourries par un régime gras. Ainsi les souris RELM- β KO placées sous régime gras prennent moins de poids que les contrôles sous le même régime alors que les deux groupes montrent des modifications de flore identiques induites par le régime. Ceci suggère que ce n'est pas l'adiposité qui contrôle la flore mais le régime alimentaire. Les antibiotiques sont également capables de modifier la composition de la microflore intestinale. Ainsi l'administration orale de ciprofloxacine pendant 5 jours diminue clairement la diversité des communautés bactériennes fécales (Dethlefsen, Huse et al. 2008). Des souris rendues obèses génétiquement (ob/ob) ou par un régime riche ont été traitées par une combinaison d'antibiotiques et montrent de forts changements dans la composition de leur flore associés à une sensibilité à l'insuline et une tolérance au glucose améliorée sans variation de poids (Chou, Membrez et al. 2008; Membrez, Blancher et al. 2008). Il y a quelques années, Backhed et ses collaborateurs ont mis en évidence que des souris axéniques (dépourvues de toute flore) développaient une masse grasse 40% inférieure à celle de souris conventionnelles bien que ces dernières présentaient un apport calorique moins important (prise alimentaire plus faible) (Backhed, Ding et al. 2004). Parallèlement, les auteurs ont démontré que les souris dépourvues de flore intestinale à la naissance, puis colonisées avec une flore intestinale émanant de souris normales, développaient une masse grasse plus

importante et présentait une diminution de la sensibilité à l'insuline dès deux semaines après la colonisation (Backhed, Manchester et al. 2007).

Une expérience clé dans la démonstration du rôle causatif de la flore a été réalisée par le groupe de Gordon (Turnbaugh, Ley et al. 2006). En effet, deux groupes de souris axéniques ont été colonisés avec la flore provenant soit de souris conventionnelles sauvages soit de souris obèses ob/ob. Après 10 jours de colonisation, les souris colonisées avec la flore de souris ob/ob présentaient une augmentation de leur poids corporel de plus de 40% alors que l'augmentation chez les souris ayant reçu la flore issue de souris sauvages n'était que de 20% (Turnbaugh, Ley et al. 2006). La flore des souris obèses semble donc être une « super-flore » avec des capacités plus importantes dans la récupération de l'énergie ingérée. Dans ce sens, le caecum de souris obèses comparé à celui de souris normopondérales contient plus d'acides gras à chaînes courtes de type acétates et butyrates. Cette « super-flore » avec un ratio Firmicutes sur Bacteroidetes augmenté a donc des capacités d'extraction d'énergie supérieures à celle de la flore normale.

Cependant d'autres mécanismes ont été proposés afin de comprendre le rôle de la flore dans l'installation des maladies métaboliques.

II-2.3.3 Comment la flore peut-elle modifier l'homéostasie énergétique ?

II-2.3.3.1 Les bactéries intestinales régulent le stockage de l'énergie chez leur hôte

Le premier mécanisme expliquant le rôle du microbiote sur l'homéostasie énergétique a été décrit suite à des expériences de colonisation de souris axéniques. Ainsi, la prise de poids des souris nouvellement colonisées a été associée à une diminution de l'expression intestinale du facteur circulant Fiaf (fasting-induced adipose factor, également nommé angiopoietin-like protein 4). Fiaf est un inhibiteur de la lipoprotéine lipase (LPL) produite notamment par le foie et

le tissu adipeux. Une augmentation de l'activité de la LPL se traduit par une accumulation de triglycérides dans les adipocytes. Des études chez des souris axéniques et déficientes pour Fiaf ont confirmé le rôle médiateur de Fiaf sur le stockage de l'énergie et ceci via la flore intestinale (Backhed, Ding et al. 2004).

Le second mécanisme met en jeu l'inactivation de la protéine kinase dépendante de l'AMP (AMPK), véritable carrefour métabolique de la cellule. En effet, chez les souris axéniques, il a été observé une suractivation de l'AMPK dans le muscle et le foie. L'AMPK serait donc une cible potentielle indirecte des bactéries intestinales (Backhed, Manchester et al. 2007).

Enfin, un des rôles de la flore est de digérer les nutriments alimentaires non digestibles par nos cellules eucaryotes. Pour cela le microbiote est capable de synthétiser de nombreuses hydrolases afin de digérer des polysaccharides complexes en sucres simples et en acides gras à chaîne courte dont les principaux sont l'acétate, le propionate et le butyrate (Flint, Bayer et al. 2008). Ces acides gras à chaînes courtes représentent une importante source d'énergie pour notre corps et sont également les ligands de récepteurs couplés aux protéines G présents sur les enterocytes (RCPGs) : Gpr41 et Gpr43 (Brown, Goldsworthy et al. 2003; Le Poul, Loison et al. 2003). Les souris invalidées pour Gpr41, conventionnelles ou axéniques, prennent moins de poids que des souris sauvages malgré un régime similaire. La déficience de Gpr41 chez ces souris a pu être associée avec une augmentation du transit intestinal, une diminution de l'extraction de l'énergie des aliments et une diminution de la lipogenèse hépatique (Samuel, Shaito et al. 2008). Ainsi l'activation de Gpr41 dans l'intestin pourrait être une future cible thérapeutique permettant de moduler l'énergie extraite à partir des aliments

Afin de mieux comprendre le rôle de la flore dans l'extraction de l'énergie, ce même groupe a réalisé une analyse métagénomique des bactéries intestinales de souris nourries par régime gras. Ils décrivent une augmentation de protéines et enzymes impliquées dans la digestion de polysaccharides alimentaires non digérés et la fermentation, donnant alors des sucres simples qui pourront alors être utilisés par l'hôte (Turnbaugh, Backhed et al. 2008).

Ainsi un très faible excès énergétique, généré par une efficacité supérieure du microbiote, pourrait être suffisant pour entraîner une augmentation du poids corporel sur une période équivalente à plusieurs années (Fig 14).

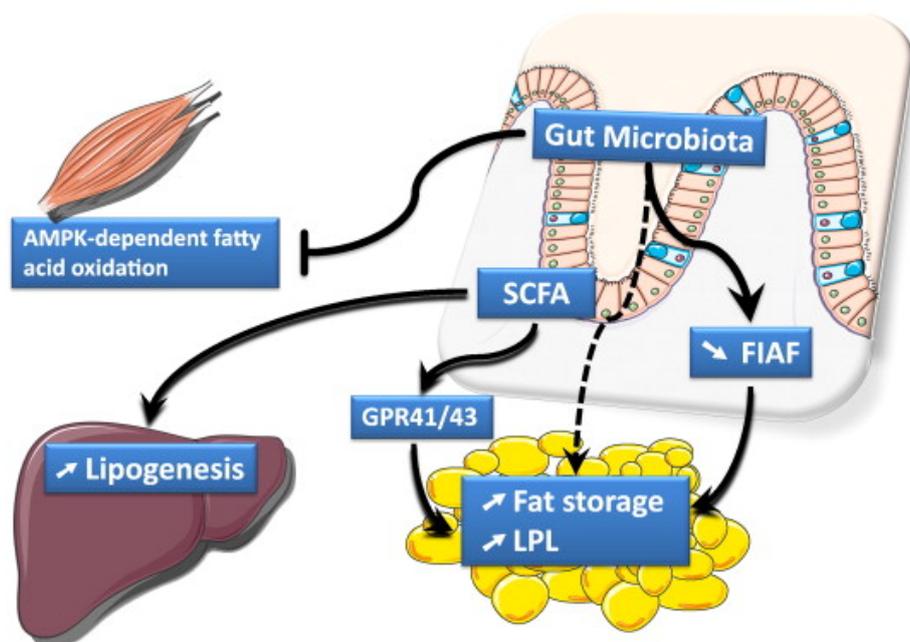


Fig 14. La flore intestinale augmente le stockage de l'énergie.

Le microbiote semble capable de favoriser le stockage énergétique par différents mécanismes. En augmentant les acides gras à chaînes courtes (sCFA ; short chain fatty acid) la flore fournit plus de nutriments lipogénique à l'organisme et augmente ainsi la lipogénese hépatique et la stockage adipocytaire. En supprimant FIAF (fasting-induced adipose factor) dans l'intestin, les bactéries contrôlent indirectement l'activité de la lipoprotéine lipase (LP)L. De plus en agissant sur les GRP 41/43 les acides gras à chaînes courtes favorisent également le stockage. Lors d'un régime gras, le microbiote inhibe l'oxydation des acides gras en diminuant l'activité de la protéine kinase dépendante de l'AMP (AMPK). D'après Cani P.D 2011

En parallèle à ces mécanismes notre laboratoire a proposé que la flore bactérienne pourrait être à l'origine de l'inflammation métabolique associée au DT2 et à l'obésité.

II-2.3.3.2 Les bactéries intestinales pourraient-elle être à l'origine de l'inflammation des maladies métaboliques.

Les maladies métaboliques sont caractérisées par une inflammation de basse intensité et associées à une activation du système immunitaire (Pickup and Crook 1998; Weisberg, McCann et al. 2003; Caspar-Bauguil, Cousin et al. 2005; Hotamisligil 2006; Shoelson, Lee et al. 2006; Feuerer, Herrero et al. 2009; Winer, Chan et al. 2009). Nous avons récemment exploré comment un facteur associé aux bactéries pouvait être responsable de l'obésité et du DT2 au cours d'une alimentation hyper-lipidique. Nous avons découvert que les lipopolysaccharides (LPS) issus des bactéries Gram-négatives présents dans l'intestin pourraient constituer le candidat idéal (Cani, Amar et al. 2007).

II-2.3.3.2.1 Les Lipopolysaccharides

Généralités : Structure du LPS

Les lipopolysaccharides sont des glycolipides composés d'un lipide A, permettant l'ancrage à la membrane, et d'une partie polysaccharidique débordant de la membrane externe (**Fig 15**). Les propriétés inflammatoires et toxiques des LPS sont dues au lipide A qui n'est libéré qu'après la lyse des bactéries. Il est constitué de 2 sucres aminés liés par liaison beta 1-6, phosphorylés et liés à des acides gras. La nature des sucres aminés (glucosamines ou parfois 3-aminoglucosamine) ainsi que la nature et le nombre des acides gras sont variables selon les espèces bactériennes. L'utilisation de lipide A obtenu par synthèse a permis de démontrer que le lipide A est responsable du pouvoir inflammatoire du LPS.

La fraction polysaccharidiques est constituée d'un noyau ou core interne lié au lipide A et d'un core externe lié à des polysaccharides également appelés chaîne O. Le core est similaire pour les souches d'une même espèce mais varie entre les espèces. La chaîne O est liée à la partie variable du LPS. Elle est constituée de chaînes répétitives comprenant chacune de 3 à 8 sucres

et dont le nombre est variable en fonction des espèces (**Fig 15**). Ainsi les capacités du LPS à déclencher une inflammation de basse intensité et participant aux maladies métaboliques peut être différente en fonction des propriétés du lipide A. Cependant aucune donnée expérimentale n'est disponible pour répondre à cette question.

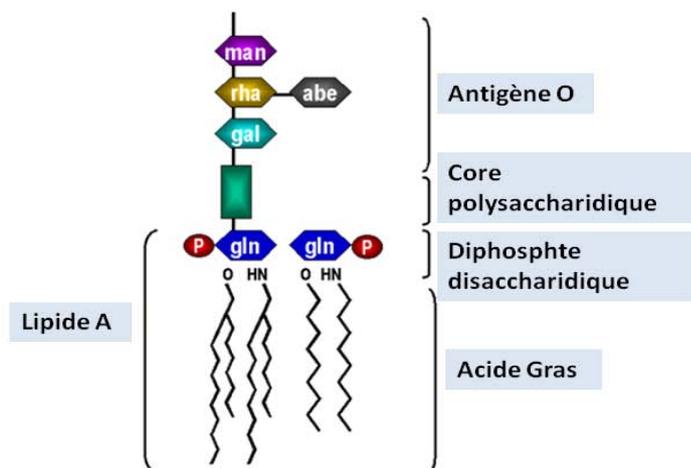


Fig 15. Structure moléculaire du LPS.

Entrée du LPS dans l'organisme: passage de la barrière intestinale.

Une alimentation riche en lipide semble favoriser l'absorption du LPS à travers la barrière intestinale (Cani, Amar et al. 2007; Erridge, Attina et al. 2007). Très récemment, Ghoshal et al. ont démontré que la formation de chylomicrons promeut l'absorption de LPS dans un modèle de cellules épithéliales humaines (CaCo-2) issu d'un adénocarcinome colorectal (Ghoshal, Witta et al. 2009). Pour cela les auteurs ont incubé les cellules avec de l'acide oléique capable d'induire la formation de chylomicrons (acides gras à chaîne longue) ou avec de l'acide butyrique qui n'induit pas de chylomicrons (acides gras à chaînes courtes). Ils ont alors constaté que les cellules incubées avec l'acide oléique relarguée plus de LPS que celles étant en contact avec l'acide butyrique. En présence d'un inhibiteur de la formation de chylomicrons (Pluronic L-81) l'effet de l'acide oléique sur le relargage du LPS n'est plus observé. Afin de confirmer *in vivo* que l'absorption de LPS a lieu à travers la formation de chylomicrons, les auteurs ont gavé

des souris LDL KO avec du LPS radiomarqué puis du trioléine en présence ou non de l'inhibiteur Pluronic L-81. Le trioléine augmente l'absorption du LPS alors qu'elle est réduite avec l'inhibiteur. De plus 1 heure après le gavage avec le trioléine, la radioactivité des nœuds lymphatiques mésentériques est augmentée alors qu'elle est réduite avec Pluronic L-81. Ceci met en évidence que le LPS est absorbé à travers les nœuds lymphatiques mésentériques via la formation de chylomicrons. Goshal et al. n'ont observé aucun effet des acides gras sur la perméabilité bien que de précédentes études avaient suggérées que les acides gras étaient capables de perturber l'intégrité de la barrière intestinale (Brun, Castagliuolo et al. 2007). Cependant ces études avaient été réalisés avec des concentrations d'acide oléique 10 fois plus importantes (Levels, Abraham et al. 2003).

Un autre mécanisme d'absorption du LPS pourrait être dépendant de l'internalisation par les entérocytes via le récepteur TLR4 (Neal, Leaphart et al. 2006). A l'intérieur des entérocytes le LPS est transporté jusqu'à l'appareil de golgi ou les chylomicrons sont synthétisés (Hornef, Frisan et al. 2002). Ainsi un effet des acides gras sur l'intégrité de la barrière intestinale ne peut être exclu puisque l'endotoxémie induite par un régime gras est associé a une diminution de la concentration des ARN messagers codant pour l'occludine et la *zonola occludens* qui permettent la jonction des cellules épithéliale (Cani, Possemiers et al. 2009).

Transport sanguin du LPS : Lipoprotéine et LBP (LPS binding protéine)

Les LPS ne sont pas libres dans la circulation sanguine. Ils sont transportés par une glycoprotéine, la LBP (la LPS binding protéine). Toutes les lipoprotéines peuvent également transporter du LPS de façon dépendante du nombre de phospholipides à la surface des lipoprotéines. En effet ce sont les phospholipides qui vont lier la LBP. En condition physiologique, les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont les principaux vecteurs de LPS. Au cours d'inflammation ou d'infection, le taux plasmatique de HDL et de cholestérol est diminué

alors que les TG et chylomicrons sont augmentés. Le LPS se lie alors aux lipoprotéines en fonction de leur contenu en phospholipides. En augmentant et redistribuant le contenu des phospholipides dans les différentes lipoparticules, l'activité du LPS peut être atténuée. Ainsi ce mécanisme de remodelage des lipoprotéines pourrait représenter un processus important dans la réponse du système immunitaire en réponse à une endotoxémie ou infection par des bactéries gram-négative (Levine, Parker et al. 1993). Dans ce sens il a été observé que la liaison du LPS avec les lipoprotéines et notamment avec les chylomicrons prévient partiellement l'activation des macrophages/monocytes et la sécrétion de cytokines inflammatoires en réponse à une endotoxémie (Cavaillon, Fitting et al. 1990; Harris, Grunfeld et al. 1993). Cependant la majorité des études a été réalisées dans des conditions d'inflammation aiguë et très peu de résultats démontrent le rôle des lipoprotéines au cours d'une augmentation faible d'endotoxémie comme décrite au cours de l'obésité, DT2.

Signalisation du LPS

Une fois que le LPS est fixé à la LBP cette protéine va permettre le transfert du LPS vers le récepteur CD14. Le récepteur CD14 membranaire est une glycoprotéine de 53 kDa ancré à la membrane par un glycosylphosphatidylinositol (GPI), ne possédant pas de partie cytoplasmique. Le complexe CD14/LPS est reconnu par la protéine *myeloid differentiation protein-2* (MD-2) qui est associée au récepteur TLR4. Le récepteur TLR4 possède un domaine de signalisation intra-cellulaire et va, via son activation, recruter différents adaptateurs aboutissant à l'activation des voies de signalisation NF- κ B et AP1 (Heumann and Roger 2002; Rakoff-Nahoum, Paglino et al. 2004). Il existe une forme soluble du récepteur CD14 (CD14s). Le CD14 soluble est capable de lier le LPS via la LBP. Ce complexe peut se lier sur des cellules n'exprimant pas le CD14 comme les cellules endothéliales. Le rôle du CD14 soluble

proposé comme un tampon ou un médiateur des effets du LPS est discuté (Heumann and Roger 2002).

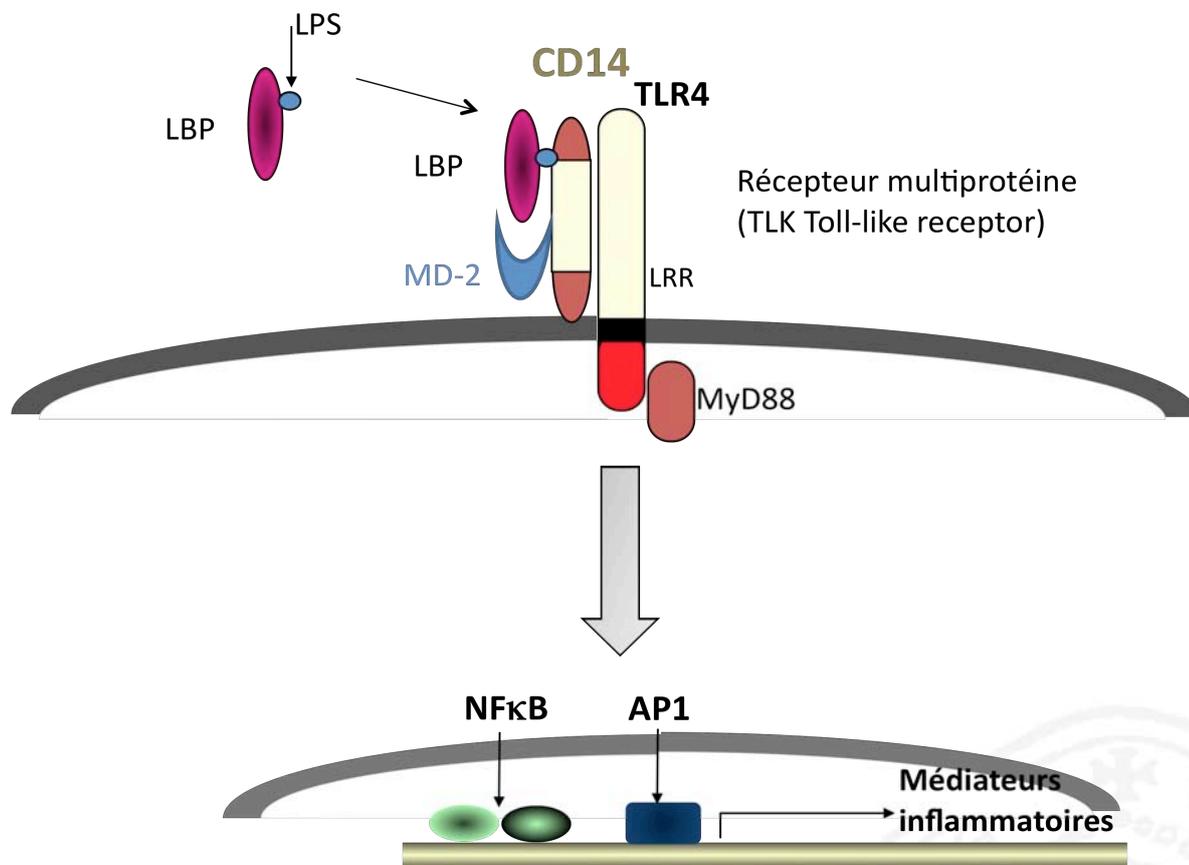


Fig 16. Signalisation cellulaire du complexe LPS/CD14.

II-2.3.3.2.2 Relation entre le LPS et les maladies métaboliques

L'endotoxémie métabolique

L'étude de Cani et al. est la première suggérant qu'un facteur issu de la flore bactérienne pourrait être responsable de la prise de poids, de l'inflammation de basse intensité et du développement de l'insulino-résistance (Cani, Amar et al. 2007). Il a donc été suggéré que le LPS puisse être le facteur moléculaire initiateur de ces phénomènes. Dans un premier temps Cani et al. ont mis en évidence la relation étroite existant entre un régime hyperlipidique et le taux plasmatique de LPS. Pour cela l'endotoxémie plasmatique a été observée chez des souris nourries par un régime hyperlipidique pendant 4 semaines. Alors que le taux de LPS au cours d'une journée atteint son maximum à l'état nourri pour diminuer fortement au cours de périodes

de jeûne ce rythme est totalement perturbé chez des souris nourries avec un régime gras. En effet ce régime entraîne une augmentation faible (d'un facteur 3) mais permanente du LPS sanguin tout au long de la journée. Cette endotoxémie a alors été qualifiée d'endotoxémie métabolique par les auteurs. De même, l'administration orale de LPS avec de l'huile de colza ou de l'eau entraîne une augmentation de LPS plasmatique seulement en présence de l'huile. Ceci met en évidence la relation de cause à effet entre l'absorption de graisse et l'augmentation des quantités d'endotoxines plasmatiques.

LPS, prise de poids, insulino-résistance et inflammation.

Les auteurs se sont alors attachés à étudier l'effet in vivo de cette endotoxémie métabolique sur la prise de poids, l'insulino-résistance et l'inflammation de basse intensité (Cani, Amar et al. 2007). Des souris sauvages ont été équipées de mini pompes osmotiques délivrant du LPS en sous-cutanée en faible quantité pendant 1 mois afin de retrouver les concentrations plasmatiques de LPS décrites lors d'un régime hyperlipidique contenant 72% de gras. Les souris perfusées par le LPS ou nourries par un régime gras montrent une augmentation de la concentration de glucose et d'insuline dans le sang par rapport à des souris nourries par un régime standard. La réponse insulinique à une administration orale de glucose est diminuée dans le groupe des souris nourries par un régime gras par rapport au groupe contrôle mais ce n'est pas le cas dans le groupe des souris perfusées LPS. Néanmoins, la détermination de la production hépatique de glucose au cours d'un clamp montre que seules les souris perfusées au LPS ont une augmentation de l'insulino-résistance hépatique alors que les souris en régime gras présentent les caractéristiques d'une insulino-résistance périphérique (muscle, tissu adipeux mais pas le foie).

De façon intéressante la perfusion de LPS génère une prise de poids similaire à celle engendrée par le régime riche en graisses ainsi qu'une augmentation de

triglycérides hépatiques. La détermination de l'expression génique des cytokines inflammatoires $TNF\alpha$, PAI1, IL-1 et IL-6 montre une réponse inflammatoire au niveau du muscle, du foie et du tissu adipeux des souris perfusées au LPS et nourries par un régime gras. Cette inflammation semble être dépendante du récepteur CD14 puisque l'injection en intra veineuse de LPS chez des souris déficientes pour ce récepteur (CD14 KO) ne montre pas d'augmentation des cytokines inflammatoires dans le tissu adipeux alors qu'une très forte augmentation de ces cytokines est retrouvée chez des souris sauvages. Les souris CD14 KO perfusées par du LPS via une mini-pompe osmotique ne développent pas d'hypérglycémie, d'hyperinsulinémie ni de stockage des triglycérides au niveau hépatique. Ces animaux montrent une hypersensibilité à l'insuline comme démontré par un clamp euglycémique hyperinsulinémique. Lorsque les souris CD14 KO sont nourries par un régime hyper lipidique, l'apparition de l'insulino-résistance est retardée par rapport aux souris sauvages bien qu'au terme de 24 semaines de régime gras les deux génotypes de souris développent une intolérance aux carbohydrates. L'accumulation hépatique de triglycérides n'est plus présente en l'absence du récepteur CD14 chez les souris sous régime gras. L'endotoxémie et le régime gras semblent donc promouvoir le développement du DT2. L'endotoxémie induite par une alimentation riche en graisses pourrait agir parallèlement aux acides gras alimentaires entraînant des caractéristiques pro-inflammatoires et pro-diabétogènes.

Dans cette même étude, Cani a pu montrer que l'effet du LPS et du régime gras sur la taille adipocytaire était différent. En effet, la perfusion de LPS entraîne une diminution de la taille des adipocytes et une augmentation du nombre de macrophages au sein du tissu adipeux par rapport aux souris contrôles, nourries par un régime gras ou déficientes pour le récepteur CD14. En l'absence du récepteur CD14, les souris perfusées au LPS ou nourries avec un régime gras démontrent une taille adipocytaire similaire aux souris sauvages avec un régime normal, et n'ont développé aucun signe d'inflammation dans le TA. Il serait donc intéressant d'évaluer si l'endotoxémie est capable d'induire un phénomène d'hyperplasie au

niveau du TA et ceci via le récepteur CD14 en agissant sur le nombre de pré-adipocytes et sur la différenciation des adipocytes. La plasticité du TA est une étape déterminante dans la prise de poids mais également dans l'insulino-résistance. L'endotoxémie métabolique pourrait donc être un facteur supplémentaire des acides gras participant au développement d'un tissu adipeux inflammé.

L'endotoxémie dite métabolique retrouvée au cours de cette étude correspond à une concentration en LPS plasmatique au moins 50 fois inférieure à celle retrouvée au cours d'une septicémie (Mitaka 2005). En effet, les concentrations plasmatiques de LPS retrouvées chez les souris perfusées au LPS ou nourries par un régime gras varient entre 4,5 et 5 EU/ml. Il est connu que l'endotoxémie au cours d'une infection diminue la prise alimentaire (Langhans 2000). **Cependant dans cette étude les concentrations de LPS plasmatique ne semblent pas être suffisantes pour induire un effet anorexigène.**

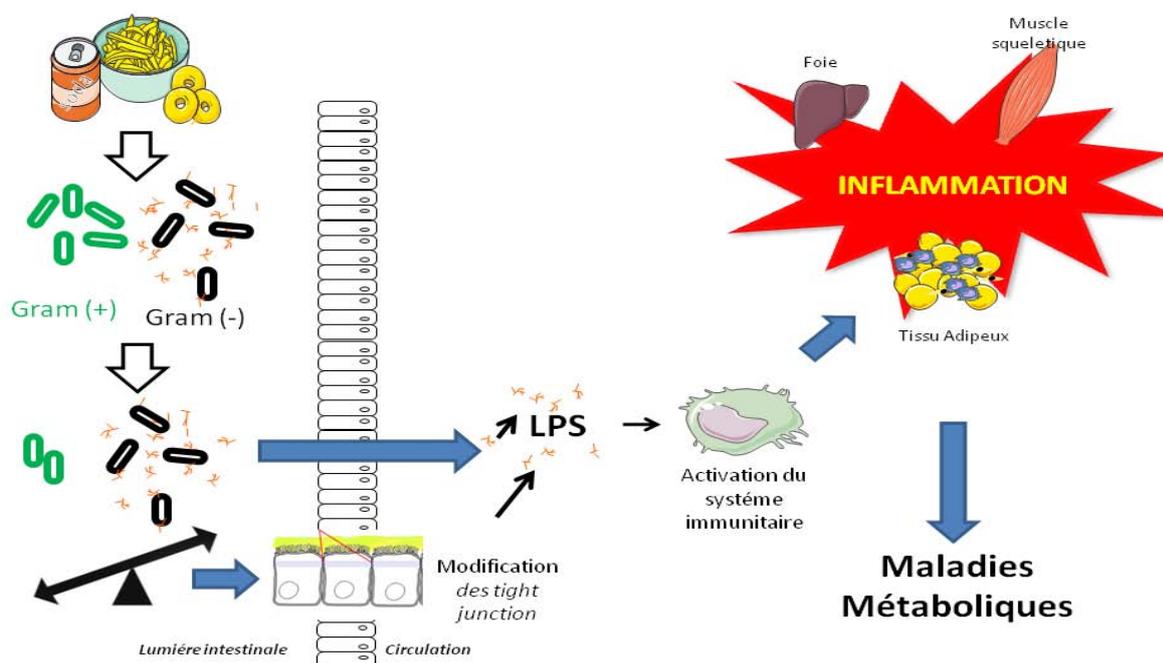


Fig 17. L'endotoxémie métabolique et ses conséquences.

Un régime gras est responsable de l'augmentation du rapport Firmicutes/Bacteroidetes entraînant des dérégulations de la perméabilité intestinale aboutissant à l'augmentation de l'endotoxémie métabolique.

L'endotoxémie va alors initier une inflammation au niveau du foie, tissu adipeux, muscle contribuant au développement des maladies métaboliques. Modifié d'après Serino M. 2009.

LPS et signalisation à l'insuline.

Les endotoxines sont responsables de réponse immunitaire et d'inflammation pouvant interagir avec la signalisation de l'insuline. Dans les adipocytes, deux mécanismes sont responsables de l'insulino-résistance en réponse aux endotoxines. En effet, l'activation par du LPS des pré-adipocytes par le TLR4 est responsable de la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que $\text{TNF}\alpha$ et IL-6 (Hotamisligil, Peraldi et al. 1996) qui alors vont inhiber la signalisation à l'insuline dans les adipocytes. Le LPS est également capable de stimuler l'expression de NF-kB (Song, Kim et al. 2006) ainsi que l'activation de la voie de signalisation de la MAPK dans les adipocytes. Ces deux voies vont conduire à une diminution de l'expression des gènes codant pour le transporteur GLUT4, la Stearoyl-CoA désaturase, la Fatty acids synthase et la perilipine (Chung, Lapoint et al. 2006).

Une étude a également observé l'effet du LPS sur les cellules musculaires. Pour cela des myoblastes ont été traités par des milieux conditionnés de macrophages incubés en présence de LPS. Ceci a pour conséquence d'augmenter le transport de glucose dans les myoblastes sans modifier l'expression de molécules de stress et de l'inflammation. Afin de justifier ces effets, une quantité importante d'IL-10 a été retrouvée dans le milieu alors qu'en présence d'un anticorps anti IL-10 l'effet sur le transport de glucose n'est plus observé (Samokhvalov, Bilan et al. 2009).

Transport de glucose-Le LPS semble donc capable d'augmenter la sensibilité à l'insuline. Chez des sujets sains une faible dose de LPS (mimant une faible septicémie) entraîne une réponse biphasique dans l'utilisation du glucose. En effet la sensibilité à l'insuline est augmentée 2 heures après l'injection de LPS (van der Crabben, Blumer et al. 2009) mais va nettement diminuer après 24 heures (Anderson, Mehta et al. 2007). Cette diminution pourrait être due à l'action des cytokines inflammatoires telles que le $\text{TNF}\alpha$ et l'IL-6. Cet effet biphasique du LPS

sur la sensibilité à l'insuline reflète le passage d'un état hypoglycémique à un état hyperglycémique décrit dans des conditions d'infection (Agwunobi, Reid et al. 2000). L'hypoglycémie induite par le LPS est associée à une diminution de la production de glucose par le foie. En effet l'activation de la voie de signalisation NF- κ B inhibe la production de glucose dans des hépatocytes en culture (Raetzsch, Brooks et al. 2009). De plus l'activation de la voie de NF- κ B conduit à une augmentation de production de NO par la iNOS (Titheradge, Knowles et al. 1995), et diminue l'activité des enzymes clés et limitantes dans la synthèse de glucose comme la glucose-6-phosphatase et la phosphoenolpyruvate carboxykinase (Titheradge, Knowles et al. 1995; Maitra, Gestring et al. 1999).

LPS et insuline-Les endotoxines stimulent la sécrétion d'insuline et l'hyperinsulinémie favorise la clairance du LPS (notamment en inhibant l'action des cellules de Küpffer dans le foie) (Cornell 1980; Walrand, Guillet et al. 2004). Ce rétrocontrôle positif participerait à la défense de l'organisme contre les pathogènes. Cependant ce mécanisme semble être augmenté en cas de forte adiposité, d'hyperinsulinémie (Muzio, Polntarutti et al. 2000) ou d'un régime gras (Erridge, Attina et al. 2007). Les patients atteints de DT2 ont une endotoxémie plus élevée (76%) que les sujets sains (Creely, McTernan et al. 2007). Lorsque les patients sont traités avec la rosiglitazone, un agoniste PPAR- γ connu également pour ses propriétés anti-inflammatoires, les patients atteints de DT2 ont une diminution de la concentration d'insuline plasmatique de 51% associée à une diminution du LPS plasmatique de 35% par rapport a des patients non traités. Creely et al. proposent que les glitazones pourraient diminuer l'inflammation en favorisant la clairance du LPS (Creely, McTernan et al. 2007) via une diminution de l'insulinémie et une augmentation de la biodisponibilité des HDL. De plus l'augmentation des HDL est capable d'inhiber la production de cytokines en réponse au LPS.

II-2.3.3.2.3 Les bactéries intestinales dans le développement de la stéatose hépatique non alcoolique.

La stéatose non alcoolique est un aspect caractéristique du syndrome métabolique. La stéatose hépatique non alcoolique va malheureusement pouvoir évoluer vers une fibrose, cirrhose pour parfois aboutir à un hépatocarcinome (Musso, Gambino et al.). Actuellement un grand intérêt est porté sur l'inflammation hépatique et la fibrose. Certaines études suggèrent que la flore bactérienne contribue à cette pathologie hépatique. En effet chez des patients atteints exclusivement d'une stéatose hépatique, une augmentation du taux de LPS circulant a aussi été retrouvée ainsi qu'une plus grande perméabilité intestinale et une augmentation de l'expression du récepteur TLR4 au niveau du foie (Farhadi, Gundlapalli et al. 2008; Miele, Valenza et al. 2009). Ces observations pourraient découler d'une plus forte croissance bactérienne observée au niveau intestinal chez ces patients (Sabate, Jouet et al. 2008). Le taux de la protéine LBP est également augmenté chez ces malades et ceci de façon corrélée à l'expression hépatique du TNF α (Ruiz, Casafont et al. 2007). De plus des souris déficientes pour le récepteur TLR-4 sont protégées de l'induction de stéatose hépatiques induit par un régime déficient en méthionine et choline (MCD). Ainsi le rôle de l'axe LPS-TLR4 semble donc participer dans la mise en place de la pathologie (Rivera, Adegboyega et al. 2007).

En parallèle un autre mécanisme capable de perturber la perméabilité intestinale a été avancé. En effet des études réalisées chez l'homme et l'animal suggèrent que le métabolisme du pyruvate produit par la digestion des carbohydrates génère des métabolites toxiques, l'éthanol et l'acétylaldehyde, qui vont altérer les jonctions serrées de l'épithélium intestinal (Cope, Risby et al. 2000; Nair, Cope et al. 2001). Dans le même sens, une forte consommation de fructose a été récemment associé au développement de la stéatose hépatique et ceci indépendamment d'obésité ou de DT2 (Assy, Nasser et al. 2008). Afin d'investir le rôle du fructose et le complexe LPS-TLR4, Spruss et al. ont placé du fructose dans l'eau de boisson de souris sauvages ou mutées pour le TLR4 (Spruss, Kanuri et al. 2009). La prise chronique de

fructose cause une forte augmentation des marqueurs de la stéatose de l'insulino-résistance et ceci est corrélé à une augmentation de 22% de l'expression hépatique de $TNF\alpha$ et une augmentation de 27% de l'endotoxémie plasmatique chez les animaux sauvages. Toutes ces altérations, exceptée l'endotoxémie, sont significativement diminuées chez les souris déficientes pour le TLR4 malgré la supplémentation en fructose dans l'eau de boisson. Ces expériences démontrent que le fructose a des effets délétères sur la mise en place de la stéatose et ceci de façon dépendante de l'axe LPS-TLR4. Une autre étude a mis en évidence qu'une antibiothérapie non absorbable par l'intestin était capable de diminuer fortement l'endotoxémie plasmatique, l'expression hépatique du $TNF\alpha$ et la stéatose chez des souris supplémentées en fructose (Bergheim, Weber et al. 2008).

De façon intéressante le LPS intestinal a également été impliqué dans la mise en place de la fibrose hépatique via son interaction avec le récepteur TLR4 présent sur les cellules stellaires (Seki, De Minicis et al. 2007). Grace à l'utilisation de souris TLR4 KO, Seki et ses collaborateurs ont mis en évidence l'activation de ces cellules en réponse au LPS. Cette activation a pour conséquence la sécrétion de chimiokines permettant le recrutement de cellules de Küpffer qui vont alors sécréter du TGF- β connu comme étant profibrogénique.

Ces expériences suggèrent que la manipulation du microbiote intestinal permettrait de prévenir les effets d'un régime alimentaire déséquilibré et pourrait ainsi être une stratégie thérapeutique supplémentaire dans la prise en charge de cette maladie.

II-2.3.3.3 Le microbiote intestinal: future cible thérapeutique ?

Face à la forte augmentation de la prévalence de l'obésité et du DT2 des stratégies de prévention doivent être mise en place. A la vue des résultats énoncés ci-dessus, agir sur la flore intestinale paraît être une cible privilégiée dans la prévention de ces maladies. Parmi les outils utilisés pour modifier la flore intestinale, les **prébiotiques** et **probiotiques** font parties des plus importants.

Un **prébiotique** est un nutriment non digéré et fermenté de façon sélective par des bactéries (bifidobactéries, lactobacilles) entraînant des modifications à la fois de la composition de la flore intestinale mais aussi de son activité, ce qui se répercute de façon bénéfique sur le bien-être et la santé de l'hôte (Roberfroid 2007; Roberfroid 2007). Tout composé alimentaire représente alors un éventuel prébiotique (Gibson 1998). Les fructo-oligosaccharides sont clairement des agents prébiotiques. Ces fibres alimentaires sont capables d'augmenter de façon significative les bactéries du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* chez l'homme et l'animal. Les mécanismes d'action sont mal connus mais ces composés pourraient agir de façon bénéfique en favorisant une meilleure intégrité de la muqueuse intestinale (Guarner 2007) mais également en augmentant la production endogène de peptides comme le *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) (Knauf, Cani et al. 2008), le *glucose-dependent insulintropic peptide* (GIP) et le peptide YY, et diminuent les taux d'une hormone orexigène la ghréline (Cani, Dewever et al. 2004; Cani, Daubioul et al. 2005; Cani, Neyrinck et al. 2005; Cani, Joly et al. 2006; Cani, Knauf et al. 2006). Il a également été montré que la stimulation de la sécrétion du peptide *glucagon-like peptide-2* (GLP2) permettait d'améliorer la perméabilité intestinale et ainsi diminuer la concentration de LPS plasmatique (Cani, Possemiers et al. 2009) (**Fig 18**).

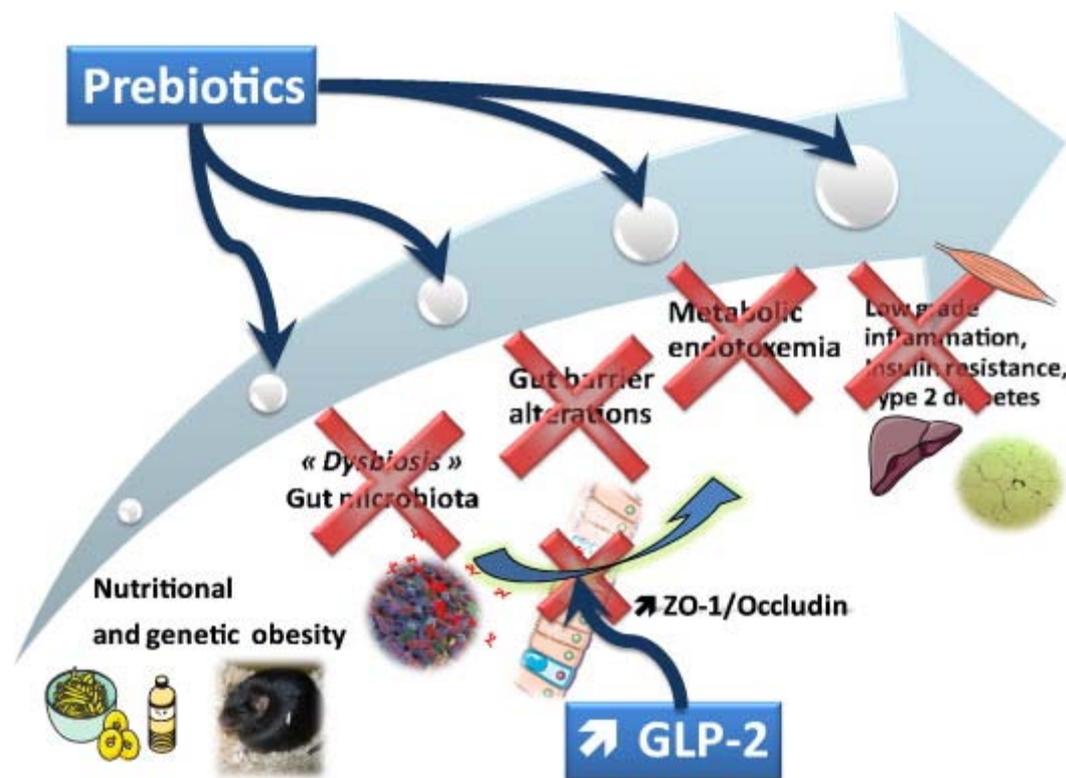


Fig 18. Effets des prébiotiques. Le microbiote intestinal participe à l'apparition des maladies métaboliques. Ces maladies métaboliques sont associées à un déséquilibre de la flore qui se traduit par des perturbations de la perméabilité intestinale, par une endotoxémie métabolique qui participe à l'initiation de l'inflammation de basse intensité et l'insulino-résistance dans le foie le muscle et le tissu adipeux. D'après Cani P.D 2011

Une autre stratégie est l'utilisation de bactéries vivantes administrées oralement en quantité adéquate afin de coloniser le colon, autrement dit l'utilisation de **probiotiques**. Les bactéries les plus utilisées sont les bifidobactéries et les *lactobacillus* avec des effets divers pour la santé. Les mécanismes d'actions de ces probiotiques sont mal connus (Boirivant and Strober 2007). Ils semblent modifier l'adhésion de certaines bactéries à la muqueuse (Collado, Meriluoto et al. 2007) et réguler la perméabilité intestinale (Trevisi, De Filippi et al. 2008). Ils sont également capables d'influencer le système immunitaire entérique à travers la production d'IgA (Fukushima, Kawata et al. 1999) ou l'induction de cytokines inflammatoires tel que l'Il-10 (McCarthy, O'Mahony et al. 2003; Menard, Candalh et al. 2004; Osman, Adawi et al. 2006). De récentes études ont démontré que les bactéries *B. longum* sont capables de réduire

l'inflammation intestinale par une production importante d'acétate issu de la fermentation des fibres alimentaires (Fukuda, Toh et al. 2011). L'acétate interagit avec le système immunitaire entérique et favorise la prolifération de lymphocytes T régulateurs. Les conséquences métaboliques de l'utilisation de probiotiques sont nombreuses puisqu'il a été observé une diminution du poids corporel (Kondo, Xiao et al. 2010), de la stéatose hépatique non alcoolique (Medina, Fernandez-salazar et al. 2004; Esposito, Iacono et al. 2009; Velayudham, Dolganiuc et al. 2009), de la tolérance au glucose et de la résistance à l'insuline (Laitinen, Poussa et al. 2009; Andreassen, Larsen et al. 2010).

Ainsi s'ouvre une nouvelle perspective dans laquelle nous aurons à considérer et à mieux comprendre le rôle d'un nouvel organe riche de plus de 3 millions de gènes : Le Microbiote Intestinal.

L'identification des cibles tissulaires de ce microbiote permettra d'envisager de nouvelles thérapies afin de lutter contre des pathologies telles que l'obésité et de diabète de type 2.

OBJECTIFS



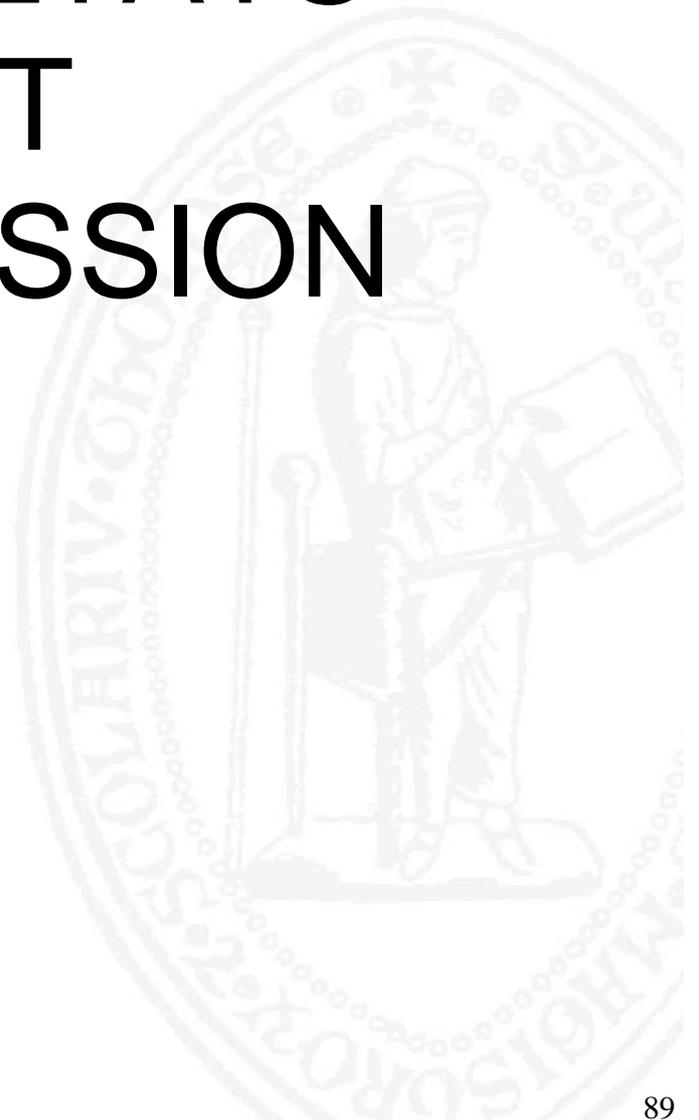
Comme nous l'avons vu dans la Partie I de ce document, le tissu adipeux, longtemps considéré comme un simple tissu de stockage, est décrit aujourd'hui comme un organe clé des maladies métaboliques. En effet cet organe peut être le siège d'une inflammation contribuant aux dérégulations fonctionnelles de ce tissu qui vont alors participer au développement du diabète de type 2 et de l'obésité. Le facteur initiateur de cette inflammation reste inconnu. Une hypothèse récente démontre que la flore intestinale participerait à l'apparition des maladies métaboliques (Partie II). Ainsi, des changements de flore induits par un régime gras seraient responsables d'une plus forte capacité d'extraction et de stockage de l'énergie. En complément, une autre hypothèse propose qu'un facteur issu de cette flore bactérienne participe à la mise en place du diabète de type 2 et de l'obésité en initiant la réaction inflammatoire métabolique. En effet au début de mon doctorat le laboratoire venait de démontrer que les lipopolysaccharides (LPS), issu des bactéries Gram-négatives, participaient à l'initiation des maladies métaboliques. Cependant aucune cible tissulaire des LPS n'avait été identifiée. Or nous avons observé que, en plus d'être responsable d'une inflammation, l'augmentation de LPS sanguin était suffisante à la prise de poids. Le tissu adipeux nous semblait donc être une cible potentielle et intéressante de l'endotoxémie.

Mon projet de thèse à consister à étudier la relation entre les LPS intestinaux et le TA.

Pour cela j'ai développé 2 axes de recherche.

- Etudier si l'augmentation de LPS induite lors d'un régime gras était capable de cibler le dépôt adipeux lors de l'apparition du DT2 et de l'obésité.
- Comprendre le rôle des cellules myéloïdes en réponse à cette endotoxémie métabolique au cours du développement des maladies métaboliques.

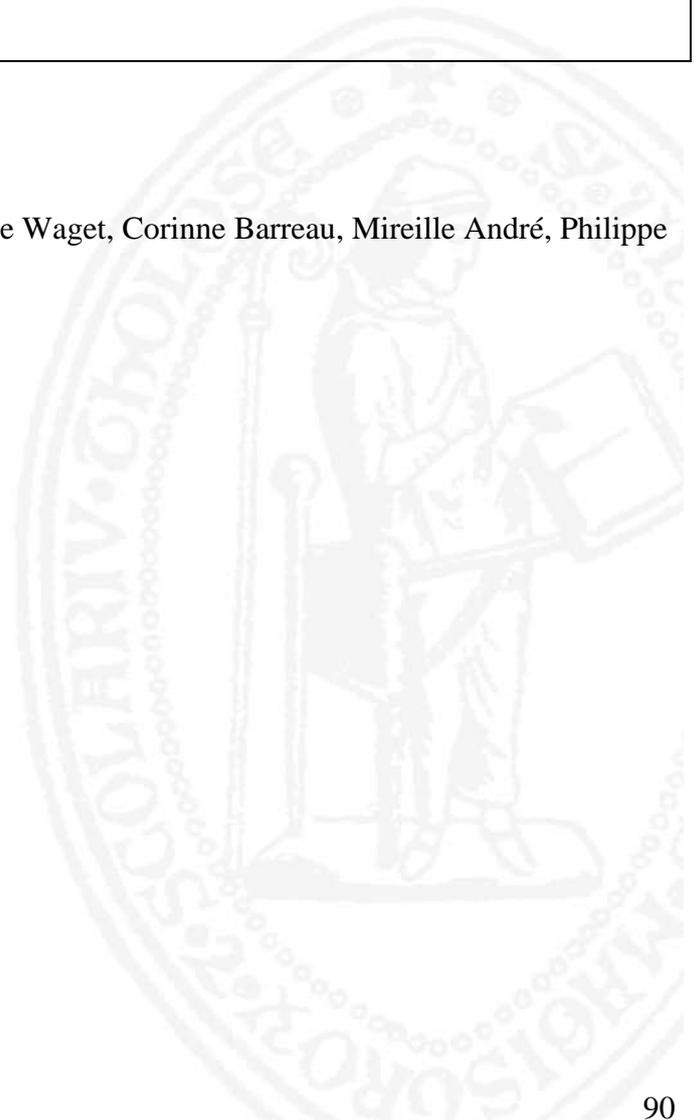
RESULTATS ET DISCUSSION



L'endotoxémie métabolique cible directement le tissu adipeux et induit la prolifération de progéniteurs adipocytaires au cours du développement des maladies métaboliques induit par un régime gras dans un modèle murin.

Elodie Luche, Béatrice Cousin, Matteo Serino, Aurélie Waget, Corinne Barreau, Mireille André, Philippe Valet, Louis Casteilla, Rémy Burcelin

En soumission *Diabetologia*.



IV-1.1 Résumé

Le développement des maladies métaboliques est associé à une inflammation de basse intensité. Comme nous l'avons déjà évoqué, le tissu adipeux semble être le siège principal de ce processus inflammatoire. Au sein de l'équipe, nous avons démontré en 2008 qu'un régime riche en graisses était responsable d'une augmentation de lipopolysaccharides au niveau plasmatique, on parle alors d'endotoxémie métabolique. Ces fragments bactériens, issus de notre flore intestinale, semblent être impliqués dans l'initiation de l'inflammation participant au développement des maladies métaboliques. Ces différentes observations nous ont naturellement conduits à envisager **le tissu adipeux comme cible directe de l'endotoxémie métabolique.**

Pour cela nous avons mis en place un modèle murin permettant d'**isoler** la sensibilité du TA blanc sous-cutané du reste de l'organisme en réponse aux LPS. Ce modèle consiste à greffer des dépôts adipeux sous-cutanés de souris sauvages, donc sensibles aux LPS, dans un organisme dépourvu de récepteur CD14 (CD14KO) et donc insensible aux effets des LPS. Le comportement du greffon sauvage nous permettra alors d'observer si le tissu adipeux sous-cutané est une cible directe de l'endotoxémie métabolique induite par un régime gras ou mimé par la perfusion de LPS via une mini-pompe osmotique implantée sous-cutané.

La première étape a donc été de caractériser le métabolisme du dépôt adipeux originaire de souris sauvages (WT) et de déterminer si l'endotoxémie métabolique a pu cibler ce dépôt malgré un hôte receveur dépourvu de récepteur CD14 (CD14KO). L'expression génique de marqueurs métaboliques est diminuée dans les greffons issus de souris WT en réponse à une augmentation de l'endotoxémie et non dans les greffons CD14KO. **L'endotoxémie est donc capable de cibler directement le dépôt adipeux et de perturber le métabolisme de façon dépendante du récepteur CD14KO.**

Afin d'expliquer ces perturbations métaboliques du dépôt adipeux nous avons caractérisé l'inflammation des dépôts et leur plasticité en réponse à l'endotoxémie métabolique.

L'endotoxémie augmente la concentration des ARN messagers des cytokines inflammatoires seulement dans le greffon issu de souris WT. De plus, des analyses de cytométrie de flux nous ont permis d'observer que la perfusion de LPS induisait une augmentation du nombre de préadipocytes résultant d'une plus grande prolifération de ces cellules. Le LPS est donc capable d'induire une réaction inflammatoire et une plasticité du tissu adipeux participant au développement des maladies métaboliques. Ceci nous a finalement conduits à nous demander si le LPS ne pouvait pas être capable de sensibiliser de façon précoce le tissu adipeux à un excès énergétique. Un « prétraitement » au LPS suivi d'une mise sous régime gras, a permis de mettre en évidence que le LPS allait potentialiser les effets du régime gras en favorisant la prise de poids, l'intolérance au glucose et l'inflammation.

L'endotoxémie métabolique est un facteur capable de cibler directement le tissu adipeux déclenchant alors une réaction inflammatoire et une plasticité du tissu qui sont associés à des perturbations métaboliques du tissu adipeux.



IV.1.2 Article

Metabolic endotoxemia induces the proliferation of adipocyte progenitors at the early onset of high-fat diet-induced diabetes

Elodie Luche^{1,2}, Béatrice Cousin^{3,4,5, 6}, Matteo Serino^{1,2†}, Aurélie Waget^{1,2}, Corinne Barreau^{3,4,5, 6}, Mireille André^{3,4}, Philippe Valet^{1,2}, Louis Casteilla^{3,4, 5, 6}, Rémy Burcelin^{1,2*}

Running title : LPS and adipose tissue development

Keywords: Lipopolysaccharides/adipose tissue precursor cells / inflammation /obesity / diabetes

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Toulouse, France.

²Université Paul Sabatier, Toulouse, France

³ Université Paul Sabatier, Unité Mixte de Recherche 5273 STROMALab, Toulouse, France

⁴ CNRS; UMR 5273 STROMALab, Toulouse, France

⁵ EFS; UMR 5273 STROMALab, Toulouse, France

⁶ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR 1031, Toulouse, France.

* Corresponding authors: Pr Rémy Burcelin, Tel: +33 5 61 32 56 14; Fax: +33 561 325 621; E-mail : remy.burcelin@inserm.fr

Abstract

High-fat diet-induced (HFD) metabolic endotoxemia (blood lipopolysaccharide-LPS) triggers low grade inflammation, adipocyte hyperplasia, and diabetes. To analyze whether LPS directly targets cells from adipose tissue and initiate cellular and metabolic phenotypes, subcutaneous fat pads from CD14 knockout (KO) or wild-type (WT) mice were grafted under the back skin of CD14KO mice. The animals were then infused for one month with a low rate of LPS, or fed a HFD. The metabolic endotoxemia reduced metabolic markers of adipocytes and the number of WT large cells only. Conversely, LPS increased cytokines mRNA concentration to the same extent as observed under HFD. Importantly, the number of adipocyte progenitors increased as assessed in vivo using BrdU labeling and then generated adipocytes. As a pathological consequence mice pretreated with LPS, and subsequently fed with a fat and carbohydrate-enriched diet, were characterized by increased adiposity and glucose intolerance. In conclusion, metabolic endotoxemia directly stimulates adipocyte progenitor proliferation through CD14-dependent mechanism, which could contribute to the enlargement of the adipose precursor pool and subsequently to body weight gain and glucose intolerance.



Introduction

Evidence now shows that inflammation is increasingly being regarded as a key process underlying metabolic diseases (Dandona, Aljada et al. 2004; Wellen and Hotamisligil 2005; Hotamisligil 2006; Shoelson, Lee et al. 2006; Manco, Fernandez-Real et al. 2007; Nishimura, Manabe et al. 2009). In the adipose tissue of obese individuals this mechanism includes features characteristic of active local inflammation (Dandona, Aljada et al. 2004; Lumeng, Bodzin et al. 2007; Nguyen, Favelyukis et al. 2007). The cytokines released impair insulin signaling (Ueki, Kondo et al. 2004; Federici, Hribal et al. 2005; Plomgaard, Bouzakri et al. 2005) thus leading to cytokine-mediated insulin-resistance. This inflammatory process is linked on one hand to macrophage infiltration of adipose tissue (Bouloumie, Curat et al. 2005; Kanda, Tateya et al. 2006; Weisberg, Hunter et al. 2006; Lumeng, Bodzin et al. 2007; Lumeng, Deyoung et al. 2007; Nguyen, Favelyukis et al. 2007; Suganami, Tanimoto-Koyama et al. 2007; Nishimura, Manabe et al. 2009) and on the other hand to the presence of lymphocytes (Feuerer, Herrero et al. 2009; Nishimura, Manabe et al. 2009; Winer, Chan et al. 2009). These data clearly demonstrated the bone marrow origin of the infiltrating cells. Using functional analyses and microarray technology, we demonstrated that adipocyte progenitors and macrophages were characterized by a closed genome and phenotypome, (Charriere, Cousin et al. 2003; Charriere, Cousin et al. 2006) suggesting that inflammation could also be attributed to cells initially present in adipose fat pads such as preadipocytes. Therefore, both infiltrating and resident cells are most likely involved in the processes characterizing adipose tissue inflammation. However, little is known about the sequence of events which leads to the low grade inflammatory tone that characterizes the adipose tissue of high-fat diet-fed mice. We and others recently demonstrated the important and innovative role of inflammatory molecules from bacterial origin such as the lipopolysaccharide (LPS) from intestinal microbiota. Furthermore, we also showed the role of the corresponding receptors TLR4 and CD14 in the control of adipose tissue inflammation (Shi, Kokoeva et al. 2006; Cani, Amar et al. 2007; Poggi, Bastelica et al. 2007; Suganami, Mieda et al. 2007), insulin sensitivity (Xu, Barnes et al. 2003; Song, Kim et al. 2006), and obesity (Gerhardt, Romero et al. 2001; Cani, Bibiloni et al. 2008). LPS concentration is increased in the blood

of high-fat diet-fed (HFD) mice (Cani, Amar et al. 2007; Cani, Neyrinck et al. 2007; Cani, Bibiloni et al. 2008) and in patients who were mainly eating a fat-enriched diet (Amar, Burcelin et al. 2008). This was recently confirmed since metabolic endotoxemia was also associated with, but not causally, an increased risk of incident diabetes in humans (Pussinen, Sundvall et al. 2011). Furthermore, to causally demonstrate the role of LPS in the control of inflammation, insulin resistance, and adipose tissue plasticity we infused wild type and CD14 knockout mice (CD14KO) with LPS for one month with the result that most of the early features of metabolic diseases were reproduced (Cani, Amar et al. 2007; Poggi, Bastelica et al. 2007). In addition, in HFD and *ob/ob* mice, antibiotic treatment reduced the features of metabolic disease and attenuated the plasma concentration of LPS (Cani, Bibiloni et al. 2008). This last set of data suggested that the LPS originated from a change in the intestinal microbiota, which we and others then largely confirmed (Cani, Neyrinck et al. 2007; Cani, Bibiloni et al. 2008; Turnbaugh, Ridaura et al. 2009).

Therefore, it remains to be determined whether LPS, which originates from a change in the microbiota induced by a fat-enriched diet, directly targets the LPS receptor CD14 of the resident cells from the adipose depot, as a first step to generate inflammation, control the proliferation of adipose precursors and launch adipose tissue development and then diabetes. To this aim we grafted subcutaneous adipose fat pads from wild-type and CD14 knockout (KO) mice under the back skin of the LPS and HFD-insensitive CD14 knockout mice. The mice were then either infused with a low dose of LPS for one month using osmotic minipumps or fed a HFD diet in order to compare with engrafted mice on a normal diet. We showed that solely the wild-type grafted adipose fat pads became inflamed in response to the low rate chronic LPS infusion, which induced adipocyte precursor cell proliferation in a CD14 dependent manner. As a pathological consequence, increasing metabolic endotoxemia during pretreatment with LPS favors the subsequent induction of glucose intolerance induced by a fat-enriched diet.

Results

In a first set of experiments to demonstrate that bacterial determinants from intestinal microbiota, such as LPS, can directly target the resident cells and modify the biology of the adipose depot through a CD14 dependent mechanism, we grafted fat pads from wild-type and CD14KO mice under the back skin of CD14KO mice. This animal model ensures that at this low concentration, as previously described (Cani, Amar et al. 2007), the action of LPS does not involve CD14 expressing cells outside the grafted adipose depot. Therefore the changes observed are directly related to the presence of CD14 in the fat pad itself (**Figure 1**). Data obtained from this animal model were compared with those obtained where mice, when studied in the same conditions, were fed with a HFD but not infused with LPS for four weeks.

LPS directly reduced the expression of metabolic genes through a CD14-dependent mechanism

The data show that four weeks of LPS treatment reduced the mRNA concentration of the glucose transporter (GLUT4), hexokinase II (HKII), fatty acid synthase (FAS), and the carbohydrate responsive transcription factor (ChREBP) in the wild-type grafted fat pads when compared with saline infused mice fed a normal diet (**Figures 2A-D**). Importantly, the effect of LPS was similar to that observed in HFD treated mice but totally blunted in the corresponding CD14 knockout fat pads in both conditions. In addition LPS reduced the number of large adipocytes of the WT fat pad (**Figures 2E**) but surprisingly increased the mean size of the adipocytes in the fat pads from CD14 knockout mice (**Figures 2F**). In response to a HFD the number of large adipocytes was increased in both the WT and CD14KO fat pads (**Figures 2E,F**). To further analyze the changes in adipocyte size we calculated the median size of adipocytes i.e., the mean size reached by half of the population. The data show that LPS reduced the median size of the adipocytes when CD14 was expressed i.e. in the WT fat pad (**Figure 2G**). Conversely, in absence of CD14 LPS increased the median size of the adipocytes demonstrating an effect of LPS which is CD14 independent (**Figure 2G**). We then analyzed the metabolic consequences of these changes on insulin-stimulated glucose utilization during hypersinsulinemic clamps and during *in vitro* lipolysis.

No change was observed in both grafted fat pads in response to LPS infusion when compared with saline infused mice suggesting that the changes in gene expression involved in metabolism are early markers, which precede the later metabolic impairments (**Supplementary figure 1A-B**).

LPS directly impacts on adipose tissue inflammation through a CD14-dependent mechanism

LPS infusion increased the concentrations of the mRNA of the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), tumor necrosis factor alpha (TNF α), and interleukin 1b (IL1 β), in the grafted fat pad from wild type mice when compared to saline-infused mice (**Figures 3A,B,C**). No such effect was observed in the absence of CD14 receptors (CD14KO grafted fat pads; **Figures 3A,B,C**). This effect was similar to that observed in response to a HFD. LPS also increased the mRNA concentrations of the macrophage chemo-attractant peptide 1 (MCP1), osteopontin, and macrophage inhibitory factor (MIF) in the wild-type fat pad when compared to saline infused mice and mimicked what was observed in HFD-fed mice (**Figures 3D-F**). Importantly, all the changes were totally blunted in CD14KO fat pads irrespective of the LPS and dietary treatments (**Figures 3A-F**). The direct inflammatory action of LPS was also determined by immunohistochemistry. The data show that both in the LPS treated and HFD mice, the number of F4/80 positive cells was increased in the wild-type fat pads but not in the CD14KO fat pad when compared the control saline infused mice on a normal diet (**Figures 3G,H**).

Importantly, the total number of cells from the stroma vascular fraction increased at completion of the chronic LPS infusion (**Figure 3I**). It was precisely the number of macrophages and adipocyte progenitors that increased but not endothelial cells, as assessed by FACS analysis (**Figure 3I**). The number of cells from the SVF also increased in HFD-fed mice (not shown).

LPS directly impacts on the stroma vascular fraction development of fat pads in vitro through a CD14-dependent mechanism

In the second set of experiments we aimed to demonstrate *in vitro* the direct effect of LPS on SVF cells from subcutaneous adipose tissue. LPS dramatically reduced the triglyceride to protein ratio of wild-type

cells but not of CD14KO cells in a dose-dependent manner (**Figures 4A,B**). It is noteworthy that the dose of LPS used was low (25ng/mL at maximum) compared with the concentration of 1µg/mL usually used to induce inflammation in other circumstances. This was accompanied by a dramatic reduction in GLUT4, HKII, FAS, and ChREBP mRNA (**Figures 4C-F**). Furthermore, LPS dramatically and dose dependently increased the proliferation of SVF cells from subcutaneous fat pads of wild type mice (**Figure 4G**) but again this was not observed with SVF cells from CD14 KO mice.

LPS directly stimulates the proliferation of adipocyte progenitors in vivo

In a third set of experiments to identify whether adipocyte progenitor cells were proliferating *in vivo* in response to LPS, we injected BrdU into LPS infused mice to specifically label the proliferating cells. After four days of LPS infusion the number of BrdU positive cells was dramatically increased (**Figure 5A**) and this was also observed after 28 days of LPS treatment. We confirmed by FACS analysis (**Figure 5B**) and immunohistochemistry that adipocyte progenitors were proliferating in response to LPS and then differentiated into adipocytes when the mice were subsequently fed a high-fat high-carbohydrate diet (HF-HC) for two weeks (**Figure 5C**).

LPS pretreatment enhances high-fat carbohydrate diet-induced total fat mass, body weight gain, and glucose intolerance

In this last set of experiments we aimed to demonstrate that since LPS directly increases the number of preadipocytes and inflammatory markers *in vivo*, this mechanism should favor body weight gain, the development of diabetes, and insulin resistance. Therefore, we pretreated mice for one month with LPS and then fed them a high-fat carbohydrate diet (**Figure 6A**) for eight weeks (Dray, Knauf et al. 2008). Under such conditions, body weight was increased in the LPS-pretreated mice (**Figure 6B**) as well as the weight of several isolated adipose depots, whereas that of the liver remained unchanged (**Figure 6C**). This was confirmed by echo magnetic resonance imaging analysis that showed that the LPS pretreatment increased the fat mass and not the lean mass (**Figure 6D**). Similarly, the LPS pretreatment considerably

increased the sensitivity of the mice to high-fat carbohydrate diet-induced glucose intolerance (**Figures 6E,F**). We then calculated the increase in cell size induced by the HF-HC diet following the pretreatment period with LPS or saline. The data show that mean fold increase of the adipocyte size calculated from the difference between the size following the LPS/Saline pre-treatment and the size following an eight week high-fat carbohydrate period was higher when the mice were pretreated with LPS than with saline (**Figure 6G**). This was still associated with an increase in inflammatory markers (**Figure 6H**).

Discussion

In this study we demonstrate that metabolic endotoxemia firstly targets resident cells present in the SVF of the adipose tissue to directly induce inflammation and stimulate the proliferation of adipocyte progenitor cells through a CD14-dependent mechanism. This occurs before the early onset of the metabolic disease and hence precedes the further development of adipose tissue under a high-fat diet and its consequences on insulin resistance. Secondly, this mechanism is direct since CD14 expressing cells outside the adipose depot are not mandatory for the development of adipose tissue during high-fat diet induced metabolic diseases (**Figure 7**).

The incidence of obesity and type-2 diabetes is increasing worldwide where both genetic and environmental factors are considered as the initiating causes. A characteristic low grade adipose tissue inflammation plays a pivotal role in these metabolic diseases. We first suggested that the molecular actors responsible for the triggering of HFD-induced metabolic diseases could issue from the intestinal microbiota, such as the bacterial lipopolysaccharides. Their concentration moderately increases, within two- to three-fold, in the plasma of mice (Cani, Amar et al. 2007; Membrez, Blancher et al. 2008) and of humans (Amar, Burcelin et al. 2008) on a fat-enriched diet. It was also recently associated with an increased risk of incident diabetes in humans (Pussinen, Sundvall et al. 2011). This hypothesis reconciles numerous data from the literature which give credit to mechanisms that involve the activation of the innate immune system as described by the so-called 'metabolic inflammatory tone' (Hotamisligil 2006; Shoelson, Lee et al. 2006; Nishimura, Manabe et al. 2009; Winer, Chan et al. 2009). Focusing on the

adipose tissue it however remained to determine whether bacterial LPS could directly trigger this tissue and through a mechanism requiring the expression of the LPS receptor CD14. To this aim we here show that the induction of metabolic endotoxemia by as little as 4 days of LPS treatment and up to one month increases the proliferation of adipocyte progenitor cells from the SVF of the adipose depot. The direct action of LPS was confirmed *in vitro* in primary cultures of precursor cells from the SVF since LPS directly and dose-dependently induced cell proliferation through a CD14 dependent mechanism. Associated with this phenotype, LPS reduced the triglyceride content and the expression of genes involved in lipogenesis. The effect of LPS on the modulation of adipose tissue could be extended to *ob/ob* mice where high LPS concentrations in plasma are observed (Cani, Bibiloni et al. 2008). Therefore, it could be suggested that the adipogenesis of the *ob/ob* mice requires the LPS/CD14 system. In this context, we had previously shown that the genetic deletion of CD14 within the background of leptin mutant mice reduced the mesenteric adipose tissue weight and inflammatory tone (Cani, Bibiloni et al. 2008). This result shows that LPS is required to precondition cells of the adipose depot and notably the preadipocyte progenitors, which in turn could initiate the secondary development of obesity under HFD. This conclusion is further supported by our present data that demonstrated that the treatment of mice with LPS increased adipocyte precursor proliferation which then generated adipocytes and increased the body weight. Glucose intolerance similarly developed when the mice were subsequently fed with a high-fat diet. However, we could not determine whether the impaired glucose metabolism was a consequence of the increased adiposity or a direct effect of LPS on insulin secretion or insulin action.

Another important debate in the literature is related to the role of infiltrating cells on the control of adipose tissue development and insulin-resistance. Inflammatory and insulinresistogenic adipokines such as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), or resistin can be produced by both the infiltrating (Kim, van de Wall et al. 2007; Furuhashi, Fucho et al. 2008) and the resident adipose tissue macrophages (Charriere, Cousin et al. 2003; Charriere, Cousin et al. 2006). Therefore, a key question was whether other cells such as those from the innate immune system and infiltrating the adipose depot, were also required. Our data also showed that the LPS/CD14 system was required to directly affect the

inflammatory status and the metabolism of the adipose tissue itself. Indeed, the grafted fat pads from the wild type donor was characterized by a large number of macrophages, a high concentration of inflammatory cytokine mRNA, a reduced expression of genes involved in glucose and lipid metabolism and a state of insulin resistance. This demonstrates that the development of large adipocytes is favored when the inflammatory process is reduced. This set of data is similar to what is observed in transgenic mice over-expressing the glucose transporter GLUT4 specifically in adipose cells (Shepherd, Gnudi et al. 1993; Tozzo, Gnudi et al. 1997). Such transgenic animals showed adipose hypertrophy but no sign of inflammation. Therefore, a healthy adipose depot is not susceptible to develop inflammation even when the adipocytes are large and hypertrophic. Hence, confounding factors such as LPS should be included in the process associating a fat-enriched diet with obesity and insulin-resistance.

The mechanisms by which LPSs reached the adipose depots are still unclear but could be related to their association with lipoproteins. Indeed, lipoproteins have been showed to buffer plasma LPS (Vreugdenhil, Rousseau et al. 2003). Recent data suggest that dietary fat promotes the intestinal absorption of lipopolysaccharides from the gut microflora. They could be transported by lipoproteins (Vreugdenhil, Rousseau et al. 2003) towards target tissues such as the liver, the muscles and the adipose depots and consequently contribute to various inflammatory disorders (Ghoshal, Witta et al. 2009). This hypothesis is supported by our observation, where we found that the chemokine mRNA was increased in response to LPS or HFD in wild-type fat pads only, which could, in a second step, increase the number of proliferating and infiltrating host macrophages, further enhancing inflammation. This mechanism, at the onset of HFD-induced metabolic disease, is to be differentiated from the mechanism responsible for the inflammation in overtly obese subjects or from animal models and patients with established obesity or diabetes (Bouloumie, Curat et al. 2005). In that respect we show here that the LPS pre-treatment was sufficient for the engagement of the adipose depot towards metabolic diseases. The increased proliferation of adipocyte progenitor cells induced by LPS preceded adipose tissue development when energy was available.

In summary, our data show that in response to a high-fat diet, the change in intestinal microbiota leads to metabolic endotoxemia which directly triggers adipose tissue inflammation and stimulates adipocyte progenitor cell proliferation (**Figure 7**). This CD14-dependent mechanism would precede the onset of adipose tissue development when excessive energy is available. Eventually, the increased metabolic and inflammatoric activity of the adipose depot could subsequently contribute to insulin resistance and to the development of diabetes.

Materials and Methods

Animals and treatments

Twelve-week-old male C57bl6/J mice (Charles River, France) and CD14 mutant (KO) male mice (Jackson laboratory, Bar Harbor, ME) were bred in a C57bl6 background and housed in a controlled environment (inverted 12-h daylight cycle, lights off at 10:00 A.M.) with free access to food and water. All the animal experimental procedures were approved by the local ethical committee of the Toulouse University Hospital (Rangueil).

Fat pad grafted mice

In a first set of mice, to analyze the direct role of LPS/CD14 from adipose tissue, 12 week-old mice were grafted with subcutaneous fat pads. Under general anesthesia each recipient mouse was grafted with approximately 100mg each of 2 subcutaneous fat pads, one originating from 12 week-old wild type (WT) donor and the other from a CD14KO donor (Figure 1). A 1 cm incision was made in the middle of the back skin and the two fat pads were symmetrically grafted towards each side of the animal and the incision then sutured. The mice were fed with a normal chow diet (NC, content: 12% fat, 28% protein, and 60% carbohydrate, A04, Vилlemonisson sur Orge, France) or a high-fat carbohydrate-free diet (HFD, content: 72 % fat, 28% protein and <1% carbohydrate) for 4 weeks. This type of fat-enriched diet induced a rapid (one month) fasting hyperglycemia, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation, as previously described (Cani, Amar et al. 2007; Cabou, Campistron et al. 2008; Cani, Bibiloni et al. 2008; Riant, Waget et al. 2009). The NC fed mice were implanted with osmotic minipumps, as described by

(Perrin, Knauf et al. 2004) (ALZET Model 2004; Alza, Palo Alto, Ca). The pumps were filled either with NaCl (0.9%) or LPS (from *Escherichia Coli 055:B55*; Sigma, St. Louis, MO) to infuse $300 \mu\text{g.kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ for 4 weeks.

LPS pre-treated mice

In a second set of experiments we pre-treated mice with LPS. Twelve week-old WT mice were implanted with LPS or NaCl filled osmotic mini-pumps for 4 week infusions. At completion of the infusion period a subset of these mice was sacrificed to determine adipocyte size and the rest were fed with a high-fat and carbohydrate diet (HFCD) containing 45% fat, 20% protein, and 35% carbohydrate, for eight weeks (Research diets laboratory). This type of diet induces obesity and glucose intolerance over the course of 3-4 months. Intraperitoneal glucose tolerance, fat and lean mass distribution, and tissue weight were assessed at completion of the dietary treatment.

Quantification of cell proliferation in the stroma vascular fraction from LPS-treated mice

In a third set of mice, LPS-induced adipose tissue precursor proliferation was assessed from the stroma vascular fraction (SVF) of the adipose tissue in response to the four week LPS or saline continuous infusion. To do this, BrdU (100mg/kg, Sigma, St Louis, MO) was administered intravenously at the beginning of the LPS infusion every 48 hours for 4 or 28 days. The mice were sacrificed and the cells from the SVF collected and studied by FACS analysis.

In a subset of mice to visualize the transformation of precursor cells into differentiated adipocytes, the LPS-treated mice were injected with BrdU from the second week of LPS treatment. The mice were then fed a HF-HC diet for two more weeks after the LPS infusion but the BrdU treatment was continued for only one week during the dietary treatment. After the two weeks of dietary treatment immunohistological analyses were carried out.

Clamp procedures

For the clamp studies, an indwelling intrafemoral catheter was installed, as previously described (Knauf, Rieusset et al. 2006; Cabou, Campistron et al. 2008). Insulin sensitivity was assessed by the euglycemic-

hyperinsulinemic clamp method. Briefly, 6-h-fasted mice were infused with insulin at a rate of 18 mU.Kg⁻¹.min⁻¹ for 3 h. To determine the insulin-stimulated glucose utilization rate in tissues, a pulse of 50 µCi of 2-deoxy-D-[3H] glucose (D-[3H]-2DG) (NEN LifeScience) was injected intravenously through the femoral vein 60 min before the end of the clamp. Plasma D-[3H]-2DG disappearance and glucose concentrations were determined in 5 µl of blood sampled from the tail vein at 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, and 60 min after injection. The grafted fat pads were then dissected out and treated as previously described (Perrin, Knauf et al. 2004).

Lipolytic assay

Subcutaneous adipose tissue was quickly dissected and adipocytes were isolated in Krebs–Ringer bicarbonate buffer containing collagenase (1 mg/ml). Fat cells were incubated at 37 °C in the presence of the different agents and shaken gently for 90 min, the glycerol released and lipids was determined as previously described (Castan, Valet et al. 1994).

Real-time quantitative PCR.

The concentrations of mRNA for TNFα, IL-1β, PAI-1, MCP-1, MIF, OSN, GLUT4, HKII, FAS, ChREBP, were evaluated by quantitative RT-PCR analysis. Total mRNA from the grafted fat pads was extracted using TriPure reagent (Roche, Basel, Switzerland). PCRs were performed using an AbiPrism 7900 Sequence Detection System instrument and software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), as previously described (Cani, Amar et al. 2007). The concentration of each mRNA was normalized for RNA loading for each sample using RPL19 rRNA as an internal standard. Primer sequences for the targeted mouse genes are available upon request (elodie.luche@inserm.fr).

Adipose tissue morphometry, F4/80 and BrdU staining.

The size of the adipocytes was assessed using image analyzing software (Image J) from paraffin-embedded hematoxylin and eosin counterstained sections. The number of adipocytes was then classified according to their size (μm^2), which was estimated by point-counting, and expressed as the percentage of the total population counted, as described previously (Cani, Amar et al. 2007). The total count ranged from 1936 to 5270 cells per condition. The size (μm^2) reached by half of the adipocyte population was also calculated and reported.

F4/80 staining was carried out as follows. Ethanol-fixed, paraffin-embedded adipose tissue sections were de-paraffinized and rehydrated. Sections were blocked in normal serum and incubated overnight with primary rat anti-mouse F4/80 monoclonal antibody (1/1000; Serotec, Oxford, U.K). Endogenous peroxidase activity was quenched when incubated with 3% hydrogen peroxide for 20 min. Secondary antibody staining was done using goat anti-rat biotinylated Ig Ab (1/500, 30 min, room temperature) and streptavidin conjugated horseradish peroxidase (1/500, 30 min, room temperature) and detected with 3,3'-diaminobenzidine. Sections were counterstained with hematoxylin eosin before dehydration and coverslip placement. The number of F4/80 positive cells per microscope field was counted and divided by the total number of adipocytes in the sections. Five to 12 fields were counted per sample.

BrdU staining was carried out on ethanol-fixed, paraffin-embedded adipose tissue sections that were de-paraffinized, rehydrated and permeabilized to allow the binding of anti-BrdU biotinylated antibody. Horse radish peroxidase coupled streptavidin was used to detect the bound antibodies as described (BD Pharmingen, Palo Alto, Ca).

Measurement of body composition by Nuclear Magnetic Resonance

The body composition of the mice, including the fat and lean masses, was analyzed by NMR using EchoMRI-100TM equipment (Echo Medical Systems, Houston, Texas).

Isolation of the Stroma Vascular Fraction (SVF)

Cells were isolated according to Björntorp et al with minor modifications (Björntorp, Karlsson et al. 1978). The grafted fat pads were digested at 37°C in phosphate buffered saline containing 0.2% bovine serum albumin and 2mg/ml collagenase for 30 minutes (collagenase A, Roche Diagnostics, Meylan, France). After elimination of undigested fragments by filtration through 25 µm filters, the adipocyte fractions were separated from the pellets of the stroma-vascular fraction (SVF) by centrifugation (600 x g, 10 min). SVF cells were incubated for 5 minutes in a buffer to hemolyse red blood cells (140nmol/L NH₄Cl and 20 mmol/L Tris, pH 7.6), washed, and centrifuged in PBS. The number of isolated SVF cells was then counted with a cell counter (Coulter Z2). SVF cells were either used for flow cytometry analyses or plated *in vitro*.

Cell phenotyping

Cells isolated from the adipose depots were analyzed by flow cytometry (FACS). Freshly isolated SVF cells were stained in staining buffer consisting of phosphate-buffered saline containing 0.5% fetal calf serum and FcR Blocking reagent (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). Cells were incubated with PerCP anti-mouse CD45 (clone 30-F11; BD Biosciences) and Alexa 647 anti-mouse F4/80 (clone A3-1; Serotec) antibodies (mAb) or rat immunoglobulins (isotypes) conjugated with PerCP, or Alexa 647 for 30 minutes at 4°C. Cells were washed in staining buffer and then analyzed on a FACS (FACS Canto II, Becton Dickinson, Mountain View, CA). Data acquisition and analysis were then carried out using DIVA software (Becton Dickinson). For BrdU detection SVF cells were stained according to manufacturers' protocol (BrdU Flow Kit, BD Pharmingen, Palo Alto, Ca) with minor modifications. Briefly, cells were fixed and permeabilized with BD Cytotfix/Cytoperm buffer. The cells were then treated with DNase (300µg/ml) to expose incorporated BrdU and finally immunofluorescent staining of cell surface marker was performed.

In vitro proliferation and differentiation assay

Cell proliferation was assessed as follows. SVF cells were plated at a density of 5500 cells/cm² in DMEM:F12 supplemented with 10% fetal calf serum, biotin (16 μmol/L), pantothenic acid (18 μmol/L), ascorbic acid (100 μmol/L), amphotericin (25 μg/ml), streptomycin (10 mg/ml), and penicillin (10000 U/ml). The medium was changed every 2 days. The cells were counted each day with a cell counter (Coulter Z2) over 6 days.

Cell differentiation was assessed as follows. Cells from the SVF were similarly plated. When they reached confluence the adipogenic differentiation process was induced with dexamethasone (33 nmol/L), insulin (2 nmol/L), 3, 3', 5'-tri-iodo-L-thyronine (T3; 2 nmol/L) and transferrin (10 μg/mL) for 10 days. The medium was changed every 2 days. At the end of the culture period (after 14 days), the cells were lysed with 0.1N NaOH, neutralized and the triglyceride (TG) content measured using a commercially available kit (Triglycerides enzymatiques PAP 150, Biomerieux, Marcy l'Etoile, France). The total protein content was determined using the DC Protein Assay Kit (BioRad, Marne la Coquette, France).

Glucose tolerance test

Intraperitoneal glucose tolerance tests was performed as follows: 6-h-fasted mice were injected with glucose into the peritoneal cavity (1 g/kg glucose, 20% glucose solution). Blood glucose was determined with a glucose meter (Roche Diagnostics) on 3.5 μl blood collected from the tip of the tail vein. A glycemic index, in μM/min was calculated as the sum of each blood glucose measurement divided by the corresponding time point from -30 to 90 minutes.

Statistical analyses

Results are presented as the means \pm SE. Statistical significance of differences was analyzed by t-test or two-way ANOVA followed by post hoc (Bonferroni's multiple comparison test) using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Data with identical superscript letters are not statistically different with $p > 0.05$. Data labeled with * are statistically different with $p < 0.05$

Acknowledgments

We would like to thank Dr John Woodley for editing the English and Daniele Prevot for technical assistance. This work has been supported by grants to RB from the Agence National de la Recherche (ANR, Transflora and Floradip).

Author contributions

BC, AW, CB, MA, EL performed the experiments. MS, PV contributed to discussion. EL, RB, LC and BC designed the experiments, analyzed the data, contributed to discussion and wrote the paper.

Supporting information is available at EMBO Molecular Medicine online.



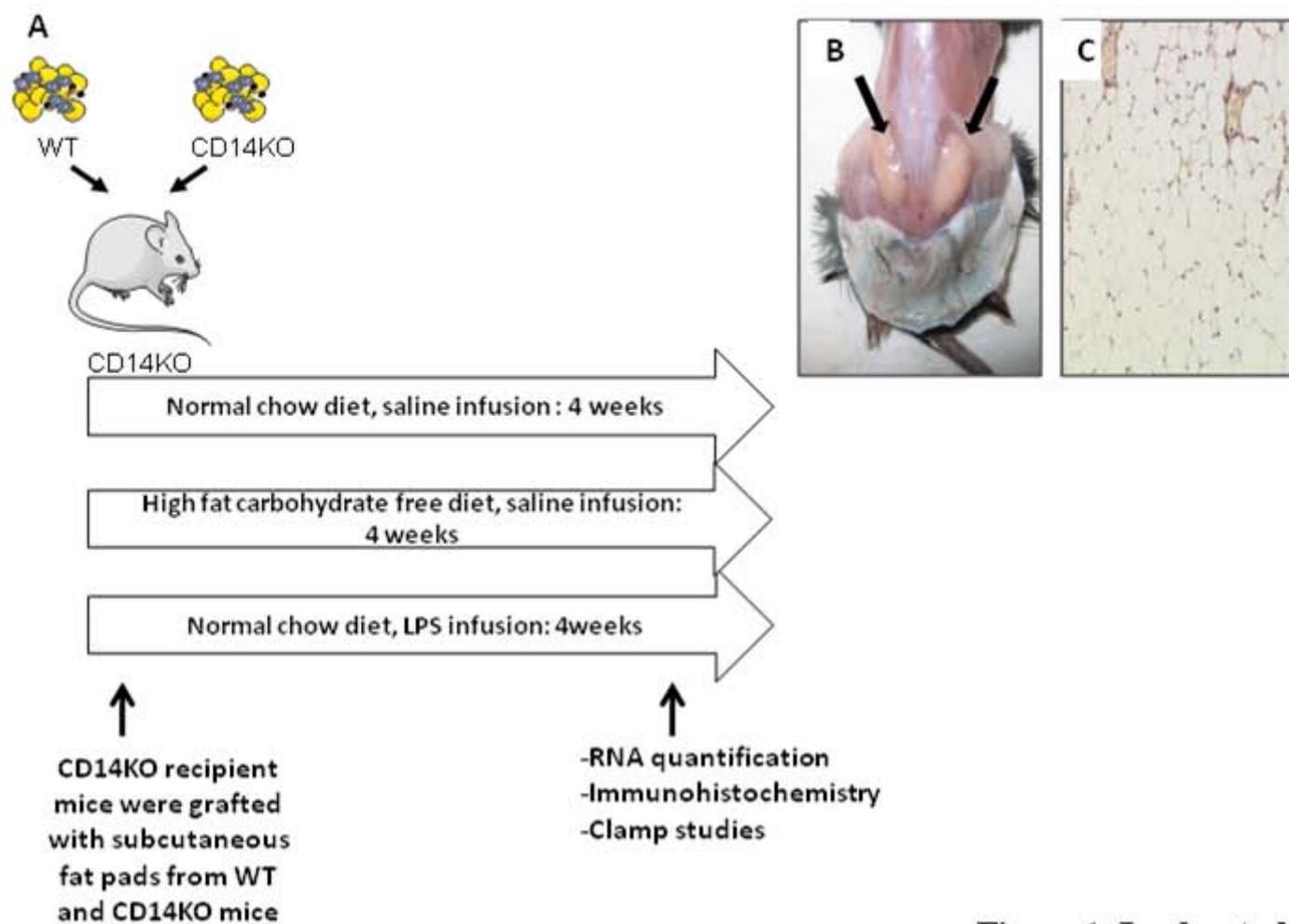


Figure 1; Luche et al.

Figure 1: Fat pad grafting strategy.

A: Twelve week old C57b16 male CD14 knockout (CD14 KO) recipient mice were grafted with subcutaneous fat pads from wild type (WT) and CD14 KO mice. The recipient mice were fed normal chow (NC) and infused with saline or LPS for four weeks or fed a high-fat diet (HFD) and infused with saline. (B) shows two grafted fat pads (arrows) and (C) a section of an adipose fat pad stained with hematoxylin eosin. The blood vessels and the lack of inflammation or fibrosis showed the integrity of the graft.

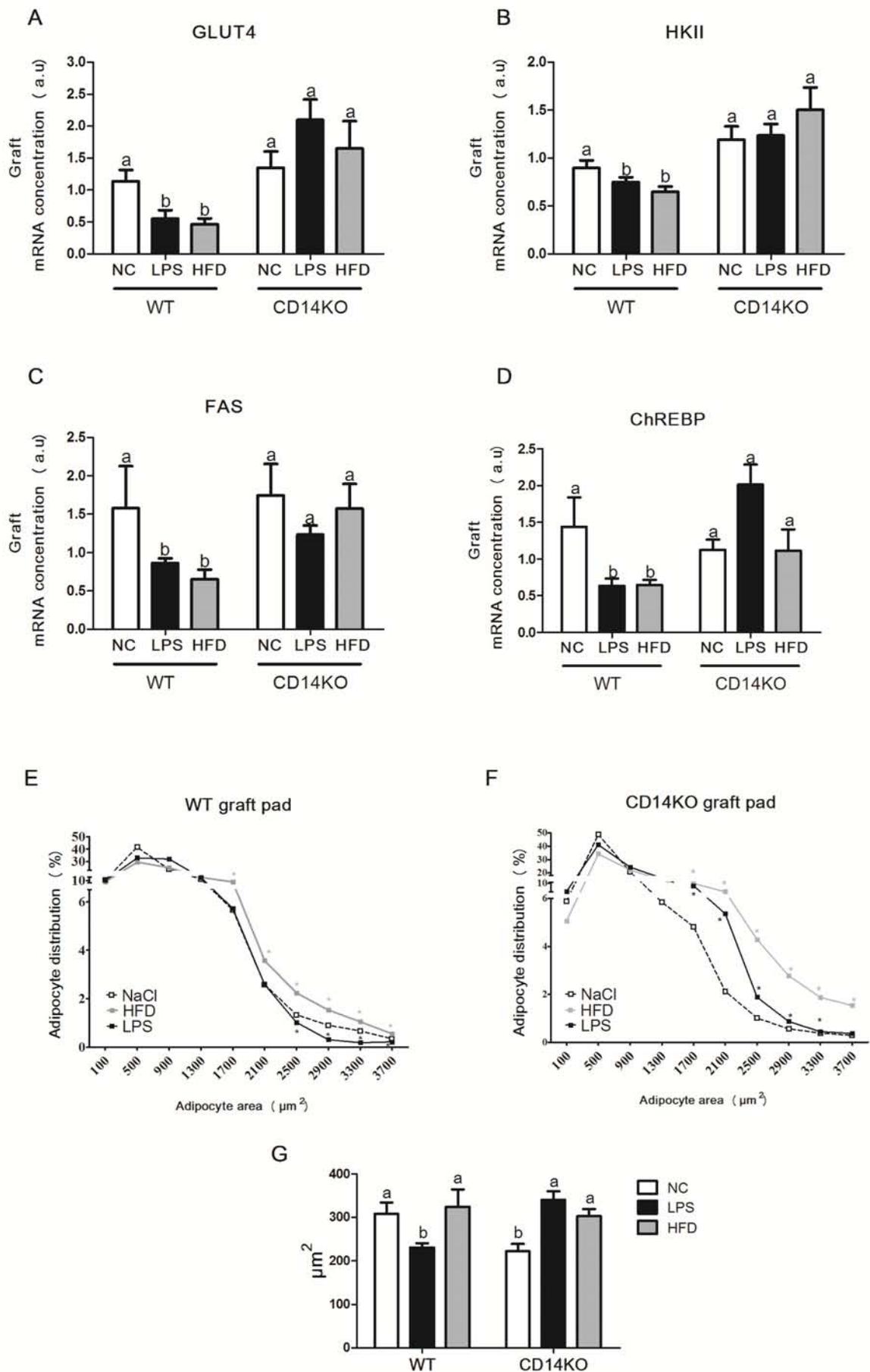


Figure 2; Lucche et al.

Figure 2: LPS infusion reduces lipogenic mRNA concentrations and adipocyte size in grafted fat pads.

mRNA concentrations (arbitrary units, a.u.) of genes coding for the glucose transporter (**A**-GLUT4), hexokinase II (**B**-HKII), Fatty Acid Synthase (**C**-FAS), the Carbohydrate Responsive Element Binding Protein (**D**-ChREBP), in fat pads from wild type (WT) and CD14 knockout (CD14 KO) mice grafted into CD14 KO recipient mice fed a normal chow diet and infused with saline (NC) or with lipopolysaccharides (LPS) or fed a high-fat diet (HFD) and infused with saline for four weeks. **E** and **F**: distribution in % of adipocytes according to their size (μm^2) in the wild type (**E**, WT) and the CD14 KO (**F**) grafted fat pads in the NC-saline and LPS infused mice or in mice fed a high-fat diet. **G**: the mean size (μm^2) of the adipocytes reached by half of the adipocyte population. Six mice per group were studied. Statistical differences between both fat pads when $p < 0.05$ were noted with *. Statistical similarity between groups when $p > 0.05$, were noted with similar superscripted letters.



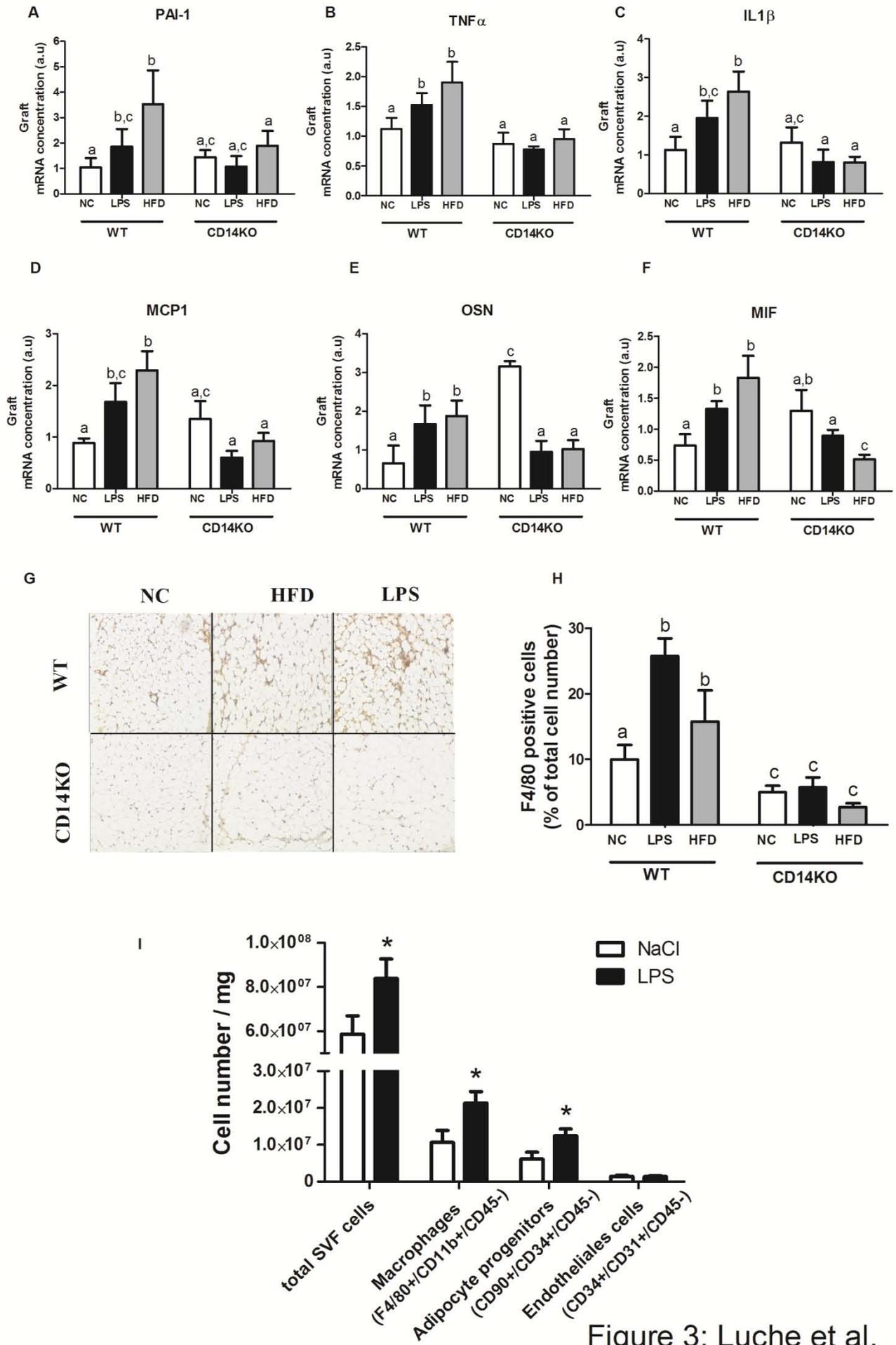


Figure 3; Luche et al.

Figure 3: LPS infusion increases inflammatory markers in grafted fat pads.

mRNA concentrations of genes coding for Plasminogen Activator Inhibitor-1 (**A**-PAI1), Tumor Necrosis Factor α (**B**-TNF α), Interleukin 1 β (**C**-IL1 β), the Macrophage Chemoattracting Protein-1 (**D**-MCP1), Osteopontin (**E**-OSN), the Macrophage Inhibitory Factor (**F**-MIF) from wild-type (WT) and CD14 knockout (CD14 KO) grafted fat pads in CD14 KO mice fed a normal chow and infused with saline (NC), or LPS, or fed a high-fat diet (HFD) and infused with saline. Statistical similarity between groups when $p > 0.05$, were noted with similar superscripted letters. (**G**) eosin hematoxylin and F/80 co-staining and (**H**) number of F4/80 positive cells/total cells in the corresponding adipose tissues. **I**: total number of cells in the stroma vascular fraction (SVF), of macrophages (F4/80+/CD11b+/CD45-), preadipocytes (CD90+/CD34+/CD45-) and endothelial cells (CD31+/CD34+/CD45-) from the subcutaneous adipose tissue of mice infused with saline (NaCl) or with LPS. Statistical similarity between groups when $p > 0.05$, were noted with similar superscripted letters.



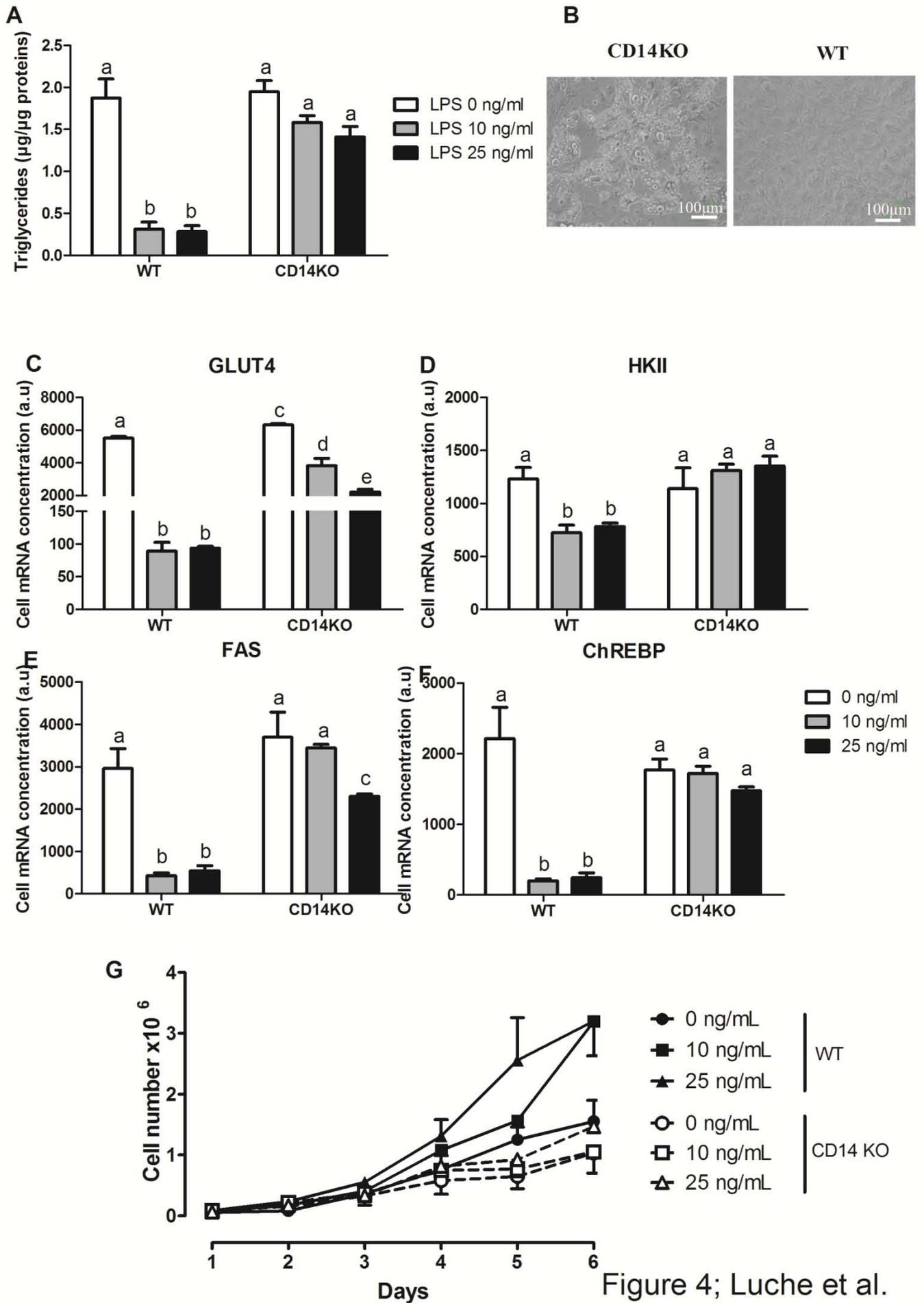


Figure 4; Luche et al.



Figure 4: Effect of LPS on cells from the stroma vascular fraction from subcutaneous adipose tissue

A: Triglyceride content ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$ of proteins) and **(B)** images of the corresponding cells from the stroma vascular fraction from subcutaneous adipose depots from WT and CD14KO mice when incubated for six days with different concentrations of LPS. The scale (μm) is presented. **C-F:** The mRNA concentrations of genes coding for the glucose transporter (**C-GLUT4**), hexokinase II (**D-HKII**), Fatty Acid Synthase (**E-FAS**), the Carbohydrate Responsive Element Binding Protein (**F-ChREBP**). The number of cells was determined every day. Statistical similarities between groups when $p > 0.05$, were noted with similar superscripted letters. **G:** Cells from the stroma vascular fraction of wild type and CD14 KO mice incubated for 6 days in the presence of different concentrations of LPS (ng/ml).



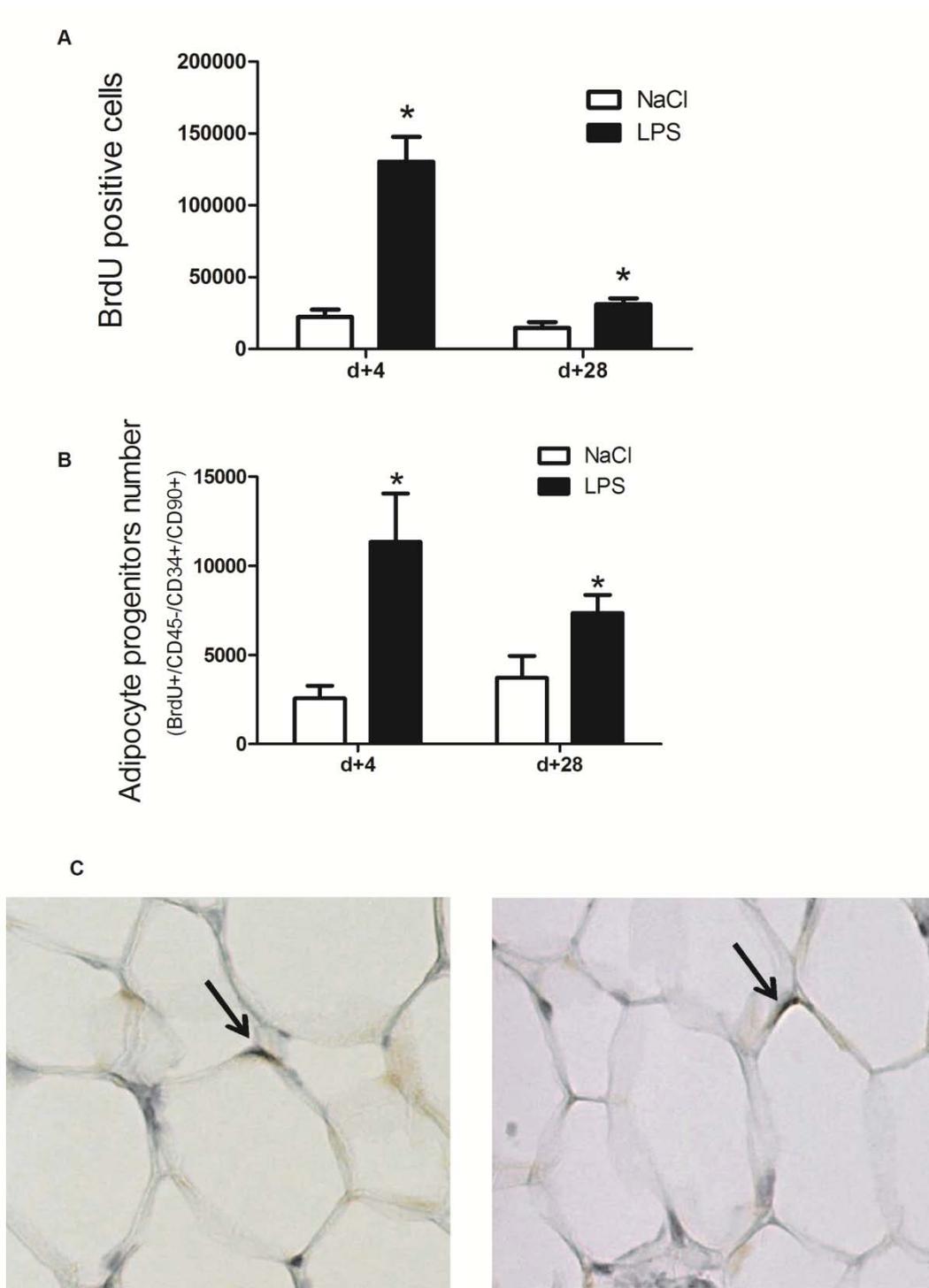


Figure 5; Luche et al.

Figure 5: Characterization of cells from the stoma vascular fraction

A: Total number of BrdU positive cells 4 and 28 days after saline (NaCl) or LPS infusion. **B:** Number of preadipocytes labeled with BrdU 4 days and 28 days (**D**). **C:** BrdU positive adipocytes issued from the

differentiation of the precursor cells and following 2 weeks of a high fat carbohydrate diet, as shown by the arrows.



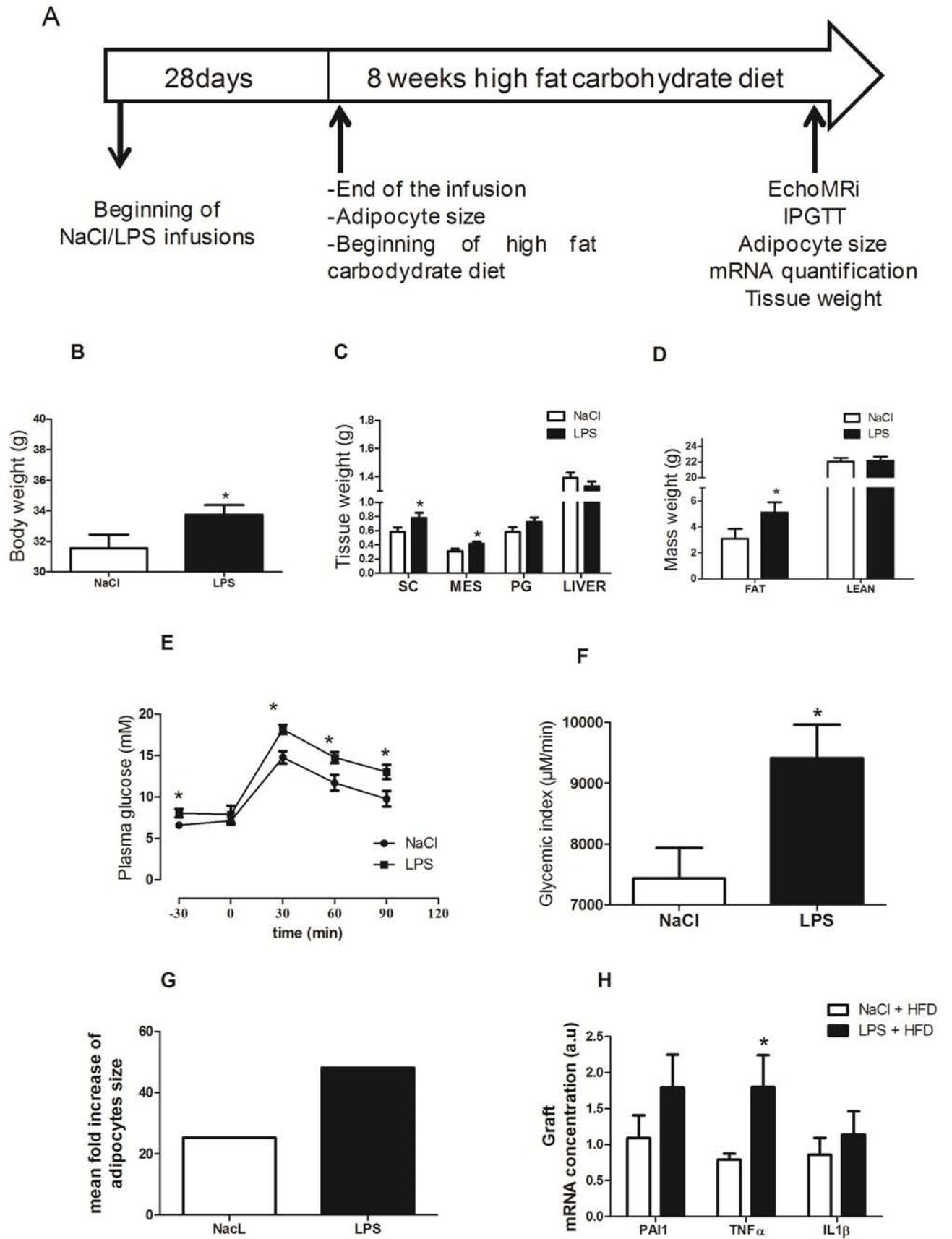


Fig. 6; Luche et al.



Figure 6: LPS is a prerequisite to high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance

(A) LPS (n=8) or NaCl (n=9) were infused in mice for 28 days using osmotic implantable minipumps. In a subset of mice adipocyte size was determined at the end of this first period of time. The remaining mice were then fed a high-fat carbohydrate diet (HFCD) for eight weeks before the final analyses. (B) Body weight (g), (C) subcutaneous (SC), mesenteric (MES), perigonadal (PG) adipose tissue and liver weights (g), (D) echo MRI analyses showing grams of fat or lean masses, (E) intraperitoneal glucose tolerance and (F) the corresponding glycemic index ($\mu\text{M}/\text{min}$). (G): The mean fold increase in adipocyte size induced by the HF-CD consequent to the pretreatment period with LPS or saline (NaCl). (H): The corresponding mRNA concentrations for adipose tissue cytokines. Differences between groups were statistically significant when $p < 0.05$ and noted with *.



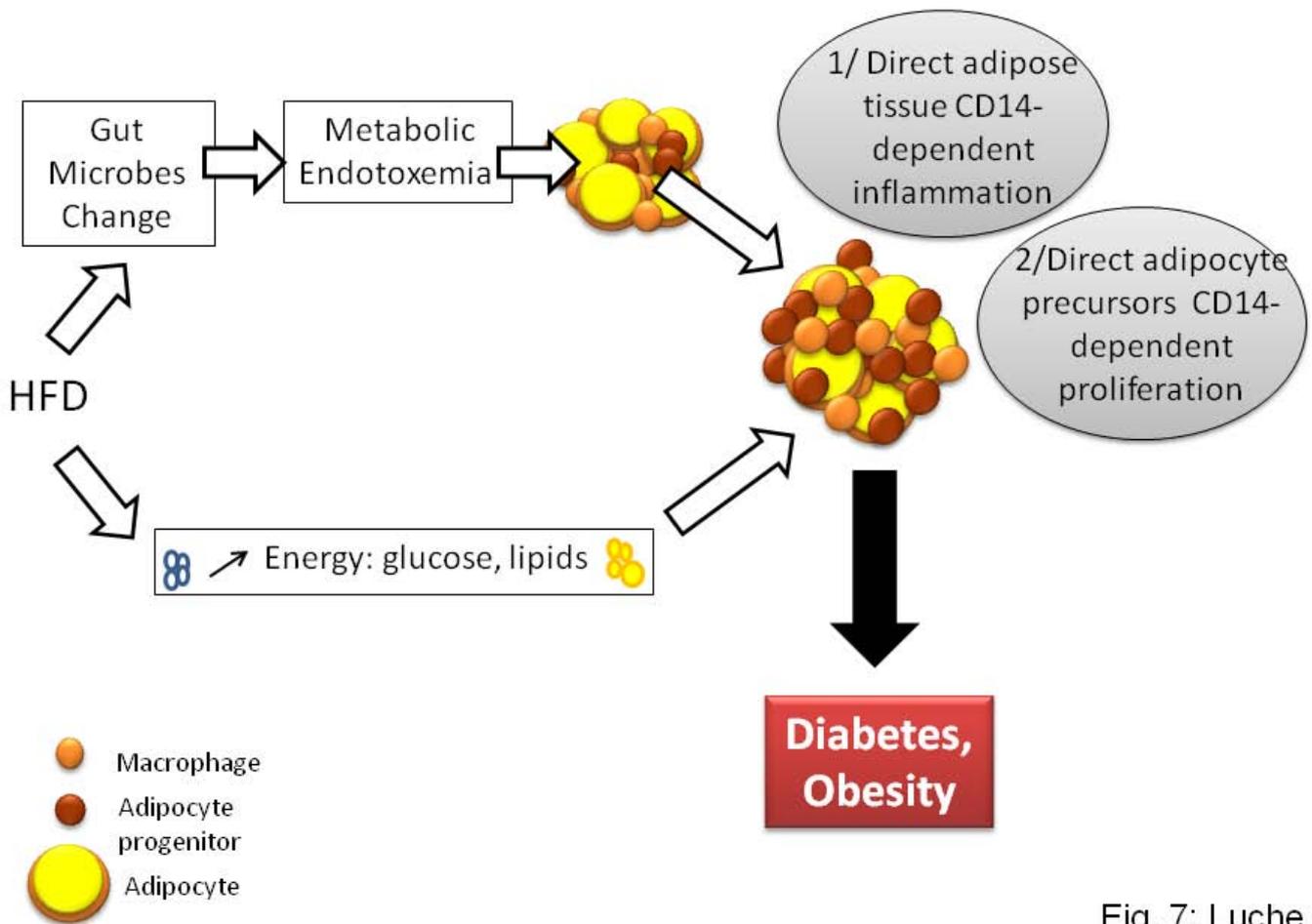


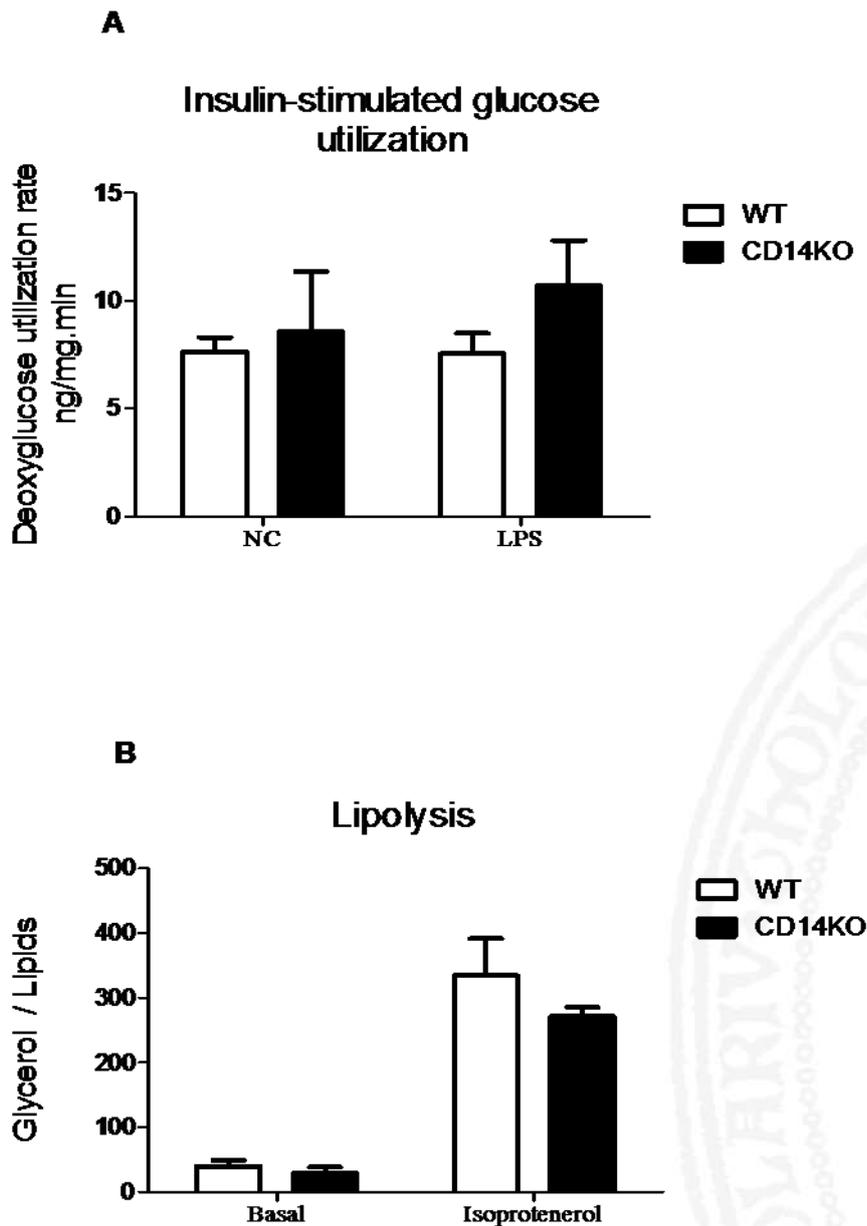
Fig. 7; Luche et al

Fig. 7 Schematic dynamic representation of HFD-induced white adipose tissue (WAT) modulation.

A fat-enriched diet (HFD) changes intestinal microbiota and induces metabolic endotoxemia (increased plasma LPS concentration), and energetic nutrients (glucose and lipids). Firstly, LPS triggers inflammation by directly targeting cells from the stroma vascular fraction such as the macrophages. In addition, LPS activates adipocyte precursor cell proliferation. Secondly, in available circulating energy (lipids, glucose) is stored in newly differentiated adipose cells. Altogether, the increased adipose tissue inflammation and precursor cell proliferation are at the early onset of metabolic endotoxemia-induced metabolic disease.

Supplementary Figure 1

A: *In vivo* insulin-stimulated deoxyglucose utilization rate (ng/mg.min) in subcutaneous fat pads from WT or CD14KO donors in normal chow (NC) fed and in LPS infused recipient mice. **B:** Lipolysis calculated from the amount of glycerol released in the medium ($\mu\text{M/g}$ of lipids) following isoproterenol (10^{-8} mol/l) stimulus.



Supplementary data 1
Luche et al.

References

Bibliography

Amar J, Burcelin R, Ruidavets J, Cani P, Fauvel J, Alessi M, Chamontin B, Ferrieres J (2008) Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr* 87: 1219-1223

Bjorntorp P, Karlsson M, Pertoft H, Pettersson P, Sjostrom L, Smith U (1978) Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *J Lipid Res* 19: 316-324

Bouloumie A, Curat CA, Sengenès C, Lolmede K, Miranville A, Busse R (2005) Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8: 347-354

Cabou C, Campistron G, Marsollier N, Leloup C, Cruciani-Guglielmacci C, Penicaud L, Drucker DJ, Magnan C, Burcelin R (2008a) Brain glucagon-like peptide-1 regulates arterial blood flow, heart rate, and insulin sensitivity. *Diabetes* 57: 2577-2587

Cabou C, Campistron G, Marsollier N, Leloup C, Cruciani-Guglielmacci C, Pénicaud L, Drucker DJ, Magnan C, Burcelin R (2008b) Brain GLP-1 regulates arterial blood flow, heart rate and insulin sensitivity. *Diabetes* 57: 2577-2587.

Cani P, Amar J, Iglesias M, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck A, Fava F, Tuohy K, Chabo C et al (2007a) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761-1772

Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C et al (2007b) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761-1772

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

Cani PD, Delzenne NM, Amar J, Burcelin R (2008b) Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathol Biol (Paris)*

Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, Gibson GR, Delzenne NM (2007c) Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50: 2374-2383

Castan I, Valet P, Quideau N, Voisin T, Ambid L, Laburthe M, Lafontan M, Carpenne C (1994) Antilipolytic effects of alpha 2-adrenergic agonists, neuropeptide Y, adenosine, and PGE1 in mammal adipocytes. *Am J Physiol* 266: R1141-1147

Charriere G, Cousin B, Arnaud E, Andre M, Bacou F, Penicaud L, Casteilla L (2003) Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem* 278: 9850-9855

Charriere GM, Cousin B, Arnaud E, Saillan-Barreau C, Andre M, Massoudi A, Dani C, Penicaud L, Casteilla L (2006) Macrophage characteristics of stem cells revealed by transcriptome profiling. *Exp Cell Res* 312: 3205-3214

Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A (2004) Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 25: 4-7

Dray le boss de la thèse C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buleon M, Cani PD, Attane C, Guigne C, Carpenne C et al (2008) Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8: 437-445

Federici M, Hribal ML, Menghini R, Kanno H, Marchetti V, Porzio O, Sunnarborg SW, Rizza S, Serino M, Cunsolo V et al (2005) Timp3 deficiency in insulin receptor-haploinsufficient mice promotes diabetes and vascular inflammation via increased TNF-alpha. *J Clin Invest* 115: 3494-3505

Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine A, Benoist C, Shoelson S et al (2009) Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature Medicine* 15: 930-939

Furuhashi M, Fucho R, Gorgun CZ, Tuncman G, Cao H, Hotamisligil GS (2008) Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *J Clin Invest* 118: 2640-2650

Gerhardt CC, Romero IA, Canello R, Camoin L, Strosberg AD (2001) Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 175: 81-92

Ghoshal S, Witta J, Zhong J, de Villiers W, Eckhardt E (2009) Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res* 50: 90-97

Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-867

Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K et al (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116: 1494-1505

Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G et al (2007) Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 117: 2621-2637

Knauf C, Rieusset J, Foretz M, Cani PD, Uldry M, Hosokawa M, Martinez E, Bringart M, Waget A, Kersten S et al (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null mice have increased white adipose tissue glucose utilization, GLUT4, and fat mass: Role in liver and brain. *Endocrinology* 147: 4067-4078

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007a) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117: 175-184

Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR (2007b) Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 56: 16-23

Manco M, Fernandez-Real JM, Equitani F, Vendrell J, Valera Mora ME, Nanni G, Tondolo V, Calvani M, Ricart W, Castagneto M et al (2007) Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 483-490

Membrez M, Blancher F, Jaquet M, Bibiloni R, Cani PD, Burcelin RG, Corthesy I, Mace K, Chou CJ (2008) Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *Faseb J* 22: 2416-2426

Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, Liu-Bryan R, Glass CK, Neels JG, Olefsky JM (2007) A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* 282: 35279-35292

Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S et al (2009) CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 15: 914-920

Perrin C, Knauf C, Burcelin R (2004) Intracerebroventricular infusion of glucose, insulin, and the adenosine monophosphate-activated kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, controls muscle glycogen synthesis. *Endocrinology* 145: 4025-4033

Plomgaard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, Mittendorfer B, Zierath JR, Pedersen BK (2005) Tumor necrosis factor- α induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes* 54: 2939-2945

Poggi M, Bastelica D, Gual P, Iglesias MA, Gremeaux T, Knauf C, Peiretti F, Verdier M, Juhan-Vague I, Tanti JF et al (2007) C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* 50: 1267-1276

Pussinen Pj, Sundvall J, Havulinna A, Salomm V, lehto M (2011) Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes. *Diabetes Care* 34: 392–397

Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, Gourdy P (2009) Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* 150: 2109-2117

Shepherd PR, Gnudi L, Tozzo E, Yang H, Leach F, Kahn BB (1993) Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry* 268: 22243-22246

Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 3015-3025

Shoelson S, Lee J, Goldfine A (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 1793-1801

Song MJ, Kim KH, Yoon JM, Kim JB (2006) Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 739-745

Suganami T, Mieda T, Itoh M, Shimoda Y, Kamei Y, Ogawa Y (2007a) Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 45-49

Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, Kotani H, Yamaoka S, Miyake K, Aoe S et al (2007b) Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 84-91

Tozzo E, Gnudi L, Kahn BB (1997) Amelioration of insulin resistance in streptozotocin diabetic mice by transgenic overexpression of GLUT4 driven by an adipose-specific promoter. *Endocrinology* 138: 1604-1611

Turnbaugh P, Ridaura V, Faith J, Rey F, Knight R, Gordon J (2009) The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Science Translational Medicine* 1: 6-14

Ueki K, Kondo T, Kahn CR (2004) Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 24: 5434-5446

Vreugdenhil AC, Rousseau CH, Hartung T, Greve JW, van 't Veer C, Buurman WA (2003) Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons. *J Immunol* 170: 1399-1405

Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. (2006) CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116: 115-124

Wellen KE, Hotamisligil GS (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-1119

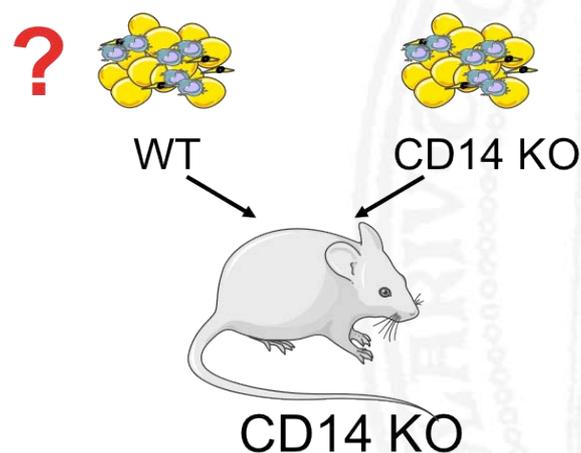
Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F et al (2009) Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 15: 921-929

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA et al (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest 112: 1821-1830

IV-1.3 Discussion ARTICLE

IV-1.3.1 Le tissu adipeux: organe cible direct de l'endotoxémie métabolique.

Notre premier objectif était de savoir si le tissu adipeux pouvait représenter un organe cible et suffisant lors d'une augmentation de LPS associée à un régime gras. Pour répondre à cela nous avons imaginé un modèle animal nous permettant d'observer les réactions du tissu adipeux de façon **indépendante** du reste de l'organisme. La greffe d'un dépôt adipeux sous-cutané sensible au LPS (WT) mais implanté dans un organisme insensible aux LPS (CD14KO) nous a donc permis de focaliser sur cet organe et d'affirmer que le dépôt adipeux représente une cible directe de l'endotoxémie métabolique.



- 4 sem de régime gras / minipompe LPS

Schéma du modèle expérimental de l'étude.

En effet, la perfusion de LPS mimant une endotoxémie similaire à celle retrouvée lors d'un régime gras, est responsable de l'augmentation des marqueurs de l'inflammation dans le

greffon issu de souris sauvage (WT) et non dans le greffon de souris déficiente pour le récepteur CD14 (CD14KO) (Fig.3). **Le LPS est donc capable de cibler le TA directement via le récepteur CD14 et ceci indépendamment de la réponse du reste de l'organisme.** De plus l'endotoxémie générée par l'absorption d'un régime produit un résultat similaire. En effet seul le greffon WT est inflammé (Fig.3) et cette inflammation est d'amplitude similaire à celle observée lors de la perfusion de LPS (Fig.3). En l'absence du récepteur CD14 la mise en régime gras n'induit pas d'inflammation comme en témoigne la faible expression de cytokines inflammatoires dans le greffon CD14KO (Fig.3). **Le LPS semble donc être un candidat capable d'initier la réaction inflammatoire du tissu adipeux.** Une autre hypothèse propose que les acides gras activent les cellules immunitaires et stimulent ainsi la sécrétion de cytokines inflammatoires. En effet la stimulation d'adipocytes en culture exprimant le récepteur TLR4 par des acides gras montre une augmentation de cytokines inflammatoires in vitro. Ces mêmes cellules transfectées avec un siRNA diminuant l'expression du TLR4 permet une diminution de l'expression de cytokines en réponse aux acides gras. De plus les souris déficientes pour le TLR4 sont protégées de l'insulino-résistance induite par un régime hyperlipidique (Shi, Kokoeva et al. 2006). Dans notre modèle les souris CD14KO ne présentent pas d'augmentation de l'expression des cytokines inflammatoires en réponse au régime hyperlipidique et notamment aux acides gras. Ceci suggère donc qu'en l'absence du récepteur CD14 les acides gras ne sont plus capables d'induire une réaction inflammatoire via le TLR4. Nos résultats suggèrent donc que le TLR4 requiert le récepteur CD14 dans l'expression de cytokines en réponse aux acides gras. Il serait alors intéressant de réaliser ces expériences chez les souris déficientes pour le récepteur CD14.

L'ensemble de ces résultats montre que le complexe CD14/LPS pourrait agir directement sur les cellules du greffon afin de médier l'inflammation de celui-ci.

Ceci nous amène donc à comprendre comment le LPS pourrait être transporté jusqu'au TA. Nous avons précédemment vu que la digestion de lipides et la sécrétion de chylomicrons

pouvait promouvoir l'absorption intestinale de fragments bactériens issus de la flore intestinale tels que les LPS. Les chylomicrons et les lipoparticules seraient donc des transporteurs des LPS jusqu'aux organes tels que le foie ou le TA. Les endotoxines, alors véhiculées avec les lipides jusqu'au TA et libérées par l'activité de la lipoprotéine lipase, pourraient ainsi contribuer au processus d'inflammation métabolique. Nous avons précédemment démontré que le régime gras altérait les jonctions serrées de l'épithélium intestinal, facilitant ainsi la diffusion de fragments bactériens (Cani, Neyrinck et al. 2007; Cani, Possemiers et al. 2009). Cependant de récents travaux réalisés au laboratoire suggèrent une toute nouvelle hypothèse. Plus que des fragments bactériens tel que les LPS, des bactéries entières issues de la flore intestinale pourraient être transportées dans le TA. En effet en utilisant une souche bactérienne commensale marquée avec un fluorophore et un gène rapporteur (l'ampicilline) nous avons pu déterminer par étalement sur boîte le contenu microbien du TA de souris. Ainsi Amar et al. démontrent pour la première fois la présence physiologique de bactéries entières dans le TA mésentérique ainsi que dans les nœuds lymphatiques correspondant (Amar, Chabo et al.). Ce phénomène est alors augmenté au cours des maladies métaboliques induites par un régime HFD. Nous suggérons qu'il existe une accumulation de bactéries de la lumière vers la muqueuse au cours d'un régime gras et que ceci favorise la translocation de celles-ci par des cellules dendritiques pouvant alors migrer vers les tissus métaboliquement actif. Les cellules dendritiques pourraient être un acteur clé dans les phénomènes d'inflammation métabolique. Il a déjà été démontré que ces cellules étaient sensibles aux perturbations métaboliques (Macia, Delacre et al. 2006) et pourraient ainsi faciliter l'entrée des bactéries au sein de l'organisme et les véhiculer jusqu'au TA, site où ces cellules sont retrouvées en plus grand nombre lors des maladies métaboliques. (Nguyen, Faveyukis et al. 2007).

Le TA semble donc être un site capable d'attirer des fragments bactériens ou bactéries entières. Il reste cependant à comprendre quelle est la relevance physiologique et les conséquences physiopathologiques de cette localisation de composés bactériens ou bactéries

dans les tissus. Un argument pour expliquer la présence de bactéries issues de l'intestin au sein des tissus adipeux mésentérique et sous-cutané est le fait que ce sont des tissus drainés par le réseau lymphatique. Le tissu adipeux périgonadique ne possède pas de drainage lymphatique et aucun marqueur bactérien n'a été retrouvé à son niveau. De façon très intéressante il a été proposé que le tissu adipeux puisse être un organe « réservoir » d'agents pathogènes. En effet une étude réalisée sur des biopsies de patients ayant développés une infection par *Mycobacterium tuberculosis* (agents de la tuberculose) a mis en évidence la persistance de cet agent à l'intérieur de l'adipocyte et de la gouttelette lipidique (Neyrolles, Hernandez-Pando et al. 2006). La reactivation de ces bactéries, plusieurs années plus tard, entraîne alors une nouvelle infection. Ceci a été retrouvé pour plusieurs types d'infections mais est également vrai avec des polluants stockés au niveau de l'adipocyte et pouvant être relargués lors de la lipolyse (Yu, Laseter et al.). **Ainsi nous pourrions imaginer que le tissu adipeux renferme des bactéries latentes et qu'en condition de stress celles-ci puissent être relarguées dans le milieu extra cellulaire.**

IV-1.3.2 Cellules du dépôt adipeux responsables de l'inflammation.

Population cellulaire cruciale de la fraction stroma-vasculaire du TA, les macrophages pourraient être à l'origine de l'inflammation de ce tissu associée aux maladies métaboliques. Nous avons donc quantifié la densité macrophagique par marquage immunohistochimique dirigé contre le récepteur F4/80 marqueur des cellules macrophagiques. A l'image de l'expression des cytokines inflammatoires, nous retrouvons une augmentation du nombre de macrophages dans le dépôt issu de souris WT induite par le régime gras ou la perfusion de LPS (Fig 3 G-H). Cette augmentation est dépendante de la présence du récepteur CD14 au sein du dépôt adipeux car aucune variation n'est retrouvée en l'absence de ce récepteur. Depuis plusieurs années il est déjà clair que les maladies métaboliques sont associées à une augmentation du nombre de macrophages dans les TA (Weisberg, McCann et al. 2003).

L'origine de ces macrophages semble pouvoir être double : myéloïde ou adipocytaire. En effet, des expériences de transplantations de moelle osseuse chez la souris ont permis de mettre en évidence une infiltration par les monocytes sanguins circulants dans le tissu adipeux (Weisberg, McCann et al. 2003) tandis que *Charriere et al.* suggèrent que les macrophages puissent provenir de la différenciation des préadipocytes résidents (Charriere, Cousin et al. 2003).

Une des questions essentielles réside dans l'origine des macrophages retrouvés en plus grand nombre dans le dépôt adipeux WT lors d'une endotoxémie métabolique. Nous avons donc quantifié l'expression de chimokines qui jouent un rôle important dans le recrutement des monocytes/macrophages. Nous avons retrouvé une augmentation de l'expression des chimiokines MCP1, OSN, MIF1 dans le greffon WT en réponse au régime gras comme à la perfusion de LPS (Fig 3A-F). Ce résultat montre que l'augmentation de l'expression de chimiokines pourrait participer à l'infiltration de nouveaux monocytes/macrophages circulants dans le dépôt adipeux. Cependant, l'expression des chimiokines en réponse au régime HFD est supérieure à celle induite par le LPS, alors que le nombre de macrophages (déterminé par immunomarquage) tend à être inférieur en réponse au régime HFD comparé au traitement LPS (Fig 3 E). Le nombre de macrophages dans le dépôt n'est donc pas strictement proportionnel à l'expression de chimiokines. Ceci suggère que le LPS puisse être capable d'augmenter le nombre de macrophages du dépôt de façon indépendante du processus d'infiltration. Le LPS pourrait donc augmenter le nombre de macrophages en stimulant des cellules intrinsèques au dépôt telles que les préadipocytes (Charriere, Cousin et al. 2003). En effet l'injection de cellules issues de lignées préadipocytaires dans la cavité péritonéale de souris a mis en évidence que ces cellules avaient la capacité d'acquérir le phénotype et des propriétés de phagocytose de macrophage (Charriere, Cousin et al. 2003) en réponse à un stimulus infectieux. **Ainsi certains déterminants inflammatoires, tel que le LPS par exemple, induiraient une conversion de cellules préadipocytaires vers des cellules macrophagiques. Il sera donc important de**

déterminer avec précision l'origine de ces cellules, myéloïde ou adipocytaire, afin de mieux comprendre la succession des événements.

Cependant les macrophages ne sont pas les seules cellules capables de médier l'inflammation. En effet les préadipocytes ont également été décrits comme des acteurs importants dans le relais de l'inflammation au sein du TA (Lacasa, Taleb et al. 2007). Ainsi des préadipocytes en culture isolés à partir de TA murins ont une sécrétion de cytokine nettement supérieure à celle d'adipocytes en réponse au LPS (Lacasa, Taleb et al. 2007). Les préadipocytes pourraient être également une cible cellulaire privilégiée en réponse au LPS.

Une question non abordée dans notre étude au sujet des macrophages du dépôt adipeux concerne leur phénotype. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce mémoire une attention particulière a été portée depuis quelques années au phénotype de ces cellules immunitaires et à leurs capacités fonctionnelles en différenciant des macrophages de type M1 (pro-inflammatoire) avec le type M2 (anti-inflammatoire). Cependant il semble difficile de déterminer la fonction des macrophages à partir de l'expression d'une multitude de marqueurs, parfois mal connus, exprimés à leur surface. Il existe des divergences entre des études réalisées chez la souris (Lumeng, Bodzin et al. 2007) et chez l'homme (Bourlier, Zakaroff-Girard et al. 2008) au cours de l'obésité. Ceci pourrait s'expliquer par un état des lieux réalisé à des cinétiques différentes au cours de la prise de poids. En effet, chez la souris, 12 semaines de régime gras sont responsables d'un changement de phénotype M2 vers M1 participant donc à l'inflammation du tissu adipeux. Chez l'homme il a été montré que l'obésité était associée à une augmentation de macrophages de type M2 qui participeraient au remodelage du tissu adipeux. Il serait donc intéressant de réaliser des études à différentes cinétiques afin de déterminer si l'augmentation de macrophages M1 décrits chez les souris est associée à l'obésité ou plutôt à l'insulino-résistance associée à l'obésité. Ainsi, différents points d'études nous permettraient peut être d'observer qu'il ne s'agit pas d'un procédé rectiligne, à savoir un changement de macrophages M2 vers un phénotype M1, mais plutôt une oscillation permanente entre les deux

phénotypes. Cette oscillation tenterait de maintenir un état physiologique du tissu jusqu'à parvenir à une stabilité qu'elle soit physiologique ou pathologique.

IV-1.3.3 Hyperplasie et inflammation.

Les macrophages et les préadipocytes sont des cellules composant la fraction stroma-vasculaire. Nous avons décrit une augmentation des cellules totales de cette fraction en réponse à une perfusion de LPS (Fig 3I) mais également après un mois de régime gras (résultat non montré) associé à une augmentation significative du nombre de macrophages et de préadipocytes. Afin de mieux comprendre cette variation de précurseurs adipocytaires nous avons isolé et placé en culture des préadipocytes murins. Nos résultats montrent que les cellules prolifèrent plus rapidement en présence de LPS dans le milieu de culture. De plus en l'absence du récepteur CD14 aucun effet du LPS n'est observé (Fig 4G). Ce résultat suggère donc que le complexe CD14/LPS puisse stimuler directement la prolifération des précurseurs adipocytaires. Nous avons ensuite mesuré la prolifération des précurseurs adipocytaires au cours d'une perfusion de LPS in vivo. Dès le début du traitement par le LPS (5ème jour) et jusqu'à la fin du traitement (28ème jour), une augmentation de la prolifération des préadipocytes par rapport au souris perfusées avec une solution saline apparaît (Fig 5 B). Nous n'avons pas déterminé si cet effet nécessitait un facteur soluble sécrété par les préadipocytes en réponse au LPS et qui agirait, via un mode paracrine, sur la prolifération de ces mêmes cellules. Bien que la majorité des hypothèses tendent à démontrer que l'inflammation du dépôt adipeux lors d'un régime hyperlipidique soit un phénomène relativement tardif (Mlinar and Marc) et ayant un rôle délétère sur la plasticité du tissu il semble que l'inflammation produite par les préadipocytes en réponse au LPS pourrait être étroitement responsable de la prolifération de ces précurseurs. Dans ce sens, une étude réalisée par *Lacasa et al.* a démontré qu'un milieu conditionné obtenu avec des cellules stimulées par du LPS est responsable d'une augmentation de la prolifération des préadipocytes humains in vitro (Lacasa, Taleb et al. 2007). Plus récemment, il a été

démontré qu'un facteur soluble, l'activine A, était produit par les précurseurs adipocytaires en réponse à l'inflammation et avait pour action de stimuler la prolifération de ces précurseurs (Zaragosi, Wdziekonski et al. 2010). Il serait donc intéressant de mesurer la sécrétion de cette molécule par le TA en réponse au LPS.

Ainsi le LPS plasmatique véhiculé lors d'un régime gras est capable d'aller cibler directement les préadipocytes du TA provoquant alors une inflammation. Cette inflammation engendrerait une plus forte prolifération des précurseurs adipocytaires.

Nous pourrions imaginer que ce phénomène de prolifération soit une étape de régulation dans le contrôle de l'inflammation de ce tissu. Ainsi des vagues successives d'inflammation suivies d'une étape de prolifération pourraient participer à un cercle vicieux expliquant le développement excessif du TA.

La question du devenir de ce pool de précurseurs adipocytaires va alors se poser. Dans cette étude nous avons démontré que les préadipocytes qui avaient proliféré en réponse au LPS étaient capables de devenir des adipocytes (Fig 5 C). Dans de précédents travaux et dans cette étude (Fig 2G) nous avons décrit une augmentation du nombre de petits adipocytes en réponse à une perfusion de LPS. Il s'agit bien d'une augmentation du nombre de petits adipocytes et non d'une diminution de la taille de ceux-ci car aucun effet lipolitique n'a été retrouvé suite à la perfusion de LPS (résultat supplémentaire Fig 1A). De plus, cette simple perfusion est responsable d'une augmentation du poids du dépôt adipeux. Cette prise de poids pourrait être la résultante d'une hypertrophie adipeuse mais le nombre de gros adipocytes n'est pas augmenté. Il ne reste alors que le phénomène d'hyperplasie afin d'expliquer le développement de la masse adipeuse.

Nous avons ensuite observé in vitro l'effet du LPS sur l'inhibition de la différenciation des adipocytes (Fig 4 A,B). En effet il a largement été décrit que le LPS et plus précisément les molécules inflammatoires sécrétées en réponse à ce stimulus inhibait la différenciation

adipocytaire (Lacasa, Taleb et al. 2007). A l'image de l'étude réalisée par Zaragosi le LPS pourrait induire une diminution de l'expression de facteurs clés de l'adipogénèse tels que C/EBP β (Zaragosi, Wdziekonski et al. 2010). Il serait donc intéressant de comprendre par quel facteur moléculaire le LPS est capable de cibler l'adipogénèse et d'étudier si cette diminution des capacités adipogéniques est une conséquence de la prolifération de précurseurs comme proposé par Zaragosi, ou si au contraire cette diminution de la capacité à stocker les lipides pourrait avoir comme conséquence une augmentation des précurseurs adipocytaires. Cette prolifération serait alors un mécanisme de compensation au déficit adipogénique.

Ainsi le LPS agirait par deux approches sur le dépôt adipeux et sa plasticité. Il semble capable d'induire une forte prolifération des précurseurs adipocytaires tout en inhibant la différenciation des adipocytes. Le LPS apparait donc comme un acteur clé dans la plasticité du dépôt adipeux mais qu'en est-il de la relation de cette plasticité et des perturbations métaboliques induites par une alimentation trop riche en graisses ?

IV-1.3.4 Développement du dépôt adipeux et perturbation métaboliques.

Nos précédents travaux ont démontré que l'endotoxémie métabolique induite par un régime gras représentait un puissant stimulant de la réaction inflammatoire qui, via les cytokines inflammatoires, inhibait l'action de l'insuline et contribuait ainsi au développement des maladies métaboliques. Ici nous avons démontré que l'inflammation du dépôt adipeux engendrée par l'endotoxémie métabolique est suffisante pour perturber l'expression d'acteurs clés des réactions métaboliques (Fig 2A-E). Cependant nous avons observé que l'apparition des maladies métaboliques générées par l'endotoxémie était associée à une forte plasticité du dépôt adipeux. Ainsi l'endotoxémie métabolique favorise le développement/plasticité du TA et participe à l'apparition des maladies métaboliques. Cette dualité peut sembler surprenante puisqu'une hypothèse répandue propose que tant que le TA est capable de se développer il protège l'organisme du développement des maladies métaboliques. C'est lorsque ce tissu a atteint ses limites et que sa plasticité ralentie que l'excès d'énergie va alors être redirigée vers

des organes non spécialisés dans le stockage des TG (Mathieu, Lemieux et al.). Il est également proposé que c'est lorsque l'adipocyte est hypertrophié qu'il va devenir inflammatoire. Dans notre étude nous avons vu que le LPS était capable de cibler directement le tissu adipeux et d'engendrer une prolifération des préadipocytes et une diminution de la lipogénèse des adipocytes. Nous avons quantifié l'inflammation du tissu seulement au terme des 4 semaines de perfusion de LPS ou de régime gras. Il serait intéressant de s'assurer que la mise en place de l'inflammation est plus rapide. Ainsi le développement du tissu adipeux observé dès 5 jours de perfusion de LPS serait le développement d'un « tissu pathologique » dans un contexte inflammatoire. Ses capacités fonctionnelles alors perturbées pourraient participer à la mise en place des maladies métaboliques.

IV-2 Résultats complémentaires 1 (Cf. Article en annexe *Fernandez et al.*)

Nous venons de démontrer que le tissu adipeux était un organe capable de réagir, indépendamment du reste de l'organisme, à une augmentation de LPS. Cependant, il est parfaitement envisageable que d'autres organes réagissent à ce stimulus et participent alors à la réaction inflammatoire du tissu adipeux. De nombreux tissus tels que le compartiment endothélial ou les cellules myéloïdes semblent pouvoir tenir ce rôle. Nous avons donc voulu savoir s'il existait un rôle de l'organisme et notamment des cellules myéloïdes, sur la réaction inflammatoire du tissu adipeux lors d'une endotoxémie métabolique. Pour cela nous avons utilisé le modèle animal précédant, consistant à greffer des dépôts adipeux de souris WT et CD14KO, mais ici dans une souris receveuse WT et donc entièrement sensible au LPS. Ces souris ont été placées sous régime gras afin d'augmenter les taux de LPS plasmatique. Ainsi en comparant le comportement du greffon CD14KO par rapport au WT nous pourrions identifier s'il existe un rôle de l'organisme sur le greffon insensible au LPS.

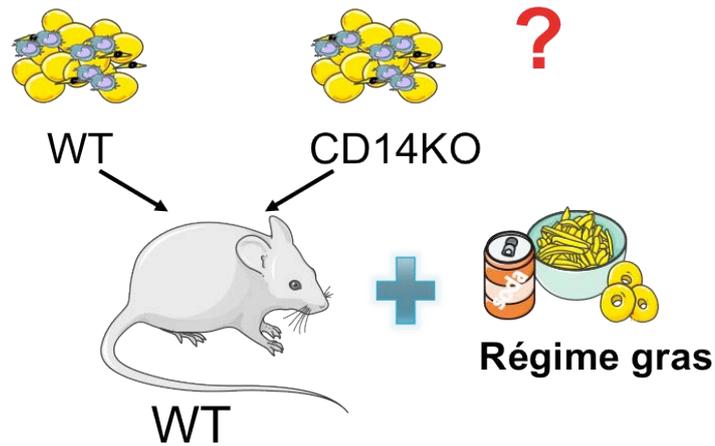


Schéma expérimental du modèle animal

Afin de visualiser un éventuel rôle de l'organisme sur l'inflammation du TA nous avons quantifié les ARN messagers de cytokines inflammatoires des greffons en réponse au régime gras.

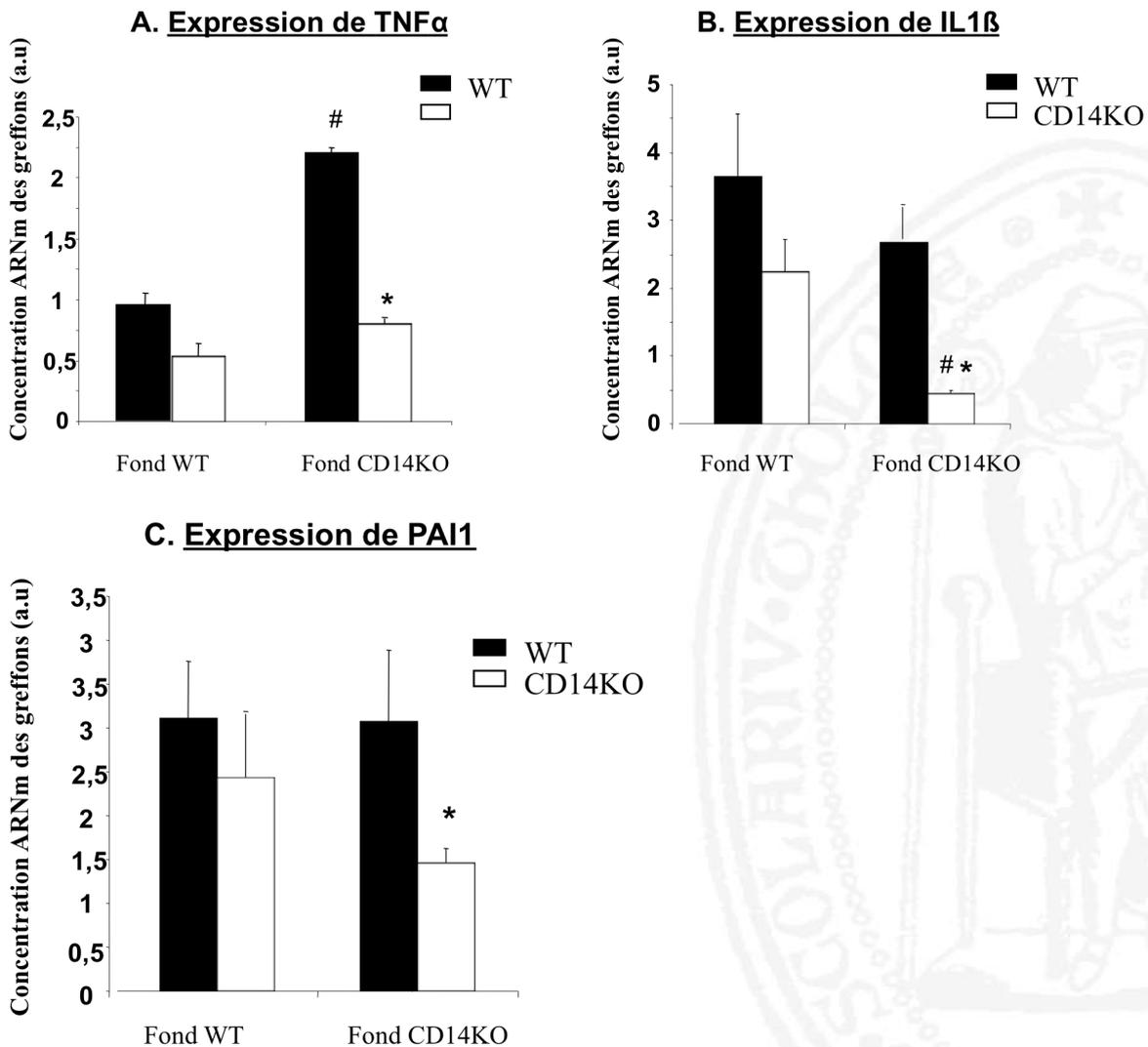


Fig.supplémentaire 1: Rôle des cellules de l'organisme dans l'inflammation des dépôts adipeux.

Chaque souris est greffée avec un dépôt adipeux issu de souris WT (noir) et un dépôt adipeux issu de souris CD14KO (blanc). Après 4 semaines de régime gras les souris sont sacrifiées et les greffons sont récupérés. L'analyse de l'expression génique est effectuée par PCR quantitative. **A.) TNF α B.) IL1 β C.) PAI1.** Tous les résultats sont des valeurs moyennes +/-ESM, n=6. Les résultats sont exprimés en unités. # P<0,05 : comparaison par rapport au fond WT, * P<0,05 : comparaison par rapport au greffon WT dans le même fond.

Ainsi chez les souris receveuses WT, la concentration des ARNm du TN α , d'IL1 et de PAI1 est similaire dans le greffon CD14KO et WT. De plus la comparaison des souris receveuses des deux fonds génétiques montre que le niveau d'inflammation est identique indépendamment du fond dès lors que le récepteur CD14 est présent dans un ou plusieurs compartiments. Or nous avons vu précédemment que le greffon issu d'une souris WT implanté dans une souris CD14KO présentait les stigmates de l'inflammation au cours d'un régime HFD.

Ces résultats suggèrent donc que des cellules extra-adipocytaires exprimant le récepteur CD14 sont capables de déclencher une réaction inflammatoire au niveau du tissu adipeux.

Nous avons ensuite caractérisé d'un point de vue cellulaire l'inflammation en quantifiant le nombre de cellules exprimant le récepteur F4/80 spécifique des macrophages matures.

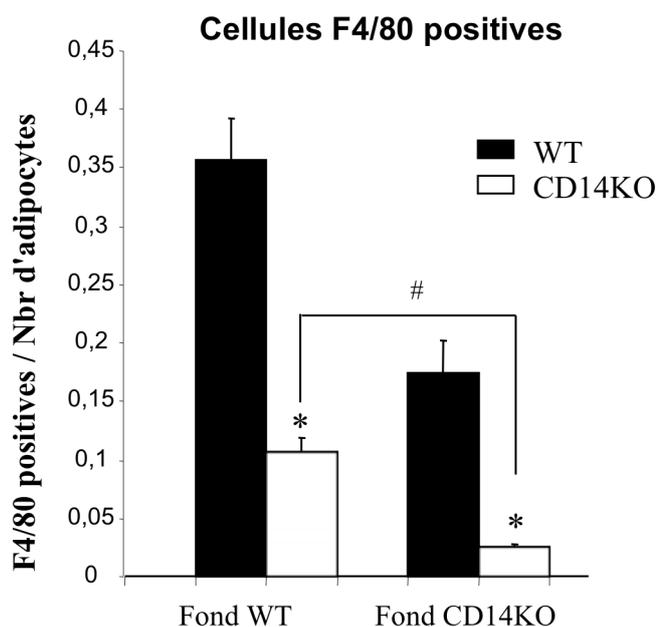


Fig.Supplémentaire 2. Macrophages du tissu adipeux blanc

Chaque souris est greffée avec un dépôt adipeux issu de souris WT (en noir) et un dépôt adipeux issu de souris CD14KO (en blanc). Après 4 semaines de régime gras les souris sont sacrifiées et les greffons sont récupérés afin de réaliser un marquage du récepteur F4/80. Les résultats sont rapportés aux nombres d'adipocytes.

Tous les résultats sont des valeurs moyennes +/-ESM, n=4. # P<0,05 : comparaison par rapport au fond WT, * P<0,05 : comparaison par rapport au greffon WT dans le même fond.

Chez la souris receveuse WT le nombre de macrophages du greffon CD14KO est diminué par rapport au WT. **Ce résultat suggère qu'au sein du tissu adipeux blanc, le complexe CD14/LPS est fortement impliqué dans la présence macrophagique.** Cependant la comparaison des dépôts adipeux de même origine implantés dans les deux fonds génétiques montre que le nombre de macrophages était également réduit dans les greffons implantés dans les souris CD14KO. **Ce résultat suggère que les cellules du dépôt adipeux (exprimant le récepteur CD14) ainsi que le reste de l'organisme favorisent ensemble la présence de macrophages au sein du dépôt en réponse au HFD.**

Pour étudier l'impact de l'inflammation du dépôt adipeux greffé sur son propre métabolisme, nous avons quantifié la concentration des ARNm de GLUT4, HKII, FAS, ChREBP qui sont des témoins de l'action anabolique de l'insuline et du glucose.

Les résultats de la figure 3 montrent que dans le groupe des souris receveuses WT, l'expression de ces gènes n'est pas modifiée entre les greffons issus de souris WT et CD14KO. Enfin en comparant les 2 fonds génétiques des souris receveuses nous notons que le taux d'expression des ARNm est identique en présence de CD14 dans au moins un des compartiments. Or nous avons précédemment démontré que le greffon WT dans une souris CD14KO présentait des perturbations métaboliques induites par un régime gras.

Ces résultats suggèrent donc que des cellules extérieures au tissu adipeux exprimant le récepteur CD14 sont capables d'entraîner des perturbations métaboliques.

Bien qu'incomplets, l'ensemble de ces résultats démontre une contribution bipartite du fond génétique et des cellules du dépôt adipeux en réaction à une endotoxémie métabolique.

Les cellules myéloïdes ont largement été décrites comme participant à l'inflammation du tissu adipeux blanc associée aux maladies métaboliques. De nombreuses études ont décrit une augmentation du nombre de cellules immunitaires telles que les macrophages ou plus récemment les lymphocytes, les mastocytes ou les neutrophiles. Ces cellules sont une grande source de cytokines inflammatoires et peuvent ainsi participer à l'initiation des défauts métaboliques du tissu adipeux. En effet des expériences consistant à diminuer l'infiltration de macrophages au cours du développement des maladies métaboliques montrent une diminution de l'inflammation au niveau du tissu adipeux et une protection dans la genèse des troubles métaboliques. De plus nous avons rapporté que l'endotoxémie métabolique était associée à une augmentation de macrophages au sein du tissu adipeux. **Nous avons donc voulu évaluer le rôle du récepteur CD14 des cellules myéloïdes en réponse à une endotoxémie métabolique induite par un régime gras au cours du développement des maladies métaboliques.** Pour cela nous avons irradié léthalement des souris WT (afin d'éliminer les cellules du compartiment hématopoïétique) puis greffé celles-ci avec des cellules issues de la moelle osseuse provenant de souris CD14KO.

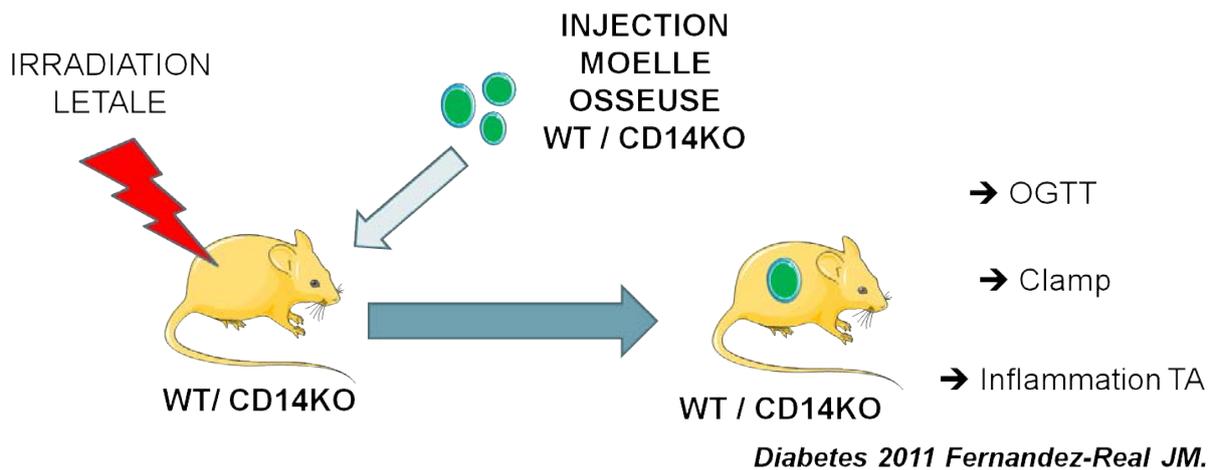


Schéma du protocole expérimental pour obtenir des souris chimères

Trois semaines après la greffe ces souris sont alors nourries avec un régime gras pendant 3 mois afin d'augmenter la concentration en LPS plasmatique. Afin de tester in vivo leur sensibilité à l'insuline nous avons réalisé un clamp euglycémique hyperinsulinémique au terme des 4 semaines de régime ainsi que leur tolérance au glucose par injection orale.

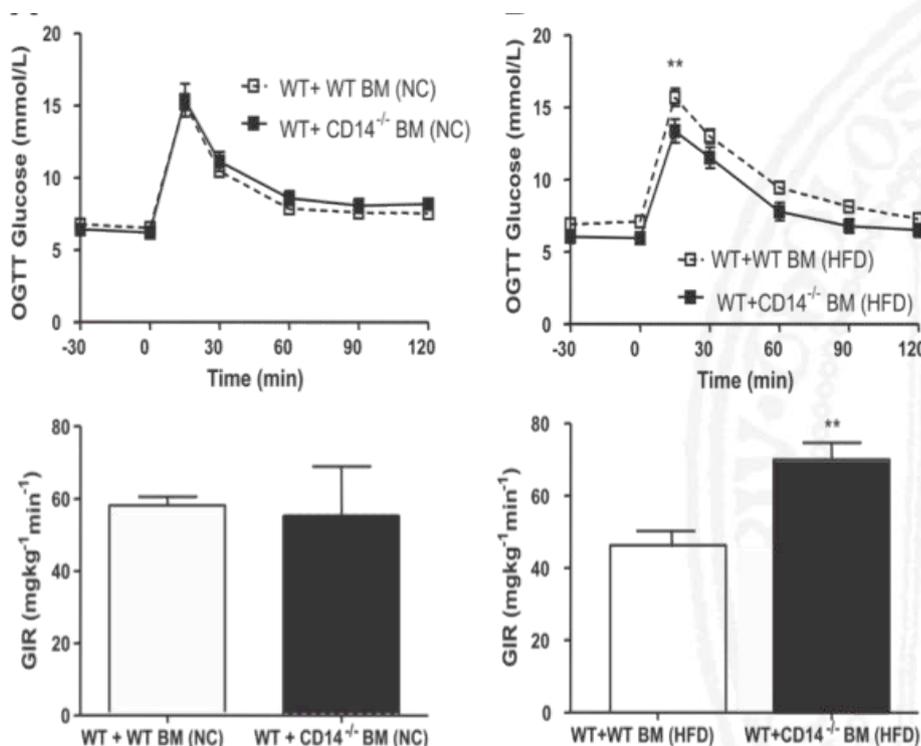


Fig. Supplémentaire 3. Rôle du récepteur CD14 des cellules de la moelle au cours des maladies métaboliques induit par un régime gras.

A Test oral de tolérance au glucose et **B** Utilisation du glucose mesuré au cours d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique de souris sauvages (WT) irradiées puis greffées avec des cellules de la moelle de souris CD14

KO (CD14^{-/-} BM) ou sauvages (WT BM) nourries par un régime gras (HFD) ou par un régime normal (NC) (n=6 à 8 par groupe) *Fernandez-Real JM Diabetes 2011* voir article en annexe

Les résultats montrent que les souris WT greffées avec les cellules issues de souris WT deviennent insulino-résistantes et intolérantes au glucose en réponse au régime gras (Fig 3 A et B). Les souris WT ayant reçues des cellules de moelles déficientes pour le récepteur CD14 résistent à l'intolérance au glucose ainsi qu'à l'insulino-résistance. **Ceci suggère que le récepteur CD14 des cellules de la moelle participe à l'apparition du diabète type 2 induit par un régime gras.**

De plus les souris chimères ne possédant plus de récepteur CD14 dans le compartiment hématopoïétique présentent une diminution des ARN messagers des cytokines inflammatoires dans les tissus adipeux. La diminution de l'inflammation est alors associée à des améliorations de l'inflammation. Il serait également intéressant de connaître le profil inflammatoire des autres organes en absence du récepteur CD14 sur les cellules de la moelle. Cette diminution d'inflammation au sein du tissu adipeux pourrait être la conséquence d'une diminution des cellules inflammatoires dans le tissu mais cela n'a pas été déterminé dans l'étude (Fig. 4).

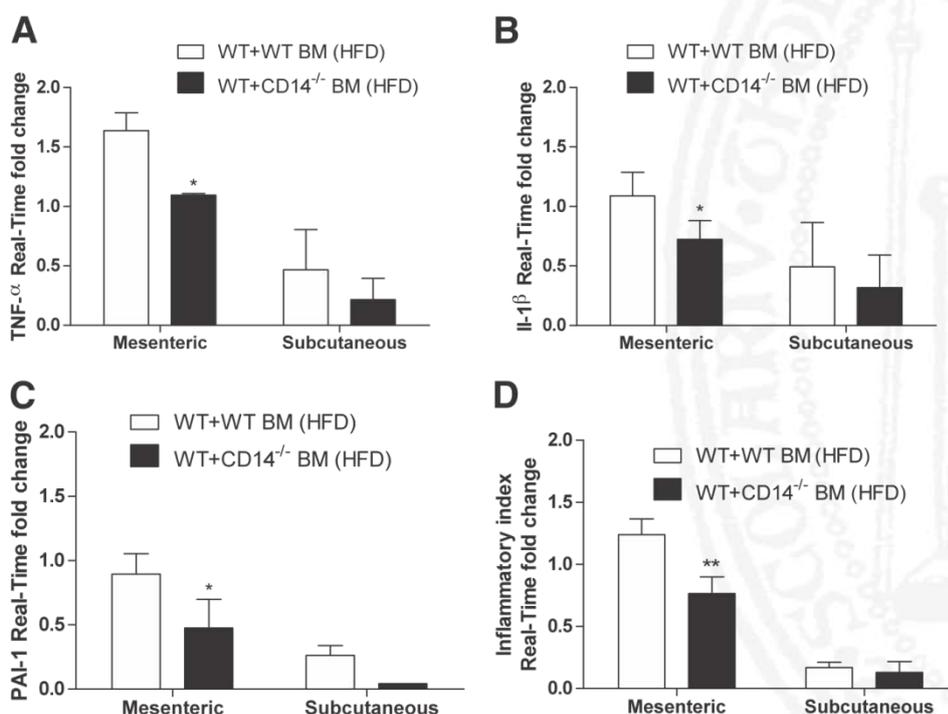


Fig Supplémentaire 4. Diminution de l'expression génique des ARN messager des cytokines inflammatoires dans les tissus adipeux mésentérique et sous-cutané.

Expression génique relative (contrôle interne étant le gène RPL19) de cytokines inflammatoires TNF- α (A) IL1- β (B) et PAI-1 (C) du tissu adipeux mésentérique et sous-cutané de souris sauvages (WT) irradiées puis gréffées avec des cellules de la moelle de souris CD14 KO (CD14^{-/-} BM) ou sauvages (WT BM) nourries par un régime gras (HFD) (n=6 à 8 par groupe). *Fernandez-Real JM Diabetes 2011 voir article en annexe*

Le récepteur CD14 du compartiment hématopoïétique participe donc à l'inflammation du tissu adipeux et l'initiation du diabète de type 2 en réponse à l'endotoxémie métabolique induit par un régime gras.

Nous avons alors voulu savoir si la présence seule du récepteur CD14 était suffisante à la mise en place du diabète de type 2. Pour cela nous avons irradiés des souris CD14 KO et injecté des cellules de la moelle osseuse provenant de souris WT (ou CD14 pour le groupe contrôle). Ainsi, seul le compartiment hématopoïétique exprime le récepteur CD14. Après recolonisation ces souris sont alors nourries par un régime hyper-lipidique pendant 4 semaines. Un test de tolérance au glucose montre qu'il n'existe pas de différence entre les 2 groupes de souris (Fig 5). **Ainsi l'expression du récepteur CD14 sur les cellules hématopoïétiques ne semble pas capable d'initier le diabète de type 2.**

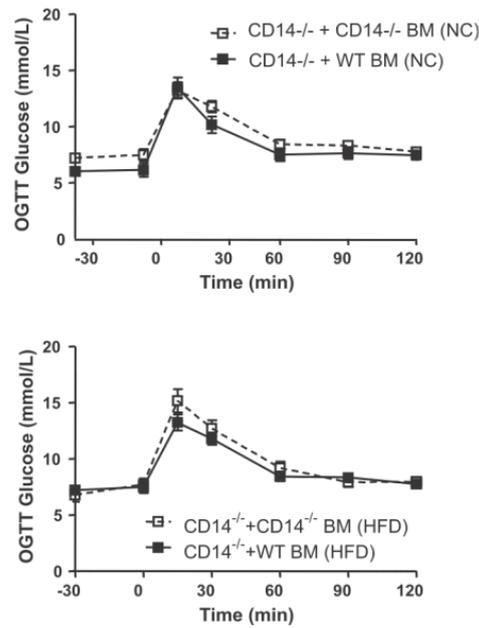


Fig Supplémentaire 5. Rôle du récepteur CD14 des cellules de la moelle au cours des maladies métaboliques induit par un régime gras.

Test oral de tolérance au glucose de souris CD14 KO (CD14 ^{-/-}) irradiées puis greffées avec des cellules de la moelle **de souris** CD14 KO (CD14^{-/-} BM) ou sauvages (WT BM) nourries par un régime gras (HFD) ou par un régime normal (NC) (n=6 à 8 par groupe) .*Fernandez-Real JM Diabetes 2011 voir article en annexe*

Nous avons montré que les souris CD14 KO ne développent pas d'inflammation au niveau du tissu adipeux en réponse à une endotoxémie métabolique. Ainsi en l'absence d'inflammation du tissu adipeux médié par le récepteur CD14 il est possible d'envisager que les cellules hématopoïétiques, et probablement les macrophages, ne soient plus capables d'être activés et de s'infiltrer dans le tissu pour participer au phénomène inflammatoire et au développement des maladies métaboliques. Des études ont mis en évidence que l'inhibition de l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux protégeait de l'apparition de ces maladies métaboliques (CCR2). **Le tissu adipeux pourrait donc être un acteur déterminant dans l'initiation de l'inflammation et donc l'apparition du diabète de type 2 en réponse à l'endotoxémie métabolique.**

Ainsi l'endotoxémie métabolique, ou le LPS plasmatique, induit par un régime gras est capable de cibler directement le tissu adipeux induisant une réaction inflammatoire et une plasticité de ce tissu. En activant le tissu adipeux le LPS pourrait être le facteur moléculaire responsable de l'infiltration de cellules inflammatoires dans ce tissu qui vont alors participer au maintien de l'inflammation et ainsi au perturbations métaboliques de ce tissu et de l'organisme.



IV-3 Résultats complémentaires 2 (Cf. Article en annexe *Serino et al.*)

Au cours de ma thèse j'ai eu l'opportunité de replacer mes résultats dans un contexte plus physiopathologique grâce à une étude réalisée en collaboration. Dans cette étude nous avons utilisé l'avantage de notre modèle animal caractérisé par une adaptation métabolique à un régime composé de 72% de lipides. En effet des souris de même fond génétique (C57Bl/6) nourries par ce régime hyper-lipidique vont devenir diabétiques (HFD-D) ou vont résister au développement du diabète (HFD-DR) (Burcelin, Crivelli et al. 2002). Nous avons alors voulu étudier le rôle du microbiote intestinal, indépendamment de l'alimentation et du fond génétique, sur le développement de phénotypes métaboliques (métabotypes) chez des souris.

Pour cela, après 3 mois de régime gras nous avons pyroséquéncé la flore du caecum des souris afin de déterminer s'il existe des différences du métagénome en fonction des différents métabotypes (HFD-D et HFD-DR). Malgré un régime similaire et un fond génétique identique nous avons identifié un profil génétique bactérien spécifique en fonction des différents métabotypes. Le métagénome du groupe de souris devenant diabétiques (HFD-D) est associé à une augmentation de la perméabilité intestinale au LPS associée à une augmentation de la concentration en LPS plasmatique. Une augmentation du nombre de cellules de la FSV du tissu adipeux viscéral est également corrélé à ce phénotype. La plupart de ces caractéristiques peuvent alors être modulées en modifiant la flore intestinale par ajout de fibres alimentaires (GOS).

Ainsi le microbiote est une signature des métabotypes et ceci de façon indépendante du régime alimentaire et du fond génétique.

CONCLUSION



V- Conclusion

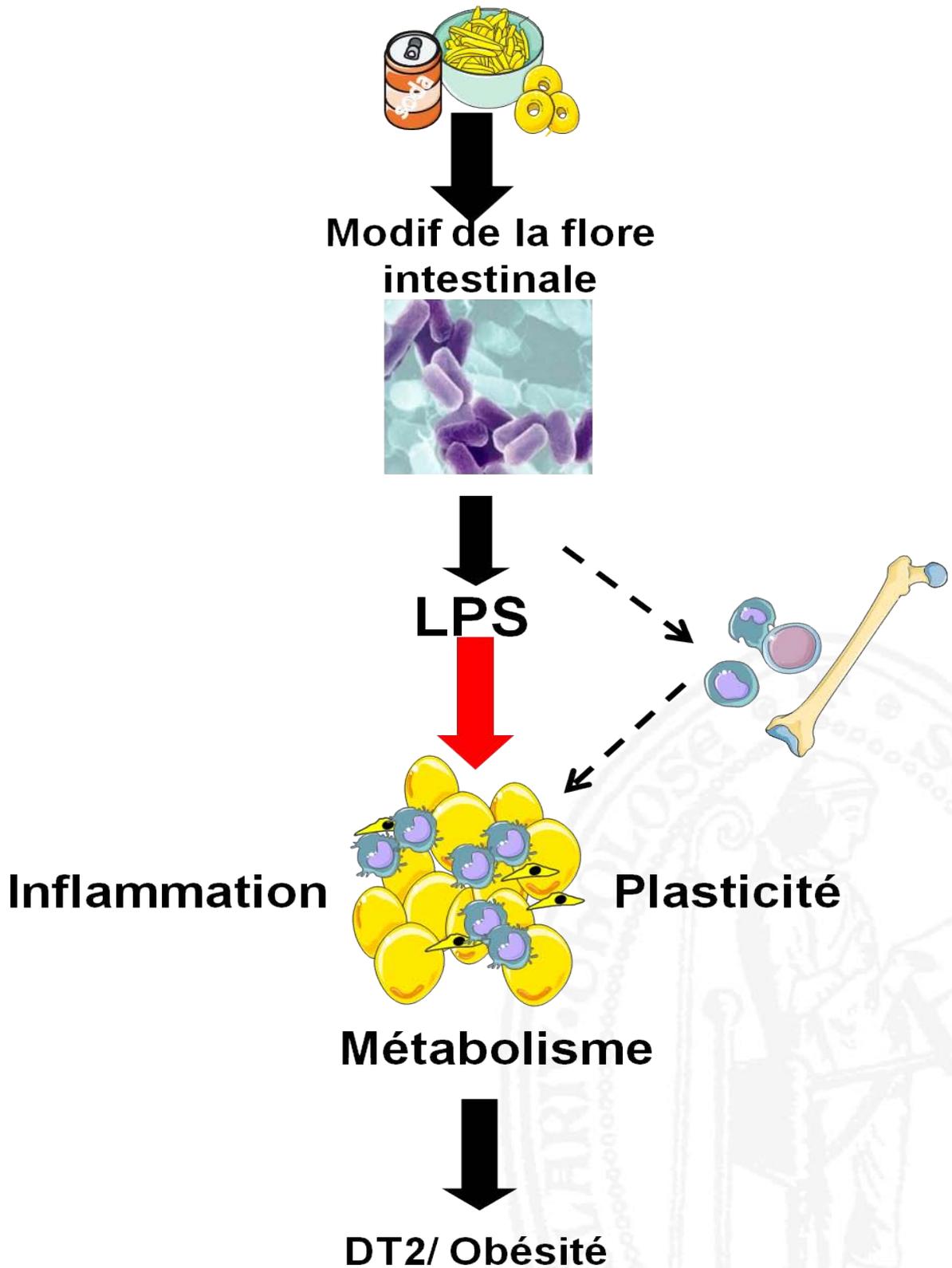


Schéma de conclusion générale

Pour la première fois, nous venons de voir que des facteurs d'origine bactérienne, les lipopolysaccharides, pourraient être des initiateurs moléculaires des maladies métaboliques par leur action directe sur le tissu adipeux. Le LPS va alors déclencher une réaction inflammatoire de ce tissu. Cette inflammation est une étape déterminante pour l'infiltration des cellules myéloïdes dans le dépôt participant alors à la mise en place de l'insulino-résistance.

Le LPS va également jouer sur la plasticité du tissu adipeux en favorisant la prolifération des préadipocytes mais également en inhibant la différenciation des adipocytes. Déterminer si cette plasticité est la cause ou la conséquence de l'état inflammatoire du tissu adipeux devra être étudiée afin de pouvoir diminuer le rôle délétère de ce tissu dans le développement de la maladie.

La modification de la flore intestinale sous l'influence de l'alimentation conduit à une augmentation de l'absorption des fragments bactériens tels que le LPS. D'après les récents travaux du laboratoire nous pensons que, plus que des fragments bactériens, des bactéries entières passeraient la barrière intestinale pour être véhiculées jusqu'au tissu cible. Des résultats récents nous indiquent qu'il existe un microbiote tissulaire physiologique. Nous savons qu'au cours des maladies métaboliques la flore intestinale va être modifiée ainsi que la perméabilité de l'intestin. Ces changements intestinaux pourraient alors impliquer et générer des changements au niveau du microbiote tissulaire. Ainsi grâce au séquençage de l'ADNS bactériens présent dans le tissu adipeux de patients obèses ou non obèses nous avons observé des différences de ce microbiote tissulaire en fonction du phénotype mince ou obèse des patients.

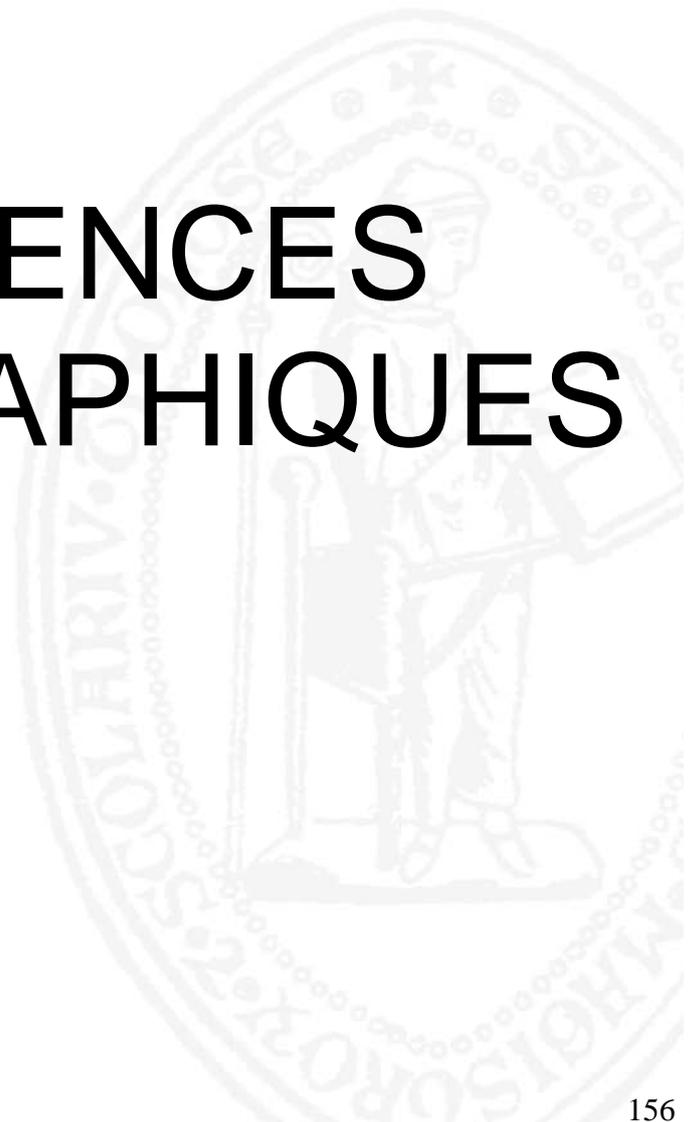
Il serait très intéressant de déterminer et identifier quelles sont les bactéries augmentées au niveau du tissu adipeux au cours de l'obésité. En effet si l'on arrivait à corréler une famille de bactéries avec les maladies métaboliques il serait ensuite possible de décortiquer, grâce aux nombreux outils moléculaires, les effets de ces bactéries et de leurs antigènes sur le

développement du tissu adipeux par exemple. Ceci permettrait de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques et surtout préventives agissant sur le microbiote et permettant de diminuer la très forte prévalence des maladies métaboliques.

Nous avons probablement vécu en symbiose co-évolutive et mutualiste avec notre microbiote intestinal depuis l'origine de l'Homme partageant les avantages sélectifs et Darwiniens de cette cohabitation. Au cours de ces 50 dernières années nous pouvons suggérer qu'un déséquilibre s'installe progressivement. En effet, sous la pression de changements environnementaux marqués, telque la modification rapide de nos habitudes et qualités alimentaires, le microbiote intestinal à du s'adapter et évoluer rapidement. Les conséquences pour notre organisme à long terme sont difficiles à anticiper. Cependant, la forte augmentation de l'incidence des maladies métaboliques au cours de ces 20 dernières années pourrait être un premier signe témoignant une rupture de la symbiose qui était établie entre notre microbiote et notre organisme. Quelle influence à long terme ce déséquilibre engendrera? Serons-nous capables de nous adapter également à ces changements environnementaux et à ce nouveau microbiote ? Existera-t-il une sélection naturelle des personnes possédant un microbiote capable de nous protéger contre les complications cardiovasculaires léthales liées à l'incidence galopante des maladies métaboliques ?

Les réponses à ces questions doivent être trouvées et représentent les thèmes actuels de nos travaux de recherche.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Aarsland, A., D. Chinkes, et al. (1997). "Hepatic and whole-body fat synthesis in humans during carbohydrate overfeeding." Am J Clin Nutr **65**(6): 1774-1782.
- Abrams, G. D. and J. E. Bishop (1967). "Effect of the normal microbial flora on gastrointestinal motility." Proc Soc Exp Biol Med **126**(1): 301-304.
- Acheson, K. J., Y. Schutz, et al. (1984). "Nutritional influences on lipogenesis and thermogenesis after a carbohydrate meal." Am J Physiol **246**(1 Pt 1): E62-70.
- Agwunobi, A. O., C. Reid, et al. (2000). "Insulin resistance and substrate utilization in human endotoxemia." J Clin Endocrinol Metab **85**(10): 3770-3778.
- Ahmadian, M., Y. Wang, et al. "Lipolysis in adipocytes." Int J Biochem Cell Biol **42**(5): 555-559.
- Ailhaud, G., P. Grimaldi, et al. (1992). "Cellular and molecular aspects of adipose tissue development." Annu Rev Nutr **12**: 207-233.
- Amar, J., R. Burcelin, et al. (2008). "Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men." Am. J. Clin Nutr. **87**: 1219-1223.
- Amar, J., C. Chabo, et al. "Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment." EMBO Mol Med **3**(9): 559-572.
- Anderson, P. D., N. N. Mehta, et al. (2007). "Innate immunity modulates adipokines in humans." J Clin Endocrinol Metab **92**(6): 2272-2279.
- Andreasen, A., N. Larsen, et al. (2010). "Effects of Lactobacillus acidophilus NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects." British Journal of Nutrition: 1-8.
- Arner, E., P. O. Westermark, et al. (2010). "Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology." Diabetes **59**(1): 105-109.
- Assy, N., G. Nasser, et al. (2008). "Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors." Can J Gastroenterol **22**(10): 811-816.
- Avram, A. S., M. M. Avram, et al. (2005). "Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue." J Am Acad Dermatol **53**(4): 671-683.
- Backhed, F., H. Ding, et al. (2004). "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(44): 15718-15723.
- Backhed, F., R. E. Ley, et al. (2005). "Host-bacterial mutualism in the human intestine." Science **307**(5717): 1915-1920.
- Backhed, F., J. K. Manchester, et al. (2007). "Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(3): 979-984.
- Bastard, J. P., M. Maachi, et al. (2002). "Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro." J Clin Endocrinol Metab **87**(5): 2084-2089.
- Bechah, Y., C. D. Paddock, et al. "Adipose tissue serves as a reservoir for recrudescence Rickettsia prowazekii infection in a mouse model." PLoS One **5**(1): e8547.
- Berg, A. H., T. P. Combs, et al. (2002). "ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism." Trends Endocrinol Metab **13**(2): 84-89.

- Bergheim, I., S. Weber, et al. (2008). "Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin." *J Hepatol* **48**(6): 983-992.
- Bjorntorp, P., M. Karlsson, et al. (1978). "Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes." *J Lipid Res* **19**(3): 316-324.
- Bjorntorp, P. and L. Sjostrom (1978). "Carbohydrate storage in man: speculations and some quantitative considerations." *Metabolism* **27**(12 Suppl 2): 1853-1865.
- Boirivant, M. and W. Strober (2007). "The mechanism of action of probiotics." *Curr Opin Gastroenterol* **23**(6): 679-692.
- Bouloumie, A., C. A. Curat, et al. (2005). "Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **8**(4): 347-354.
- Bour, S., S. Caspar-Bauguil, et al. (2009). "Semicarbazide-sensitive amine oxidase/vascular adhesion protein-1 deficiency reduces leukocyte infiltration into adipose tissue and favors fat deposition." *Am J Pathol* **174**(3): 1075-1083.
- Bourlier, V., A. Zakaroff-Girard, et al. (2008). "Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages." *Circulation* **117**(6): 806-815.
- Brakenhielm, E., R. Cao, et al. (2004). "Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice." *Circ Res* **94**(12): 1579-1588.
- Brown, A. J., S. M. Goldsworthy, et al. (2003). "The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids." *J Biol Chem* **278**(13): 11312-11319.
- Brun, P., I. Castagliuolo, et al. (2007). "Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**(2): G518-525.
- Burcelin, R., V. Crivelli, et al. (2002). "Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**(4): E834-842.
- Cabou, C., G. Campistron, et al. (2008). "Brain glucagon-like peptide-1 regulates arterial blood flow, heart rate, and insulin sensitivity." *Diabetes* **57**(10): 2577-2587.
- Canello, R., C. Henegar, et al. (2005). "Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss." *Diabetes* **54**(8): 2277-2286.
- Cani, P., J. Amar, et al. (2007). "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance." *Diabetes* **56**: 1761-1772.
- Cani, P. D., J. Amar, et al. (2007). "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance." *Diabetes* **56**(7): 1761-1772.
- Cani, P. D., R. Bibiloni, et al. (2008). "Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice." *Diabetes* **57**(6): 1470-1481.
- Cani, P. D., C. A. Daubioul, et al. (2005). "Involvement of endogenous glucagon-like peptide-1(7-36) amide on glycaemia-lowering effect of oligofructose in streptozotocin-treated rats." *J Endocrinol* **185**(3): 457-465.
- Cani, P. D., N. M. Delzenne, et al. (2008). "Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding." *Pathol Biol (Paris)*.
- Cani, P. D., C. Dewever, et al. (2004). "Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats." *Br J Nutr* **92**(3): 521-526.
- Cani, P. D., E. Joly, et al. (2006). "Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study." *Eur J Clin Nutr* **60**(5): 567-572.
- Cani, P. D., C. Knauf, et al. (2006). "Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor." *Diabetes* **55**(5): 1484-1490.
- Cani, P. D., A. M. Neyrinck, et al. (2007). "Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia." *Diabetologia* **50**(11): 2374-2383.
- Cani, P. D., A. M. Neyrinck, et al. (2005). "Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1." *Obes Res* **13**(6): 1000-1007.

- Cani, P. D., S. Possemiers, et al. (2009). "Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability." Gut **58**(8): 1091-1103.
- Cani, P. D., S. Possemiers, et al. (2009). "Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability." Gut.
- Caspar-Bauguil, S., B. Cousin, et al. (2005). "Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity." FEBS Lett **579**(17): 3487-3492.
- Castan, I., P. Valet, et al. (1994). "Antilipolytic effects of alpha 2-adrenergic agonists, neuropeptide Y, adenosine, and PGE1 in mammal adipocytes." Am J Physiol **266**(4 Pt 2): R1141-1147.
- Cavaillon, J. M., C. Fitting, et al. (1990). "Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide." Infect Immun **58**(7): 2375-2382.
- Charriere, G., B. Cousin, et al. (2003). "Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity." J Biol Chem **278**(11): 9850-9855.
- Charriere, G. M., B. Cousin, et al. (2006). "Macrophage characteristics of stem cells revealed by transcriptome profiling." Exp Cell Res **312**(17): 3205-3214.
- Chou, C. J., M. Membrez, et al. (2008). "Gut decontamination with norfloxacin and ampicillin enhances insulin sensitivity in mice." Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program **62**: 127-137; discussion 137-140.
- Chung, S., K. Lapoint, et al. (2006). "Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes." Endocrinology **147**(11): 5340-5351.
- Cinti, S., G. Mitchell, et al. (2005). "Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans." J Lipid Res **46**(11): 2347-2355.
- Cipolletta, D., D. Kolodin, et al. "Tissular T(regs): A unique population of adipose-tissue-resident Foxp3+CD4+ T cells that impacts organismal metabolism." Semin Immunol.
- Collado, M. C., J. Meriluoto, et al. (2007). "Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus." Lett Appl Microbiol **45**(4): 454-460.
- Cope, K., T. Risby, et al. (2000). "Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: implications for fatty liver disease pathogenesis." Gastroenterology **119**(5): 1340-1347.
- Cornell, R. P. (1980). "Mechanisms of acute hyperinsulinemia after Kupffer cell phagocytosis." Am J Physiol **238**(3): E276-283.
- Crandall, D. L., G. J. Hausman, et al. (1997). "A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives." Microcirculation **4**(2): 211-232.
- Creely, S. J., P. G. McTernan, et al. (2007). "Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes." Am J Physiol Endocrinol Metab **292**(3): E740-747.
- Crossno, J. T., Jr., S. M. Majka, et al. (2006). "Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells." J Clin Invest **116**(12): 3220-3228.
- Dalmas, E., K. Clement, et al. "Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue." Trends Immunol **32**(7): 307-314.
- Dandona, P., A. Aljada, et al. (2004). "Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes." Trends Immunol **25**(1): 4-7.
- de Luca, C. and J. M. Olefsky (2008). "Inflammation and insulin resistance." FEBS Lett **582**(1): 97-105.
- de Roos, B., V. Rungapamestry, et al. (2009). "Attenuation of inflammation and cellular stress-related pathways maintains insulin sensitivity in obese type I interleukin-1 receptor knockout mice on a high-fat diet." Proteomics **9**(12): 3244-3256.
- Deiuliis, J., Z. Shah, et al. (2011). "Visceral adipose inflammation in obesity is associated with critical alterations in regulatory cell numbers." PLoS One **6**(1): e16376.
- Despres, J. P. and I. Lemieux (2006). "Abdominal obesity and metabolic syndrome." Nature **444**(7121): 881-887.

- Dethlefsen, L., P. B. Eckburg, et al. (2006). "Assembly of the human intestinal microbiota." Trends Ecol Evol **21**(9): 517-523.
- Dethlefsen, L., S. Huse, et al. (2008). "The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing." PLoS Biol **6**(11): e280.
- Diraison, F., V. Yankah, et al. (2003). "Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans." J Lipid Res **44**(4): 846-853.
- Dray, C., C. Knaut, et al. (2008). "Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice." Cell Metab **8**(5): 437-445.
- Duffaut, C., J. Galitzky, et al. (2009). "Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity." Biochem Biophys Res Commun **384**(4): 482-485.
- Duffaut, C., A. Zakaroff-Girard, et al. (2009). "Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(10): 1608-1614.
- Erridge, C., T. Attina, et al. (2007). "A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation." Am J Clin Nutr **86**(5): 1286-1292.
- Esposito, E., A. Iacono, et al. (2009). "Probiotics Reduce the Inflammatory Response Induced by a High-Fat Diet in the Liver of Young Rats." J. Nutr. **139**: 905-911.
- Fanaro, S., R. Chierici, et al. (2003). "Intestinal microflora in early infancy: composition and development." Acta Paediatr Suppl **91**(441): 48-55.
- Farhadi, A., S. Gundlapalli, et al. (2008). "Susceptibility to gut leakiness: a possible mechanism for endotoxaemia in non-alcoholic steatohepatitis." Liver Int **28**(7): 1026-1033.
- Farmer, S. R. (2006). "Transcriptional control of adipocyte formation." Cell Metab **4**(4): 263-273.
- Faust, I. M., P. R. Johnson, et al. (1978). "Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity." Am J Physiol **235**(3): E279-286.
- Federici, M., M. L. Hribal, et al. (2005). "Timp3 deficiency in insulin receptor-haploinsufficient mice promotes diabetes and vascular inflammation via increased TNF-alpha." J Clin Invest **115**(12): 3494-3505.
- Feuerer, M., L. Herrero, et al. (2009). "Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters." Nature Medicine **15**: 930-939.
- Feuerer, M., L. Herrero, et al. (2009). "Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters." Nat Med **15**(8): 930-939.
- Flint, H. J., E. A. Bayer, et al. (2008). "Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis." Nat Rev Microbiol **6**(2): 121-131.
- Foster, M. T., H. Shi, et al. "Transplantation of non-visceral fat to the visceral cavity improves glucose tolerance in mice: investigation of hepatic lipids and insulin sensitivity." Diabetologia.
- Fox, C. S., J. M. Massaro, et al. (2007). "Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study." Circulation **116**(1): 39-48.
- Frayn, K. N., B. A. Fielding, et al. (1996). "Nutritional influences on human adipose-tissue metabolism." Biochem Soc Trans **24**(2): 422-426.
- Friedman, J. M. and J. L. Halaas (1998). "Leptin and the regulation of body weight in mammals." Nature **395**(6704): 763-770.
- Froesch, E. R., H. Burgi, et al. (1965). "Insulin inhibition of spontaneous adipose tissue lipolysis and effects upon fructose and glucose metabolism." Mol Pharmacol **1**(3): 280-296.
- Fruhbeck, G. (2008). "Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders." Methods Mol Biol **456**: 1-22.
- Fukuda, S., H. Toh, et al. (2011). "Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate." Nature **469**(7331): 543-547.
- Fukumura, D., A. Ushiyama, et al. (2003). "Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis." Circ Res **93**(9): e88-97.
- Fukushima, Y., Y. Kawata, et al. (1999). "Effect of bifidobacteria feeding on fecal flora and production of immunoglobulins in lactating mouse." Int J Food Microbiol **46**(3): 193-197.

- Furuhashi, M., R. Fucho, et al. (2008). "Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice." J Clin Invest **118**(7): 2640-2650.
- Gerhardt, C. C., I. A. Romero, et al. (2001). "Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes." Mol Cell Endocrinol **175**(1-2): 81-92.
- Gesta, S., Y. H. Tseng, et al. (2007). "Developmental origin of fat: tracking obesity to its source." Cell **131**(2): 242-256.
- Ghoshal, S., J. Witta, et al. (2009). "Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides." J Lipid Res **50**(1): 90-97.
- Gibson, G. R. (1998). "Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics." Br J Nutr **80**(4): S209-212.
- Gill, S. R., M. Pop, et al. (2006). "Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome." Science **312**(5778): 1355-1359.
- Gorbach, S. L. (1990). "Lactic acid bacteria and human health." Ann Med **22**(1): 37-41.
- Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." Nat Rev Immunol **3**(1): 23-35.
- Granneman, J. G., H. P. Moore, et al. (2007). "Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes." J Biol Chem **282**(8): 5726-5735.
- Guarner, F. (2007). "Studies with Inulin-Type Fructans on Intestinal Infections, Permeability, and Inflammation." J Nutr **137**: 2568S-2571S.
- Guo, Z. K., L. K. Cella, et al. (2000). "De novo lipogenesis in adipose tissue of lean and obese women: application of deuterated water and isotope ratio mass spectrometry." Int J Obes Relat Metab Disord **24**(7): 932-937.
- Hamdy, O., S. Porramatikul, et al. (2006). "Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat." Curr Diabetes Rev **2**(4): 367-373.
- Harris, H. W., C. Grunfeld, et al. (1993). "Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death." J Clin Invest **91**(3): 1028-1034.
- Hellerstein, M. K. (1999). "De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects." Eur J Clin Nutr **53 Suppl 1**: S53-65.
- Heumann, D. and T. Roger (2002). "Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria." Clin Chim Acta **323**(1-2): 59-72.
- Himms-Hagen, J. (1997). "On raising energy expenditure in ob/ob mice." Science **276**(5315): 1132-1133.
- Holm, C. (2003). "Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis." Biochem Soc Trans **31**(Pt 6): 1120-1124.
- Hooper, L. V. and J. I. Gordon (2001). "Commensal host-bacterial relationships in the gut." Science **292**(5519): 1115-1118.
- Hornef, M. W., T. Frisan, et al. (2002). "Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells." J Exp Med **195**(5): 559-570.
- Hosogai, N., A. Fukuhara, et al. (2007). "Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation." Diabetes **56**(4): 901-911.
- Hotamisligil, G. S. (2006). "Inflammation and metabolic disorders." Nature **444**(7121): 860-867.
- Hotamisligil, G. S., P. Peraldi, et al. (1996). "IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance." Science **271**(5249): 665-668.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, et al. (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." Science **259**(5091): 87-91.
- Hundal, R. S., K. F. Petersen, et al. (2002). "Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes." J Clin Invest **109**(10): 1321-1326.
- Ihle, J. N. and I. M. Kerr (1995). "Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily." Trends Genet **11**(2): 69-74.
- Ilan, Y., R. Maron, et al. (2010). "Induction of regulatory T cells decreases adipose inflammation and alleviates insulin resistance in ob/ob mice." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(21): 9765-9770.

- Jager, J., T. Gremeaux, et al. (2007). "Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression." *Endocrinology* **148**(1): 241-251.
- James, D. E., R. Brown, et al. (1988). "Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein." *Nature* **333**(6169): 183-185.
- James, D. E., M. Strube, et al. (1989). "Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter." *Nature* **338**(6210): 83-87.
- Jenkins, C. M., D. J. Mancuso, et al. (2004). "Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities." *J Biol Chem* **279**(47): 48968-48975.
- Joe, A. W., L. Yi, et al. (2009). "Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet." *Stem Cells* **27**(10): 2563-2570.
- Juge-Aubry, C. E., E. Somm, et al. (2004). "Regulatory effects of interleukin (IL)-1, interferon-beta, and IL-4 on the production of IL-1 receptor antagonist by human adipose tissue." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(6): 2652-2658.
- Kalliomaki, M., M. C. Collado, et al. (2008). "Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight." *Am J Clin Nutr* **87**(3): 534-538.
- Kanda, H., S. Tateya, et al. (2006). "MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity." *J Clin Invest* **116**(6): 1494-1505.
- Kim, J. Y., E. van de Wall, et al. (2007). "Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue." *J Clin Invest* **117**(9): 2621-2637.
- Kintscher, U., M. Hartge, et al. (2008). "T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**(7): 1304-1310.
- Klein, S., L. Fontana, et al. (2004). "Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease." *N Engl J Med* **350**(25): 2549-2557.
- Knauf, C., P. D. Cani, et al. (2008). "Role of central nervous system glucagon-like Peptide-1 receptors in enteric glucose sensing." *Diabetes* **57**(10): 2603-2612.
- Knauf, C., J. Rieusset, et al. (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null mice have increased white adipose tissue glucose utilization, GLUT4, and fat mass: Role in liver and brain." *Endocrinology* **147**(9): 4067-4078.
- Koh, Y. J., S. Kang, et al. (2007). "Bone marrow-derived circulating progenitor cells fail to transdifferentiate into adipocytes in adult adipose tissues in mice." *J Clin Invest* **117**(12): 3684-3695.
- Kondo, S., J. Xiao, et al. (2010). "Antiobesity effects of Bifidobacterium breve strain B-3 supplementation in a mouse model with high-fat diet-induced obesity." *Biosc Biotechnol Biochem* **74**: 1656-1651.
- Kosteli, A., E. Sugaru, et al. (2010). "Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue." *J Clin Invest* **120**(10): 3466-3479.
- Lacasa, D., S. Taleb, et al. (2007). "Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes." *Endocrinology* **148**(2): 868-877.
- Lafontan, M. (2005). "Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 119-146.
- Laitinen, k., T. Poussa, et al. (2009). "Probiotics and dietary counselling contribute to glucose regulation during and after pregnancy: a randomised controlled trial." *British Journal of Nutrition* **101**: 1679-1687.
- Langhans, W. (2000). "Anorexia of infection: current prospects." *Nutrition* **16**(10): 996-1005.
- Langin, D., C. Holm, et al. (1996). "Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism." *Proc Nutr Soc* **55**(1B): 93-109.
- Larsen, C. M., M. Faulenbach, et al. (2007). "Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus." *N Engl J Med* **356**(15): 1517-1526.

- Lass, A., R. Zimmermann, et al. (2006). "Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome." Cell Metab **3**(5): 309-319.
- Le Poul, E., C. Loison, et al. (2003). "Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation." J Biol Chem **278**(28): 25481-25489.
- Lebovitz, H. E. and M. A. Banerji (2005). "Point: visceral adiposity is causally related to insulin resistance." Diabetes Care **28**(9): 2322-2325.
- Lemonnier, D. (1972). "Effect of age, sex, and sites on the cellularity of the adipose tissue in mice and rats rendered obese by a high-fat diet." J Clin Invest **51**(11): 2907-2915.
- Levels, J. H., P. R. Abraham, et al. (2003). "Distribution and kinetics of lipoprotein-bound lipoteichoic acid." Infect Immun **71**(6): 3280-3284.
- Levine, D. M., T. S. Parker, et al. (1993). "In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 12040-12044.
- Ley, R. E., F. Backhed, et al. (2005). "Obesity alters gut microbial ecology." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(31): 11070-11075.
- Ley, R. E., P. J. Turnbaugh, et al. (2006). "Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity." Nature **444**(7122): 1022-1023.
- Li, P., M. Lu, et al. (2010). "Functional heterogeneity of CD11c-positive adipose tissue macrophages in diet-induced obese mice." J Biol Chem **285**(20): 15333-15345.
- Lumeng, C. N., J. L. Bodzin, et al. (2007). "Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization." J Clin Invest **117**(1): 175-184.
- Lumeng, C. N., S. M. Deyoung, et al. (2007). "Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity." Diabetes **56**(1): 16-23.
- Lumeng, C. N., S. M. Deyoung, et al. (2007). "Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins." Am J Physiol Endocrinol Metab **292**(1): E166-174.
- Macia, L., M. Delacre, et al. (2006). "Impairment of dendritic cell functionality and steady-state number in obese mice." J Immunol **177**(9): 5997-6006.
- Mahowald, M. A., F. E. Rey, et al. (2009). "Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(14): 5859-5864.
- Maitra, S. R., M. L. Gestring, et al. (1999). "Endotoxin-induced alterations in hepatic glucose-6-phosphatase activity and gene expression." Mol Cell Biochem **196**(1-2): 79-83.
- Manco, M., J. M. Fernandez-Real, et al. (2007). "Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women." J Clin Endocrinol Metab **92**(2): 483-490.
- Mathieu, P., I. Lemieux, et al. "Obesity, inflammation, and cardiovascular risk." Clin Pharmacol Ther **87**(4): 407-416.
- Maumus, M., C. Sengenès, et al. (2008). "Evidence of in situ proliferation of adult adipose tissue-derived progenitor cells: influence of fat mass microenvironment and growth." J Clin Endocrinol Metab **93**(10): 4098-4106.
- McCarthy, J., L. O'Mahony, et al. (2003). "Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance." Gut **52**(7): 975-980.
- McInerney, M. F., S. B. Pek, et al. (1991). "Prevention of insulinitis and diabetes onset by treatment with complete Freund's adjuvant in NOD mice." Diabetes **40**(6): 715-725.
- Medina, J., L. Fernandez-salazar, et al. (2004). "Approach to the Pathogenesis and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis." Diabetes care **27**: 2057-2066.
- Meek, S. E., K. S. Nair, et al. (1999). "Insulin regulation of regional free fatty acid metabolism." Diabetes **48**(1): 10-14.
- Membrez, M., F. Blancher, et al. (2008). "Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice." FASEB J **22**(7): 2416-2426.
- Menard, S., C. Candalh, et al. (2004). "Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport." Gut **53**(6): 821-828.

- Miele, L., V. Valenza, et al. (2009). "Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* **49**(6): 1877-1887.
- Miranville, A., C. Heeschen, et al. (2004). "Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells." *Circulation* **110**(3): 349-355.
- Mitaka, C. (2005). "Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectious systemic inflammatory response syndrome." *Clin Chim Acta* **351**(1-2): 17-29.
- Mlinar, B. and J. Marc "Review: New insights into adipose tissue dysfunction in insulin resistance." *Clin Chem Lab Med*.
- Mueckler, M. (1990). "Family of glucose-transporter genes. Implications for glucose homeostasis and diabetes." *Diabetes* **39**(1): 6-11.
- Mueckler, M., C. Caruso, et al. (1985). "Sequence and structure of a human glucose transporter." *Science* **229**(4717): 941-945.
- Musso, G., R. Gambino, et al. "Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update." *Obes Rev* **11**(6): 430-445.
- Muzio, M., N. Polntarutti, et al. (2000). "Toll like receptor family (TLT) and signalling pathway." *Eur Cytokine Netw* **11**(3): 489-490.
- Nair, S., K. Cope, et al. (2001). "Obesity and female gender increase breath ethanol concentration: potential implications for the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis." *Am J Gastroenterol* **96**(4): 1200-1204.
- Neal, M. D., C. Leaphart, et al. (2006). "Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier." *J Immunol* **176**(5): 3070-3079.
- Nedergaard, J., T. Bengtsson, et al. (2007). "Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**(2): E444-452.
- Neels, J. G., T. Thinnes, et al. (2004). "Angiogenesis in an in vivo model of adipose tissue development." *FASEB J* **18**(9): 983-985.
- Ness-Abramof, R. and C. M. Apovian (2008). "Waist circumference measurement in clinical practice." *Nutr Clin Pract* **23**(4): 397-404.
- Neyrolles, O., R. Hernandez-Pando, et al. (2006). "Is adipose tissue a place for Mycobacterium tuberculosis persistence?" *PLoS One* **1**: e43.
- Nguyen, M. T., S. Favelyukis, et al. (2007). "A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways." *J Biol Chem* **282**(48): 35279-35292.
- Nishimura, S., I. Manabe, et al. (2009). "CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity." *Nat Med* **15**(8): 914-920.
- O'Hara, A. M. and F. Shanahan (2006). "The gut flora as a forgotten organ." *EMBO Rep* **7**(7): 688-693.
- Osman, N., D. Adawi, et al. (2006). "Bifidobacterium infantis strains with and without a combination of oligofructose and inulin (OFI) attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats." *BMC Gastroenterol* **6**: 31.
- Ouchi, N., J. L. Parker, et al. "Adipokines in inflammation and metabolic disease." *Nat Rev Immunol* **11**(2): 85-97.
- Ouwehand, A., E. Isolauri, et al. (2002). "The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood." *Eur J Nutr* **41 Suppl 1**: I32-37.
- Palmer, C., E. M. Bik, et al. (2007). "Development of the Human Infant Intestinal Microbiota." *PLoS Biol* **5**(7): e177.
- Parks, E. J. (2002). "Changes in fat synthesis influenced by dietary macronutrient content." *Proc Nutr Soc* **61**(2): 281-286.
- Parks, E. J. (2002). "Dietary carbohydrate's effects on lipogenesis and the relationship of lipogenesis to blood insulin and glucose concentrations." *Br J Nutr* **87 Suppl 2**: S247-253.
- Paulauskis, J. D. and H. S. Sul (1988). "Cloning and expression of mouse fatty acid synthase and other specific mRNAs. Developmental and hormonal regulation in 3T3-L1 cells." *J Biol Chem* **263**(15): 7049-7054.

- Perrin, C., C. Knauf, et al. (2004). "Intracerebroventricular infusion of glucose, insulin, and the adenosine monophosphate-activated kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, controls muscle glycogen synthesis." *Endocrinology* **145**(9): 4025-4033.
- Pickup, J. C. (2004). "Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes." *Diabetes Care* **27**(3): 813-823.
- Pickup, J. C. and M. A. Crook (1998). "Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?" *Diabetologia* **41**(10): 1241-1248.
- Plomgaard, P., K. Bouzakri, et al. (2005). "Tumor necrosis factor-alpha induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation." *Diabetes* **54**(10): 2939-2945.
- Podolsky, D. K. (2002). "Inflammatory bowel disease." *N Engl J Med* **347**(6): 417-429.
- Poggi, M., D. Bastelica, et al. (2007). "C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet." *Diabetologia* **50**(6): 1267-1276.
- Poggi, M., J. Jager, et al. (2009). "The inflammatory receptor CD40 is expressed on human adipocytes: contribution to crosstalk between lymphocytes and adipocytes." *Diabetologia* **52**(6): 1152-1163.
- Porter, S. A., J. M. Massaro, et al. (2009). "Abdominal subcutaneous adipose tissue: a protective fat depot?" *Diabetes Care* **32**(6): 1068-1075.
- Powrie, F., M. W. Leach, et al. (1994). "Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells." *Immunity* **1**(7): 553-562.
- Pussinen, P. j., J. Sundvall, et al. (2011). "Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes." *Diabetes Care* **34**: 392-397.
- Raetzsch, C. F., N. L. Brooks, et al. (2009). "Lipopolysaccharide inhibition of glucose production through the Toll-like receptor-4, myeloid differentiation factor 88, and nuclear factor kappa b pathway." *Hepatology* **50**(2): 592-600.
- Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, et al. (2004). "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis." *Cell* **118**(2): 229-241.
- Rausch, M. E., S. Weisberg, et al. (2008). "Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration." *Int J Obes (Lond)* **32**(3): 451-463.
- Ravussin, E. and S. R. Smith (2002). "Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus." *Ann N Y Acad Sci* **967**: 363-378.
- Raynolds, M. V., P. D. Awald, et al. (1990). "Lipoprotein lipase gene expression in rat adipocytes is regulated by isoproterenol and insulin through different mechanisms." *Mol Endocrinol* **4**(9): 1416-1422.
- Riant, E., A. Waget, et al. (2009). "Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice." *Endocrinology* **150**(5): 2109-2117.
- Ricquier, D. (1988). "[Thermogenesis and obesity: molecular aspects]." *Phlebologie* **41**(3): 543-549.
- Rigamonti, A., K. Brennand, et al. "Rapid cellular turnover in adipose tissue." *PLoS One* **6**(3): e17637.
- Rivera, C. A., P. Adegboyega, et al. (2007). "Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis." *J Hepatol* **47**(4): 571-579.
- Rizack, M. A. (1964). "Activation of an Epinephrine-Sensitive Lipolytic Activity from Adipose Tissue by Adenosine 3',5'-Phosphate." *J Biol Chem* **239**: 392-395.
- Roberfroid, M. (2007). "Prebiotics: the concept revisited." *J Nutr* **137**(3 Suppl 2): 830S-837S.
- Roberfroid, M. B. (2007). "Inulin-type fructans: functional food ingredients." *J Nutr* **137**(11 Suppl): 2493S-2502S.
- Rocha, V. Z., E. J. Folco, et al. (2008). "Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity." *Circ Res* **103**(5): 467-476.
- Rodbell, M. (1964). "Localization of Lipoprotein Lipase in Fat Cells of Rat Adipose Tissue." *J Biol Chem* **239**: 753-755.
- Rodbell, M. (1964). "Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis." *J Biol Chem* **239**: 375-380.

- Rodeheffer, M. S., K. Birsoy, et al. (2008). "Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo." Cell **135**(2): 240-249.
- Rosen, E. D. and O. A. MacDougald (2006). "Adipocyte differentiation from the inside out." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(12): 885-896.
- Rosen, E. D., C. J. Walkey, et al. (2000). "Transcriptional regulation of adipogenesis." Genes Dev **14**(11): 1293-1307.
- Ross, R., T. Berentzen, et al. (2008). "Does the relationship between waist circumference, morbidity and mortality depend on measurement protocol for waist circumference?" Obes Rev **9**(4): 312-325.
- Ruiz, A. G., F. Casafont, et al. (2007). "Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF-alpha gene expression in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis." Obes Surg **17**(10): 1374-1380.
- Sabate, J. M., P. Jouet, et al. (2008). "High prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in patients with morbid obesity: a contributor to severe hepatic steatosis." Obes Surg **18**(4): 371-377.
- Sadelain, M. W., H. Y. Qin, et al. (1990). "Prevention of type I diabetes in NOD mice by adjuvant immunotherapy." Diabetes **39**(5): 583-589.
- Samokhvalov, V., P. J. Bilan, et al. (2009). "Palmitate- and lipopolysaccharide-activated macrophages evoke contrasting insulin responses in muscle cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(1): E37-46.
- Samuel, B. S., A. Shaito, et al. (2008). "Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(43): 16767-16772.
- Schlossman, D. M. and R. M. Bell (1976). "Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells. Evidence that the sn-glycerol-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate acyltransferase activities are dual catalytic functions of a single microsomal enzyme." J Biol Chem **251**(18): 5738-5744.
- Schwarz, J. M., R. A. Neese, et al. (1995). "Short-term alterations in carbohydrate energy intake in humans. Striking effects on hepatic glucose production, de novo lipogenesis, lipolysis, and whole-body fuel selection." J Clin Invest **96**(6): 2735-2743.
- Seale, P., B. Bjork, et al. (2008). "PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch." Nature **454**(7207): 961-967.
- Seale, P., H. M. Conroe, et al. (2011). "Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice." J Clin Invest **121**(1): 96-105.
- Seki, E., S. De Minicis, et al. (2007). "TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis." Nat Med **13**(11): 1324-1332.
- Seksik, P., H. Sokol, et al. (2006). "Review article: the role of bacteria in onset and perpetuation of inflammatory bowel disease." Aliment Pharmacol Ther **24 Suppl 3**: 11-18.
- Sengenès, C., A. Bouloumie, et al. (2003). "Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes." J Biol Chem **278**(49): 48617-48626.
- Sengenès, C., K. Lolmede, et al. (2005). "Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells." J Cell Physiol **205**(1): 114-122.
- Senn, J. J., P. J. Klover, et al. (2002). "Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes." Diabetes **51**(12): 3391-3399.
- Senn, J. J., P. J. Klover, et al. (2003). "Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes." J Biol Chem **278**(16): 13740-13746.
- Sethi, J. K. and G. S. Hotamisligil (1999). "The role of TNF alpha in adipocyte metabolism." Semin Cell Dev Biol **10**(1): 19-29.
- Shen, W., Z. Wang, et al. (2003). "Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification." Obes Res **11**(1): 5-16.
- Shepherd, P. R., L. Gnudi, et al. (1993). "Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue." Journal of Biological Chemistry **268**(30): 22243-22246.

- Shi, H., M. V. Kokoeva, et al. (2006). "TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance." *J Clin Invest* **116**(11): 3015-3025.
- Shoelson, S., J. Lee, et al. (2006). "Inflammation and insulin resistance." *J. Clin Invest* **116**: 1793-1801.
- Shoelson, S. E., L. Herrero, et al. (2007). "Obesity, inflammation, and insulin resistance." *Gastroenterology* **132**(6): 2169-2180.
- Shoelson, S. E., J. Lee, et al. (2006). "Inflammation and insulin resistance." *J Clin Invest* **116**(7): 1793-1801.
- Shoelson, S. E., J. Lee, et al. (2003). "Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance." *Int J Obes Relat Metab Disord* **27 Suppl 3**: S49-52.
- Sokol, H., P. Seksik, et al. (2006). "Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease." *Inflamm Bowel Dis* **12**(2): 106-111.
- Song, M. J., K. H. Kim, et al. (2006). "Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **346**(3): 739-745.
- Spalding, K. L., E. Arner, et al. (2008). "Dynamics of fat cell turnover in humans." *Nature* **453**(7196): 783-787.
- Spranger, J., A. Kroke, et al. (2003). "Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study." *Diabetes* **52**(3): 812-817.
- Spruss, A., G. Kanuri, et al. (2009). "Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice." *Hepatology* **50**(4): 1094-1104.
- Stephens, J. M., J. Lee, et al. (1997). "Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction." *J Biol Chem* **272**(2): 971-976.
- Stephens, T. W. and J. F. Caro (1998). "To be lean or not to be lean. Is leptin the answer?" *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **106**(1): 1-15.
- Steppan, C. M., S. T. Bailey, et al. (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes." *Nature* **409**(6818): 307-312.
- Strand, O., M. Vaughan, et al. (1964). "Rat Adipose Tissue Lipases: Hormone-Sensitive Lipase Activity against Triglycerides Compared with Activity against Lower Glycerides." *J Lipid Res* **5**: 554-562.
- Strissel, K. J., Z. Stancheva, et al. (2007). "Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications." *Diabetes* **56**(12): 2910-2918.
- Stunkard, A. J., J. R. Harris, et al. (1990). "The body-mass index of twins who have been reared apart." *N Engl J Med* **322**(21): 1483-1487.
- Subramanian, V., A. Rothenberg, et al. (2004). "Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes." *J Biol Chem* **279**(40): 42062-42071.
- Suganami, T., T. Mieda, et al. (2007). "Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation." *Biochem Biophys Res Commun* **354**(1): 45-49.
- Suganami, T. and Y. Ogawa (2010). "Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling." *J Leukoc Biol* **88**(1): 33-39.
- Suganami, T., K. Tanimoto-Koyama, et al. (2007). "Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(1): 84-91.
- Sul, H. S. and D. Wang (1998). "Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription." *Annu Rev Nutr* **18**: 331-351.
- Tang, W., D. Zeve, et al. (2008). "White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature." *Science* **322**(5901): 583-586.
- Thorne, A., F. Lonnqvist, et al. (2002). "A pilot study of long-term effects of a novel obesity treatment: omentectomy in connection with adjustable gastric banding." *Int J Obes Relat Metab Disord* **26**(2): 193-199.

- Titheradge, M. A., R. G. Knowles, et al. (1995). "Mechanism of inhibition of hepatic gluconeogenesis by bacterial endotoxin: a role for nitric oxide?" *Biochem Soc Trans* **23**(4): 1002-1008.
- Tomiyama, K., N. Murase, et al. (2008). "Characterization of transplanted green fluorescent protein+ bone marrow cells into adipose tissue." *Stem Cells* **26**(2): 330-338.
- Tozzo, E., L. Gnudi, et al. (1997). "Amelioration of insulin resistance in streptozotocin diabetic mice by transgenic overexpression of GLUT4 driven by an adipose-specific promoter." *Endocrinology* **138**(4): 1604-1611.
- Tran, T. T., Y. Yamamoto, et al. (2008). "Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism." *Cell Metab* **7**(5): 410-420.
- Trayhurn, P. and J. H. Beattie (2001). "Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ." *Proc Nutr Soc* **60**(3): 329-339.
- Trayhurn, P., B. Wang, et al. (2008). "Hypoxia and the endocrine and signalling role of white adipose tissue." *Arch Physiol Biochem* **114**(4): 267-276.
- Trevisi, P., S. De Filippi, et al. (2008). "Effect of fructo-oligosaccharides and different doses of *Bifidobacterium animalis* in a weaning diet on bacterial translocation and Toll-like receptor gene expression in pigs." *Nutrition*.
- Turnbaugh, P., V. Ridaura, et al. (2009). "The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice." *Science Translational Medicine* **1**: 6-14.
- Turnbaugh, P. J., F. Backhed, et al. (2008). "Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome." *Cell Host Microbe* **3**(4): 213-223.
- Turnbaugh, P. J., M. Hamady, et al. (2009). "A core gut microbiome in obese and lean twins." *Nature* **457**(7228): 480-484.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, et al. (2007). "The human microbiome project." *Nature* **449**(7164): 804-810.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, et al. (2006). "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest." *Nature* **444**(7122): 1027-1031.
- Ueki, K., T. Kondo, et al. (2004). "Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms." *Mol Cell Biol* **24**(12): 5434-5446.
- Unger, R. H. and L. Orci (2000). "Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity." *Int J Obes Relat Metab Disord* **24 Suppl 4**: S28-32.
- Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, et al. (1997). "Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function." *Nature* **389**(6651): 610-614.
- van der Crabben, S. N., R. M. Blumer, et al. (2009). "Early endotoxemia increases peripheral and hepatic insulin sensitivity in healthy humans." *J Clin Endocrinol Metab* **94**(2): 463-468.
- Vaughan, M. (1962). "The production and release of glycerol by adipose tissue incubated in vitro." *J Biol Chem* **237**: 3354-3358.
- Vaughan, M. and D. Steinberg (1963). "Effect of Hormones on Lipolysis and Esterification of Free Fatty Acids during Incubation of Adipose Tissue in Vitro." *J Lipid Res* **4**: 193-199.
- Velayudham, A., A. Dolganiuc, et al. (2009). "VSL#3 Probiotic Treatment Attenuates Fibrosis Without Changes in Steatohepatitis in a Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Model in Mice." *Hepatology* **49**: 989-997.
- Villena, J. A., K. H. Kim, et al. (2002). "Pref-1 and ADSF/resistin: two secreted factors inhibiting adipose tissue development." *Horm Metab Res* **34**(11-12): 664-670.
- Villena, J. A., S. Roy, et al. (2004). "Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis." *J Biol Chem* **279**(45): 47066-47075.
- Vreugdenhil, A. C., C. H. Rousseau, et al. (2003). "Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons." *J Immunol* **170**(3): 1399-1405.
- Walrand, S., C. Guillet, et al. (2004). "In vivo evidences that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions." *J Leukoc Biol* **76**(6): 1104-1110.

- Wang, B., I. S. Wood, et al. (2008). "Hypoxia induces leptin gene expression and secretion in human preadipocytes: differential effects of hypoxia on adipokine expression by preadipocytes." J Endocrinol **198**(1): 127-134.
- Wang, Y., S. Sullivan, et al. (2003). "Perilipin expression in human adipose tissues: effects of severe obesity, gender, and depot." Obes Res **11**(8): 930-936.
- Weisberg, S. P., D. Hunter, et al. (2006). "CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding." J Clin Invest **116**(1): 115-124.
- Weisberg, S. P., D. McCann, et al. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." J Clin Invest **112**(12): 1796-1808.
- Wellen, K. E. and G. S. Hotamisligil (2005). "Inflammation, stress, and diabetes." J Clin Invest **115**(5): 1111-1119.
- Wen, L., R. E. Ley, et al. (2008). "Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes." Nature **455**(7216): 1109-1113.
- Winer, D. A., S. Winer, et al. (2011). "B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies." Nat Med **17**(5): 610-617.
- Winer, S., Y. Chan, et al. (2009). "Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy." Nat Med **15**(8): 921-929.
- Wu, H., S. Ghosh, et al. (2007). "T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity." Circulation **115**(8): 1029-1038.
- Xu, H., G. T. Barnes, et al. (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." J Clin Invest **112**(12): 1821-1830.
- Xu, J. and J. I. Gordon (2003). "Inaugural Article: Honor the symbionts." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(18): 10452-10459.
- Ye, J. (2009). "Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance." Int J Obes (Lond) **33**(1): 54-66.
- Yu, G. W., J. Laseter, et al. "Persistent organic pollutants in serum and several different fat compartments in humans." J Environ Public Health **2011**: 417980.
- Yuan, M., N. Konstantopoulos, et al. (2001). "Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta." Science **293**(5535): 1673-1677.
- Zaneveld, J., P. J. Turnbaugh, et al. (2008). "Host-bacterial coevolution and the search for new drug targets." Curr Opin Chem Biol **12**(1): 109-114.
- Zaragosi, L. E., B. Wdziekonski, et al. (2010). "Activin a plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors." Diabetes **59**(10): 2513-2521.
- Zechner, R., P. C. Kienesberger, et al. (2009). "Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores." J Lipid Res **50**(1): 3-21.
- Zeidler, H., W. Mau, et al. (1992). "Undifferentiated spondyloarthropathies." Rheum Dis Clin North Am **18**(1): 187-202.
- Zimmermann, R., J. G. Strauss, et al. (2004). "Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase." Science **306**(5700): 1383-1386.
- Zoetendal, E. G., A. D. Akkermans, et al. (1998). "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.
- Zoetendal, E. G., E. E. Vaughan, et al. (2006). "A microbial world within us." Mol Microbiol **59**(6): 1639-1650.

ANNEXES





CD14 Modulates Inflammation-Driven Insulin Resistance

José Manuel Fernández-Real,¹ Sofia Pérez del Pulgar,^{1,2,3} Elodie Luche,^{4,5}
 José Maria Moreno-Navarrete,¹ Aurelie Waget,^{4,5} Matteo Serino,^{4,5} Eleonora Soriano,³
 Alex Sánchez-Pla,^{6,7} Francesc Carmona Pontaque,⁶ Joan Vendrell,² Matilde R. Chacón,²
 Wifredo Ricart,¹ Remy Burcelin,^{4,5} and Antonio Zorzano³

OBJECTIVE—The study objective was to evaluate the possible role of the macrophage molecule CD14 in insulin resistance.

RESEARCH DESIGN AND METHODS—The effects of recombinant human soluble CD14 (rh-sCD14) on insulin sensitivity (clamp procedure) and adipose tissue gene expression were evaluated in wild-type (WT) mice, high fat-fed mice, *ob/ob* mice, and CD14 knockout (KO) mice. We also studied WT mice grafted with bone marrow stem cells from WT donor mice and CD14 KO mice. Finally, CD14 was evaluated in human adipose tissue and during differentiation of human preadipocytes.

RESULTS—rh-sCD14 led to increased insulin action in WT mice, high-fat-fed mice, and *ob/ob* mice, but not in CD14 KO mice, in parallel to a marked change in the expression of 3,479 genes in adipose tissue. The changes in gene families related to lipid metabolism were most remarkable. WT mice grafted with bone marrow stem cells from WT donor mice became insulin resistant after a high-fat diet. Conversely, WT mice grafted with cells from CD14 KO mice resisted the occurrence of insulin resistance in parallel to decreased mesenteric adipose tissue inflammatory gene expression. Glucose intolerance did not worsen in CD14 KO mice grafted with bone marrow stem cells from high fat-fed WT mice when compared with recipient KO mice grafted with cells from CD14 KO donor mice. CD14 gene expression was increased in whole adipose tissue and adipocytes from obese humans and further increased after tumor necrosis factor- α .

CONCLUSIONS—CD14 modulates adipose tissue inflammatory activity and insulin resistance. *Diabetes* 60:2179–2186, 2011

Insulin resistance and chronic, low-grade inflammation are important predisposing factors for the development of type 2 diabetes and atherosclerosis. Genes and environment unequivocally induce variations in the inflammatory response that contribute to

different susceptibility for developing all these processes among healthy individuals (1–4).

Adipose tissue is the main source and target for several inflammatory pathways. In obesity, both the intrinsic cells (adipocytes) and the infiltrating immune cells exhibit proinflammatory properties. Of these infiltrating cells, macrophages are of particular importance given their capacity to secrete a variety of proinflammatory molecules leading to insulin resistance. In fact, the percentage of resident macrophages in adipose tissue is higher with increased fat mass, confirming that fat tissue growth is associated with a recruitment of blood monocytes (5–7).

One of the main functions of macrophages is to continuously sense the extracellular milieu. Toll-like receptors in these cells efficiently transduce the inflammatory signals, and this process is especially important in obesity. In particular, toll-like receptor 4 (TLR4) is a key receptor highly expressed in macrophages and adipose tissue, and involved in activation of the innate/inflammatory response. Knockout of TLR4 in hematopoietic cells (including macrophages) prevented hyperinsulinemia and hyperglycemia induced by obesity and a high-fat diet (HFD) and abrogated insulin resistance in adipose tissue in contrast with diverse effects found in systemic TLR4 deletion (8). However, TLR4 does not interact directly with the most potent inflammatory signals. Upstream to TLR4 is the multifunctional receptor CD14 (9–11).

CD14 is a 55-kDa protein that is expressed in two forms: glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane protein (mCD14) and a soluble serum protein (sCD14) lacking the glycosylphosphatidylinositol anchor (9–12). Different tissues and cells express a different form of CD14, i.e., mCD14 is the expressed form mainly in myeloid cells and macrophages, whereas sCD14 is the expressed form in the other cells, including hepatocytes and adipocytes (13–16). Both circulating sCD14 and cellular CD14 receptor interact with the inflammatory signals; lipopolysaccharide (LPS) is one of the most potent stimuli known. An excess of circulating sCD14 is known to buffer these signals, avoiding their exposure with cell (macrophage)-anchored CD14 (9–12).

Any strategy directed at blocking macrophage CD14 (e.g., with excess sCD14) will be capable of interrupting the inflammatory signal (LPS) before it is transduced. CD14 is in close interaction with TLR4, and LPS induces physical proximity between TLR4 and CD14 before nuclear translocation of nuclear factor- κ B and triggering of the inflammatory cascade (12).

Mice harboring null mutations in CD14 showed decreased body fat and increased bone mineral content. These mutant mice live long lives. Unlike many strains of caged wild-type (WT) mice, they do not become obese (17) and resist most of the features of metabolic disease triggered by CD14 ligands (18). However, it is important to

From the ¹Section of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, University Hospital of Girona, Biomedical Research Institute “Dr Josep Trueta” and CIBERObn Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Girona, Spain; the ²Unit of Endocrinology and Nutrition, University Hospital of Tarragona “Joan XXIII,” and CIBERDEM Tarragona, Tarragona, Spain; the ³Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Institute for Research in Biomedicine and CIBERDEM, Barcelona, Spain; the ⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Toulouse, France; the ⁵Université de Toulouse, UPS, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, Toulouse, France; the ⁶Departament d’Estadística, Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; and the ⁷Unitat d’Estadística i Bioinformàtica, Hospital Universitari Vall d’Hebrón, Barcelona, Spain.

Corresponding author: José Manuel Fernández-Real, jmfernandezreal.girona.ics@gencat.cat.

Received 26 August 2010 and accepted 19 May 2011.

DOI: 10.2337/db10-1210

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db10-1210/-/DC1>.

© 2011 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

elucidate whether bone marrow CD14 and adipocyte CD14 are equally responsible for these metabolic changes.

The grafting of mice with bone marrow stem cells has been used to evaluate the influence of these cells on whole-body insulin sensitivity (8). We grafted CD14 knockout (KO) mice with bone marrow stem cells from WT donor mice fed an HFD. We also grafted WT mice with cells from CD14 KO mice to test the reverse hypothesis. We then explored whether these findings can be extended to normal physiology. sCD14, apparently derived from both secretion and enzymatically cleaved glycosyl-phosphatidylinositol-anchored tissue CD14, is known to antagonize CD14 receptor signaling (11). Blocking cellular CD14 in macrophages and adipocytes by excess sCD14 should result in a decrease of the inflammatory pathways in adipose tissue and improvement of whole-body insulin action. Finally, we explored whether the observations can be extended to humans.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animal studies

Effects of recombinant human soluble CD14 on insulin action. WT and CD14 KO mice in a C57BL/6 J background were anesthetized with isoflurane-oxygen (1.5–2.5%) (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), and an intrafemoral catheter was indwelled as previously described by Riant et al. (19). All mice were allowed to recover until they fully reached their presurgery body weight.

Oral glucose tolerance test. Overnight fasted mice were given glucose (2 g/kg) orally. Whole blood was collected from the tail vein at 0, 15, 30, 60, 120, and 180 min. To assess whether insulin sensitivity could be controlled by sCD14, a 4-h intravenous infusion of the recombinant human soluble CD14 (rh-sCD14) protein was performed at a rate of 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$.

Euglycemic hyperinsulinemic clamp and isotope measurements and calculations were performed as previously described (19). Briefly, 6-h fasted mice were infused with insulin at a rate of 4 mU/kg/min for 3 h, and D-(^3H)3-glucose (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA) was simultaneously infused at rate of 30 $\mu\text{Ci}/\text{kg}/\text{min}$. Euglycemia was maintained by periodically adjusting a variable infusion of a 16.5% (w/v) glucose solution. Plasma glucose concentrations and D-(^3H)3-glucose specific activity were determined in 5 μL of blood sampled from the tip of the tail vein every 10 min during the last hour of the infusion.

Effects of rh-sCD14 on insulin resistance in mice fed HFD. Forty C57BL/6 J male mice (8 weeks old) were purchased from Harlan Iberica (Barcelona, Spain). Thirty mice were fed a high-fat Western-type diet (Harlan Teklad No. 88137, Madison, WI) that contained 21% (wt/wt) fat (42% of calories), 49.2% (wt/wt) carbohydrate, and 19.8% (wt/wt) protein for 26–28 weeks (mice were 34–36 weeks old at the experimental procedure). Ten mice were fed a standard rodent chow diet. Mice were maintained on 12-h light/12-h dark cycles. Water and food were available ad libitum. Twenty mice fed an HFD received 1 $\mu\text{g}/\text{g}/\text{day}$ of rh-sCD14, or vehicle, for 12 days. rh-sCD14 was administered in two subcutaneous injections (0.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ each one) every 12 h. This interval was calculated after observing that a single subcutaneous injection of rh-sCD14 resulted in serum concentration of this protein between 0.6 and 1.2 ng/mL. rh-sCD14 was easily measured using a human sCD14 enzyme-linked immunosorbent assay after rh-sCD14 administration and was preferred over murine-sCD14. Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT), mice exsanguination, and tissue harvest were then performed. The Animal Ethics Committee at Parc Científic de Barcelona approved the protocols.

Effects of rh-sCD14 on insulin resistance in ob/ob mice. Male C57BL/6 J ob/ob mice (10 weeks old) were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Mice were maintained on 12-h light/12-h dark cycles and fed a standard chow diet and water ad libitum. rh-sCD14 (1 $\mu\text{g}/\text{g}/\text{day}$) was continuously delivered by Alzet pumps (pump 1002, 100 μL ; Cupertino, CA) to five mice for 12 days. The mini pumps were implanted on the back, slightly posterior to the scapulae. The control group ($n = 5$) received vehicle alone.

HFD effects on insulin resistance in WT mice grafted with CD14 bone marrow stem cells. Six-week-old C57BL/6 J male mice were subjected to 9.5-Gy lethal total body γ -irradiation to eliminate endogenous bone marrow stem cells and bone marrow-derived cells as described. Twelve hours later, they were intravenously reconstituted with bone marrow cells (5×10^6) extracted from the femur and tibia of CD14 KO mice. Mice were then allowed to recover for 4 weeks under a chow diet. Then, mice were fed an HFD for 4 weeks. CD14 bone marrow cell deficiency was systematically assessed in peripheral blood mononuclear cells and resident peritoneal macrophages by PCR (data not shown). We performed fluorescence-activated cell sorter analyses on total blood

and showed that the grafting efficiency was >85%. Any mouse showing a grafting efficiency below this cutoff was discarded. The mice then underwent clamp experiments to assess insulin sensitivity.

Human studies

Study of circulating sCD14. Consecutive nondiabetic healthy subjects ($n = 146$ [93 men], aged 38.7 ± 9.8 years, with a BMI of 25.7 ± 3.1 [men] and 24.6 ± 4.3 kg/m^2 [women]) were recruited prospectively in the Hospital of Girona. None of these healthy subjects were taking any medication or showed any evidence of metabolic disease other than obesity. All subjects were of Caucasian origin and reported that their body weight had been stable for at least 3 months before the study. Inclusion criteria were 1) BMI (weight in kilograms divided by the square of height in meters) <40 kg/m^2 , 2) absence of any systemic disease, and 3) absence of any infections in the previous month. Fat mass and fat-free mass were measured through bioelectric impedance (Holtain BC Analyzer, Holtain, Cambridge, U.K.), which provides both absolute and percent fat mass.

Circulating sCD14 was measured by the sCD-14 EASIA (Biosource Europe S.A., Zoning Industriel B-6220, Fleunes, Belgium), a solid-phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microliter plate. The minimum detectable concentration is estimated to be 1 ng/mL. The intra- and interassay coefficients of variation were <5.2 and 7.8%, respectively.

Study of CD14 expression in human adipose tissue. A sample of 32 subjects (13 lean [BMI <25 kg/m^2] and 19 obese) were selected at the Endocrinology Service among patients who were scheduled for abdominal elective surgical procedures (gastric bypass operation, cholecystectomy, and surgery of abdominal hernia) at the Hospital Universitari Joan XXIII and Hospital Sant Pau i Santa Tecla (Tarragona, Spain). An independent replication study in a sample of 40 subjects was performed at the Hospital of Girona (Girona, Spain).

All subjects were of Caucasian origin and reported that their body weight had been stable for at least 3 months before the study. Systemic inflammatory disease and recent infections (in the previous month) were considered as exclusion criteria. Liver and renal diseases were specifically excluded by biochemical workup. All subjects gave informed written consent. The ethics committees of the participant institutions approved the study.

CD14 real-time PCR. Real-time quantitative PCR analyses were performed with 2 μL of cDNA, corresponding to 100 ng of total RNA on LightCycler Instrument (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), using the SYBR Green (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) fluorescence method. Primers are available on request. Adipose tissue and adipocyte expression levels of CD14 were normalized by β -actin and cyclophilin A (*CypA*) gene. *CypA* gene expression was highly homogeneous comparing lean versus obese subjects (23.48 ± 1.2 vs. 23.4 ± 1.03 , $P = 0.6$), and preadipocytes and stromovascular cells versus adipocytes (23.66 ± 0.24 and 23.3 ± 0.7 vs. 23.86 ± 0.6 , $P = 0.8$ and $P = 0.5$). β -Actin gene expression (with a variation coefficient of 3%) was more heterogeneous than *CypA* (with a variation coefficient of 1.2%) comparing preadipocytes with adipocytes.

CD14 expression during differentiation of human preadipocytes. Isolated preadipocytes from adipose tissue of lean and obese subjects (SP-F1 and SP-F3; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC) were plated on T-75 cell culture flasks and cultured at 37°C and 5% CO_2 in Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mix F-12 medium (1:1, v/v). Further details of the differentiation process are available on request. The experiment was performed in triplicate for each sample. The differentiation was monitored with the fatty acid synthase and adiponectin expression (Hs00188012_m1 and Hs00605917_m1; Applied Biosystems, Inc., Madrid, Spain).

Effects of TNF- α on CD14 gene expression in human adipocytes. Adipocytes were incubated with fresh media (control) and fresh media containing TNF- α (100 ng/mL; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). After 48 h, the supernatants were centrifuged at 400g for 5 min. The cells were then harvested, and pellets and supernatants were stored at -80°C for RNA and protein analysis.

Statistical methods. Descriptive results of continuous variables are expressed as mean \pm SD. Before statistical analysis, normal distribution and homogeneity of the variances were evaluated using Levene test, and then variables were given a log-transformation if necessary. Relation between variables was tested using Pearson test and stepwise multiple linear regression analysis. Unpaired *t* tests were used to compare CD14 mRNA expression in subcutaneous adipose tissue. The analyses were performed using the program SPSS version 12.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Effects of bone marrow grafting on HFD-induced insulin resistance and adipose tissue inflammation. After irradiation, the time required for the mice to become frankly diabetic increased from 1 to 3 months in response

to a high-fat carbohydrate-free diet (Supplementary Fig. 1A). Furthermore, the extent of glucose intolerance obtained is lower compared with nonirradiated and nongrafted WT mice (Supplementary Fig. 1B–D). Figure 1B–C compares oral glucose tolerance tests performed at 1 and 3 months in HFD-fed mice grafted and not grafted with bone marrow stem cells. Body weight gain and fat mass in response to an HFD was unchanged in irradiated grafted mice with either WT or CD14^{-/-} bone marrow (data not shown). This effect was most likely attributed to the destruction of precursor cells from the adipose tissue during irradiation, which hampers the development of the tissue. Circulating levels of sCD14 in the different models used are shown in Supplementary Fig. 2A.

We hypothesized that CD14 expression in bone marrow stem cells was responsible for HFD-induced insulin resistance. To this end, WT mice were grafted with bone marrow stem cells from CD14 KO mice and then clamped at hyperinsulinemia. The data showed that, as expected, WT mice grafted with bone marrow stem cells from WT donor mice became insulin resistant and glucose intolerant when fed an HFD when compared with mice fed normal chow (Fig. 1A and B, Supplementary Fig. 2B). Fasting glycemia values were 5.6 ± 0.2 mmol/L in the WT

mice grafted with bone marrow stem cells from WT donor mice and 7.2 ± 0.4 mmol/L in the WT mice grafted with bone marrow stem cells from CD14^{-/-} mice. Free fatty acids and fasting triglycerides are shown in Supplementary Fig. 2C.

Conversely, WT mice grafted with cells from CD14 KO mice resisted the occurrence of glucose intolerance and insulin resistance when fed an HFD.

These observations were associated with decreased mesenteric adipose tissue mRNA expression of genes coding for common cytokines (Fig. 2). It is noteworthy that these differences primarily affected the mesenteric rather than the subcutaneous adipose depot.

Both macrophages and adipocytes could be responsible for these effects because glucose intolerance did not worsen in CD14 KO mice grafted with bone marrow stem cells from WT mice fed an HFD, when compared with recipient KO mice grafted with cells from CD14 KO donor mice also fed an HFD (Fig. 1C).

Effects of sCD14 on insulin action. We then explored whether these observations can be extended to normal physiology. If cellular CD14 in macrophages and adipocytes plays a role in inflammation-induced systemic insulin resistance, a strategy known to block cellular CD14 should

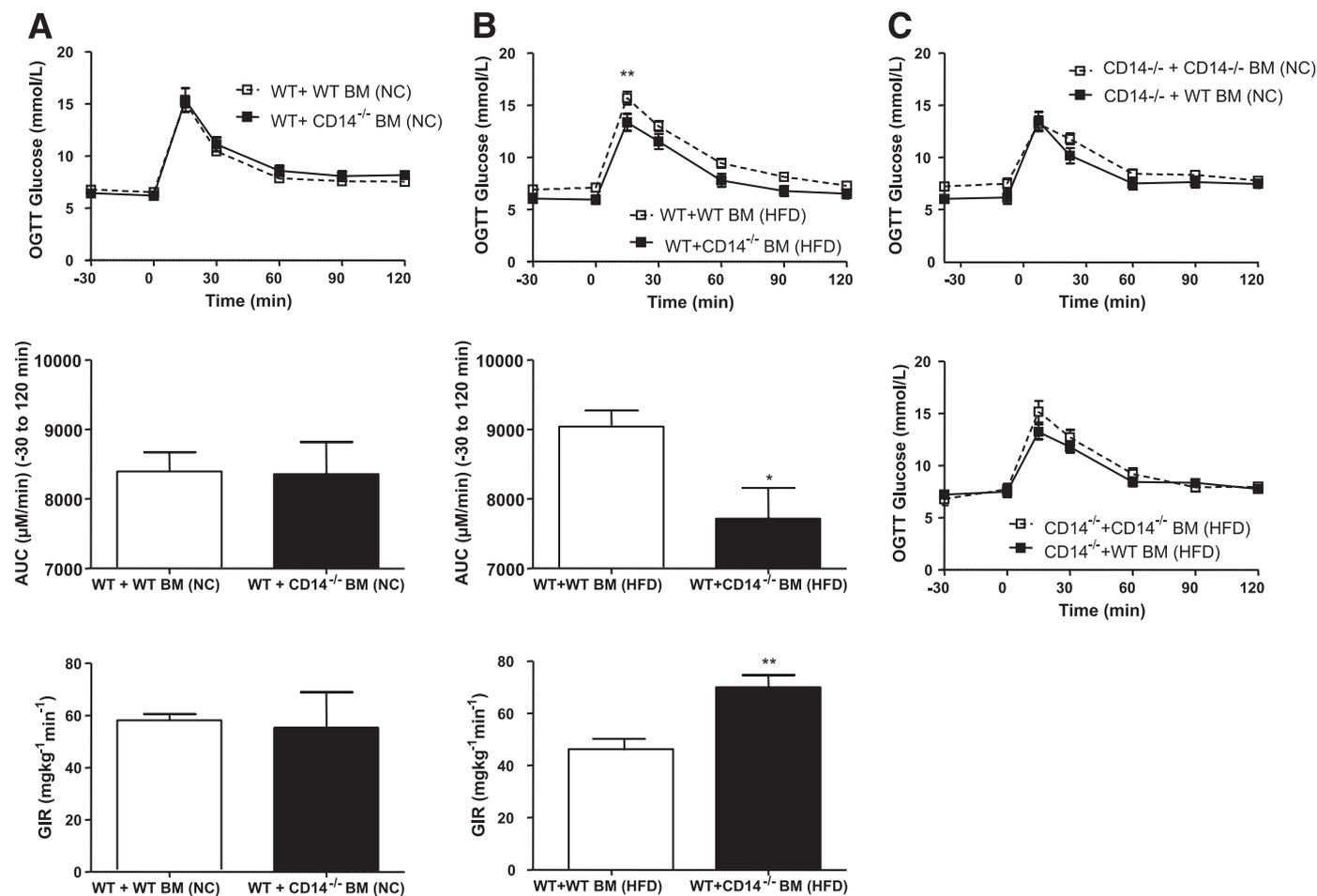


FIG. 1. Glucose tolerance time course in WT mice. **A** and **B**: Glucose tolerance test (*top*) and the corresponding area under the curve ($\mu\text{mol/L}/\text{min}$, *middle*) and glucose infusion rates (*bottom*) in WT mice grafted with cells from CD14 KO mice (CD14^{-/-}) and fed normal chow or HFD. Data are from 6–8 mice per group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ for WT mice grafted with cells from CD14 KO mice vs. WT mice grafted with cells from WT donor using Student *t* test. Glucose infusion rate calculations were made during the last 60 min of the 180-min clamp in steady-state condition. **C**: Glucose tolerance test in CD14 KO mice (CD14^{-/-}) grafted with cells from CD14 KO or WT mice and fed normal chow or HFD ($n = 6–8$ mice per group). AUC, area under the curve; BM, bone marrow; GIR, glucose infusion rate; NC, normal chow; OGTT, oral glucose tolerance test.

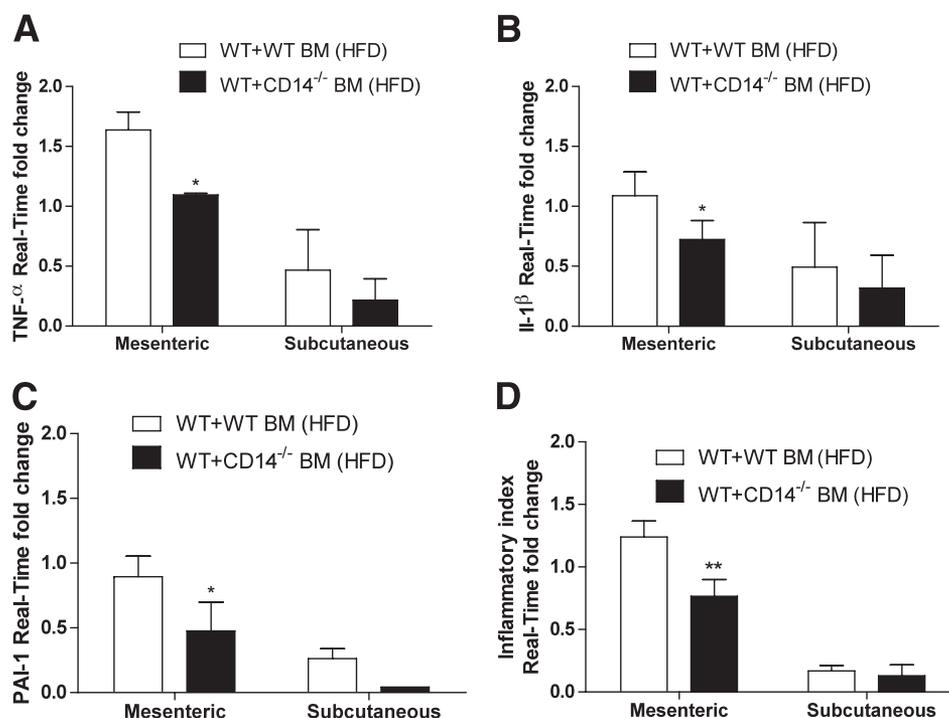


FIG. 2. Gene expression in fat from CD14^{-/-} mice and HFD effect. mRNA concentration coding for TNF- α (A), IL1- β (B), plasminogen activator inhibitor-1 (C), and inflammatory index (D) in the mesenteric and subcutaneous adipose depots from WT mice grafted with cells from WT or CD14 KO mice (CD14^{-/-}) fed HFD. The inflammatory index was calculated as follows. The relative mRNA concentration was quantified as fold change over an internal control gene (*RPL19*) for all individuals and for all cytokines considered. Then all relative quantifications were pooled (including plasminogen activator inhibitor-1, IL1- β , and TNF- α). Data are from 6–8 mice per group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ for WT mice grafted with cells from CD14 KO mice vs. WT mice grafted with cells from WT donor using Student *t* test. BM, bone marrow; PAI, plasminogen activator inhibitor.

result in improved inflammatory activity in adipose tissue and increased insulin action. It is known that an excess of sCD14 buffers the inflammatory signals, avoiding their exposure with cell-anchored CD14. To analyze this hypothesis, we clamped mice at a low physiologic insulin infusion rate ensuring a total inhibition of hepatic glucose production and submaximal peripheral insulin known to stimulate glucose utilization. After a 4-h infusion with rh-sCD14, insulin sensitivity was increased in WT mice (Fig. 3A) to a level similar to what was observed in CD14 KO mice not infused with the recombinant protein (18). The insulin-sensitizing action of sCD14 was totally absent in CD14 KO mice, showing the specificity of the effect (Fig. 3A).

Effects of rh-sCD14 in mice fed HFD. To further test the effects of rh-sCD14 on insulin sensitivity, we also tested this recombinant protein in C57BL/6 J mice previously fed a Western-type diet containing 21% fat for up to 28 weeks (high fat-fed mice). Fasting blood glucose levels were similar in rh-sCD14-treated versus vehicle-treated mice (Fig. 3B). However, glucose tolerance significantly improved after treatment with rh-sCD14. The area under the curve of blood glucose after IPGTT was 38% lower in rh-sCD14-treated mice compared with vehicle ($P = 0.002$, by two-way ANOVA, Fig. 3C).

Body weight and daily food intake were not significantly different after rh-sCD14 or vehicle treatment in high fat-fed mice for 12 days. Likewise, rh-sCD14 treatment did not change the weight of epididymal adipose tissue or soleus muscle.

Effects of rh-sCD14 on adipose tissue gene expression in mice fed HFD. We found 3,479 genes whose expression in adipose tissue was significantly different in

rh-sCD14-treated mice versus vehicle. Of all these genes, only those with a P value < 0.01 and a fold change of at least 1.5 were considered differentially expressed, giving a total of 82 genes.

Supplementary Table 1 shows the list of genes that were most changed (fold change of at least 1.75) with respect to all genes (3,479) analyzed. Some gene families—such as the *APOA*, *APOB*, and *APOC* genes—whose functions are clearly related to lipid metabolism appeared repeatedly in the full list of 82 genes. The microarray analysis of the expression of key genes involved in lipid metabolism and inflammation was confirmed by quantitative PCR (Supplementary Fig. 3). Supplementary Figs. 4 and 5 show the two top significant networks derived by the Ingenuity software. Of note, the two top selected networks dealt with inflammatory pathways and metabolism. No gene was considered to be differentially expressed in muscle of CD14-treated versus untreated mice.

Effects of rh-sCD14 in *ob/ob* mice. Fasting blood glucose decreased significantly after rh-sCD14 treatment (242 ± 30 vs. 153 ± 14 mg/dL, for vehicle- and rh-sCD14-treated mice, respectively; $P = 0.02$) (Fig. 3E). In addition, glucose tolerance during an IPGTT improved significantly after treatment with rh-sCD14 ($P = 0.02$, by two-way ANOVA, Fig. 3F) in parallel with a decrease in the area under the curve for serum insulin ($P = 0.0001$) and glucose/insulin ratio (Fig. 3G). Body weight and daily food intake did not differ significantly after treatment with rh-sCD14 or vehicle for 12 days (Fig. 3D and data not shown). Likewise, rh-sCD14 treatment did not change the weight of epididymal adipose tissue or soleus muscle (data not shown).

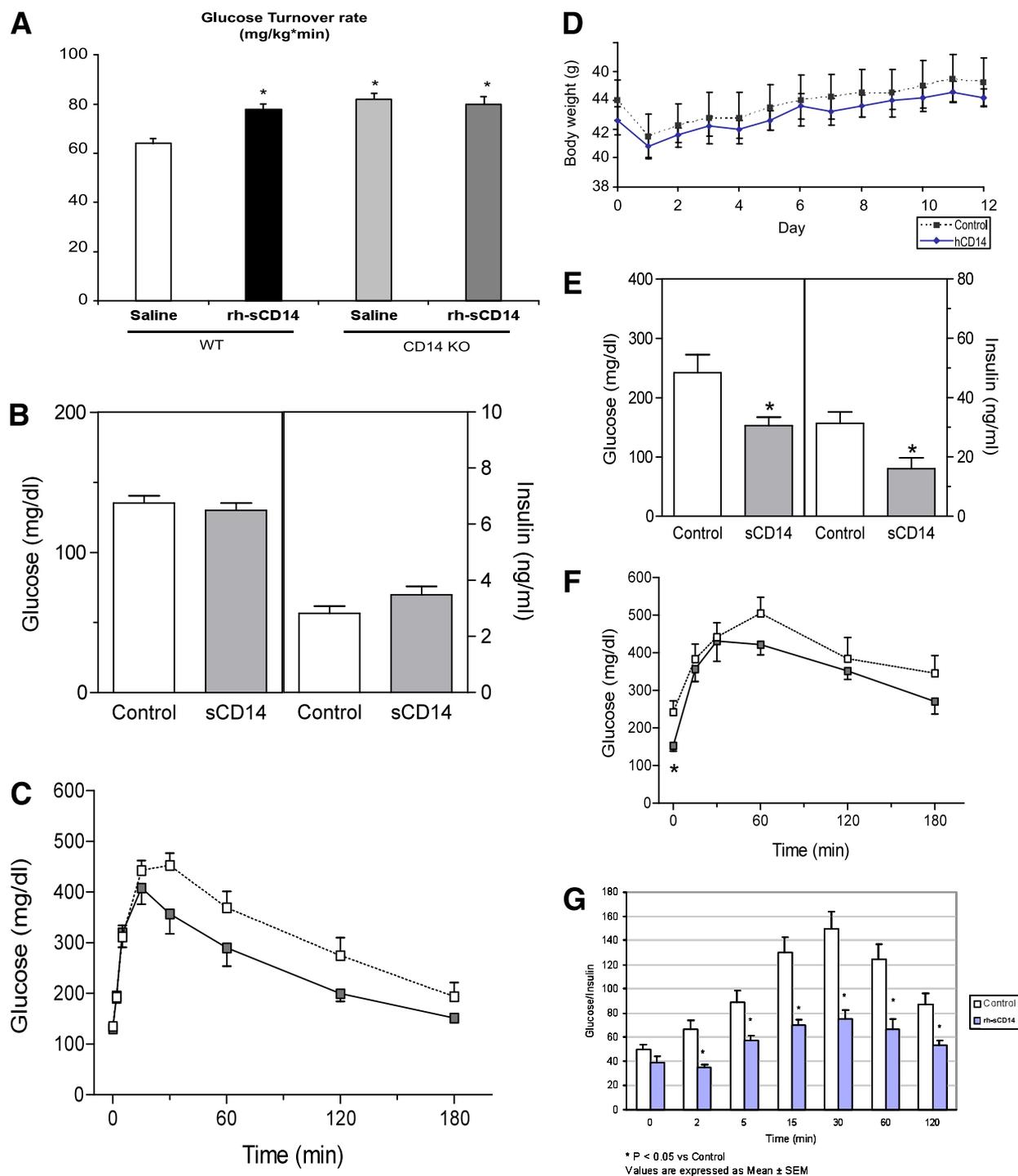


FIG. 3. Effects of rh-sCD14 on insulin action and glucose turnover. **A:** Glucose turnover rates (mg/kg/min) of WT and CD14 KO mice infused with rh-sCD14 or saline during a hyperinsulinemic glucose clamp ($n = 6-8$ mice per group). * $P < 0.05$ for sCD14 vs. saline treatment, using Student t test. Effects of rh-sCD14 ($n = 9$) or vehicle ($n = 9$) in high fat-fed mice on **(B)** fasting glucose and insulin concentrations and **(C)** glucose after IPGTTs. Glucose (2 g/kg) was injected intraperitoneally after an overnight fast. Effects of treatment with rh-sCD14 or vehicle in *ob/ob* mice on body weight **(D)**, fasting glucose and insulin concentrations ($n = 4-5$) **(E)**, and IPGTT **(F)**. Dashed line, mice treated with vehicle; continuous line, mice treated with rh-sCD14. **G:** Glucose/insulin ratio. Two-way ANOVA test indicated a significant difference between the glucose ($P = 0.002$) and insulin ($P < 0.0001$) curves of sCD14- and vehicle-treated mice. * $P < 0.05$ for sCD14 vs. vehicle treatment, using Student t test. (A high-quality color representation of this figure is available in the online issue.)

Studies in humans. CD14 mRNA expression was evaluated in human subcutaneous adipose tissue in two independent studies. In the first study, the expression of CD14 was increased in 19 obese subjects (10 men and 9 women, BMI 30.7 ± 5 kg/m²) compared with 13 lean subjects (8 men and 5 women, BMI 22.9 ± 1.4 kg/m²)

(0.054 ± 0.029 vs. 0.032 ± 0.015 relative units, $P = 0.02$). CD14 mRNA expression was linearly associated with BMI ($r = 0.40$, $P = 0.02$). In the replication study, we evaluated 40 subjects: 4 lean (BMI 22.3 ± 1.7 kg/m², 1 man), 12 overweight (BMI 26.9 ± 1.8 kg/m², 3 men), and 24 obese (BMI 45.9 ± 4.1 kg/m², 4 men). The three groups of

subjects were similar in age (43.5 ± 13.7 vs. 47.8 ± 12.2 vs. 45.3 ± 12.4 years, $P = 0.8$) and sex. CD14 mRNA expression increased with obesity status (Fig. 4A). Systemic inflammation contributed to this association to some extent, given the linear association between CD14 mRNA expression and peripheral white blood cell count ($r = 0.37$, $P = 0.02$).

CD14 mRNA expression decreased significantly during in vitro differentiation of human preadipocytes into adipocytes when CypA was used as an internal control ($P < 0.005$, Fig. 4B). CD14 protein concentrations, which were concordant with CD14 mRNA levels, were significantly increased in both isolated preadipocytes and adipocytes from obese subjects when compared with lean subjects (Fig. 4C). Further supporting the role of inflammation on increased CD14 gene expression, TNF- α (100 ng/mL) administration during 48 h led to significantly increased CD14 gene expression in human adipocytes ($P = 0.003$) (Fig. 4D).

Finally, we evaluated circulating sCD14 concentrations. Women showed significantly higher circulating sCD14 concentrations than men in parallel to their physiologically increased percent fat mass (4.81 ± 1.8 vs. 4.13 ± 1.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Circulating sCD14 was significantly associated with both absolute fat mass ($r = 0.19$, $P = 0.02$) and percent fat

mass ($r = 0.20$, $P = 0.01$), and this relationship was stronger in women ($r = 0.31$ and $r = 0.32$, for absolute and percent fat mass, $P = 0.023$ and $P = 0.018$, respectively).

DISCUSSION

The inflammatory signals leading to metabolic derangement are known to be sensed by TLR4, among others (8,20,21). However, TLR4 does not interact directly. Upstream to TLR4 is the multifunctional receptor CD14. Both circulating sCD14 and cellular CD14 receptors interact with the inflammatory signals in close relationship with TLR4. Any strategy directed at blocking cellular CD14 will be capable of interrupting the inflammatory signal before it is transduced.

Mice harboring a null mutation in the *CD14* gene showed decreased mesenteric fat, among other phenotypic characteristics of type 2 diabetes (17). However, genetic deletion provides little information about the relative contribution of the different cells expressing CD14 leading to this phenotype. According to current findings, both bone marrow-derived macrophages and tissue macrophages expressing CD14 seem important targets in systemic inflammation and insulin action.

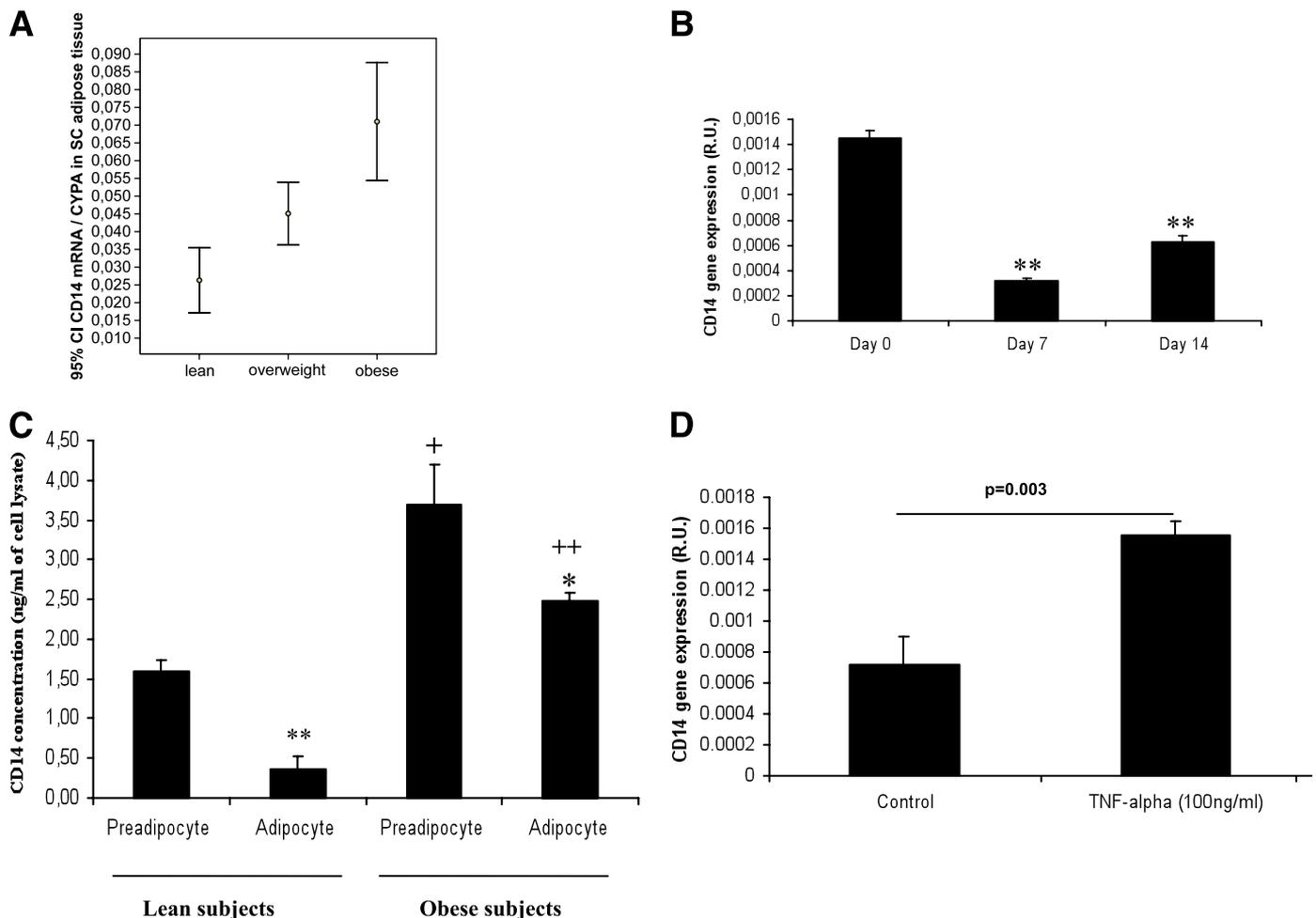


FIG. 4. CD14 gene expression in obese subjects and during adipogenesis. **A:** The 95% CI for the mean of CD14 mRNA expression according to obesity status. **B:** Study of CD14 mRNA expression during in vitro differentiation of human adipocytes. ****** $P < 0.005$ in comparison with day 0. **C:** Study of CD14 mRNA in isolated preadipocytes and adipocytes from lean and obese subjects. *** $P < 0.05$** in comparison with preadipocyte. **** $P < 0.005$** in comparison with preadipocyte. *** $P < 0.05$** in comparison with lean cells. **** $P < 0.005$** in comparison with lean cells. **D:** TNF- α (100 ng/mL) administration during 48 h significantly increased CD14 gene expression in human adipocytes ($P = 0.003$). SC, subcutaneous.

As expected, WT mice grafted with bone marrow stem cells from WT donor mice became insulin resistant and glucose intolerant when fed an HFD when compared with mice fed normal chow. In confirmation that bone marrow-derived macrophages were responsible for these effects, WT mice grafted with cells from CD14 KO mice resisted the occurrence of glucose intolerance, insulin resistance, and adipose tissue inflammation when fed an HFD. The reduced cytokine mRNA concentration in mesenteric adipose depot but not the subcutaneous fat depot suggests that the former was targeted by CD14 activation. This difference was probably related to the well-known dissimilar biochemical and metabolic properties of the visceral fat versus the subcutaneous fat (22). This dataset fits with what has been described using TLR4 KO mice (8,20,21).

However, CD14 expression in adipocytes could also be responsible for these effects because glucose intolerance did not worsen in CD14 KO mice grafted with bone marrow stem cells from WT mice fed an HFD, when compared with recipient KO mice grafted with cells from CD14 KO donor mice also fed an HFD (Fig. 3A).

Given the difficulty of producing effective “diet-induced obesity” after bone marrow transplantation, tissue-specific CD14 KOs will be needed to more fully characterize the importance of the different tissue sources of CD14 in the obese state.

For all these reasons, we explored whether these findings could be extended to normal physiology. One way to decrease CD14 signaling is to deliver rh-sCD14 that competes with endogenous CD14 receptor in the membrane of macrophages and other myeloid cells. Blocking cellular CD14 in macrophages and adipocytes by excess sCD14 resulted in a decrease of the inflammatory pathways (interleukin [IL]-1 α and IL-1 β among them, Supplementary Fig. 3C) specifically in adipose tissue (and not in muscle) and improved insulin action. This was found not only at the individual gene but also at multiple levels, as suggested by the microarray results in adipose tissue, confirmed by quantitative PCR (Supplementary Fig. 3). Expression profiles of genes listed in Supplementary Table 1 were analyzed using the Ingenuity Pathway Analysis methodology to compose a set of interactive networks, taking into consideration canonical pathways and the relevant biological interactions.

A number of canonical pathways were revealed to play an important role, especially those related with glycolysis and gluconeogenesis and IL-4 signaling. Next, two significant biological networks were identified by the Ingenuity Pathway Analysis. Further analysis of the highest scored network (score 24, 14 focus genes) identified inflammatory response ($P < 0.028$), genetic disorder ($P < 0.048$), and inflammatory disease ($P < 0.0375$) as the most significant biological functions linked to these networks (Supplementary Figs. 3–5).

Treatment with rh-sCD14 was associated with improved glucose tolerance in three animal models. In WT mice, rh-sCD14 led to increased insulin action. This improvement consistently was not observed in CD14 KO mice. In obese high-fat mice, rh-sCD14 also led to improvement of glucose tolerance. In *ob/ob* mice, a model with established diabetes and prominent insulin resistance, treatment with rh-sCD14 resulted in lowering of plasma glucose and insulin concentrations. It is therefore conceivable that treatment with sCD14 in individuals with decreased serum sCD14 concentrations may increase their levels above a certain threshold of functional deficiency.

LPS, an abundant component of the outer membrane of gram-negative bacteria, is one of the most potent inflammatory stimuli in animal host cells. Whereas LPS recognition benefits the host by sensing the presence of bacteria and mobilizing defense mechanisms, an exaggerated response to LPS may contribute to the harmful sequelae of severe inflammation (23). The buffering of LPS is crucial not only during acute inflammatory and infectious processes. In normal humans, triglyceride-rich lipoproteins contain detectable levels of endogenous LPS that are presumably scavenged *in vivo* (24). LPS is extraordinarily ubiquitous in nature, being present in food and water and in normal indoor environments as a constituent of house dust (25). In the mice studied, plasma LPS concentration ranged between 6 and 15 EU/mL with a mean of 7.5 EU/mL. Of note, an HFD led to increased circulating LPS concentrations even in humans (26). Endogenous LPS is also continually produced within the gut by the death of gram-negative bacteria and absorbed into intestinal capillaries. Therefore, low-grade portal venous LPS is the status quo in humans (27). LPS is increasingly recognized as a strong stimulatory factor involved in the release of several cytokines that are key inducers of insulin resistance and other metabolic disturbances. A two- to threefold increased plasma concentration of LPS has been demonstrated to constitute a sufficient molecular mechanism for triggering insulin resistance, obesity, and type 2 diabetes (18,28). This process was named “metabolic endotoxemia,” in which day-to-day circulating endotoxin (LPS) for 1 month affects inflammation, but not enough to produce acute endotoxemia (18,28).

The host has numerous mechanisms that downregulate responses to LPS and remove it from the circulation and tissues. sCD14 can both potentiate and downregulate responses to LPS. sCD14 was originally described as an LPS inhibitor, and other studies have described inhibitory effects of high concentrations of sCD14 under various conditions (23). Other works have shown that in plasma, sCD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins (23). Moderate to high concentrations of sCD14 that are found in human blood may help to prevent LPS-induced systemic inflammation, whereas lower concentrations of sCD14 may promote inflammation (23).

It remains to be determined which cells are directly sensitive to metabolic endotoxemia-induced inflammation in human obesity. At first glance, the increased CD14 mRNA and protein levels in adipocytes of obese subjects make these cells more sensitive to the effects of metabolic endotoxemia. A proinflammatory environment was possibly behind this observation because TNF- α administration led to increased CD14 mRNA in adipocytes. In fact, CD14 mRNA decreased with preadipocyte conversion into adipocytes in parallel to the downregulation of inflammatory genes during adipocyte differentiation (Fig. 4B).

The scenario seems more complex. We also found that circulating sCD14 was proportional to fat mass. This association may be envisioned as an attempt to buffer metabolic endotoxemia with increased fat mass. However, increased metabolic endotoxemia possibly results in increased turnover of sCD14 because weight loss results in both decreased LPS (J.M.M.-N. and J.M.F.-R. unpublished results) and increased sCD14 levels (29).

Finally, our results are consistent with studies reporting lower levels of proinflammatory cytokines and apparent

protection from atherosclerosis in subjects with gene *TLR4* mutations (30).

In summary, systemic CD14 expression might play a role in obesity and inflammation-induced insulin resistance. The administration of sCD14 could be a therapeutic strategy to ameliorate these phenotypes.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by research grants from the Instituto de Salud Carlos III (CIBERobn and CIBERDEM), by a grant from the Société Francophone du Diabète (SFD) and GlaxoSmithKline, by a grant from the Société Française de Diabétologie (R.B.), and by Grant MTM2008-00642 (A.S.-P.). This work was partially supported by FLORINASH (7th FP). No other potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

All authors of this article directly participated in the execution and analysis of the study. J.M.F.-R. carried out the conception, design, and coordination of the study; performed the statistical analysis; and wrote the manuscript. S.P.P. carried out the animal studies, analyzed the biochemical variables, and performed the statistical analysis. E.L. carried out the animal studies, analyzed the biochemical variables, performed the statistical analysis, and was responsible for the experiment with LPS. J.M.M.-N. and A.W. carried out the animal studies, analyzed the biochemical variables, and performed the statistical analysis. M.S. carried out the animal studies, analyzed the biochemical variables, performed the statistical analysis, and performed the HFD-based obese and diabetic mouse models. E.S. carried out the animal studies, analyzed the biochemical variables, and performed the statistical analysis. A.S.-P. and F.C.P. analyzed the microarray data. J.V. participated in the conception and coordination of the study. M.R.C. carried out the animal studies, analyzed the biochemical variables, and performed the statistical analysis. W.R., R.B., and A.Z. participated in the conception and coordination of the study.

The authors thank P. Cani, INSERM, and M. Iglesias, INSERM, for technical expertise and Roser Rodriguez, CIBERobn, for administrative help.

REFERENCES

- Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 1998;41:1241–1248
- Fernández-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 2003;24:278–301
- Fernández-Real JM, Broch M, Richart C, Vendrell J, López-Bermejo A, Ricart W. CD14 monocyte receptor, involved in the inflammatory cascade, and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1780–1784
- Fernández-Real JM, Pickup JC. Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2008;19:10–16
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796–1808
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112:1821–1830
- Tsou CL, Peters W, Si Y, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 2007;117:902–909
- Saber M, Woods NB, de Luca C, et al. Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice. *Cell Metab* 2009;10:419–429
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990;249:1431–1433
- Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, et al. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity* 1994;1:509–516
- Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 1995;13:437–457
- Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol* 2000;165:3541–3544
- Pan Z, Zhou L, Hetherington CJ, Zhang DE. Hepatocytes contribute to soluble CD14 production, and CD14 expression is differentially regulated in hepatocytes and monocytes. *J Biol Chem* 2000;275:36430–36435
- Fearn C, Kravchenko VV, Ulevitch RJ, Loskutoff DJ. Murine CD14 gene expression in vivo: extramylloid synthesis and regulation by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1995;181:857–866
- Sewter CP, Digby JE, Blows F, Prins J, O'Rahilly S. Regulation of tumour necrosis factor-alpha release from human adipose tissue in vitro. *J Endocrinol* 1999;163:33–38
- Daniel JA, Elsasser TH, Morrison CD, et al. Leptin, tumor necrosis factor-alpha (TNF), and CD14 in ovine adipose tissue and changes in circulating TNF in lean and fat sheep. *J Anim Sci* 2003;81:2590–2599
- Johnson GB, Riggs BL, Platt JL. A genetic basis for the "Adonis" phenotype of low adiposity and strong bones. *FASEB J* 2004;18:1282–1284
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1761–1772
- Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, Gourdy P. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* 2009;150:2109–2117
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:3015–3025
- Poggi M, Bastelica D, Gual P, et al. C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* 2007;50:1267–1276
- Pérez-Pérez R, Ortega-Delgado FJ, García-Santos E, et al. Differential proteomics of omental and subcutaneous adipose tissue reflects their unalike biochemical and metabolic properties. *J Proteome Res* 2009;8:1682–1693
- Thompson PA, Tobias PS, Viriyakosol S, Kirkland TN, Kitchens RL. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits responses to cell-bound LPS. *J Biol Chem* 2003;278:28367–28371
- Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Rapp JH. Human very low density lipoproteins and chylomicrons can protect against endotoxin-induced death in mice. *J Clin Invest* 1990;86:696–702
- Michel OJ, Kips J, Duchateau J, et al. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1641–1646
- Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, et al. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1219–1223
- Jacob AI, Goldberg PK, Bloom N, Degenshein GA, Kozinn PJ. Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* 1977;72:1268–1270
- Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008;57:1470–1481
- Manco M, Fernandez-Real JM, Vecchio FM, et al. The decrease of serum levels of human neutrophil alpha-defensins parallels with the surgery-induced amelioration of NASH in obesity. *Obes Surg* 2010;20:1682–1689
- Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002;347:185–192



ORIGINAL ARTICLE

Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota

Matteo Serino,^{1,2} Elodie Luche,^{1,2} Sandra Gres,^{1,2} Audrey Baylac,³ Mathieu Bergé,³ Claire Cenac,⁴ Aurelie Waget,^{1,2} Pascale Klopp,^{1,2} Jason Iacovoni,^{1,2} Christophe Klopp,⁵ Jerome Mariette,⁵ Olivier Bouchez,⁶ Jerome Lluch,⁶ Françoise Ouarné,⁷ Pierre Monsan,^{7,8,9,10} Philippe Valet,^{1,2} Christine Roques,³ Jacques Amar,¹¹ Anne Bouloumié,^{1,2} Vassilia Théodorou,⁴ Remy Burcelin^{1,2}

See Commentary, p 474

► Additional materials are published online only. To view these files please visit the journal online (<http://gut.bmj.com/content/61/4.toc>).

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to

Dr Remy Burcelin, Université Paul Sabatier (UPS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 1048, Institut de Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I²MC), F-31432 Toulouse Cedex 4, France; remy.burcelin@inserm.fr

Revised 3 October 2011
Accepted 18 October 2011
Published Online First
22 November 2011

ABSTRACT

Objective The gut microbiota, which is considered a causal factor in metabolic diseases as shown best in animals, is under the dual influence of the host genome and nutritional environment. This study investigated whether the gut microbiota per se, aside from changes in genetic background and diet, could sign different metabolic phenotypes in mice.

Methods The unique animal model of metabolic adaptation was used, whereby C57Bl/6 male mice fed a high-fat carbohydrate-free diet (HFD) became either diabetic (HFD diabetic, HFD-D) or resisted diabetes (HFD diabetes-resistant, HFD-DR). Pyrosequencing of the gut microbiota was carried out to profile the gut microbial community of different metabolic phenotypes. Inflammation, gut permeability, features of white adipose tissue, liver and skeletal muscle were studied. Furthermore, to modify the gut microbiota directly, an additional group of mice was given a gluco-oligosaccharide (GOS)-supplemented HFD (HFD+GOS).

Results Despite the mice having the same genetic background and nutritional status, a gut microbial profile specific to each metabolic phenotype was identified. The HFD-D gut microbial profile was associated with increased gut permeability linked to increased endotoxaemia and to a dramatic increase in cell number in the stroma vascular fraction from visceral white adipose tissue. Most of the physiological characteristics of the HFD-fed mice were modulated when gut microbiota was intentionally modified by GOS dietary fibres.

Conclusions The gut microbiota is a signature of the metabolic phenotypes independent of differences in host genetic background and diet.

INTRODUCTION

The increasing fat-to-fibre ratio in the Western diet is now considered among the major triggering factors of metabolic impairments such as obesity and type II diabetes.^{1,2} Using axenic mice,^{3–6} a key advancement has been made during the last decade when the gut microbiota was first associated with, and then causally involved in, the regulation of metabolic diseases. Furthermore, next generation sequencing techniques have allowed a more detailed study of gut microbes by avoiding laboratory cultivation. Pyrosequencing has permitted the

Significance of this study

What is already known about this subject?

- Gut microbiota alterations have been shown to be associated and causally linked to metabolic diseases such as type II diabetes and obesity in humans and mice.
- A high-fat diet is able to unbalance the gut microbiota and impair the gut barrier resulting in increased endotoxaemia and metabolic diseases in mice.
- A core gut microbiome has been shown to exist and divergences from this core define a healthy (ie, lean) versus diseased (ie, obese) status.

What are the new findings?

- A change in the ratio of Firmicutes to Bacteroidetes characterises the different metabolic phenotypes independently from the genetic background or the diet during the metabolic adaptation of mice to the dietary treatment.
- Direct treatment of the gut microbiota using dietary fibres (gluco-oligosaccharide) affects the metabolic adaptation of the mice independently from their genetic background or their diet.
- Different gut microbial community profiles can sign the same metabolic phenotype such as the resistance to diabetes.
- Gut physiology and white adipose tissue mainly affect the responsiveness of mice to the high-fat diet independently from their genetic background or the diet.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- Bacterial markers could predict the occurrence of a given metabolic phenotype (ie, diabetes) and, furthermore, the treatment of apparently healthy patients with nutritional additives targeting intestinal microbiota might prevent the occurrence of metabolic diseases independently from risk factors such as a fat-enriched diet or a genetic background.

identification of the so-called ‘bacterial signature’ of obesity—an increased Firmicutes to Bacteroidetes ratio in humans⁷ and mice.⁸



This paper is freely available online under the BMJ Journals unlocked scheme, see <http://gut.bmj.com/site/about/unlocked.xhtml>

We were the first to link the gut microbiota to inflammation-driven^{9–10} insulin resistance by showing the lipopolysaccharide (LPS) as an initiator of metabolic impairment.¹¹ A continuous infusion of low-dose LPS induced low-grade chronic inflammation and most of the features of the early onset of metabolic diseases such as visceral fat deposition, glucose intolerance and hepatic insulin resistance.¹¹ Several studies subsequently showed gut microbiota-driven modifications of white adipose tissue (WAT) plasticity by regulating fat storage,¹² energy harvesting,¹³ diet-induced obesity¹⁴ and adiposity,¹⁵ presenting WAT as a major target of gut microbes.

However, both the genetic background of the host and the dietary environment are responsible for the occurrence of metabolic diseases by shaping the gut microbiota, even if this concept can be challenged by the notion of diabetic-sensitive and diabetic-resistant mice.¹⁶ We first showed that, in inbred male C57Bl/6 mice fed a high-fat carbohydrate-free diet (HFD) for 9 months, most of the mice became diabetic and obese but some remained lean and non-diabetic or diabetic but with a lean phenotype.¹⁶ Importantly, the metabolism of each phenotype was different, showing that, despite an unchanged genetic background and diet, a metabolic adaptation occurred. We therefore postulated that a different gut microbiota could be associated with the metabolic phenotypes. In this study we focus on the occurrence of diabetes, without obesity as a confounding factor, by pyrosequencing gut microbiota from mice fed a HFD for 3 months and comparing lean diabetes-sensitive (HFD-D) mice with lean diabetes-resistant (HFD-DR) mice. Moreover, to understand whether the gut microbiota directly affected the metabolic phenotypes, another group of mice was given a gluco-oligosaccharide (GOS)-supplemented HFD (HFD+GOS) for 3 months. Our results showed that a phenotype-specific gut microbiota signature exists, characterising the metabolic heterogeneity of mice aside from changes in genetic background and diet.

MATERIALS AND METHODS

Animal model and dietary treatment

A cohort of 100 C57Bl/6 4-week-old male mice was fed a HFD (approximately 72% fat (corn oil and lard), 28% protein and <1% carbohydrate; SAFE, Augy, France) for 3 months. In addition, another group of 10 mice was fed a α 1-2-GlucoOligoSaccharide¹⁷ (O- α -D-glc_p(1-2)-O- α -D-glc_p(1-6)n-O- α -D-glc_p(1-4) where (2<n<7), GOS)-supplemented HFD (500 mg/mouse/day, 10% of daily intake) (HFD+GOS) for 3 months. Mice were group-housed (five mice per cage) in a controlled environment (inverted 12 h daylight-cycle, light off at 10:00 h). Mice were fasted for 6 h and killed by cervical dislocation; the tissues were collected and snap-frozen in liquid nitrogen. All animal experimental procedures were approved by the local ethical committee of Rangueil University Hospital (Toulouse).

Glucose tolerance test, plasma non-esterified fatty acids and triglyceride

After 3 months of HFD, an intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) was performed to phenotype the mice as diabetes resistant (HFD-DR) or diabetic (HFD-D). Briefly, mice fasted for 6 h were injected with glucose (1 g/kg) into the peritoneal cavity as previously described.¹¹

Plasma levels of non-esterified fatty acids (NEFA) and triglycerides were measured using commercial kits (Wako Diagnostics, Richmond, Virginia, USA and Triglycerides enzymatiques PAP 150, Biomerieux, Marcy l'Etoile, France, respectively).

Luminex analysis

Simultaneous ELISA assays (tumour necrosis factor α (TNF α), interleukin 6 (IL-6), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), insulin, leptin, resistin) were performed with 10 μ l plasma and analysed by a continuous flux fluorimeter using Multiplex Immunoassays, Xmap technology (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA).

WAT morphometry and F4/80 staining

Adipocyte numbers were classified according to size, estimated by a point counting technique on paraffin-embedded H&E counterstained sections, and expressed as a percentage of the total population counted, as previously described.¹¹ The total count ranged from 3275 to 7052 cells per condition. The mean surface area (μ m²) of the adipocytes was calculated using image analyser software (ImageJ). F4/80 staining was performed as follows. Ethanol-fixed paraffin-embedded adipose tissue sections were deparaffinised and rehydrated. Sections were blocked in normal serum and incubated overnight with primary rat anti-mouse F4/80 monoclonal antibody (1/1000; Serotec, Oxford, UK). Endogenous peroxidase activity was quenched when incubated with 3% hydrogen peroxide for 20 min. Secondary antibody staining was done using goat anti-rat biotinylated Ig antibody (1/500, 30 min, room temperature (RT)) and streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (1/500, 30 min, RT) and detected with 3,3'-diaminobenzidine. Sections were counterstained with haematoxylin before dehydration and coverslip placement. The number of F4/80 positive cells per microscope field was counted and divided by the total number of adipocytes in the section; 5–12 fields were counted per sample.

FACS analysis

Cells from the stroma vascular fraction (SVF) were obtained after collagenase digestion of fresh mouse visceral WAT, as previously described.¹⁸ Murine SVF cells (100 000 cells) were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antibodies (CD4, F4/80), PE-conjugated antibodies (CD3, CD34), PercP-Cy5.5-conjugated antibody (CD11b), APC-conjugated antibody (CD8, CD31) or respective isotype controls. Analyses were performed using a FACS Calibur flow cytometer as previously described.¹⁸

DNA denaturing gradient gel electrophoresis (DNA DGGE)

Total DNA was extracted from frozen caecum contents using the TriPure reagent (Roche Diagnostics, Meylan, France) according to the manufacturer's protocol. 200 ng DNA were amplified by PCR using a *Taq* Polymerase (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA) and 300 nM denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)-specific 16S rRNA universal primers (forward primer 5'-CG CCCGGGGCGCGCCCCGGGGCGGGGGCGGGGGCACGGGGGG-AC TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'; reverse primer 5'-GTATTA CCGCGGCTGCTGGCAC-3'), carrying (forward primer only) a GC-enriched region (GC clamp), generating 233 bp amplicons. The size of the latter was checked by 2% agarose gel electrophoresis. 80 ng of amplicons were loaded on 8% acrylamide gel with a 35–55% (w/v) urea denaturant gradient. The gels were run overnight in TAE 1X at 60°C. The following day the gels were stained for 30 min in TAE 1X-SYBR safe DNA gel staining and scanned with a Typhoon 9400 instrument (Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe GmbH Branch France, Velizy-Villacoublay, France). The band profile was analysed using PermutMatrixEN software Version 1.9.3.0.¹⁹

RNA extraction and real-time PCR

Total RNA was extracted from frozen subcutaneous or visceral WAT using the RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). 500 ng RNA were retrotranscribed for 2 h at 37°C using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with random hexamers. Real-time PCR was performed with 12.5 ng cDNA and 900 or 300 nM concentrations of forward and reverse primers in a final volume of 20 µl using the SYBR green or TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Fluorescence was monitored and analysed in a GeneAmp 7500 detection system instrument (Applied Biosystems). Analysis of the 18S ribosomal RNA was done in parallel using the primers and probe of the ribosomal RNA control Taqman Assay Kit (Applied Biosystems) to normalise gene expression. The results are expressed as $2^{-(Ct_{18S}-Ct_{gene})}$, where Ct corresponds to the number of cycles needed to generate a fluorescent signal above a predefined threshold. Primers were designed using the Primer Express software (Applied Biosystems).

Bacterial RT-PCR

Total RNA was extracted from frozen caecum contents using the TriPure reagent according to the manufacturer's protocol. 1 µg total RNA was retrotranscribed for 2 h at 37°C using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France). 10 ng cDNA were amplified using sense and antisense primers at a concentration of 300 nM and the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The bacterial primer sequences are reported in table 2 in the online supplement.

Gut paracellular permeability assay

Ileum, caecum and colon were collected from fed mice and strips mounted in Easymount Ussing-type chambers (Physiologic Instruments, San Diego, California, USA) with a flux area of 0.3 cm², as previously described.²⁰ After 15 min, one-fifth of the initial volume of the apical compartment (mucosal side) buffer solution was replaced with FITC-labelled dextran (4000 Da, 0.022 g/ml, Sigma). After 1 h the fluorescent intensity was measured on the serosal side of the chamber.

Protein extraction and western blot analysis

WAT, liver and skeletal muscle lysates were prepared as described elsewhere.²¹ The following antibodies were used: pSer536NF-κB, NF-κB, pSer2448mTOR, mTOR, pSer307IRS-1, IRS-1, IRS-2, pSer473Akt, Akt, β-actin, pThr172AMPKα, AMPK, pSer79ACC, ACC, pSer9GSK-3β, GSK-3β, pThr183/Tyr185SAPK/JNK, SAPK/JNK, SOCS-3 (Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint Quentin, France), PKCε and PKCθ (Santa Cruz, Heidelberg, Germany).

Intestinal tight junction proteins: western blot analysis

Ileal and caecal samples were homogenised in RIPA buffer (1% Igepal, 0.5% deoxycholic acid, and 0.1% SDS in Tris buffered saline solution 1X, pH 7.4) with protease inhibitors (Roche Diagnostics, Meylan, France) and centrifuged at 10 000g for 10 min (4°C). Protein concentrations were assayed using the BC Assay Uptima kit (Interchim, Montluçon, France). Equal amounts of protein per lane were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Optitran, Schleicher 1 Schuell Biosciences, Dassel, Germany). Membranes were blocked with 5% dry milk or 10% FCS in 0.1% Tween in TBS (TBS-T) for 2 h (RT) and then incubated overnight at 4°C with

primary antibodies. Immunoblotting was performed using polyclonal rabbit anti-occludin antibody (Zymed Laboratories, South San Francisco, California, USA) diluted 1:500 in 5% dry milk in TBS-T or polyclonal rabbit anti-ZO-1 (Zymed Laboratories) diluted 1:1000 or anti-GAPDH (Cell Signaling) diluted 1:1000 or anti-JAM-A (Abcam, Cambridge, UK) diluted 1:2500 in 10% FCS in TBS-T. After washing in TBS-T the membranes were incubated for 1 h at RT with secondary antibodies conjugated to IRDye 800CW (Li-COR). After washing again in TBS-T the membranes were briefly rinsed in TBS and scanned and analysed by an Odyssey IR scanner using Odyssey imaging software 3.0. Scan settings were medium or high image quality, 169 µm resolution and intensity 3.0–6.0 for both channels with no offset. Antibody signals were analysed as integrated intensities of regions defined around the bands of interest in either channel.

Pyrosequencing

Extraction and amplification of DNA

DNA was extracted from frozen caecum contents using the QIAamp DNA mini stool kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), slightly modified by adding a bead (≤106 µm diameter) beating step (6500 rpm, 3×30 s). 200 ng DNA were amplified by PCR using the *Pfu* DNA Polymerase (Fermentas, Saint-Rémy-lès-Chevreuse, France). The 16S rRNA V2 region was targeted by using the forward primer 8F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCT CAG-3' and reverse primer 338R 5'-GCTGCCTCCCGTAGGA GT-3'.²² Pyrosequencing was carried out on a multiplexed GS FLX-Ti, following the manufacturer's recommendations (454 Life Sciences, Roche). Six mice per group were sequenced in six runs (three mice per run).

Bioinformatic analysis

2 969 179, 2 533 380 and 2 403 166 raw sequence reads were first processed with 16SCleaner (<https://mulcyber.toulouse.inra.fr/plugins/mediawiki/wiki/ng6/index.php/16SCleaner>) to yield a total of 2 059 967, 1 479 791 and 1 591 906 reads from the HFD-DR, HFD-D and HFD+GOS groups, respectively. The Mothur package²³ was used, following the Costello stool analysis pipeline (http://www.mothur.org/wiki/Costello_stool_analysis), to further filter reads and generate taxonomic classification information (using the Silva database, <http://www.arb-silva.de/>) for a final set of 1 626 411, 959 215 and 1 182 616 reads. Permut-MatrixEN software version 1.9.3.0¹⁹ was used to identify clusters at the level of both mice groups and taxa.

Statistical analysis

The results are presented as means ± SEM. Statistical analysis was performed by one-way or two-way ANOVA followed by post hoc tests (Tukey or Bonferroni test, as reported) or by unpaired Student t test, using GraphPad Prism Version 5.00 for Windows Vista (GraphPad Software, San Diego, California, USA). p Values <0.05 were considered significant.

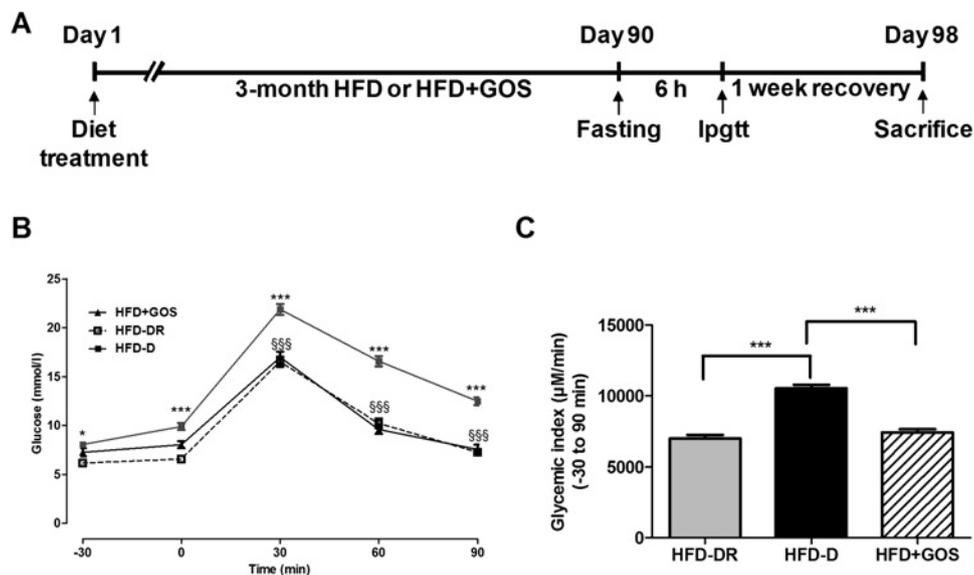
RESULTS

Metabolic adaptation to high-fat feeding after 3 months

To test whether metabolic phenotypes in HFD-fed mice were linked to a specific gut microbial signature, 100 4-week-old C57Bl/6 male mice were fed a diabetogenic/non-obesogenic carbohydrate-free (<1%) HFD for 3 months (figure 1A). An IPGTT was then performed and the mice were separated according to their resistance (HFD-DR) or sensitivity (HFD-D) to HFD-induced diabetes. HFD-D mice were characterised by

Gut microbiota

Figure 1 Metabolic adaptation after 3 months of high-fat diet (HFD) and change in phenotype by supplementation of HFD with gluco-oligosaccharides (GOS). (A) Timeline of the experimental protocol. (B) Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) in HFD-fed mice that became diabetic (HFD-D, closed squares, n=24), diabetes-resistant (HFD-DR, open squares, n=10) or fed a GOS-supplemented HFD (HFD+GOS, closed triangles, n=10). Data are shown as mean \pm SEM; * p <0.05, *** p <0.001 (HFD-D vs HFD-DR) and ^{SSS}p <0.001 (HFD-D vs HFD+GOS) (two-ANOVA and Bonferroni post test). (C) Glycaemic index; *** p <0.001 (unpaired Student t test).



higher glycaemia at all time points compared with HFD-DR mice (figure 1B), as also shown by the glycaemic index (figure 1C). To modify the gut microbiota directly, an additional group of 10 mice was fed HFD+GOS for 3 months. HFD+GOS mice showed a similar degree of glucose tolerance to HFD-DR mice (figure 1B,C) and to previously published results in a different glucose-intolerant model.²⁴

Analysis of multiple metabolic parameters

The metabolic adaptation to HFD was associated with numerous metabolic parameters. In plasma, fasting levels of NEFA increased in HFD-DR mice compared with HFD-D and HFD+GOS mice (see table 1 in online supplement). Conversely, plasma fasting and fed triglyceride levels increased in HFD-D mice compared with HFD-DR and HFD+GOS mice (see table 1 in online supplement). Fasting insulin was lower in HFD-D and HFD+GOS mice than in HFD-DR mice, whereas fed insulin levels did not vary significantly (see table 1 in online supplement). Body weight was recorded twice per month to ensure a lack of diet-induced obesity. As expected, no statistically significant change was observed (HFD-DR 26.5 ± 0.3 g, HFD-D 27.8 ± 0.3 g, HFD+GOS 28.4 ± 0.4 g; $p > 0.05$).

Metabolic adaptation to HFD is associated with metabolic phenotype-specific gut microbiota

To investigate the gut microbiota from metabolic phenotypes we first performed a DGGE on subsets of three mice per group as a primary validation of our hypothesis. DGGE data showed that the intestinal microbial profiles were considerably different among all metabolic phenotypes (see figure 2 in online supplement). Importantly, it was possible to cluster the three metabolic phenotypes according to Pearson tree analysis. However, HFD-DR and HFD-D mice were still characterised by some degree of similarity. Conversely, the gut microbial profile of HFD+GOS mice was even more different from HFD-DR and HFD-D mice (see figure 2 in online supplement).

We next quantified living bacteria in the caecum. Since up to 90% of gut microbiota is composed of Firmicutes and Bacteroidetes (two major bacterial phyla), we focused mostly on bacteria from these divisions. Quantitative RT-PCR was used to measure the 16S rRNA concentration of bacteria found

modulated during altered metabolism (see table 2 in online supplement). The results showed that the microbial composition varied according to the different metabolic phenotypes. The main significant differences between HFD-D and HFD-DR mice concerned the *C leptum* cluster IV (figure 3A in online supplement), *Enterococcus* spp (figure 3C in online supplement) and *Nitrospira* spp (figure 3D in online supplement), which were significantly decreased in HFD-D mice compared with HFD-DR mice. Interestingly, GOS supplementation of HFD generally reduced the count of the overall bacteria analysed except *Bifidobacterium* spp (figure 4A in online supplement) and *Bacteroides prevotella* (figure 4C in online supplement), although the differences were not statistically significant ($p=0.098$ and $p=0.099$, respectively).

Pyrosequencing of the gut microbiota identifies bacterial genera associated with metabolic phenotypes

To analyse the metagenomic signature, the overall caecal microbiota from each metabolic phenotype was sequenced. The operational taxonomic unit (OTU) count was higher in HFD-D mice than in HFD-DR mice while the read counts varied in the opposite direction (figure 1A,B in online supplement). Importantly, GOS treatment affected both parameters.

The data also showed an inverted Bacteroidetes to Firmicutes ratio between HFD-D and HFD-DR mice (figure 2A). We then analysed the corresponding families and genera in more detail. The Lachnospiraceae family (Firmicutes) was reduced by 28% in the HFD-D group compared with the HFD-DR group (figure 2C). In addition, the *Oscillibacter* genus was also reduced by 54% (figure 3A). The Ruminococcaceae family (Firmicutes) was slightly reduced (2%) in HFD-D mice compared with HFD-DR mice (figure 2C).

Within the Bacteroidetes, the proportion of the S24-7 family almost tripled in the HFD-D group (figure 2D) as well as the Deferribacteres phylum (figure 2B). Furthermore, the genus *Parasutterella* remained unchanged and the *Helicobacter* genus (both Proteobacteria) was dramatically reduced (figure 3D).

Interestingly, the Bacteroidetes to Firmicutes ratio was dramatically increased in HFD+GOS mice and the Actinobacteria phylum almost totally disappeared (0.1%) (figure 2A). Altogether, numerous other families and genera were affected. In particular, HFD+GOS mice had increased S24-7 family

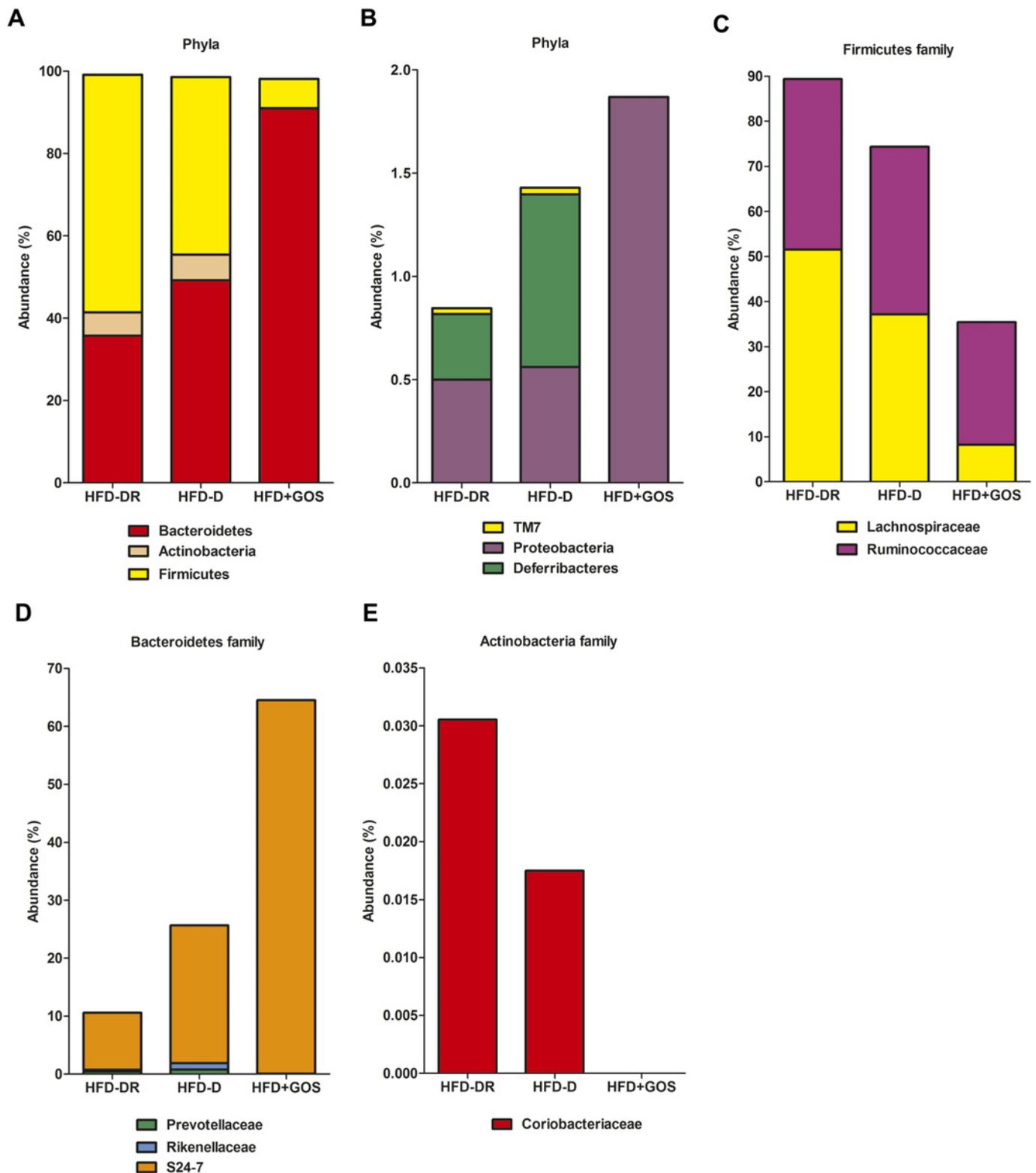


Figure 2 Caecum microbial profiles vary according to metabolic phenotypes. Pyrosequencing analysis of (A, B) phyla and (C–E) taxa families in mice fed a high-fat diet (HFD) which became diabetic (HFD-D) or diabetes-resistant (HFD-DR) or mice fed HFD supplemented with gluco-oligosaccharides (HFD+GOS). Data are shown as a percentage of the total identified sequences per group.

(figure 2D) and *Parabacteroidetes* genus (figure 3B) whereas the Coriobacteriaceae family (figure 2E) and *Olsenella* (figure 3C) and the *Mucispirillum* genera (figure 3E) disappeared. The gut microbial signature of each metabolic phenotype is summarised in figure 4.

Plasma inflammation and gut paracellular permeability are associated with metabolic phenotypes

To further determine whether changes in the gut microbiota could be associated with bacterial inflammatory factors, we measured the plasma concentration of LPS. Fasting LPS plasma

Gut microbiota

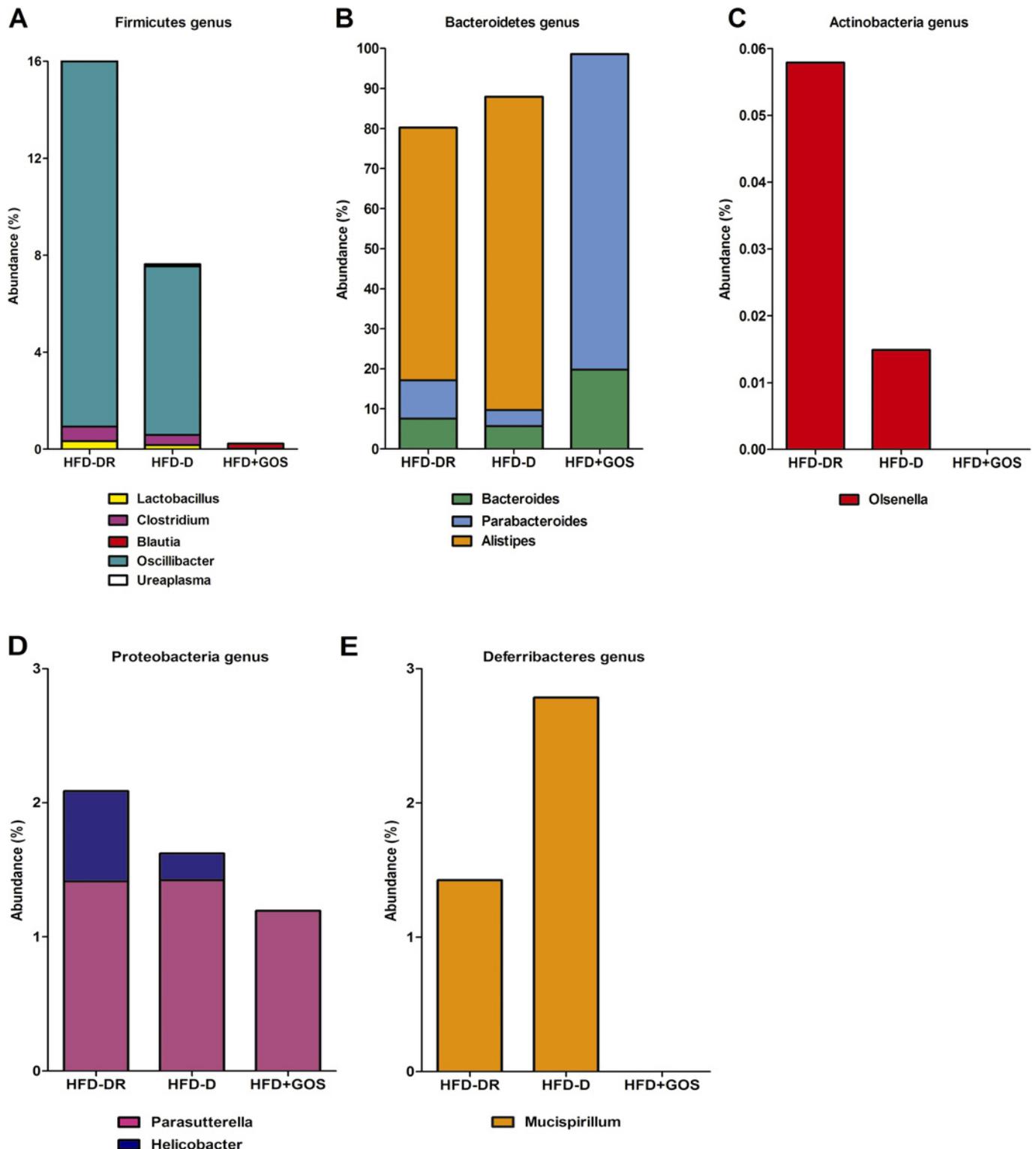


Figure 3 Caecum microbial genera of different metabolic phenotypes. (A-E) Pyrosequencing of genera in mice fed a high-fat diet (HFD) that became diabetic (HFD-D), diabetes-resistant (HFD-DR) or mice fed a diet supplemented with gluco-oligosaccharides (HFD+GOS). Data are shown as a percentage of the total identified sequences per group.

levels increased in HFD-D mice compared with HFD-DR mice but were reduced when the gut microbiota was challenged by GOS treatment (figure 5A). Measurement of circulating cytokines showed that, of the cytokines $\text{TNF}\alpha$, IL-6 and PAI-1, the latter was significantly increased in HFD-D mice compared with HFD-DR mice and GOS treatment significantly modified this parameter (figure 5B).

To understand whether a different endotoxaemia could be related to altered gut permeability, as already reported,⁴ we measured permeability using Ussing's chambers. Paracellular permeability in the ileum and caecum was significantly increased in HFD-D mice compared with all the other groups (figure 5C,D), but not significantly ($p>0.05$) in the colon (figure 5E). In the ileum this was coupled to a reduction in occludin and junctional

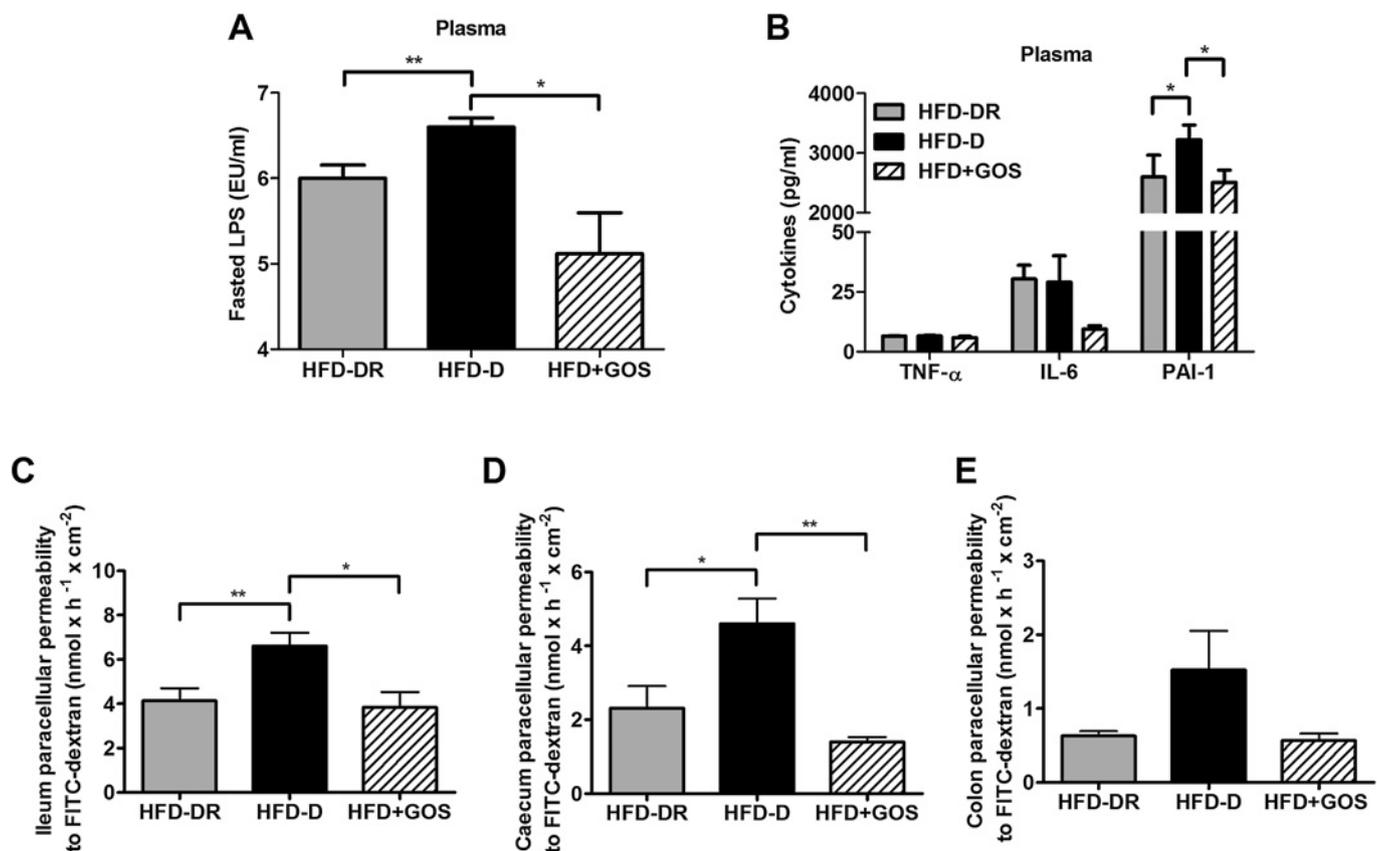


Figure 5 Plasma inflammation and gut paracellular permeability. (A) Fasting plasma lipopolysaccharide (LPS) levels, (B) cytokine concentrations in plasma and (C–E) intestinal paracellular permeability in the ileum (C), caecum (D) and colon (E) in mice fed a high-fat diet (HFD) that became diabetic (HFD-D), diabetes-resistant (HFD-DR) and in mice fed a diet supplemented with gluco-oligosaccharides (HFD+GOS). Data are shown as mean \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (unpaired Student t test; $n = 6–12$ per group). IL, interleukin; PAI-1, plasminogen activator inhibitor 1; TNF α , tumour necrosis factor α .

increased in HFD-D mice compared with HFD-DR mice. Conversely, HFD+GOS mice showed a reduced non-significant trend for NF- κ B and a similar trend, but to a lesser extent, for mTOR activation (figure 6F). In addition, no significant changes ($p > 0.05$) were observed in any groups in insulin signalling and energy metabolic pathways, except for the activation of AKT which was significantly increased in HFD+GOS mice compared with HFD-D mice (figure 7 in online supplement).

Changes in the gut microbiota slightly affected liver and skeletal muscle during metabolic adaptation

To determine whether the metabolic endotoxaemia also affected other insulin-responsive organs, we quantified proteins involved in liver and skeletal muscle metabolism. Notably, HFD-D mice had a significant increase in liver weight compared with HFD-DR mice (figure 7A). Surprisingly, HFD+GOS mice also showed a significant increase in liver weight compared with HFD-DR mice, and to the same extent as HFD-D mice (figure 7A). Moreover, TNF α and IL-6 mRNA concentrations did not vary significantly ($p > 0.05$) whatever the group, whereas PAI-1 mRNA significantly increased in HFD-D mice compared with HFD-DR and HFD+GOS mice (figure 7B). Surprisingly, liver insulin (figure 7C), energy (figure 7D) and inflammatory pathways (figure 7E) did not show significant changes ($p > 0.05$) between all the groups.

We subsequently investigated skeletal muscle and found that only TNF α mRNA increased in HFD-D mice compared with HFD-DR and HFD+GOS mice (figure 8A in online supplement).

Again there were no major changes ($p > 0.05$) in insulin, energy and inflammatory pathways between all the groups (figure 8B in online supplement).

DISCUSSION

In this study we have shown that diabetes-sensitive (HFD-D) and diabetes-resistant (HFD-DR) metabolic phenotypes are associated with a specific gut microbial profile, aside from changes in genetic background and diet. Moreover, targeting the gut microbiota of HFD-fed mice with dietary fibres prevented the occurrence of the diabetic phenotype and showed a specific microbial signature. Our data further corroborate increased gut permeability and WAT plasticity during type II diabetes.

The microbial diversity of different metabolic phenotypes displayed a wider variation in OTUs than read counts, suggesting that a given metabolic phenotype (ie, HFD+GOS) could be selecting specific bacterial populations (ie, Bacteroidetes), as shown for prebiotics.²⁵ A meticulous examination revealed that the Bacteroidetes to Firmicutes ratio increased in the diabetic phenotype, confirming the results reported in patients with type II diabetes²⁶ but contrasting with findings reported by Gordon *et al.*⁷ However, we aimed to study type II diabetes per se, intentionally lacking obesity, which explains the aforementioned mismatch. In fact, obesity has been shown as a main driving factor of changes in the gut microbiome between lean and obese twins where, despite different microbe assembly, a core microbiome exists and divergence from it leads to a pathological state (ie, lean vs obese).²²

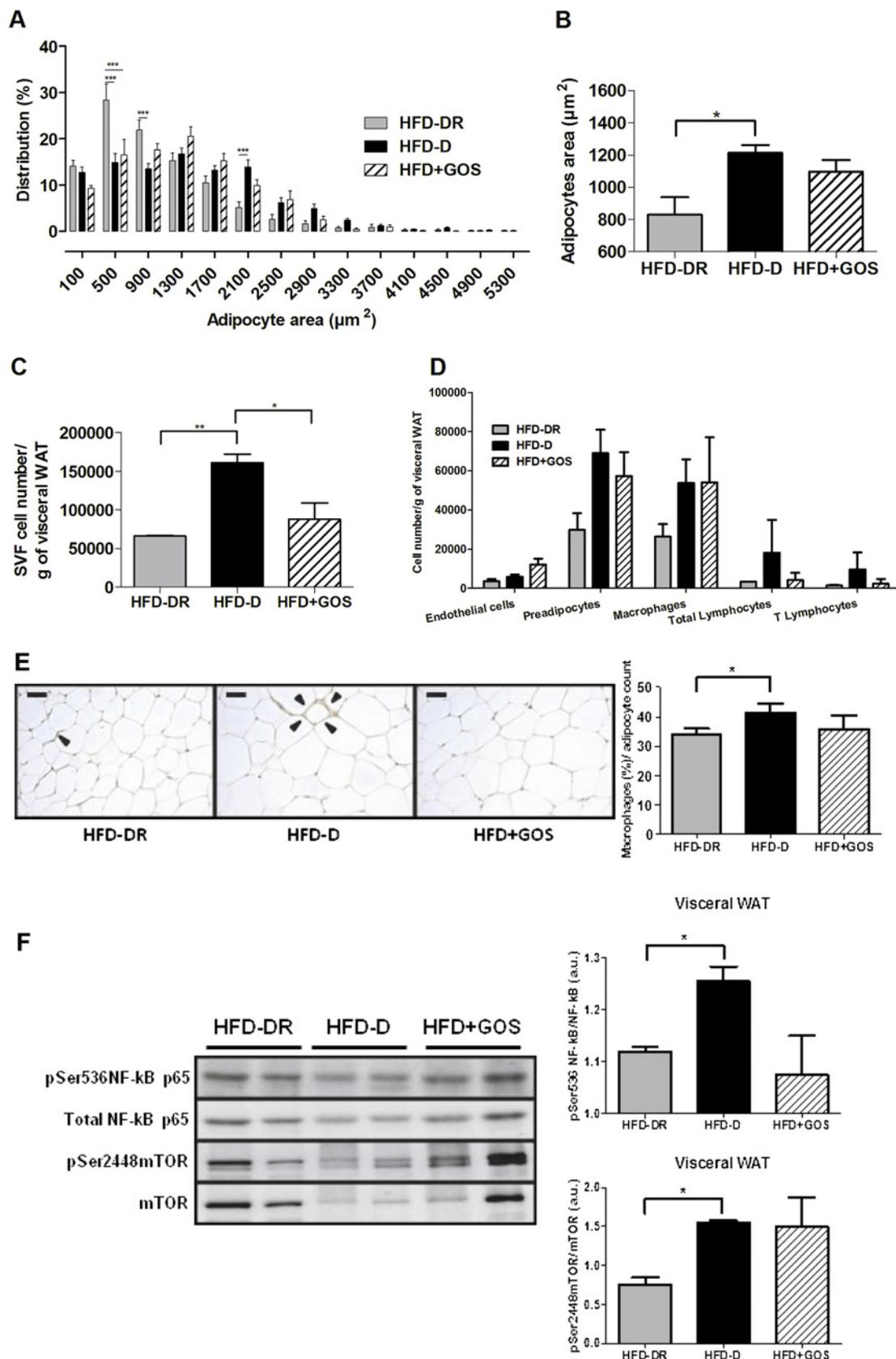
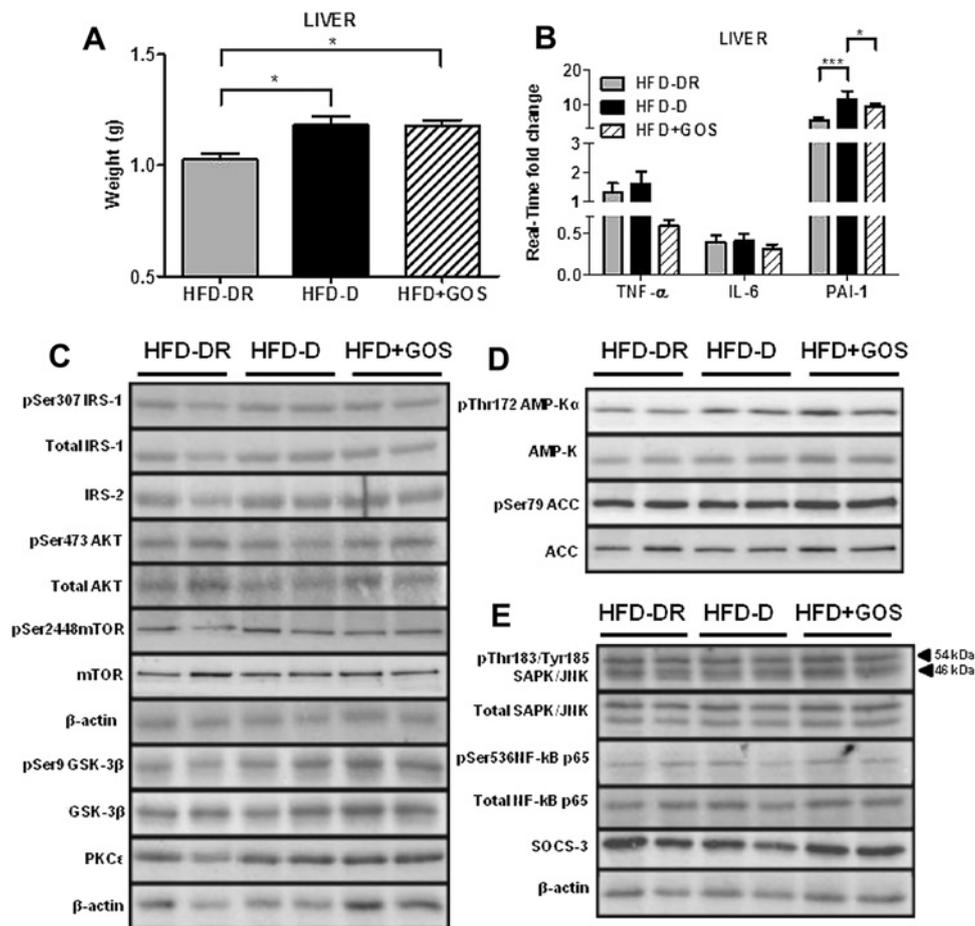


Figure 6 Cell architecture and inflammation in visceral white adipose tissue (WAT). (A) Adipocyte area and distribution, (B) mean adipocyte area, (C) total cell count of the stroma vascular fraction (SVF)/g visceral WAT, (D) endothelial (CD31+), preadipocytes (CD34+), macrophages (F4/80/CD11b+), total lymphocytes and T cells (CD3+), (E) macrophage immunostaining and number (%) per adipocyte count, (F) western blot analysis of phosphorylated and total proteins involved in inflammatory pathways in mice fed a high-fat diet (HFD) which became diabetic (HFD-D), diabetes-resistant (HFD-DR) and mice fed a diet supplemented with gluco-oligosaccharides (HFD+GOS). Data are shown as mean \pm SEM; * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 (unpaired Student t test; n =5–12 per group).

Gut microbiota

Figure 7 Liver weight, inflammation, insulin and energy pathways during metabolic adaptation. (A) Liver weight; (B) TNF α , IL-6 and PAI-1 mRNA concentrations; (C–E) western blot analysis of phosphorylated and total proteins involved in (C) insulin signalling, (D) energy metabolism and (E) inflammation from mice fed a high-fat diet (HFD) which became diabetic (HFD-D), diabetes-resistant (HFD-DR) or mice fed a diet supplemented with gluco-oligosaccharides (HFD+GOS). Data are shown as mean \pm SEM; * p <0.05, *** p <0.001 (unpaired Student t test; n=4 per group). IL, interleukin; PAI-1, plasminogen activator inhibitor 1; TNF α , tumour necrosis factor α .



Indeed, we identified specific changes in genera (*Oscillibacter*, *Parabacteroidetes*, *Alistipes* and *Olsenella*, *Helicobacter* and *Mucispirillum*) as a signature of the metabolic phenotype. The reasons for the changes in the gut microbiota remain unclear, despite unchanged genetic background and diet. Furthermore, this result is specifically linked to caecal microbiota. We cannot exclude the possibility that a different outcome could have occurred in other gut regions. A different food intake and/or the immune system could also have contributed to shape the microbiota, as reported in other studies.^{27–30} To determine whether gut microbiota is the cause or consequence of the metabolic phenotypes, we specifically modified it with dietary fibres.^{25–31} This treatment dramatically changed the gut microbiota and then the metabolic phenotype, suggesting that it could be causal, although demonstration of the causality needs further evaluation in germ-free mice. In addition, despite the diabetic state being normalised, the HFD+GOS microbiota still remained different from the non-diabetic HFD-DR mice, suggesting that several gut microbiota profiles could be a signature for the same metabolic phenotype. The pathophysiological mechanisms involved in the induction of different metabolic phenotypes might differ. To gain some information on the link between microbial profiles and metabolic phenotypes we characterised numerous tissue features.

Our data suggest that the impact of the specific microbiota was facilitated by increased gut permeability in both the ileum and caecum of HFD-D mice, resulting in increased endotoxaemia. This change could indeed dramatically affect metabolism since the intestinal barrier plays a critical role in the transport of nutrients and macromolecules and, at the same time, provides an effective barrier to harmful macromolecules and microorganisms.³² Loose tight junctions could therefore allow nutritional

and other microbial substances to cross the intestinal epithelium and target WAT, resulting in increased adipokine production (leptin and resistin), adipose cell size and SVF cell number, thus confirming the literature.^{12–15}

Conversely, neither liver nor skeletal muscle showed major metabolic modulations besides an increased TNF α mRNA concentration in HFD-D mice, suggesting that these organs do not play a pivotal role during metabolic adaptation as an early event shaping the metabolic phenotypes.

On the other hand, WAT is an important player in the control of metabolic inflammation leading to insulin resistance.^{9–33–34} Here we show that HFD-D mice were characterised by a large increase in SVF cell number. In addition, most of the cellular populations including macrophages, preadipocytes and lymphocytes tended to increase. Such changes could be responsible for the diabetic phenotype under the control of the gut microbiota, and may even explain the increased inflammatory tone observed in HFD-D mice via the slight but significant increased activation of NF- κ B and mTOR pathways which are upregulated during metabolic diseases.

We conclude that a specific gut microbiota, aside from changes in genetic background and diet, is a signature of the different metabolic phenotypes of 'diabetic' versus 'diabetes-resistant' during metabolic adaptation to HFD. We cannot exclude the possibility that subtle changes in the microbiota occurred before the HFD treatment and/or that epigenetic mechanisms could have oriented a given phenotype. However, mice from the same cage do not have completely similar gut microbiota (as occurs in mono-colonised axenic mice).

Our data suggest that the gut microbiota could affect WAT biology, essentially affecting the SVF. Consequently, modulating

the gut microbiota by appropriate dietary fibres represents a promising strategy to control or prevent metabolic diseases.

Author affiliations

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Toulouse, France

²Université Paul Sabatier (UPS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 1048, Institut de Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I²MC), Toulouse Cedex 4, France

³Université de Toulouse III, UPS, LU49, Adhésion Bactérienne et Formation de Biofilms, Toulouse Cedex 9, France

⁴Neuro-Gastroenterology and Nutrition Unit, UMR INRA/El-Purpan, Toulouse Cedex 3, France

⁵Plateforme Bio-informatique Toulouse Genopole®, UBIA INRA, Castanet-Tolosan Cedex, France

⁶GENOTOUL Platform, INRA Chemin de Borde-Rouge, Auzeville, France

⁷Université de Toulouse III, INSA, UPS, INP, LISBP, Toulouse, France

⁸CNRS, UMR5504, Toulouse, France

⁹INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, Toulouse, France

¹⁰Institut Universitaire de France, Paris, France

¹¹Rangueil Hospital, Department of Therapeutics, Toulouse, France

Acknowledgements We would like to thank the GenoToul Anexplo core facility (Dr Legonidec) in Toulouse (France) and John Woodley for editing the English.

Funding This work was supported by grants from Agence Nationale pour la Recherche (ANR) to RB and collaborators (ANR-Florinflamm and Transflora); in part, by the European Commission's Seventh Framework programme under grant agreement No 241913 (FLORINASH) to RB and by the Benjamin Delessert Foundation to MS.

Competing interests None.

Contributors MS designed, performed and analysed the experiments and wrote the manuscript; EL, SG, AB, CC, AW, PK, JI and JL performed the experiments; MB, CK, JM and OB analysed the data; FO and PM provided the gluco-oligosaccharide; PV, CR, JA, AB and VT analysed the data and wrote the manuscript; RB designed the experiments and wrote the manuscript.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Roberfroid MB. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J Nutr* 2007;**137** (11 Suppl):2493S–502S.
- Burcelin R, Luche E, Serino M, et al. The gut microbiota ecology: a new opportunity for the treatment of metabolic diseases? *Front Biosci* 2009;**14**:5107–17.
- Canani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008;**57**:1470–81.
- Canani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 2009;**58**:1091–103.
- Membrez M, Blancher F, Jaquet M, et al. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *Faseb J* 2008;**22**:2416–26.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006;**444**:1027–31.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006;**444**:1022–3.
- Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:11070–5.
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;**444**:860–7.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;**116**:1793–801.
- Canani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;**56**:1761–72.
- Backhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:15718–23.
- Velagapudi VR, Hezaveh R, Reigstad CS, et al. The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *J Lipid Res* 2010;**51**:1101–12.
- Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:979–84.
- Samuel BS, Shaito A, Motoike T, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:16767–72.
- Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, et al. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;**282**:E834–42.
- Dols-Lafargue M, Willemot RM, Monsan PF, et al. Reactor optimization for alpha-1,2 glucooligosaccharide synthesis by immobilized dextransucrase. *Biotechnol Bioeng* 2001;**75**:276–84.
- Curat CA, Miranville A, Sengenès C, et al. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 2004;**53**:1285–92.
- Caraux G, Pinloche S. PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics* 2005;**21**:1280–1.
- Dabek M, Ferrier L, Roka R, et al. Luminal cathepsin G and protease-activated receptor 4: a duet involved in alterations of the colonic epithelial barrier in ulcerative colitis. *Am J Pathol* 2009;**175**:207–14.
- Federici M, Hribal ML, Menghini R, et al. Timp3 deficiency in insulin receptor-haploinsufficient mice promotes diabetes and vascular inflammation via increased TNF-alpha. *J Clin Invest* 2005;**115**:3494–505.
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009;**457**:480–4.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2009;**75**:7537–41.
- Boucher J, Daviaud D, Simeon-Remaud M, et al. Effect of non-digestible gluco-oligosaccharides on glucose sensitivity in high fat diet fed mice. *J Physiol Biochem* 2003;**59**:169–73.
- Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* 2007;**137**:830S–7S.
- Wu X, Ma C, Han L, et al. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr Microbiol* 2010;**61**:69–78.
- Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009;**139**:485–98.
- Ivanov II, Frutos Rde L, Manel N, et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 2008;**4**:337–49.
- Shanahan F. The host-microbe interface within the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;**16**:915–31.
- Umesaki Y, Okada Y, Matsumoto S, et al. Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse. *Microbiol Immunol* 1995;**39**:555–62.
- Iliev I, Vassileva T, Ignatova C, et al. Gluco-oligosaccharides synthesized by glucosyltransferases from constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* strain Lm 28. *J Appl Microbiol* 2008;**104**:243–50.
- Hossain Z, Hirata T. Molecular mechanism of intestinal permeability: interaction at tight junctions. *Mol Biosyst* 2008;**4**:1181–5.
- Bouloumie A, Casteilla L, Lafontan M. Adipose tissue lymphocytes and macrophages in obesity and insulin resistance: makers or markers, and which comes first? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;**28**:1211–13.
- Bouloumie A, Curat CA, Sengenès C, et al. Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005;**8**:347–54.



Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota

Matteo Serino, Elodie Luche, Sandra Gres, et al.

Gut 2012 61: 543-553 originally published online November 22, 2011
doi: 10.1136/gutjnl-2011-301012

Updated information and services can be found at:
<http://gut.bmj.com/content/61/4/543.full.html>

These include:

Data Supplement

"Listen to an interview with Matteo Serino"

<http://gut.bmj.com/content/suppl/2012/04/13/gutjnl-2011-301012.DC1.html>

"Supplementary Data"

<http://gut.bmj.com/content/suppl/2012/05/21/gutjnl-2011-301012.DC2.html>

"Supplementary Data"

<http://gut.bmj.com/content/suppl/2012/07/05/gutjnl-2011-301012.DC3.html>

References

This article cites 34 articles, 16 of which can be accessed free at:

<http://gut.bmj.com/content/61/4/543.full.html#ref-list-1>

Article cited in:

<http://gut.bmj.com/content/61/4/543.full.html#related-urls>

Open Access

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non commercial and is otherwise in compliance with the license. See:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/> and

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/legalcode>.

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

To request permissions go to:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:

<http://group.bmj.com/subscribe/>

**Topic
Collections**

Articles on similar topics can be found in the following collections

[Editor's choice](#) (66 articles)
[Open access](#) (85 articles)

Notes

To request permissions go to:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:

<http://group.bmj.com/subscribe/>