

**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE
FRANCHE-COMTE**

Préparée à l'UMR INSERM 1231 « Lipides, Nutrition, Cancer » dans l'équipe LIPNESS

Ecole doctorale n°554 Environnements-Santé

Doctorat de Physiologie

Par

Quentin Escoula

**Effets préventifs des acides gras polyinsaturés en n-3
dans l'altération de la couche de mucus colique et du
stress du réticulum endoplasmique induit par un
régime obésogène**

Thèse soutenue à Dijon, le 13 Mars 2020

P. Lepage	DR, UMR Micalis, INRAE, Jouy-en-Josas	Rapporteure
P. Legrand	PU, AgroCampus Rennes	Rapporteur
D. Masson	PU-PH, UMR Lipides Nutrition Cancer, Université de Bourgogne Dijon	Examineur
V. Blasco-Baque	MCU-PH, UMR I2MC, INSERM, Toulouse	Examineur
G. Mairesse	Responsable R&D, Valorex SAS, Combourtillé	Invité
M. Narce	PU, UMR Lipides Nutrition Cancer, Université de Bourgogne Dijon	Directeur de thèse
J. Bellenger	MCU, UMR Lipides Nutrition Cancer, Université de Bourgogne Dijon	Co-Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens dans un premier temps à remercier chaleureusement les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail de thèse.

- Je remercie le Pr David Masson pour avoir accepté de présider ce jury et je le remercie de m'avoir accompagné et conseillé durant ces trois années de thèse.
- Merci au Dr Patricia Lepage et au Pr Philippe Legrand d'avoir acceptés d'être rapporteur de ce travail de thèse, merci pour le temps que vous y avez consacré et de vos remarques constructives.
- Je remercie le Dr Blasco-Baque ainsi que le Dr Mairesse Guillaume d'avoir examinés mon rapport de thèse.
- Je remercie pour terminer mes deux directeurs de thèse, le Pr Michel Narce et le Dr Jérôme Bellenger pour ces trois belles années. Je vais essayer de ne garder que le positif à savoir de riches échanges scientifiques et les bons moments passés dont un magnifique congrès à Las Vegas avec le Pr Michel Narce.

Je remercie l'entreprise Valorex, et tout particulièrement Pierre Weil et le Dr Guillaume Mairesse, de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Votre vision de la nutrition de demain est remarquable et je trouve rassurant que des entreprises soient autant impliquées dans une nutrition saine et respectueuse de l'homme comme de l'environnement. Je remercie également toute l'entreprise Valorex de m'avoir intégré lors de mes quelques visites.

Je remercie toute la plateforme Cellimap pour leur aide dans la réalisation des mesures de la couche de mucus, que ce fut compliqué, mais votre expertise m'a permis de pouvoir avancer grandement dans la réalisation de cette thèse.

Vincent, pas besoin de dire que je n'en serais surement pas là aujourd'hui sans tes conseils et ton amitié. Tu m'as donné l'envie de faire de la recherche avec la réalisation de ce premier stage sur notre amie (ou ennemie plutôt) *Phorphyromonas gingivalis*. Tu m'a surtout transmis ton envie et ta persévérance et m'a appris que le travail paie toujours, qu'importe les difficultés. Merci pour tout.

Un énorme merci à mes amis « d'en face ». Merci Gaétan pour ta fameuse dance du T-Rex, en te souhaitant tout le meilleur pour l'après thèse. Merci Marine de m'avoir raccompagné après ma chute à vélo faisant suite à une sortie intempestive d'une poubelle. Merci Burhan pour ton aide et ton soutien, en espérant de tout cœur te voir rapidement à côté de moi sur les bancs de la faculté de médecine. Merci à toi le Kiks pour ta précieuse aide pour l'analyse du stress du RE. Notre amitié avait pourtant commencé de façon étrange (et humide) mais qu'importe. Rendez-vous très bientôt au Temple bar (je me suis permis de te commander une banane pour que tes papiers soient en sécurité).

Je remercie également toutes les personnes de l'étage Gabriel. Je remercie tout spécialement mes collègues de bureau qui m'ont accompagné durant ces trois années. Merci Charlotte et Tania pour votre amitié sincère, merci pour toutes ces sorties et repas durant ces trois années, merci de nous avoir si rapidement intégrés et de nous être fait sentis chez nous aussi vite. Je vous souhaite tout le meilleur pour la suite. Merci ma petite Adélie, nos duo musicaux marqueront, j'en suis sûre, à jamais à l'étage Gabriel. Ce voyage à Las Vegas restera à jamais gravé dans nos mémoires au son des « *Go Knight Go* » et des *Sweet Home Alabama*. Merci de m'avoir aidé et soutenu pendant cette thèse tant pour tes connaissances que pour ton amitié. La réalisation d'une thèse est loin d'être une partie de plaisir, mais entouré d'amies comme vous tout deviens plus facile. Merci également à Thomas qui grâce à son expertise sur les matchs de NBA m'a permis d'être encore plus pauvre que je ne l'étais déjà. Je remercie également Chloé pour ta joie de vivre, même si nous n'avons partagé que peu de temps notre bureau j'ai beaucoup apprécié ta compagnie, à bientôt pour une petite bière. Merci à Vi et à Amina, je vous souhaite bon courage pour la réalisation de vos thèses respectives et je vous souhaite également tout le meilleur pour la suite.

Un grand merci à Pascal et Patricia pour votre aide et votre bienveillance. Je remercie également Mickael, Charles et Tony pour nos échanges et votre soutien qui m'ont permis d'avancer plus sereinement dans ce chemin tortueux qu'est la thèse. Je remercie également Sandrine, Amira, Julia, Jean-Marc et Sabrina pour leurs aides tout au long de ces trois ans.

Je remercie également Pierre qui m'a chaleureusement accueilli à Dijon et qui me permet de retrouver notre Sud-Ouest quand le manque se fait sentir.

Je remercie toute ma famille et plus particulièrement Hélène, Hugo, maman et Thierry. Merci de me soutenir au quotidien et de me conforter dans tous mes choix de vie. Redescendre et passer du temps avec vous me permet de retrouver le sourire dans n'importe quelle circonstance.

Et surtout merci à toi Marine, ma future femme. Merci de me soutenir et de m'accompagner comme tu le fais chaque jour, merci de m'avoir suivi à Dijon, merci de partager ta vie avec moi. Les choses peuvent paraître compliquées et même si la vie aime semble-t-il nous mettre des bâtons dans les roues, je sais que tant que nous serons tous les deux rien ne pourra nous résister.

Dans la vie rien n'est à craindre, tout est à comprendre.

Marie Curie

Résumé

L'obésité est aujourd'hui considérée comme une réelle épidémie mondiale affectant plus de 650 millions de personnes dans le monde. Cette maladie inflammatoire chronique dite « de bas bruit » s'accompagne d'altérations intestinales, avec notamment une altération de la couche de mucus colique et une augmentation du stress du réticulum endoplasmique colique, associée à une dysbiose du microbiote intestinale. Les acides gras polyinsaturés en n-3 sont connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires et immuno-modulatrices et semblent être une piste prometteuse dans la lutte contre les altérations métaboliques et intestinales induites par l'obésité.

Les objectifs de ces travaux de thèse ont été dans un premier temps de déterminer si un enrichissement tissulaire en n-3, dans le modèle de souris fat-1, permettait de prévenir les altérations de la couche de mucus colique induites par un régime obésogène et de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués. Nous avons ensuite voulu déterminer, par des techniques de transplantation, si le microbiote de souris fat-1 intervenait de « façon indépendante » dans la prévention des altérations induites par le régime obésogène chez la souris fat-1.

Ces travaux de thèse montrent qu'un enrichissement tissulaire en n-3 permet de prévenir la diminution de l'épaisseur de la couche de mucus colique ainsi que l'augmentation du stress du réticulum endoplasmique induits par un régime obésogène. Nous avons également démontré, grâce à des études in vitro utilisant le modèle cellulaire LS174T sécréteur de MUC2, que l'acide palmitique induisait un fort stress du réticulum endoplasmique provoquant l'inhibition de sécrétion de MUC2. De plus, nous avons mis en avant le rôle préventif du DHA et de l'EPA vis-à-vis de l'induction du stress du réticulum endoplasmique par l'acide palmitique. Cette prévention permet ainsi de maintenir une sécrétion normale de la mucine MUC2, malgré la présence d'acide palmitique.

Durant ma thèse nous nous sommes également intéressés au microbiote intestinal et notamment à l'impact d'un enrichissement tissulaire en acides gras polyinsaturés en n-3 sur sa composition. Nous avons observé que les souris fat-1 étaient protégées de la dysbiose du microbiote lors de la consommation d'un régime obésogène par rapport à des souris WT. De plus, nous avons montré que le microbiote

de souris fat-1, transplanté dans une souris WT, permettait de prévenir les altérations métaboliques et intestinales induites par un régime riche en graisse.

En conclusion, ces travaux montrent que les acides gras polyinsaturés en n-3 permettent de prévenir l'altération de la couche de mucus colique en prévenant l'activation du stress du réticulum endoplasmique induit par un régime obésogène. Nous avons également montré que le microbiote intestinal des souris fat-1, modulé par les acides gras oméga 3, intervenait de façon active dans la prévention des altérations induites par des conditions obésogéniques. Ces résultats présentent ainsi la modulation du microbiote intestinal par les acides gras oméga 3 comme une piste prometteuse dans la prévention des altérations métaboliques et intestinales induites par un régime obésogène.

Mots clefs : Omega 3, obésité, mucus, stress du RE, microbiote

Table des matières

Liste des abréviations	11
Liste des figures	14
Liste des tableaux	16
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique.....	17
I. L'obésité : une réelle pandémie	18
a) L'obésité : Définition et diagnostic.....	18
b) Etiologie de l'obésité	19
c) Les désordres métaboliques associés à l'obésité	20
i. Le diabète de type 2	20
ii. La stéatose hépatique non alcoolique	22
i. L'inflammation chronique de bas grade	22
II. L'intestin et le microbiote : Des interactions nombreuses et complexes	23
a) Le tractus gastro-intestinal.....	23
b) Barrière et perméabilité intestinale	24
c) Les altérations de la barrière intestinale lors de l'obésité	26
i. Méthodes d'évaluation de la perméabilité intestinale.....	26
ii. L'hyperperméabilité intestinale	27
iii. L'endotoxémie métabolique et ses conséquences.....	28
d) Le microbiote intestinal	30
i. Généralités	30
ii. Méthodes d'analyse du microbiote intestinal	31
iii. Composition du microbiote	32
iv. Mise en place du microbiote intestinal	33
v. Rôles du microbiote	34
1. Maturation du tractus gastro-intestinal	34
2. Maturation du système immunitaire	35
3. Microbiote intestinal et métabolisme	36
3. Modulation du microbiote : la transplantation fécale	38
e) Microbiote et maladies métaboliques.....	42
i. Dysbiose du microbiote et obésité	42
III. Le mucus : Un intermédiaire entre l'hôte et le microbiote	48
a) Les mucines : constituants majeurs de la couche de mucus	48
i. Les mucines	49
b) Structure générale du mucus gastro-intestinal	51
c) Interactions entre mucus et bactéries	54

i. Microbiote intestinal et couche de mucus : des interactions nombreuses et nécessaires	55
d) Mucus, et obésité alimentaire	57
e) Stress du réticulum endoplasmique (RE), obésité et désordres métaboliques associés	59
i. Le stress du RE en conditions physiologiques	59
ii. Stress du RE, obésité et diabète de type 2	61
ii. Stress du RE et sécrétion des mucines	61
IV. Les acides gras polyinsaturés en n-3.....	62
a) Les différents types d'acides gras	62
i. Nomenclature et structure	62
ii. Les acides gras saturés (AGS)	63
iii. Les acides gras insaturés	64
1. Les acides gras mono-insaturés	64
b) Les acides gras polyinsaturés (AGPI) : Biosynthèse et rôle	65
i. Apport et biosynthèse des AGPI	65
ii. Désaturation et élongation	66
iii. Rôles physiologiques des AGPI	67
iv. Rôles au niveau génique	70
c) Ratio Oméga 6/Oméga 3, obésité et altérations métaboliques et intestinales associées	71
i. Ratio Oméga6/Oméga3	71
ii. Oméga 3 et maladies métaboliques	72
d) Oméga 3 et Microbiote intestinal	74
e) Oméga 3 et stress du RE	76
Objectifs.....	78
Chapitre 2 : Prévention de l'obésité et des désordres métaboliques associés par les acides gras polyinsaturés en n-3 chez la souris transgénique fat 1: rôle du microbiote intestinal	82
I. Introduction.....	83
II. Article 1	84
III. Article 2	96
IV. Conclusion.....	102
Chapitre 3 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la prévention de l'altération de sécrétion de MUC2, par le DHA et l'EPA, induit par l'acide palmitique dans le modèle cellulaire LS174T.	103
I. Introduction.....	104
II. Article 3	105
III. Conclusion.....	119
Chapitre 4 : Prévention de l'altération de la couche de mucus colique induite lors de l'obésité par les oméga 3 : rôle du microbiote intestinal.	121
I. Introduction.....	122
II. Article 4	123

III. Conclusion.....	152
Chapitre 5 : Discussion générale, conclusions et Perspectives	153
Chapitre 6 : Bibliographie	161
Annexe 1 : Liste des publications, présentations scientifiques et prix issues des travaux de thèse.....	180

Liste des abréviations

4-PBA : 4-PhenylButyrate Acid

A

AGCC : Acides Gras à Chaines Courtes

AGPI : Acides Gras PolyInsaturés

AGS : Acides Gras Saturés

ALA : Acide α -Linolénique

AMOP: Adhesion-associated domain in MUC4 and Other Protein

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

ARA: Acide ARACHidonique

ASN : Asparagine

ATF4 : Activating Transcriptor Factor 4

ATF6 : Activating Transcriptor Factor 6

B

BIP : Binding Immunoglobulin Protein

C

CCK : CholécystoKinine

CD14 : Cluster of Differentiation 14

CHOP : C/EBP HOmologous Protein

ChREBP: Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein

CK domain : The C-terminal Cystine Knot

CRP : C-Reactive Protein

D

DHA : Acide DocosaHexaénoïque

DMBT1 : Deleted In Malignant Brain Tumors 1

DPA : Acide DocosaPentaénoïque

DRP1 : Dynamin-Related Protein 1

E

EDEM1 : Er Degradation Enhancing alpha-Mannosidase like protein 1

EiF2 α : Eukaryotic Initiation Factor 2

EPA : Acide EicosaPentaénoïque

ERAD : Endoplasmic Reticulum-Associated protein Degradation

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases

F

FcGBP : Fc fragment of IgG Binding Protein

FITC : Fluorescein IsoThioCyanate

G

GIP : Peptide Insulinotrope dépendant du Glucose

GLP-1 : Glucagon-Like Peptide-1

GLUT-4 : GLUcose Transporter 4

GPR : G Protein-coupled Receptor

GRP78 : Glucose Regulated Protein 78

H

HbA1C : L'hémoglobine glyquée

HDL : High Density Lipoprotein

I

IDF : International Diabetes Federation

IgA : Immunoglobuline A

IL : InterLeukine

IMC : Indice de Masse Corporelle

IRE1 α : Inositol-Requiring Enzyme 1 α

IRM : Image par Resonance Magnétique

J

JAM-A : Junctional Adhesion Molecule-A

L

LA : Acide Linoléique

LBP : Lipopolysaccharide Binding Protein

LPS: LiPopolySaccharide

LYPD-8 : LY6/PLAUR Domain

Containing 8

M

MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin

MUB : Mucin Binding Protein

N

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide H

NF- κ b : Nuclear Factor-kappa β

NIDO: Nidogen Like DObain

NOD : Nucleotid-binding Oligomerization Domain proteins

NPY: NeuroPeptide Y

O

OA : Acide oléique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Pattern molecules

PEG : PolyEthylènes Glycolés

PERK : Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase

PTS domain : Peroxysome Transfert Signal domain

Q

qPCR : quantitative PCR

R

RE : Réticulum Endoplasmique

REG3G : REGenerating islet-derived
protein 3 Gamma

RELMβ : REsistin-Like Molecule β

ZG16 : Zymogen Granule protein 16

ZO-1 : Zonula Occludens-1

S

SEA domain: Sperm protein, Enterokinase
and Agrin

SPMs : Specialized Pro-resolving
Mediators

SREBP-1C : Sterol Regulatory Element
Binding Protein-1C

T

TFF3 : TreFoil Factor 3

TG : Triglycerides

THA : Acide TétracosaHéxaénoïque

TLR : Toll Like Receptor

TNF-α : Tumor Necrosis Factor

TRP : Tryptophane

TUDCA : TauroUrsoDeoxyCholic Acid

U

UPR : Unfold Protein Response

V

vWD domain : Von Willebrand factor type
D domain

Z

Liste des figures

Figure 1 : Organisation du système digestif qui s'étend de la bouche à l'anus.	23
Figure 2 : Schéma des différentes jonctions intercellulaires et organisation d'une jonction serrée.	25
Figure 3 : Schéma de la prise en charge du LPS dans la circulation sanguine et de l'activation des différentes voies de l'inflammation.	29
Figure 4 : Représentation schématique de la densité bactérienne et des différents acteurs modulant la composition bactérienne dans le tractus gastro-intestinal.	33
Figure 5 : Représentation schématique des différentes interactions connues entre le microbiote et les cellules immunitaires de l'hôte.....	36
Figure 6 : Chronologie des principales découvertes concernant la transplantation fécale.....	40
Figure 7 : Résumé d'un profil « idéal » d'un donneur issu du rapport de l'ANSM publié en Novembre 2016 intitulé : « La transplantation du microbiote fécal et son encadrement dans les essais cliniques ».	40
Figure 8 : Protocole de la transplantation fécale ou transplantation du microbiote fécale (<i>Tauxe et al., 2015</i>)	41
Figure 9 : Régulation de l'homéostasie intestinale et énergétique par les métabolites bactériens en condition physiologique.....	47
Figure 10 : Noms, distributions et rôles des différentes mucines présentes chez l'Homme ...	48
Figure 11 : Schéma représentant les différentes structures et domaines de la mucine sécrétée MUC2, formant un gel.	49
Figure 12 : Schéma de la mucine transmembranaire MUC4.....	50
Figure 13 : Représentation graphique de la structure de la couche de mucus selon la localisation dans le tractus gastro-intestinal chez le rat Wistar	52
Figure 14 : Coupe de colon en fluorescence in situ hybridation (FISH) chez la souris	53
Figure 15 : Répartition longitudinale des bactéries dans le colon chez l'homme d'après (<i>Sekirov et al., 2010</i>).....	55
Figure 16 : Représentation des différentes interactions entre le microbiote, la couche de mucus et l'intestin	56
Figure 17 : Evolutions structurelle et fonctionnelle de la couche de mucus coliques selon différents régimes alimentaires	58

Figure 18 : Représentation schématique des 3 voies impliquées dans le stress du réticulum endoplasmique.....	60
Figure 19 : Structure et nomenclature de l'acide linoléique	63
Figure 20 : Biosynthèse des acides gras polyinsaturés chez les mammifères.....	66
Figure 21 : Voies de synthèses de certains leucotriènes (via les lipoxygénases) et de certains prostanoïdes (via l'action des cyclooxygénases) à partir de l'ARA et de l'EPA après libération par la PLA2 d'après (Guesnet et al., 2005)	68
Figure 22 : Biosynthèse de résolvine, de protectine et de marésine à partir de l'EPA et du DHA	69
Figure 23 : Composition du microbiote de souris sauvages et transgéniques fat-1 nourries avec un régime standard ou hyperlipidique	75

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification en fonction de l'IMC. D'après OMS 2017	18
Tableau 2: Liste des principaux acides gras saturés retrouvés dans l'alimentation.....	64
Tableau 3: Tableau non exhaustif des articles analysants l'impact des SPMs sur le développement de l'obésité et des altérations associées.....	70
Tableau 4: Principales études montrant l'impact de régimes enrichis avec différents acides gras sur la composition du microbiote intestinal.....	74

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I. L'obésité : une réelle pandémie

a) L'obésité : Définition et diagnostic

L'obésité est définie par l'OMS comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle pouvant nuire à la santé. Cette maladie chronique aux origines multiples (génétiques, nutritionnelles, environnementales...) est aujourd'hui considérée comme un enjeu majeur de santé publique. Malgré les nombreux plans de préventions mis en place et l'avancée des recherches pour lutter contre l'obésité, le nombre de personnes atteintes ne cesse de progresser dans le monde.

L'indice de masse corporelle, ou IMC, est le principal indicateur de mesure de l'obésité. Il correspond au rapport de la masse (exprimée en kilogrammes) sur le carré de la taille (exprimée en mètres) de la personne (**Tableau 1**).

Classification en fonction de l'indice de masse corporelle	
Insuffisance pondérale	< 18.5
Éventail normal	18.5 - 24.9
Surpoids	≥ 25.0
Préobésité	25.0 - 29.9
Obésité	≥ 30.0
Obésité, classe I	30.0 - 34.9
Obésité, classe II	35.0 - 39.9
Obésité, classe III	≥ 40.0

TABLEAU 1 : CLASSIFICATION EN FONCTION DE L'IMC. D'APRES OMS 2017

Si cet indice est très largement utilisé dans le diagnostic de l'obésité, il présente cependant plusieurs limites : il ne tient compte ni de la répartition du tissu adipeux dans l'organisme (les complications de l'obésité sont généralement associées plus à une localisation viscérale qu'à une localisation sous-cutanée) ni de la masse musculaire. Il est alors recommandé d'associer l'IMC avec une mesure du tour de taille. Si cette mesure ne permet pas de déterminer avec précision la localisation du tissu adipeux, elle permet cependant de renseigner sur un dépôt anormal du tissu adipeux et ainsi de mieux diagnostiquer l'obésité. Si l'utilisation seule de l'IMC peut suffire dans la pratique clinique courante, une évaluation précise de la composition des différents compartiments (masse maigre, masse grasse et

contenu minéral osseux) est un réel atout pour une meilleure compréhension de l'obésité et permettre ainsi une meilleure prise en charge. Cette mesure précise des différents dépôts peut être obtenue par l'utilisation de scanner (tomodensitométrie) ou par imagerie à résonance magnétique (IRM) (Lloret-Linares and Oppert, 2009).

De par son ampleur, l'obésité est qualifiée de maladie chronique pandémique (Chopra et al., 2002). En 2016, l'OMS enregistrait dans le monde plus de 1,9 milliards de personnes en surpoids dont plus de 650 millions d'obèses. Chaque année, 2,8 millions de personnes meurent des conséquences de l'obésité. En France, d'après l'enquête ObEpi menée auprès d'individus âgés de 18 ans et plus en 2012, la prévalence de l'obésité a été estimée à 15%, soit près de 6,9 millions de personnes.

b) Etiologie de l'obésité

Les origines de l'obésité sont multiples et les mécanismes précis aboutissant à son installation ne sont pas encore tous clairement identifiés. Les modifications de l'alimentation et la diminution de l'activité physique sont deux éléments très fortement impliqués dans l'évolution pandémique de l'obésité. L'alimentation de type occidentale « ou Western Diet » se caractérise par une augmentation massive de la consommation de protéines d'origine animale, de produits riches en graisses (principalement d'acides gras saturés) et de sucre associée à une diminution de la consommation de fibres (Cordain et al., 2005). Depuis les années 1950 l'alimentation de type occidental s'est progressivement installée, d'abord dans les pays riches puis dans la quasi-totalité des pays. L'augmentation de l'apport énergétique qui en résulte, associée à une forte diminution des dépenses énergétiques (activité physique, marche...), conduit à un déséquilibre de la balance énergétique aboutissant à un stockage de l'excès énergétique sous forme de graisses puis, à terme, à l'installation de l'obésité (Goran and Treuth, 2001). Cependant, ces facteurs influençant directement la balance énergétique ne peuvent à eux seuls expliquer cette expansion épidémique de l'obésité dans le monde. Des prédispositions génétiques pourraient en partie expliquer les différences observées entre les individus dans le développement de l'obésité. En effet, 70% des sujets obèses ont eux-mêmes un de leurs parents atteint d'obésité. Cependant, il est difficile de conclure à un impact direct de la génétique étant donné que ces personnes partagent souvent la même alimentation et le même mode de vie. A ce jour, plus de 250 gènes ont été identifiés comme ayant un rôle dans le développement de l'obésité et de ses complications (Rankinen and Bouchard, 2006) même si leurs impacts individuels demeurent minimes.

La composante environnementale semble également jouer un rôle majeur dans l'étiologie de l'obésité. Le stress (van der Valk et al., 2018), les troubles du sommeil (Beccuti and Pannain, 2011), certains médicaments ou encore l'exposition à certains polluants (An et al., 2018) peuvent représenter des facteurs favorisant l'installation de l'obésité. Le type d'alimentation durant la grossesse pourrait également prédisposer l'enfant à développer une obésité (Isganaitis et al., 2019).

c) Les désordres métaboliques associés à l'obésité

L'obésité est aujourd'hui associée à de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires (Poirier Paul et al., 2006), les troubles musculo-squelettiques (Wearing et al., 2006), certains cancers (du colon, de l'endomètre et du sein) mais également de nombreux désordres métaboliques tels que le diabète de type 2 ou la stéatose hépatique non alcoolique. Depuis quelques années, l'inflammation chronique dite « de bas grade » a été proposée comme jouant un rôle clé dans le développement des troubles liés à l'obésité et des désordres métaboliques associés.

i. Le diabète de type 2

En 2014, l'OMS annonce le chiffre record de 422 millions de personnes atteintes de diabète de type 2 dans le monde et estime que le diabète sera, en 2030, la septième cause de mortalité.

Le diabète de type 2 est une maladie caractérisée par une hyperglycémie à jeun chronique. A l'instar du diabète de type 1, dont l'hyperglycémie provient d'une destruction auto-immune des cellules bêta pancréatiques productrices d'insuline, l'étiologie du diabète de type 2 n'est pas la résultante directe d'une perte de sécrétion d'insuline. L'installation de ce type de diabète est plus silencieuse, sans signe avant-coureur fort et peut se diviser en trois étapes distinctes (Kahn et al., 2014).

Dans un premier temps, on observe l'installation d'une insulino-résistance dans les tissus. L'insuline n'est plus capable d'induire une baisse efficace de la glycémie conduisant à une augmentation de sécrétion d'insuline par le tissu pancréatique afin de réguler cette glycémie. Le sujet est alors hyper insulinémique mais normo-glycémique sans apparition de symptômes. Durant le deuxième stade, le patient ne parvient plus à maintenir une glycémie stable et une hyperglycémie chronique s'installe. Le troisième et dernier stade est un épuisement du pancréas, qui ne secrète plus d'insuline en réponse au glucose. On observe

alors un effondrement du taux circulant d'insuline (insulinopénie) qui devra alors être corrigé par des apports exogènes en insuline (Kahn et al., 2014).

Comme toutes les pathologies complexes, le diabète de type 2 est la résultante de plusieurs facteurs. Des prédispositions génétiques ainsi que des facteurs environnementaux semblent impliqués dans le développement du diabète de type 2 mais il est aujourd'hui admis que la surconsommation de produits riches en graisses et en sucre, associée à une diminution de l'activité physique, sont deux facteurs déterminants dans l'installation du diabète de type 2 (Hu et al., 2001). Il a été en effet constaté que la majorité des patients atteints de diabète de type 2 étaient également obèses (De Lorenzo et al., 2019). À terme le diabète de type 2 peut conduire à des rétinopathies, des néphropathies ou encore des « plaies de pieds » aboutissant souvent à des amputations (Zimmet et al., 2001) du fait de l'altération de la microcirculation.

- D'un point de vue clinique, l'hyperglycémie à jeun induite par une insulino-résistance est rarement isolée. Elle est souvent accompagnée d'autres troubles métaboliques tels que :
- Une obésité viscérale caractérisée par un tour de taille supérieur à 102 cm chez l'homme et 88 cm chez la femme.
- Une hypertriglycémie : triglycérides plasmatiques supérieurs ou égaux à 1.7 mmol/L.
- Un HDL cholestérol bas : inférieur à 1.03 mmol/L chez l'homme et 1.25 mmol/L chez la femme.
- Une augmentation de la pression artérielle : pression artérielle systolique supérieure ou égale à 135/85 mm Hg ou patient traité pour l'hypertension artérielle.

Selon l'IDF (International Diabetes Federation), le syndrome métabolique, ou syndrome « X » est défini par la coexistence d'au moins trois de ces paramètres dont l'obésité. D'un point de vue clinique, le syndrome métabolique multiplie par trois le risque d'accident cardiovasculaire et par neuf le risque de développer un diabète de type 2. La prise en charge rapide et globale de ces patients est alors indispensable pour prévenir ces complications (Delarue et al., 2006).

ii. La stéatose hépatique non alcoolique

La stéatose hépatique non alcoolique ou « NASH » est une des complications majeures de l'obésité et se caractérise par une accumulation massive de triglycérides (TG) dans les hépatocytes (Chalasani et al., 2012). Lors de l'obésité, le tissu adipeux ne peut plus stocker les trop grandes quantités de TG circulants, il en résulte alors une augmentation des taux circulants d'acides gras libres qui vont être stockés de manière ectopique dans différents organes tels que le cœur, les muscles squelettiques et le foie (Gaggini et al., 2013). Cette accumulation massive de TG induit d'importantes altérations physiologiques du foie avec notamment une augmentation de la lipogenèse (augmentation de l'expression des facteurs de transcription SREBP-1C et ChREBP), une diminution de l'oxydation mitochondriale des acides gras ainsi qu'une diminution de l'excrétion des TG aboutissant à l'installation d'une stéatose hépatique non alcoolique (Ress and Kaser, 2016). La stéatose hépatique non alcoolique et le diabète de type 2 sont intimement liés et l'évolution de l'une impacte généralement sur celle de l'autre. On estime en effet que 20 à 75% des patients diabétiques de type 2 souffrent également de stéatose hépatique non alcoolique (Ruhl and Everhart, 2004) et que la gravité de la stéatose serait un indicateur des quantités d'insuline de substitution à apporter aux patients afin de réguler leur glycémie (Yki-Järvinen et al., 2006). De plus, la stéatose hépatique non alcoolique est associée à une augmentation de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires qui vont, à leur tour, favoriser l'installation de l'insulino-résistance systémique (Cai et al., 2005).

i. L'inflammation chronique de bas grade

Il est aujourd'hui largement admis que l'obésité est associée à une inflammation chronique dite de « bas grade ». En effet, de nombreux marqueurs clés de l'inflammation ont été associés à l'obésité et ses conséquences (Bahceci et al., 2007). Une méta-analyse de 51 études transversales indépendantes a montré une corrélation entre l'obésité et les taux circulants de la C-Reactive-Protein (CRP), un marqueur d'inflammation systémique (Choi et al., 2013). En dépit de cette très forte corrélation, les liens de causalité entre obésité, inflammation et troubles du métabolisme ne sont pas encore totalement élucidés. Plusieurs hypothèses ont émergé quant à l'origine de cette inflammation chronique et seront discutées au cours de cette thèse.

II. L'intestin et le microbiote : Des interactions nombreuses et complexes

a) Le tractus gastro-intestinal

Le tractus gastro-intestinal est composé du tube digestif et des glandes annexes. Le tube digestif est décrit comme un conduit qui s'étend sans interruption des lèvres à l'anus et qui comprend la bouche, le pharynx, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et le gros intestin (comprenant le caecum, le colon, le rectum et se termine par l'anus). Les glandes annexes sont les glandes salivaires, le foie (sécrétant la bile), la vésicule biliaire (stockant la bile pour la délivrer dans le tube digestif si besoin) et le pancréas (**Figure 1**). Le principal rôle du système digestif est de digérer, d'absorber les nutriments qui rejoignent la circulation sanguine et lymphatique et d'éliminer les déchets de l'organisme.

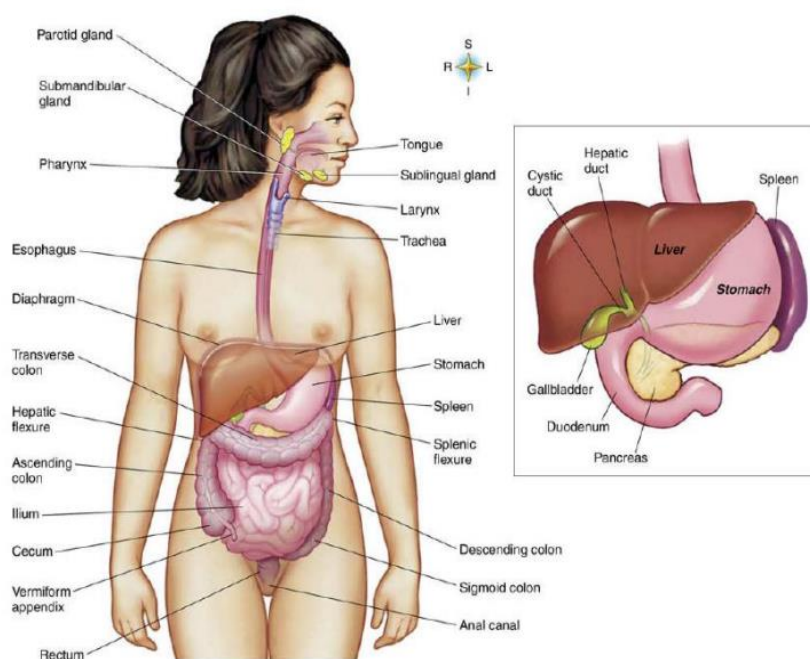


FIGURE 1 : ORGANISATION DU SYSTEME DIGESTIF QUI S'ETEND DE LA BOUCHE A L'ANUS.

L'intestin a longtemps été considéré comme un simple tube où les aliments sont digérés et absorbés. Mais cette vision simpliste de nos intestins est aujourd'hui bien révolue : l'intestin est un organe puissant et délicat qui possède des interactions avec quasiment tous les tissus du corps humain. Des maladies métaboliques (Cani et al., 2007a) aux pathologies neurodégénératives (Dodiya et al., 2018), de nombreuses études ont mis en avant des interactions entre l'apparition de ces pathologies et des altérations intestinales. Ainsi, l'étude

du système digestif est aujourd'hui devenue un élément important dans la compréhension de l'étiologie de nombreuses pathologies.

b) Barrière et perméabilité intestinale

Le rôle de la paroi intestinale est extrêmement complexe puisqu'elle doit à la fois être perméable pour permettre les échanges gazeux et nutritionnels, mais également être capable de limiter le passage de substances nocives et d'agents pathogènes. Pour cela, elle s'appuie sur une structure complexe, tant par les cellules qui la composent que par les processus chimiques et mécaniques qui lui sont associés.

La fonction barrière de l'intestin est dans un premier temps assurée par une monocouche de cellules épithéliales étroitement reliées entre elles par des jonctions adhérentes (β -caténine, E-cadhérine, p120-caténine) et des jonctions serrées (zonula occludens, occludines et claudines) garantissant ainsi une forte cohésion (Odenwald and Turner, 2017) (**Figure 2**). L'épithélium intestinal se maintient grâce à un important renouvellement cellulaire. On considère que l'épithélium intestinal est renouvelé tous les 3 à 5 jours grâce notamment à une très forte prolifération de cellules souches (Karam, 1999).

La fonction barrière de l'intestin est également assurée par une couche de mucus, principalement constituée de mucines sécrétées par les cellules caliciformes, recouvrant l'épithélium. Cette couche de mucus diffère en fonction de sa localisation dans le tractus gastro-intestinal. Elle diffère par sa composition, par le type de mucine sécrétée, par ses propriétés physico-chimiques et par son épaisseur. Le colon présente la couche de mucus la plus épaisse dans l'intestin notamment à cause de la pression bactérienne qui est très forte (Pelaseyed et al., 2014). La composition, les propriétés physico-chimiques ainsi que les fonctions précises de la couche de mucus seront présentées ultérieurement.

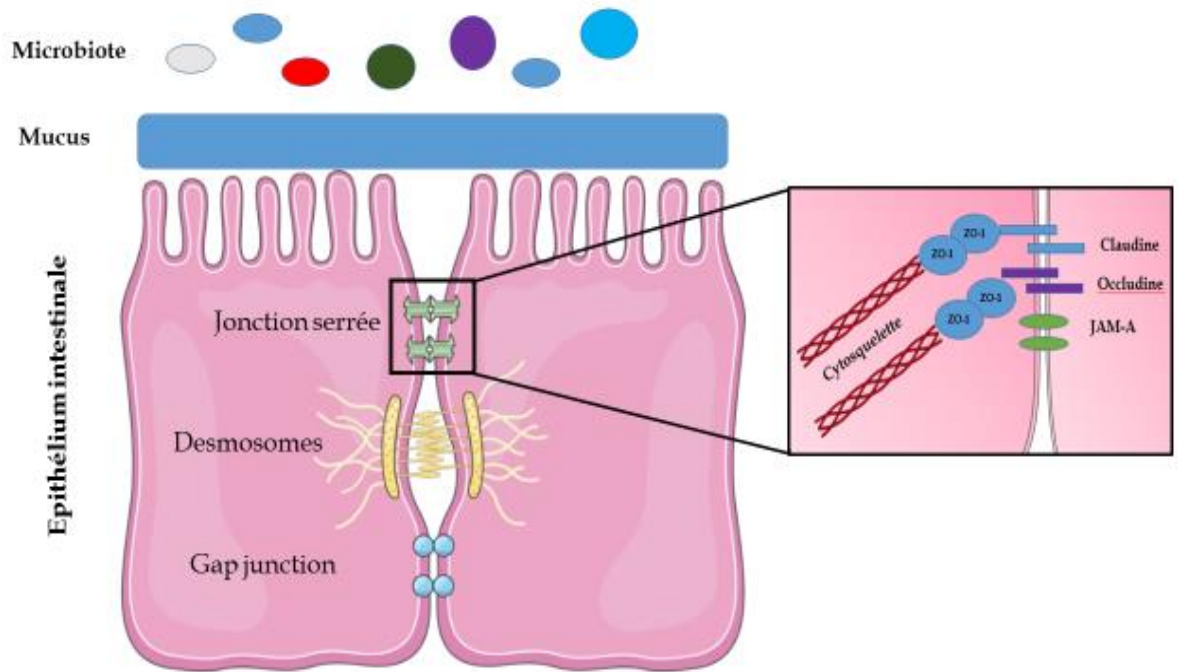


FIGURE 2 : SCHEMA DES DIFFERENTES JONCTIONS INTERCELLAIRES ET ORGANISATION D'UNE JONCTION SERREE.

Les jonctions serrées permettent de lier fermement deux cellules entre elles. Ces jonctions assurent la cohésion des épithéliums et garantissent la fonction barrière de l'intestin. ZO (Zonula Occludens), JAM-A (Junction Adhesion Molecule A)

En association avec une protection « physique », l'épithélium intestinal comprend également une protection chimique et immunitaire qui participe à sa protection vis-à-vis des microorganismes pathogènes tout en épargnant le microbiote résidant. Ainsi, les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens (PAM) aux propriétés immunologiques et bactéricides tels que les peptides REGIIIIG (Regenerating islet-derived protein 3 gamma), TFF3 (Trefoil factor 3), ou encore FCGBP (FC fragment of IgG Binding Protein). En association avec des immunoglobulines (IgA) sécrétoires et des cytokines inflammatoires issues des cellules immunitaires colonisant les muqueuses intestinales (Loonen et al., 2014), les PAM vont permettre de contenir le microbiote résidant et de prévenir ainsi une infection massive de l'intestin (Vaishnava et al., 2011).

La perméabilité est une fonction essentielle de l'intestin et s'oppose à la fonction barrière de ce dernier. L'absorption des nutriments se fait principalement *via* la perméabilité transcellulaire (à travers les entérocytes) impliquant de nombreux transporteurs actifs ainsi que des phénomènes d'endocytose et de transcytose. (Kiela and Ghishan, 2016; Turner et al., 2014). La perméabilité paracellulaire (passage entre les cellules intestinales) permet quand a

elle le passage de l'eau et des électrolytes mais peut également servir de voie de passage pour les très grosses protéines (Keita and Söderholm, 2010). En conditions physiologiques, les jonctions serrées régulent très finement le passage paracellulaire et sont capables de « s'ouvrir » à l'arrivée du bol alimentaire pour permettre le passage des nutriments (Turner et al., 2014).

c) Les altérations de la barrière intestinale lors de l'obésité

Le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale est indispensable au bon fonctionnement de l'hôte. Dans de nombreux processus pathologiques, notamment l'obésité, cette barrière intestinale est altérée et ne remplit plus correctement cette fonction. C'est ainsi que les altérations intestinales sont de plus en plus présentées comme des événements importants dans l'étiologie de l'obésité et de ces complications (Cheru et al., 2019; Genser et al., 2016).

i. Méthodes d'évaluation de la perméabilité intestinale

On peut les classer en deux catégories. La première consiste à évaluer l'intégrité de l'intestin et des jonctions serrées, grâce notamment à une coloration à l'Hémaréine et Eosine qui permet d'évaluer les structures intestinales (longueur des cryptes et des villosités, mesure de l'épaisseur de la couche de mucus interne, nombres de cellules caliciformes...). Des techniques d'immunofluorescence utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre des protéines de jonctions serrées associées à des mesures d'expression génique (PCR temps réel) et protéique (Western blot) permettent d'évaluer l'intégrité des jonctions serrées (Hartmann et al., 2012).

La deuxième catégorie regroupe l'ensemble des techniques permettant de renseigner sur la fonctionnalité de l'intestin et notamment sa fonction barrière. L'administration entérale de marqueurs non digestibles tels que le FITC-Dextran, des sucres, des radio-isotopes ou des polyéthylènes glycolés (PEG) permettent d'évaluer leurs flux depuis la lumière intestinale vers la circulation sanguine (Volynets et al., 2016). La mesure des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), tels que les lipopolysaccharides (LPS) ou les peptidoglycanes (constituants des bactéries), dans la circulation sanguine permet également de rendre compte de la fonction barrière.

Chez l'homme, plusieurs biomarqueurs sont utilisés pour étudier la perméabilité et l'inflammation intestinale. La Zonuline, protéine de 47 kDa, est capable de moduler la perméabilité intestinale en dissociant les jonctions serrées entre les cellules épithéliales du tube digestif (Wang et al., 2000). Une augmentation des taux circulants de Zonuline est notamment associée à une augmentation de la perméabilité intestinale ainsi qu'à l'obésité (Fasano, 2012).

La Calprotectine, qui représente 60% des protéines cytosoliques des granulocytes neutrophiles, est exprimée dans les macrophages et les monocytes humains (Johne et al., 1997). Lors d'altérations intestinales, les granulocytes neutrophiles activés vont migrer vers l'épithélium intestinal et sécréter de grandes quantités de Calprotectine dans les fèces (Costa et al., 2005). Sa présence dans les fèces est ainsi considérée comme un bon marqueur d'inflammation intestinale.

ii. L'hyperperméabilité intestinale

Une hyperperméabilité intestinale est observée lorsque l'intestin ne parvient plus à remplir son rôle de barrière en régulant le passage des molécules de la lumière intestinale vers la circulation sanguine. Cette hyperperméabilité intestinale a été mise en évidence chez des modèles murins génétiquement obèses ou rendus obèses par un régime hyperlipidique (Moreira et al., 2012; Johnson et al., 2015). Si l'hyperperméabilité intestinale est retrouvée presque systématiquement chez des modèles murins rendus obèses par l'utilisation de régimes hyperlipidiques (Brun et al., 2007; Bidu et al., 2018a), elle n'est en revanche pas toujours retrouvée dans les modèles génétiquement obèses pouvant suggérer que le régime hyperlipidique est responsable de l'hyperperméabilité, plus que l'obésité en elle-même (Suzuki and Hara, 2010; Stenman et al., 2013). Plusieurs équipes ont rapporté une forte altération des protéines de jonction lors d'un régime hyperlipidique (Chelakkot et al., 2018; Thaïss et al., 2018). Par exemple, Rizwan et collaborateurs ont montré que l'altération de la perméabilité intestinale était associée à une importante restructuration des jonctions serrées induite par des modifications transcriptionnelles et protéiques des claudines, protéines fortement impliquées dans la structuration des jonctions serrées. Ces auteurs ont en effet observé une diminution de l'expression des claudine-3 et 7 associée à une augmentation de l'expression de la claudine-4 chez des souris nourries avec un régime hyperlipidique par rapport à des souris nourries avec un régime contrôle. S'il est aujourd'hui largement admis que les régimes obésogènes sont responsables d'une hyperperméabilité intestinale dans les modèles murins, les données chez l'Homme sont en revanche plus rares et parfois contradictoires. Ainsi, Brignardello et collaborateurs n'ont observé aucune modification de

perméabilité intestinale chez 13 sujets obèses comparativement à 11 sujets sains suite à des mesures de perméabilité intestinale, d'inflammation systémique et de concentrations fécales en calprotectine et en leptine (Brignardello et al., 2010). En revanche, une étude similaire a rapporté une altération de la fonction barrière intestinale de sujets obèses (Teixeira et al., 2012). Chez des sujets sains, une étude a montré une corrélation positive entre la perméabilité colique et la quantité de graisse viscérale mais sans lien avec l'IMC (Gummesson et al., 2011).

iii. *L'endotoxémie métabolique et ses conséquences*

De récentes études sur des modèles murins (Cani et al., 2007a, 2008; Everard et al., 2013) et chez l'Homme (Basu et al., 2011; Pendyala et al., 2012; Kallio et al., 2015; Clemente-Postigo et al., 2019) suggèrent que l'endotoxémie métabolique pourrait être en partie responsable des altérations métaboliques observées lors de l'obésité.

L'endotoxémie métabolique est définie comme une faible augmentation chronique des taux circulants de lipopolysaccharides (LPS). Les lipopolysaccharides sont des glycolipides présents sur la paroi cellulaire externe des bactéries gram négatives, représentant 70% des bactéries peuplant l'intestin et qui contiennent une structure dite immunogène : le lipide A. Lorsque les LPS se retrouvent dans la circulation sanguine, ils vont être rapidement pris en charge par la *LPS binding protein* (LBP), synthétisée par le foie et qui permet sa présentation à un récepteur membranaire, le cluster de différenciation 14 (CD14). L'importance de LBP et de CD14, dans la réponse cellulaire induite par le LPS, a été définitivement mise en évidence à l'aide de souris invalidées pour chacune de ces protéines (Haziot et al., 1995; Moore et al., 2000). Le complexe LPS-LBP-CD14 sera ensuite présenté à son récepteur : le Toll-Like Receptor 4 (TLR4). Des souris invalidées pour TLR4 ont confirmé que la présence de TLR4 est nécessaire dans la voie de signalisation du LPS (Hoshino et al., 1999). Néanmoins, si la présence de TLR4 est nécessaire pour induire un signal cellulaire aboutissant à l'activation de plusieurs voies pro-inflammatoires, elle n'est pas suffisante. En effet, une deuxième protéine appelée MD2 (Myeloid Differentiation-2) est nécessaire pour que les cellules deviennent totalement réactives aux endotoxines (Shimazu et al., 1999). TLR4, MD2 et CD14 forment ainsi le complexe de reconnaissance du LPS, appelé LPS-recognition complex (Medzhitov and Janeway, 2000)(**Figure 3**). TLR4 est présent non seulement à la surface des cellules immunitaires mais également à la surface de nombreuses autres cellules (muscles squelettiques, foie et tissus adipeux) ce qui explique le large impact du LPS (Boutagy et al., 2016).

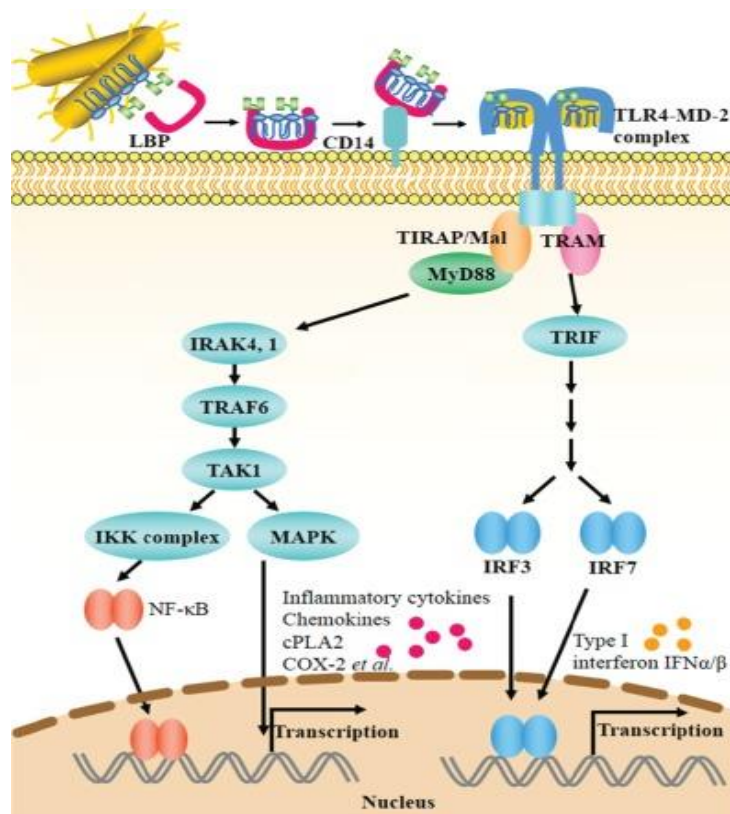


FIGURE 3 : SCHEMA DE LA PRISE EN CHARGE DU LPS DANS LA CIRCULATION SANGUINE ET DE L'ACTIVATION DES DIFFERENTES VOIES DE L'INFLAMMATION.

A la différence de ce qui peut être observé lors d'un choc septique, au cours duquel les teneurs en LPS sont environ 100 fois plus élevées que la normale, les teneurs retrouvées lors de l'endotoxémie métabolique sont « seulement » 2 à 3 fois plus élevées. Cani et collaborateurs ont été parmi les premiers à décrire, dans des modèles murins, cette « faible » augmentation chronique de LPS circulant lors d'une obésité alimentaire mais également chez des souris rendues génétiquement obèses (souris Ob/Ob) (Cani et al., 2008). Cette endotoxémie métabolique serait ainsi susceptible de déclencher et d'entretenir une inflammation chronique de bas grade et serait également associée au développement des altérations métaboliques. En effet, l'injection de faibles doses de LPS (300 µg/Kg/Jour) chez la souris, administrées en continu *via* des pompes osmotiques, conduit à l'installation d'une inflammation chronique de bas bruit ainsi qu'à des altérations métaboliques comparables à celles observées chez les souris obèses (Cani et al., 2008, Blasco-Baque et al., 2017). De plus, des souris traitées aux antibiotiques sont en partie protégées de l'endotoxémie métabolique, des altérations métaboliques et intestinales ainsi que de l'infiltration macrophagique induite par un régime riche en graisses (Cani et al., 2008). Afin de démontrer le rôle du LPS et de sa prise en charge

dans l'étiologie de l'obésité et de ses complications, des modèles murins déficients pour le récepteur TLR4, ou pour le corécepteur CD14, ont été nourris avec des régimes hyperlipidiques. Les auteurs ont rapporté que ces modèles déficients sont résistants aux altérations observées lors de l'obésité (Kim et al., 2007) mettant ainsi en lumière le rôle du LPS dans l'étiologie des maladies métaboliques.

Cependant, plusieurs études semblent aller à l'encontre du rôle causal direct de l'endotoxémie sur le développement des troubles métaboliques induits par l'obésité. En effet, que ce soit chez l'homme ou la souris (Caesar et al., 2015), l'endotoxémie métabolique n'est pas toujours retrouvée malgré la présence d'une inflammation chronique de bas grade et d'altérations métaboliques. De plus, plusieurs études n'ont pas rapporté d'altération de la sensibilité à l'insuline ni de modification de prise de poids lors d'un apport faible et continu de LPS (Dudele et al., 2015).

d) Le microbiote intestinal

i. Généralités

Nous ne sommes jamais seuls : les bactéries sont partout et peuvent proliférer dans n'importe quelles conditions. C'est Antoine van Leeuwenhoek, il y a 350 ans, qui fut le premier à observer ces microorganismes procaryotes à l'aide d'un microscope de sa propre fabrication. Il les appela les « animalcules » et publia une série d'observations qu'il envoya à la Royal Society. Le microbiologiste allemand Christian Gottfried Ehrenberg fut le premier à utiliser le nom de bactérie en 1838, qui provient du mot grec « *βακτηριον* » qui signifie bâtonnets, en référence à la forme des premières bactéries observées.

Avec leurs formidables capacités d'adaptation, les bactéries colonisent notre organisme et trouvent des conditions idéales pour s'installer au niveau intestinal : nutriments en abondance, température optimale, condition anaérobie... Ainsi, nous sommes habités par plus de 1000 espèces de bactéries qui représentent 1 à 3 kg de notre masse corporelle. Elles partagent leur environnement avec des levures, des champignons, des archées et des virus et cet ensemble constitue le microbiote (Sommer and Bäckhed, 2013). Comme il existe un microbiote intestinal, il existe également un microbiote buccal, pulmonaire, vaginal... qui présentent des compositions et des fonctions qui leurs sont propres. L'évolution des techniques d'analyses ont permis, non seulement de mieux décrire le microbiote intestinal mais également de mieux comprendre son fonctionnement.

ii. Méthodes d'analyse du microbiote intestinal

Dans les années 2000, l'avènement du séquençage à haut débit a permis de faire des avancées notoires dans l'étude du microbiote intestinal. Le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S est aujourd'hui la méthode la plus utilisée pour l'analyse compositionnelle du microbiote. L'ARN 16S est présent dans toutes les bactéries, est extrêmement bien conservé et possède des régions variables propres à un groupe de bactéries (genre, famille, espèce...) appelées « séquences signatures » qui sont amplifiées, séquencées puis comparées à des bases de données permettant d'identifier l'espèce bactérienne. Cette méthode de référence dans l'étude de la composition du microbiote présente cependant quelques limites (Poretsky et al., 2014). En effet, elle ne permet pas de quantifier les bactéries et ne renseigne pas sur leurs fonctionnalités. La métagénomique permet de séquencer les génomes entiers de bactéries et a permis de répertorier plus de 10 millions de gènes pour le microbiote humain (3 millions dans le microbiote murin) permettant ainsi de mieux comprendre comment fonctionnent les bactéries tant en condition physiologique que pathologique (Quince et al., 2017). La technique de bio-informatique, PICRUST (Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states), utilisant le séquençage de l'ARN 16S, permet de prédire la fonction de certaines bactéries, sans séquencer la totalité du génome (Langille et al., 2013). La métagénomique ne renseigne cependant pas sur la transcription des gènes en ARN et donc ce qui est finalement synthétisé par le microbiote, ce que permet la métatranscriptomique (analyse direct des ARNm) (Aguar-Pulido et al., 2016).

Ces dernières avancées technologiques ont permis de révolutionner nos connaissances du microbiote intestinal qui est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière et dont l'implication dans les maladies métaboliques en fait une cible intéressante dans la prise en charge thérapeutique des patients (Paek and Lee, 2018). De nombreux travaux doivent encore être réalisés pour mieux comprendre le fonctionnement de ce microbiote et les mécanismes moléculaires précis connectant le phénotype de l'hôte à son profil intestinal. La compréhension de ces mécanismes devrait permettre à terme de pouvoir moduler le microbiote intestinal (probiotiques, prébiotiques, transplantation...) dans un objectif préventif et curatif des maladies métaboliques.

iii. Composition du microbiote

Les techniques dites « omiques » ont permis une description plus complète du microbiote intestinal. Bien que des variations significatives aient été observées durant les premiers stades de la vie et chez les personnes âgées (Campeotto et al., 2007; Yatsunenko et al., 2012), la composition du microbiote est relativement stable tout au long de la vie. Si de nombreux facteurs sont connus pour avoir un impact sur la composition et la fonctionnalité du microbiote (alimentation, prise d'antibiotiques, alcool...), ce dernier est cependant qualifié de résilient. En effet, des facteurs extrinsèques modérés vont entraîner des modifications temporaires et réversibles (De La Cochetière et al., 2005) du microbiote. Cependant, des altérations irréversibles de ce dernier ont été observées lors d'un stress important et prolongé comme une prise massive d'antibiotiques (Nobel et al., 2015) ou un régime carencé en fibres (Sonnenburg et al., 2016).

La majorité des espèces bactériennes du microbiote intestinal appartiennent à trois phyla bactériens : Les Bacteroidetes, les Firmicutes et les Actinobacteria. Des phyla minoritaires sont également retrouvés tels que les Protéobactéries, les Fusobactéries ou les Verrucomicrobia. Il n'existe pas un microbiote mais plusieurs microbiotes intestinaux : En effet, le microbiote va présenter des densités, des compositions et des fonctionnalités différentes selon sa localisation dans le tractus gastro-intestinal (Eckburg et al., 2005). Sa densité et sa composition peuvent être modulées par des gradients chimiques (oxygène, acidité...), physiques (vitesse du transit intestinal, couche de mucus...) et immunitaires (peptides antimicrobiens, immunoglobulines A...). Le microbiote résidant de l'intestin grêle doit faire face à d'importantes quantités de peptides antimicrobiens, un environnement très acide et riche en oxygène ainsi qu'à un temps de transit du bol alimentaire très court. Les acides biliaires, produits par le foie et sécrétés dans l'intestin, sont également connus pour leurs propriétés bactéricides. En effet, leurs propriétés tensioactives vont moduler la composition du microbiote intestinal (Islam et al., 2011). Le microbiote de l'intestin grêle chez la souris est ainsi massivement représenté par les genres Lactobacillaceae et Proteobacteria (Gu et al., 2013). Chez l'homme, des échantillons d'iléon ont montré une densité plus faible que dans le colon associée à un enrichissement en bactéries du genre Proteobactéries et Clostridium (Zoetendal et al., 2012).

Contrairement à l'intestin grêle, les conditions dans le colon sont beaucoup plus permissives et accueillantes pour les bactéries : Un temps de transit lent, des fibres non-digestibles par l'hôte, une quasi absence d'oxygène, une pression immunitaire beaucoup plus faible et une épaisse couche de mucus apportant des nutriments en grande quantité, permettent de passer d'une densité de 10^4 à 10^5 bactéries par gramme de contenu intestinal du duodénum contre 10^{11} à 10^{12} dans le contenu colique et d'augmenter de façon importante la diversité de ce microbiote (**Figure 4**). Chez l'homme, le colon est composé majoritairement de *Bacteroidaceae* et *Clostridiaceae* (Donaldson et al., 2016) mais il existe également des diversités bactériennes au sein même du colon. Plusieurs études ont rapporté des différences de composition entre les microbiotes selon qu'on se situe proche de la lumière intestinale ou plus proche de la muqueuse (Eckburg et al., 2005; Lavelle et al., 2015). De plus, plusieurs études ont montré que la couche de mucus colique était une réelle niche microbienne intestinale et qu'une même espèce peut présenter une prolifération et une utilisation des substrats différentes selon sa présence dans la couche de mucus ou bien dans la lumière intestinale (Li et al., 2015; Schroeder, 2019) .

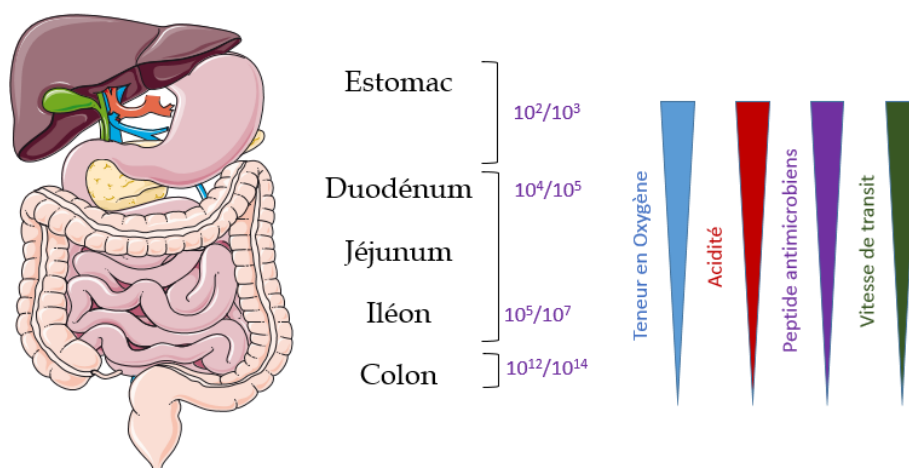


FIGURE 4 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA DENSITE BACTERIENNE ET DES DIFFERENTS ACTEURS MODULANTS LA COMPOSITION BACTERIENNE DANS LE TRACTUS GASTRO-INTESTINAL.

iv. Mise en place du microbiote intestinal

Le partenariat hôte-microbiote débute dès la naissance, durant laquelle le nourrisson passe d'un environnement clos aseptique à un environnement riche en bactéries (Campeotto et al., 2007). Cette colonisation bactérienne débute *in utero* (Walker et al., 2017). Lors de la naissance, une colonisation massive et brutale se met en place par les bactéries vaginales et fécales de la mère. (Campeotto et al., 2007). Durant les premières années de vie de l'enfant, les bactéries anaérobies facultatives (staphylocoques, entérobactéries, entérocoques) sont les

premières à s'implanter avant d'être progressivement remplacées par des bactéries anaérobies strictes telles que les genres *Bifidobacterium*, *Bacteroides* et *Clostridium* (Campeotto et al., 2007). Le microbiote de l'enfant va ensuite se diversifier et être modulé par son environnement (alimentation, contact avec les autres...) durant une période de 3 ans avant de se stabiliser (Mohammadkhah et al., 2018)

Si les mécanismes précis impliqués dans l'installation du microbiote chez le nourrisson sont encore peu connus, de nombreux facteurs peuvent la moduler. En effet, le mode d'accouchement, (Biasucci et al., 2010), le type d'alimentation (lait maternel ou lait en poudre) (Guaraldi and Salvatori, 2012), l'utilisation d'antibiotiques ou la prématurité de l'accouchement (Arboleya et al., 2012) peuvent favoriser l'installation de certains genres bactériens.

v. Rôles du microbiote

1. Maturation du tractus gastro-intestinal

Les microorganismes présents dans le microbiote jouent un rôle majeur dans la maturation morphologique et fonctionnelle des structures intestinales. La couche de mucus tapisse la totalité de la surface du tractus gastro-intestinal et permet de protéger les cellules de l'hôte. Les souris axéniques présentent une couche de mucus fortement altérée, avec une très faible épaisseur et une forte majorité de mucines neutres au niveau du colon. De plus, ces animaux présentent peu ou pas de villosités intestinales et bien moins de cellules caliciformes, sécrétrices de mucus. L'apport d'un microbiote ou de composants bactériens (LPS ou Peptidoglycanes), a été montré comme suffisant pour permettre à une souris axénique de retrouver un mucus fonctionnel, témoignant du rôle prépondérant de ce microbiote dans l'homéostasie de cette structure intestinale (Johansson et al., 2015; Sicard et al., 2017)

La maturation du tractus gastro-intestinal est ainsi dépendante de la présence d'un microbiote et de sa diversification. De ce fait, des souris axéniques présentent une surface intestinale nettement inférieure à celle de souris conventionnelles avec des villosités plus courtes et un renouvellement cellulaire plus long (Gallo and Hooper, 2012; Johansson et al., 2015). L'absence de microbiote a également été associée à une augmentation de la perméabilité intestinale du fait de l'absence de bactéries permettant de maintenir la cohésion et l'intégrité de la barrière intestinale (Hayes et al., 2018). L'implantation d'un microbiote chez des souris axéniques va permettre de rapidement inverser ces altérations et de rétablir une homéostasie intestinale (Johansson et al., 2015). Si les mécanismes moléculaires précis impliqués dans la

maturation du tractus gastro-intestinal par le microbiote restent peu connus, plusieurs études ont cependant mis en avant le rôle des récepteurs TLR2 et TLR4 et des cascades de signalisation sous-jacentes (Rakoff-Nahoum et al., 2004; Bouskra et al., 2008; Inoue et al., 2017).

2. *Maturation du système immunitaire*

Un dialogue complexe existe entre le microbiote et le système immunitaire. Le microbiote va « éduquer » le système immunitaire, en permettant notamment le développement des organes lymphoïdes primaires et secondaires, qui va en échange tolérer la présence des microorganismes.

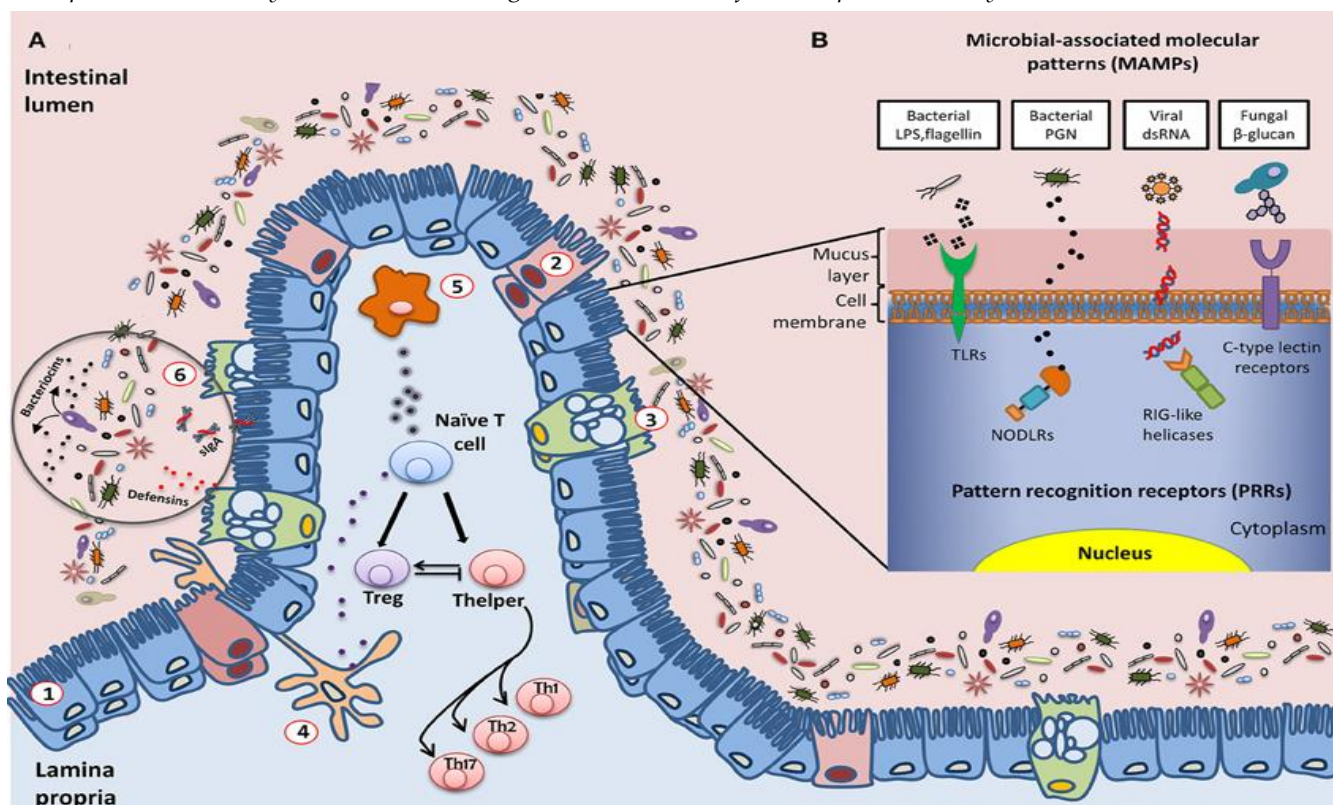
La sécrétion de peptides antimicrobiens (PAM) par les cellules de Paneth constitue l'un des premiers mécanismes de défense de l'hôte (en combinaison avec la sécrétion de mucus). Ces PAM possèdent diverses propriétés bactéricides leur permettant d'agir sur un large spectre d'espèces bactériennes (**Figure 5**). Ils sont sécrétés tout au long du tractus gastro-intestinal mais on les retrouve en très grand nombre au niveau de l'intestin grêle (Clevers and Bevins, 2013). L'implantation de bactéries chez des souris axéniques stimule fortement la sécrétion de PAM (Ostaff et al., 2013). Cette régulation dynamique fait intervenir les TLR et les NOD (Nucleotide Oligomerization Domain) qui vont activer la voie de l'inflammation NF-Kb (Nuclear factor-kappaB) entraînant la libération de cytokines pro-inflammatoires. Ces processus vont alors permettre à la fois de renforcer l'intégrité de la barrière intestinale et de recruter les cellules de l'immunité (Rakoff-Nahoum et al., 2004) (**Figure 5**). En revanche, l'inactivation de la voie NF-Kb dans les cellules intestinales conduit à de graves colites et à une dysbiose massive du microbiote intestinal. (Wullaert et al., 2011).

Secondairement, des cellules immunes hématopoïétiques sont retrouvées dans des conditions physiologiques en grande quantité dans la lamina propria et dans le chorion. Une fois activées, ces cellules immunitaires vont pouvoir rejoindre l'intestin et renforcer l'immunité innée déjà présente (Lee et al., 2018). Les macrophages CD11b⁺ CX3CR1^{hi} (C-X3-C motif chemokine receptor 1) permettent de capter les bactéries infiltrées dans l'épithélium, tout en sécrétant l'interleukine 10 (IL-10) anti-inflammatoire, maintenant ainsi l'homéostasie intestinale. Une fois activés, les plasmocytes (cellules de l'immunité adaptative) vont sécréter des IgA (immunoglobulines A) qui vont rejoindre la lumière intestinale et se lier aux bactéries (Nakajima et al., 2018) permettant la liaison de ces dernières avec le mucus pour faciliter leur élimination. Il a été montré que l'apport d'un microbiote à des souris axéniques va permettre le recrutement de divers lymphocytes au niveau intestinal, tels que des lymphocytes TH-17

(T-helper), sécréteurs d'IL-17 (Min and Rhee, 2015), jouant un rôle majeur dans la défense antibactérienne de par leur effet pro-inflammatoire.

FIGURE 5 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES INTERACTIONS CONNUES ENTRE LE MICROBIOTE ET LES CELLULES IMMUNITAIRES DE L'HÔTE

D'après (Hevia et al., 2015). **A)** : Vue générale de l'épithélium intestinal en contact avec les très nombreux microorganismes composant notre microbiote. (1) Entérocytes, (2) Les cellules M (Microfold cells) qui permettent l'endocytose sélective des antigènes du microbiote afin de les présenter au système immunitaire, (3) les



cellules caliciformes sécrétrices de mucus, (4) Cellules dendritiques, cellules présentatrices d'antigène, (5) Macrophages, (6) Défensines, bactériocines, immunoglobuline A. Toutes ces cellules et molécules de l'hôte jouent un rôle majeur dans la tolérance de l'hôte vis-à-vis des microorganismes composants le microbiote. Elles permettent à la fois de mettre en place une barrière physique et immunologique efficace tout en permettant les échanges indispensables à la bonne santé de l'hôte.

3. Microbiote intestinal et métabolisme

Le microbiote intestinal est également très fortement impliqué dans le métabolisme de l'hôte. Malgré une diversité phylogénique importante, les fonctions métaboliques du microbiote sont très similaires (notion de « core fonctionnel ») d'un individu à l'autre. En effet, à partir de composés non digérés par la partie supérieure du tractus digestif de l'hôte (fibres alimentaires, protéines et peptides) et de composés endogènes (mucus, débris cellulaire), le

microbiote intestinal va synthétiser diverses molécules, allant des acides gras à chaînes courtes à la production de vitamines en passant par celle d'ammoniac ou de certains gaz (Rowland et al., 2018). Ce « core fonctionnel » serait la résultante d'une redondance des activités métaboliques des espèces bactériennes composant le microbiote intestinal (Dusko Ehrlich and MetaHIT consortium, 2010).

La synthèse des AGCC, majoritairement l'acétate, le propionate et le butyrate, se fait principalement dans le caecum et le colon de l'hôte, là où la concentration bactérienne est la plus élevée (Macfarlane and Macfarlane, 2012). Elle provient principalement des acides gras à chaînes ramifiées tels que l'isobutyrate, le 2-méthylbutyrate et l'isovalérate issus eux-mêmes d'acides aminés à chaînes ramifiées (valine, isoleucine et leucine) (Smith and Macfarlane, 1997).

Les approches métagénomiques ont permis de mieux caractériser les espèces bactériennes responsables de la production d'AGCC. Ainsi, il a été montré que la production de propionate est effectuée par un nombre restreint de bactéries, telles que *Akkermansia muciniphila* par exemple, bactérie clé dans la production de propionate à partir de mucines sécrétées par l'hôte (Derrien et al., 2004). De même, un faible nombre d'espèces représentées majoritairement par *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium halli* et *R. bromii*, est responsable de la majeure production de butyrate par le microbiote intestinal (Louis et al., 2010).

La concentration en AGCC est différente le long du tractus gastro-intestinal avec une très forte concentration dans le caecum et le colon proximal puis une diminution progressive est observée jusqu'au colon distal (Cummings et al., 1987). Le butyrate, substrat préférentiel des entérocytes, est ainsi retrouvé en très faible concentration dans la circulation sanguine tandis que les molécules de propionate et d'acétate vont rejoindre la circulation sanguine par l'intermédiaire de la veine porte. Le propionate est alors rapidement métabolisé par le foie où il va principalement servir de substrat pour la néoglucogenèse tandis que l'acétate servira de substrat à différents organes périphériques tels que les reins et les muscles (Koh et al., 2016). Les AGCC n'ont pas seulement un rôle métabolique, ils sont en effet capables d'interagir avec les cellules intestinales et de renforcer la défense immunitaire en stimulant la sécrétion de peptides antimicrobiens (Zhao et al., 2018) (Feng et al., 2018). Les AGCC vont également stimuler la sécrétion d'hormones intestinales telles que GLP-1 (glucagon like protein 1) ou NPY (neuropeptide Y) (Christiansen et al., 2018) et ont un rôle régulateur du système

immunitaire en participant à la maturation des lymphocytes T, des lymphocytes Th17 et Th22 qui vont à leur tour participer à la défense immunitaire intestinale (Asarat et al., 2016).

Les modifications des habitudes alimentaires (augmentation de la consommation de produits riches en graisses et en sucre au détriment des fibres alimentaires) induisent de profondes modifications du métabolisme microbiotique qui va s'adapter à ces modifications et ainsi métaboliser des acides aminés et des acides gras présents. Ce surplus énergétique va limiter l'activité fermentaire du microbiote et ainsi diminuer la production d'AGCC (Russell et al., 2011). Des études utilisant des modèles murins ont permis de mieux appréhender le rôle des AGCC dans la physiologie et la physiopathologie des maladies métaboliques. Ainsi, Yamashita et collaborateurs ont montré qu'une supplémentation en acétate par voie orale chez une souche de rats diabétiques et obèses réduit leur prise de poids et améliore leur tolérance au glucose (Yamashita et al., 2007). De même, des souris supplémentées en butyrate sont protégées de l'obésité et des altérations métaboliques induites par un régime obésogène, notamment via une augmentation de la dépense énergétique et de la thermogenèse basale (Gao et al., 2009). Chez l'Homme sain, les AGCC sont plutôt associés à une bonne santé métabolique (Tan et al., 2014; Chambers et al., 2018). Schwartz et ses collaborateurs ont étonnamment rapporté que les sujets obèses présentaient une augmentation d'AGCC d'origine fécale par rapport aux sujets sains (Schwartz et al., 2010). Pour expliquer ces résultats les auteurs ont supposé que les taux élevés d'AGCC fécaux chez les patients obèses étaient le reflet d'une perte d'absorptions des AGCC plutôt qu'une réelle augmentation de leurs productions coliques.

3. *Modulation du microbiote : la transplantation fécale*

La transplantation fécale ou transplantation de microbiote fécal (TMF) consiste à administrer par voie naturelle une suspension de matières fécales d'un donneur sain à un receveur souffrant d'une pathologie induite par une altération du microbiote, dans le but de le rééquilibrer. L'échantillon de matière fécale peut être administré soit *via* une sonde nasogastrique, soit par voie basse, lors d'un lavement ou lors d'une coloscopie. Le recours à la transplantation fécale, notamment lors de troubles digestifs, est utilisé depuis longtemps par les médecins traditionnels. C'est au IV^{ème} siècle qu'a été décrite pour la première fois l'utilisation de transplantation fécale ou « soupe jaune » par des médecins chinois, dans le traitement d'empoisonnement alimentaire ou de diarrhées sévères (Zhang et al., 2012a). On retrouve également une utilisation de la transplantation fécale pour soigner les formes graves d'infections gastro-intestinales. Dans les années 1940, de nombreux soldats allemands basés

en Afrique du nord succombent à des formes graves de dysenterie sans aucun traitement disponible. Les scientifiques et médecins allemands remarquent alors que la population locale, lors des premiers signes d'infection, consomment les fèces de chameaux pour se soigner. L'analyse de ces fèces permet d'identifier et d'isoler la bactérie *Bacillus subtilis*. La culture et l'administration de cette bactérie ont été alors largement utilisées pour traiter ces infections gastro-intestinales (de Groot et al., 2017). Longtemps délaissée par les thérapeutes, la transplantation fécale retrouve aujourd'hui une place dans le traitement des infections à *Clostridium difficile*. En 1983, une infection récidivante par *Clostridium difficile* est traitée avec succès par la transplantation fécale (par voie basse) et fait l'objet d'une publication dans la revue médicale The Lancet (Schwan et al., 1983)(**Figure 6**). Plus récemment, une étude clinique a comparé l'efficacité d'un traitement antibiotique, lors d'infections récidivantes à *Clostridium difficile*, avec ou sans transplantation fécale. Cette étude rapporte un qu'un traitement de patients à la vancomycine (antibiotique) associée à une transplantation fécale, présentait une efficacité (établie sur une prévention des diarrhées sous 10 jours) de 81.3% tandis qu'un traitement uniquement à la vancomycine présentait une efficacité de seulement 30.1%.(van Nood et al., 2013)

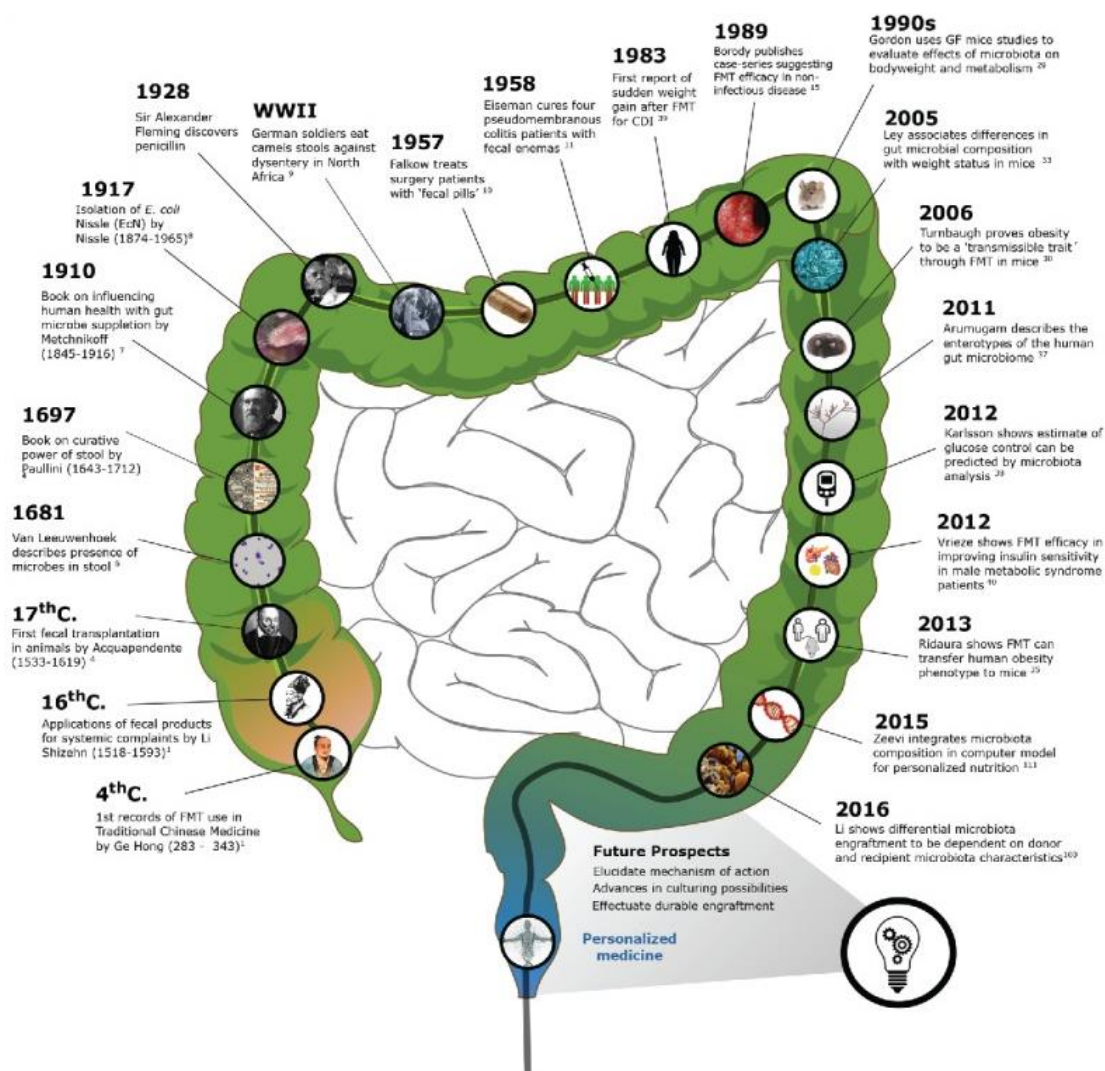


Figure 6 : Chronologie des principales découvertes concernant la transplantation fécale

(de Groot et al., 2017).

L'utilisation de la transplantation fécale est aujourd'hui considérée comme une réelle option thérapeutique, notamment dans le cadre des infections récidivantes par *Clostridium difficile*. C'est pourquoi l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) publie fréquemment des recommandations quant à l'utilisation de la transplantation fécale à des fins médicales avec notamment des conditions strictes lors de la sélection des donneurs (**Figure 7**) et des protocoles de collecte et d'administration bien définis (**Figure 8**).

- **Age : 18-65 ans**
- **IMC<30**
- **Absence de pathologies chroniques**
- **Absence de traitement curatif au long cours**
- **Absence de prise d'antibiotiques dans les 3 mois précédant le don**
- **Absence de séjour à l'étranger dans les 3 mois précédant le don**
- **Absence de résidence de plusieurs années en zone intertropicale**
- **Absence d'hospitalisation à l'étranger dans les 12 mois précédant le don**
- **Absence de troubles digestifs à type de diarrhée aigüe ou chronique dans les 3 mois précédant le don**
- **Absence d'antécédents de fièvre typhoïde**
- **Aspect macroscopique normal des selles**
- **Dépistage négatif d'agents infectieux (cf. liste proposée en annexe 1)**

Figure 7 : Résumé d'un profil « idéal » d'un donneur issu du rapport de l'ANSM publié en Novembre 2016 intitulé : « La transplantation du microbiote fécal et son encadrement dans les essais cliniques ».

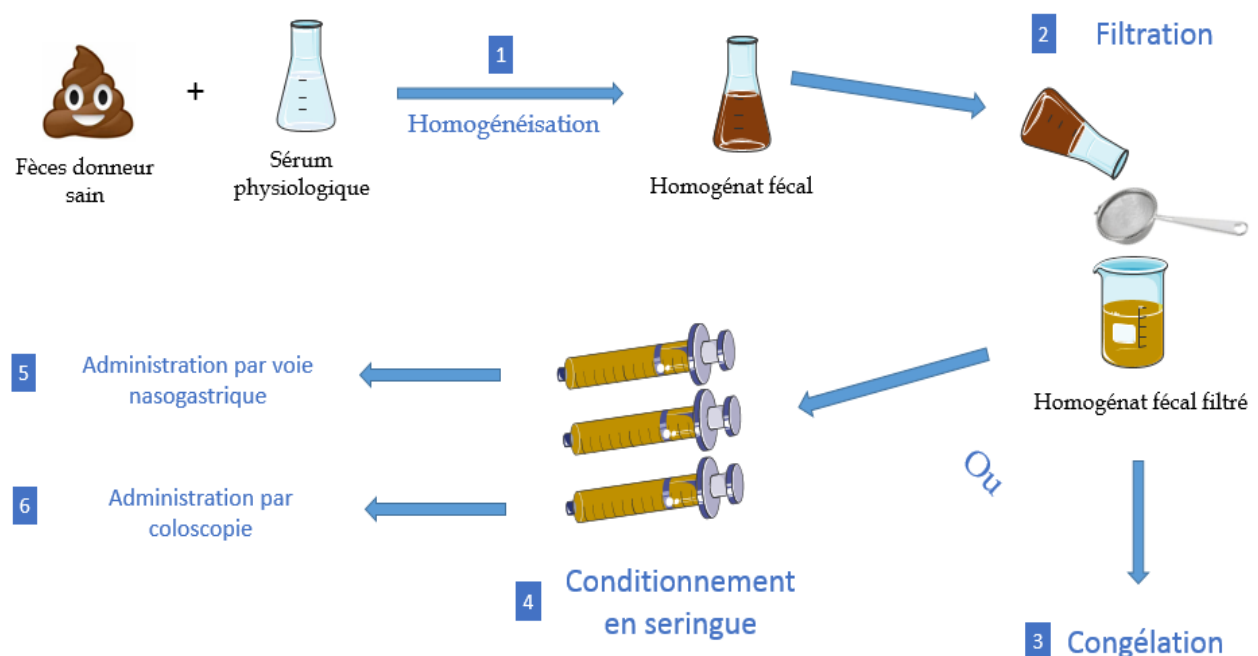


FIGURE 8 : PROTOCOLE DE LA TRANSPLANTATION FECALE OU TRANSPLANTATION DU MICROBIOTE FECALE (TAUXE ET AL., 2015) .

Les mécanismes d'action expliquant l'efficacité de la transplantation fécale sont encore peu connus, mais il semblerait que l'apport d'un microbiote sain rétablisse la diversité du microbiote et restitue les fonctions de ce dernier (Khanna et al., 2017; Wilson et al., 2019). Les nombreuses interactions, non seulement entre les bactéries et l'hôte mais également entre les bactéries elles-mêmes sont les clés de la compréhension de l'efficacité de la transplantation fécale. Des études complémentaires doivent être néanmoins effectuées afin de déterminer la notion précise de donneur sain et de pouvoir déterminer des marqueurs spécifiques associés à un bon état de santé.

e) Microbiote et maladies métaboliques.

i. *Dysbiose du microbiote et obésité*

Indépendamment de l'endotoxémie métabolique observée lors de l'obésité, des altérations de la fonction et de la diversité du microbiote, appelées dysbiose, ont été fortement corrélées avec les maladies métaboliques (Ley et al., 2006). Les travaux de Turnbaugh et collaborateurs en 2006 ont montré une relation entre obésité, diabète de type 2 et dysbiose du microbiote. Dans cette étude, les auteurs ont montré que des souris ob/ob (rendues génétiquement obèses par délétion du gène codant pour la leptine) présentaient, comparativement à des souris sauvages, une augmentation des bactéries de la famille des *Firmicutes* associée à une diminution des bactéries de la famille des *Bacteroidetes*. Le microbiote de ces souris extrait de façon plus efficace l'énergie du bol alimentaire (moins d'énergie retrouvé dans les fèces de ces souris) favorisant ainsi une augmentation de la prise de poids (Turnbaugh et al., 2006). Cette étude a mis en évidence des différences de composition et de fonctionnalité des microbiotes entre les souris obèses et les souris minces sans permettre de conclure sur la causalité de ces altérations. Ces mêmes auteurs ont transplanté des souris axéniques soit avec du microbiote issu de souris obèses soit avec du microbiote issu de souris minces. Les souris colonisées avec du microbiote issus de souris obèses ont gagné significativement plus de matière grasse que les souris ayant reçu du microbiote de souris minces. Bäckhed et collaborateurs ont montré que des souris axéniques, transplantées avec du microbiote de souris conventionnelles, prenaient plus de poids et développaient une résistance à l'insuline plus marquée lorsqu'elles étaient soumises à un régime obésogène que des souris axéniques non transplantées placées dans les mêmes conditions nutritionnelles. Les auteurs ont attribué cette différence à une meilleure efficacité à capter les carbohydrates provenant du

bol alimentaire chez les souris pourvues d'un microbiote (Ley et al., 2006; Turnbaugh et al., 2006). D'autres études sont venues confirmer ce lien de causalité entre la dysbiose du microbiote, notamment induite par des régimes hyperlipidiques, et le développement des maladies métaboliques (Anhê et al., 2015; Isolauri, 2017; Lippert et al., 2017).

Chez l'Homme, il a également été rapporté une dysbiose chez des patients obèses et des patients souffrant de diabète de type 2 avec notamment une augmentation des *Firmicutes* associée à une diminution des *Bacteroidetes* (Ley et al., 2006). Des analyses métagénomiques ont montré que le microbiote des patients diabétiques de type 2 présentait significativement moins de bactéries productrices de butyrate telles que *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia inulinivorans* et *Clostridium* (Karlsson et al., 2013; Qin et al., 2012). Plusieurs études rapportent une augmentation de l'abondance de certaines espèces de *Lactobacillus* dans les fèces de patients diabétiques comparée à celle de patients sains (Karlsson et al., 2013; Sato et al., 2014). L'abondance spécifique de deux bactéries, *Faecalibacterium prausnitzii* et *Akkermansia muciniphila* semble plus particulièrement associée à l'étiologie des maladies métaboliques.

Faecalibacterium prausnitzii, bactérie Gram+, anaérobie stricte et productrice de butyrate, appartient au phylum bactérien des *Firmicutes* et au genre des *Ruminococcus* (Duncan and Flint, 2008). Elle tient son nom du biologiste allemand Otto Prausnitz, et est une des bactéries les plus abondantes du microbiote humain avec environ 5% de la population totale d'un microbiote d'une personne saine (Louis et al., 2010). Cette bactérie joue un rôle majeur dans l'homéostasie de l'hôte. En effet, elle possède une forte capacité anti-inflammatoire notamment en bloquant l'activation de la voie NF- κ B, diminuant ainsi la sécrétion de l'IL-8 (Miquel et al., 2015). Ses effets proviennent également de sa forte capacité à produire du butyrate qui module favorablement le système immunitaire et le stress oxydatif au niveau intestinal (Hamer et al., 2008, 2009). La diminution de l'abondance de cette bactérie a été corrélée avec des pathologies telles que les MICI (Machiels et al., 2014), certains cancers (Konstantinov et al., 2013) ou encore des maladies neurodégénératives (Cattaneo et al., 2017). Plusieurs études, sur des modèles animaux et humains, ont rapporté une forte diminution de l'abondance de cette bactérie lors de la consommation de régimes riches en graisses et en sucres, en produits carnés, en produits transformés ainsi que lors de régimes pauvres en fibres (Abdallah Ismail et al., 2011; Karlsson et al., 2013). Inversement, la consommation d'une alimentation riche en polysaccharides (inuline, fibres issues des fruits et des légumes...) permet de stimuler et d'augmenter la présence de *Faecalibacterium prausnitzii* dans le

microbiote de ces sujets (Ramirez-Farias et al., 2009). La quantité de *Faecalibacterium prausnitzii* diminue de façon significative chez des patients diabétiques et cette diminution est négativement corrélée avec l'HbA1c (hémoglobine glyquée) (Karlsson et al., 2013; Qin et al., 2012). Pour comprendre cette corrélation négative entre les quantités de *Faecalibacterium prausnitzii* et les maladies métaboliques plusieurs équipes ont étudié le pouvoir anti-inflammatoire de cette bactérie. Ainsi une diminution de l'abondance de *Faecalibacterium prausnitzii* est positivement corrélée avec des marqueurs de l'inflammation tels que TNF α , IL6 et IL-1 β chez des patients obèses et diabétiques de type 2 (Hiippala et al., 2018). Il a également été montré que cette bactérie joue un rôle dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale et sa diminution, chez les patients diabétiques de type 2, favorise l'hyperperméabilité intestinale et l'endotoxémie métabolique (Ganesan et al., 2018). Dans des modèles murins, l'apport de *Faecalibacterium prausnitzii* a permis de prévenir l'inflammation et les altérations intestinales induites par une colite (Sokol et al., 2009).

Akkermansia muciniphila, naturellement présente dans les intestins, se nourrit principalement des mucines composant la couche de mucus tapissant les intestins (Ottman et al., 2017). Dans le cadre des maladies métaboliques, *Akkermansia muciniphila* semble être une piste thérapeutique prometteuse. En effet, Cani et collaborateurs ont montré que des souris rendues obèses par un régime hyperlipidique présentaient une abondance 100 fois moindre de cette bactérie par rapport à des souris nourries avec un régime standard. Pour évaluer le potentiel effet thérapeutique de cette bactérie lors de l'obésité et du diabète de type 2, ces auteurs ont administré la bactérie quotidiennement à des souris nourries avec un régime obésogène. De façon surprenante, *Akkermansia muciniphila* a permis de prévenir les altérations métaboliques induites par le régime mais également de prévenir la diminution de l'épaisseur de la couche de mucus colique (Everard et al., 2013). De plus, *Akkermansia muciniphila* est capable d'augmenter le nombre de cellules caliciformes dans le colon de souris nourries avec un régime obésogène mais également de moduler le système immunitaire en augmentant le nombre de cellules anti-inflammatoires Treg (Shin et al., 2014). Cependant, cette bactérie est très sensible à l'oxygène, rendant sa culture et son administration difficiles. Cani et collaborateurs ont récemment administré la bactérie pasteurisée (70°C) à des souris sous régime obésogène et ont montré qu'elle présentait des effets bénéfiques similaires voire meilleurs à ceux obtenus lors de l'administration de la bactérie vivante. Ils ont également montré qu'une protéine membranaire d'*Akkermansia muciniphila*, Amuc_1100, interagissait avec les récepteurs TLR2 et pouvait reproduire en partie les effets bénéfiques de la bactérie. Les prochaines étapes vont ainsi consister à évaluer si l'administration d'*Akkermansia*

muciniphila chez l'homme permet d'améliorer et /ou de prévenir les maladies métaboliques. Cani et collaborateurs ont cependant déjà montré l'innocuité de la forme pasteurisée d'*Akkermansia muciniphila* chez des receveurs sains (Plovier et al., 2017).

ii. Dysbiose et maladies métaboliques ?

De nombreuses études ont mis en avant une association entre la dysbiose du microbiote et les maladies métaboliques telles que l'obésité (Tseng and Wu, 2019), le diabète de type 2 (Grasset et al., 2017) ou encore la NASH (Brandl and Schnabl, 2017). Les mécanismes précis impliqués dans ces associations ne sont pas encore tous connus mais plusieurs pistes permettent de relier la dysbiose du microbiote et les altérations métaboliques.

Le premier élément est la modification de la production d'AGCC issus de la fermentation bactérienne. Plusieurs études ont étudié l'impact d'un régime obésogénique sur la production et le profil des AGCC. Plusieurs travaux, sur des modèles murins et lors d'études épidémiologiques, ont rapporté qu'une augmentation des concentrations fécales et plasmatiques d'AGCC étaient positivement corrélées avec la prise poids et les altérations métaboliques (Jumpertz et al., 2011; Schwiertz et al., 2010; Turnbaugh et al., 2006). Inversement, de faibles concentrations d'AGCC sont corrélées avec des phénotypes minces (Schwiertz et al., 2010). De façon surprenante, d'autres études ont rapporté, au contraire, une diminution des concentrations plasmatiques et fécales des AGCC lors de l'obésité (Murphy et al., 2010; Murugesan et al., 2015). L'équipe de Perry a analysé, en plus des AGCC plasmatiques et fécaux, le turn over de ces AGCC pour rendre compte de leur production et leur utilisation dans l'organisme entier. Les auteurs ont rapporté une augmentation importante du turn over de l'acétate chez les souris soumises à un régime obésogène mais un résultat inverse avec le butyrate et le propionate. Dans leurs travaux, les auteurs ont décrit un axe acétate-cerveau-cellules β favorisant le développement du syndrome métabolique, notamment en activant le système nerveux parasympathique, la sécrétion de ghréline et l'accumulation de graisse dans les muscles et le foie (Perry et al., 2016). Les AGCC, et plus particulièrement le butyrate, interviennent dans le maintien de la fonction barrière de l'intestin (Feng et al., 2018). Zheng et ses collaborateurs ont démontré que le butyrate favorisait le maintien de la barrière intestinale en réprimant l'augmentation de la protéine de jonction Claudine 2 *via* une augmentation de l'expression du récepteur IL-10 (Zheng et al., 2017). Dans le même sens, le butyrate favorise l'assemblage des jonctions serrées sur un modèle cellulaire de barrière intestinale (les cellules Caco2) *via* l'activation de l'AMP-activated protein kinase K (AMPK) (Zheng et al., 2017). Les AGCC sont également impliqués dans la production de peptides entéro-endocrines, en

stimulant la production de GLP-1 (Kaji et al., 2014) et de du peptide YY (PYY) (Larraufie et al., 2018) en se fixant aux récepteurs membranaires de type GPR41 et GPR43. D'autres métabolites bactériens sont également impliqués dans la régulation de la production de peptides entéro-endocriniens. En conditions physiologiques, le tryptophane apporté par l'alimentation est converti en kynurénine par l'enzyme IDO (indoléamine 2-3 dioxygénase) puis en dérivés indoles. Les indoles vont alors être capables d'une part, d'agir sur la sécrétion d'IL22 qui participe au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale mais également d'agir directement sur les cellules L en favorisant la sécrétion de GLP-1 (Chimerel et al., 2014). Enfin, les acides biliaires secondaires issus de la transformation des acides biliaires primaires par le microbiote intestinal, stimulent la sécrétion de GLP-1 par l'intermédiaire de la liaison aux récepteurs TGR5 (Katsuma et al., 2005) (**Figure 9**).

Certaines bactéries joueraient également un rôle direct dans le maintien de l'homéostasie de la barrière intestinale. En effet *Akkermansia muciniphila*, en plus de ses caractéristiques anti-inflammatoires, stimule la production de mucines, de peptides antimicrobiens et d'IL18 participant ainsi au maintien d'une couche de mucus fonctionnelle tant d'un point de vue physique qu'immunologique (Everard et al., 2013; van der Lugt et al., 2019).

De récentes études ont également montré que les acides gras à chaînes courtes présentaient également des effets extra-intestinaux importants avec notamment une augmentation de la sensibilité à l'insuline dans les muscles, le foie et le tissu adipeux (Canfora et al., 2019). Les AGCC permettraient également de diminuer la lipogenèse et l'inflammation hépatique, d'augmenter la sécrétion de leptine par le tissu adipeux mais également d'augmenter la B-oxydation dans les muscles et le foie (Morrison and Preston, 2016) (**Figure 9**).

En plus de modifier les profils des AGCC chez l'hôte, les régimes obésogènes altèrent également le métabolisme du tryptophane avec notamment une forte diminution de la production des indoles d'IL-22 (Mallmann et al., 2018). De récentes études, menées par l'équipe de Kristina Schoonjans, ont montré un regain d'intérêt pour les acides biliaires dans la lutte contre l'obésité. En effet, ces auteurs ont démontré qu'un groupe spécifique d'acides biliaires pouvait agir directement sur la thermogénèse en reprogrammant les cellules adipeuses blanches, qui stockent la graisse, en cellules adipeuses beige qui, elles, la brûlent. L'activation du récepteur TGR5 favoriserait alors la fission mitochondriale par l'activation de voie de signalisation ERK/DRP1 aboutissant à cette reprogrammation cellulaire appelée *beiging* (Velazquez-Villegas et al., 2018).

Ces nombreuses études permettent d'avancer l'hypothèse que la dysbiose du microbiote intestinal lors de l'obésité participerait, en coordination avec les éléments nutritionnels, à l'altération de la fonction barrière de l'intestin, l'inflammation chronique de bas grade et les altérations métaboliques. Une prise en charge de cette dysbiose semble être une piste thérapeutique intéressante dans la lutte contre les maladies métaboliques.

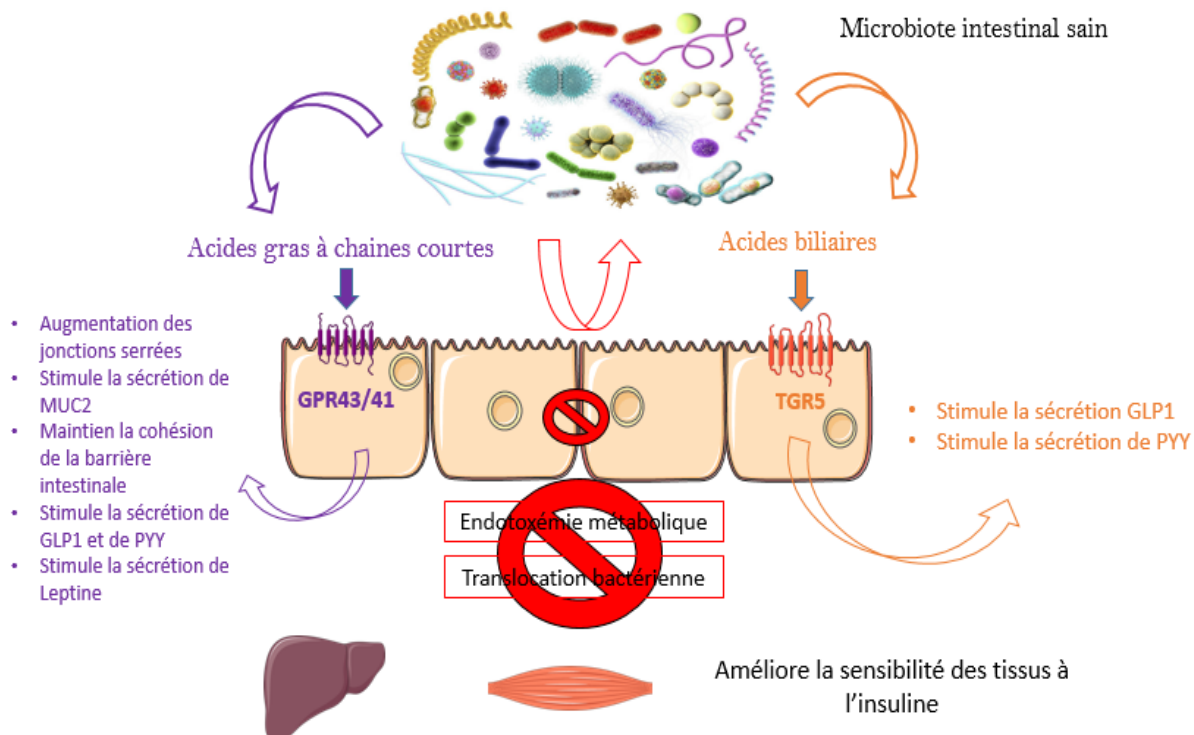


FIGURE 9 : REGULATION DE L'HOMÉOSTASIE INTESTINALE ET ÉNERGÉTIQUE PAR LES MÉTABOLITES BACTÉRIENS EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE

Les métabolites produits par le microbiote, tels que les acides gras à chaînes courtes ou les acides biliaires, jouent un rôle majeur dans le maintien de la barrière intestinale et dans la régulation des métabolismes énergétique et glucidique. La fixation des AGCC à leurs récepteurs GPR41 ou GPR43 permettent notamment de stimuler la sécrétion de GLP1, de Leptine et de PYY. Elle permet également de favoriser la formation des jonctions serrées et donc de participer à une barrière intestinale fonctionnelle capable de prévenir le passage de métabolites bactériens en trop grand nombre. La fixation de certains acides biliaires à leurs récepteurs TGR5 permet également de stimuler la production de GLP1 et de PYY par les cellules intestinales. De plus, les AGCC ont également un effet extra-intestinal en augmentant notamment la B-oxydation dans le foie et le tissu adipeux mais également en améliorant la sensibilité à l'insuline dans le foie et les muscles.

III. Le mucus : Un intermédiaire entre l'hôte et le microbiote

Afin de protéger la surface de l'intestin des contraintes physiques, (bol alimentaire et selles), chimiques, (variations de pH dû aux sucs gastriques) ou bactériennes, l'hôte produit une couche de mucus qui recouvre l'épithélium intestinal.

a) Les mucines : constituants majeurs de la couche de mucus

Les mucines sont des glycoprotéines extracellulaires à très haut poids moléculaire compris entre 0,5 et 20 MDa constituées d'un squelette protéique (apomucine), codé par un gène *MUC*, auquel vont venir se greffer de nombreuses chaînes glycaniques (qui peuvent représenter plus de 80% du poids sec des mucines) (Bansil and Turner, 2018). La formation de nombreux ponts disulfures entre les mucines permet ainsi de former un réseau protéique dense et de conférer les propriétés rhéologiques caractéristiques du mucus (viscosité, élasticité et adhérence). Les mucines sont classées en 3 sous familles distinctes : les mucines sécrétées, les membranaires, et une troisième famille dans laquelle les mucines, présentent des caractéristiques et des fonctions peu semblables aux autres mucines (**Figure 10**).

Nom	Type	Localisation	Rôle
MUC 1	Membranaire	Estomac, poumons, colon	Signalisation, protection
MUC 2	Sécrétée	Colon et intestin grêle	Protection, lubrification
MUC 3(A et B)	Membranaire	Colon, intestin grêle et vésicule biliaire	Protection de la surface apicale
MUC4	Membranaire	Colon	Signalisation, protection
MUC 5AC	Sécrétée	Estomac	Protection, lubrification
MUC 5B	Sécrétée	Vésicule biliaire, colon et glande salivaire	Protection, lubrification
MUC 6	Sécrétée	Estomac et duodénum	Protection, lubrification, réparation
MUC 7	Inclassable	Glandes salivaires, placenta	Antimicrobien
MUC 8	Inclassable	Nœuds lymphatiques, rate	Impliqué dans les pathologies respiratoires
MUC 9	Inclassable	Oviducte	?
MUC 11	Membranaire	Colon	Protection de la surface apicale
MUC 12	Membranaire	Colon	Protection de la surface apicale
MUC 13	Inclassable	Colon et intestin grêle	?
MUC 15	Inclassable	Thyroïde, peau et glandes salivaires	Protection
MUC 16	Inclassable	Endomètre, testicule et peau	Protection de la surface apicale
MUC 17	Membranaire	Intestin grêle et colon	Protection de la surface apicale
MUC 18	Inclassable	Mélanocytes	?

FIGURE 10 : NOMS, DISTRIBUTIONS ET ROLES DES DIFFÉRENTES MUCINES PRÉSENTES CHEZ L'HOMME

(Issus de la banque de donnée génomique de Pubmed).

i. Les mucines

Il existe deux sous types de mucines, les mucines sécrétées et les mucines membranaires. Les mucines sécrétées (ou gel-forming mucins) permettent la formation d'une couche de mucus stable et sont constituées des mucines MUC2, MU5AC, MUC5B, MUC6 et MUC19 (Pelaseyed et al., 2014). Ces mucines présentent généralement des structures similaires (**Figure 11**) dans lesquelles, on retrouve un corps protéique divisé en plusieurs régions distinctes : une région centrale essentiellement composée de régions PTS (Proline, Thréonine et Sérine) répétées en tandem (lieux préférentiels pour la O-glycosylation des mucines particulièrement sur les résidus thréonine et sérine) ; des régions N et C terminal riches en cystéines (plus de 10% de cystéine) qui sont des lieux de N-glycosylation.

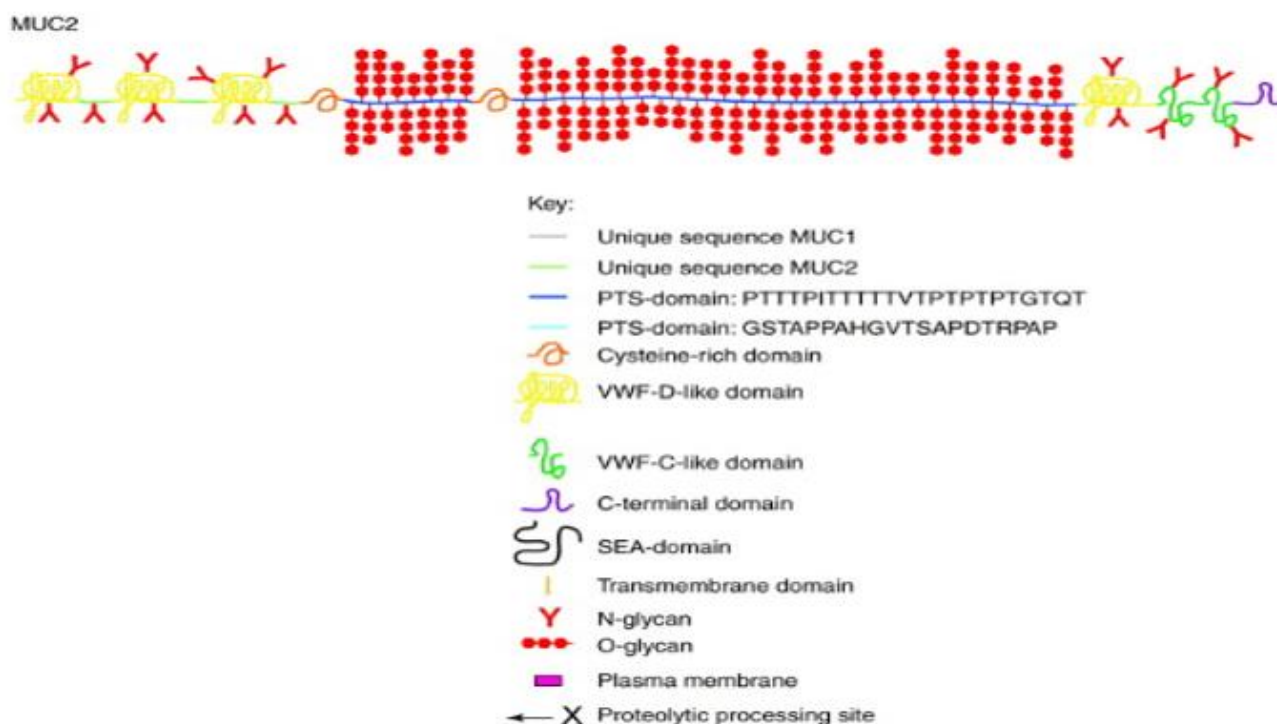


FIGURE 11 : SCHEMA REPRESENTANT LES DIFFERENTES STRUCTURES ET DOMAINES DE LA MUCINE SECRETEE MUC2, FORMANT UN GEL.

D'après (Andrianifahanana et al., 2006)

Les mucines membranaires sont au nombre de 11 : MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20 et MUC21. Elles comportent une région extracellulaire, un domaine transmembranaire permettant de s'ancrer à la barrière épithéliale et une queue cytoplasmique en position C-terminale qui présente des sites de phosphorylation impliqués dans la transduction de différents signaux (**Figure 12**).

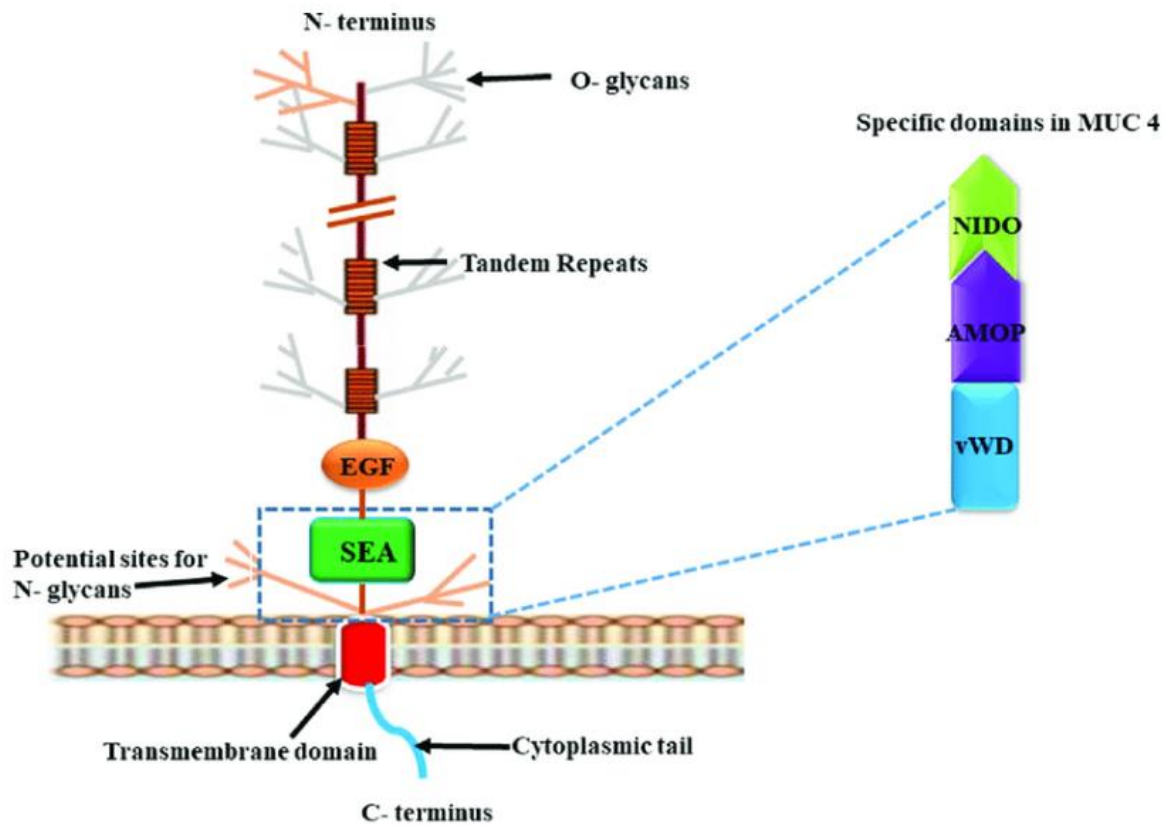


FIGURE 12 : SCHEMA DE LA MUCINE TRANSMEMBRANAIRE MUC4

D'après (Bafna et al., 2008). La partie extracellulaire de la mucine MUC4 est composée de domaines TR (Tandem Repeats), d'un domaine SEA (sea urchin sperm protein, enterokinase et agrin). Ce domaine SEA contient 3 domaines distincts, un domaine NIDO (Nidogen Like Domain), un domaine AMOP (Adhesion-associated domain in MUC4 and Other Protein) et un domaine vWD.

Même si les mucines membranaires ne participent pas directement à l'élaboration de la couche de mucus, elles semblent néanmoins jouer un rôle majeur dans l'homéostasie de cette dernière en participant à la transduction de différents signaux et notamment dans l'activation du système immunitaire (Birchenough et al., 2015).

D'autres protéines, autres que les mucines, vont intervenir pour donner à la couche de mucus ses propriétés caractéristiques. On retrouve notamment les protéines de la famille des

peptides en trèfle (TFF), des lipides le FcGBP (Fc fragment of IgG binding protein) et les transglutaminases. On retrouve chez l'homme trois TFF, les TFF 1, 2 et 3 et sont toutes sécrétées par les cellules épithéliales. C'est TFF vont former 3 boucles maintenues par des ponts disulfures, leur conférant leurs formes de trèfle. Ces protéines vont former des complexes avec d'autres protéines, pas encore toutes identifiées, se lier avec les mucines et participer aux propriétés de viscosité de la couche de mucus. Le rôle de ces protéines n'est pas encore totalement élucidé, mais la protéine TFF3 est impliquée dans la fonction de réparation et de protection de l'épithélium intestinal (Dehlawi et al., 2006).

b) Structure générale du mucus gastro-intestinal

Le mucus recouvrant le tractus gastro-intestinal est une épaisse couche gluante, visqueuse et dynamique sécrétée par les cellules caliciformes ou « goblet cells » en référence à leur forme de calice. Le mucus est constitué en grande partie d'eau (environ 95%) mais également de nombreux électrolytes, de phospholipides, d'acides gras, de cholestérol, de peptides antimicrobiens et de mucines. Il va également intégrer de nombreuses protéines telles que les trefoil factor 3 (TFF3) ou des resistin-like molecule β (RELMB) qui, avec les mucines, vont permettre de former un maillage semi-perméable hautement organisé qui va présenter des compositions, des structures et des organisations différentes selon sa localisation (Johansson et al., 2011a) (**Figure 13**).

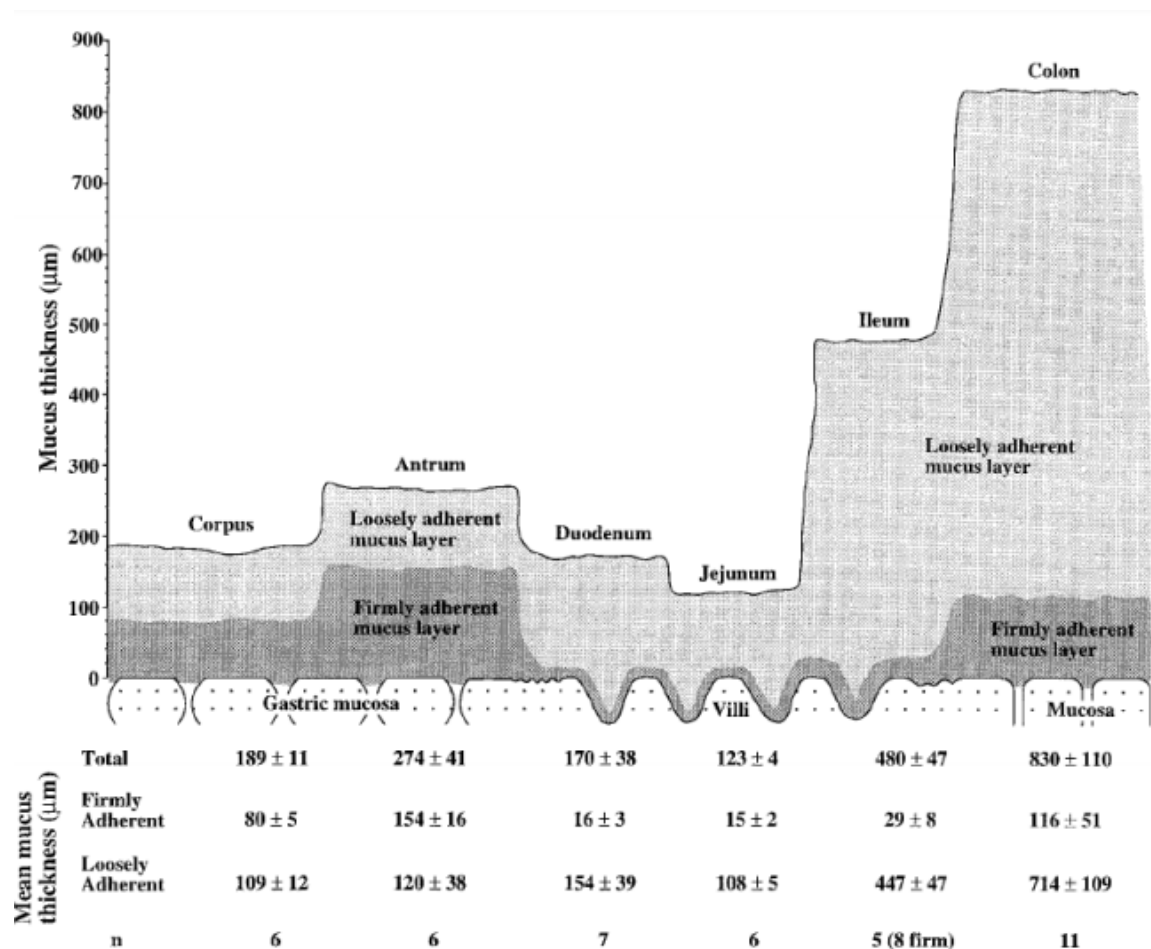


FIGURE 13 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA STRUCTURE DE LA COUCHE DE MUCUS SELON LA LOCALISATION DANS LE TRACTUS GASTRO-INTESTINAL CHEZ LE RAT WISTAR

La couche de mucus gastrique et colique présente deux couches distinctes, une couche interne fermement ancrée à son épithélium et une couche externe plus labile car sans attache. L'intestin grêle ne présente pas de stratification de sa couche de mucus mais présente une seule couche, labile et peu dense. Les valeurs représentent l'épaisseur moyenne des différentes couches selon la localisation et le type de couche.

L'intestin grêle est recouvert d'une seule couche fine de mucus labile, principalement constituée de la mucine MUC2, et présente une structure poreuse, facilement traversable par les bactéries. Pour se protéger de celles-ci, l'intestin grêle secrète des peptides antibactériens : les défensines, le lysozyme, les protéines REG3 (Regenerating islet-derived protein 3) et des phospholipases afin de maintenir les bactéries à distance (Clevers and Bevins, 2013; Johansson et al., 2011b; Vaishnava et al., 2011). De ce fait, l'intestin peut alors facilement extraire les nutriments du bol alimentaire tout en se protégeant des bactéries environnantes.

Le colon présente une double couche de mucus : une couche externe, plutôt lâche et poreuse et une couche interne beaucoup plus compacte. Malgré leurs différences de structures,

les deux couches de mucus coliques sont majoritairement constituées de la mucine MUC2. La couche de mucus interne est fermement ancrée aux cellules intestinales et présente une organisation stratifiée qui la rend, dans des conditions physiologiques, impénétrable par les bactéries. Cette couche mesure environ 60 μm chez la souris, 100 μm chez le rat et environ 200 μm chez l'homme (Johansson et al., 2008). La formation de mucus étant continue, la couche de mucus interne est lentement poussée vers la lumière intestinale. En s'éloignant de l'épithélium colique, les mucines MUC2 vont être clivées par des protéases endogènes, conduisant à une expansion massive de cette couche de mucus (qui gagne environ 2 à 3 fois en volume) et à la formation de la couche de mucus externe, beaucoup plus lâche et colonisée par les bactéries coliques devenant ainsi une réelle niche bactérienne intestinale (**Figure 14**).

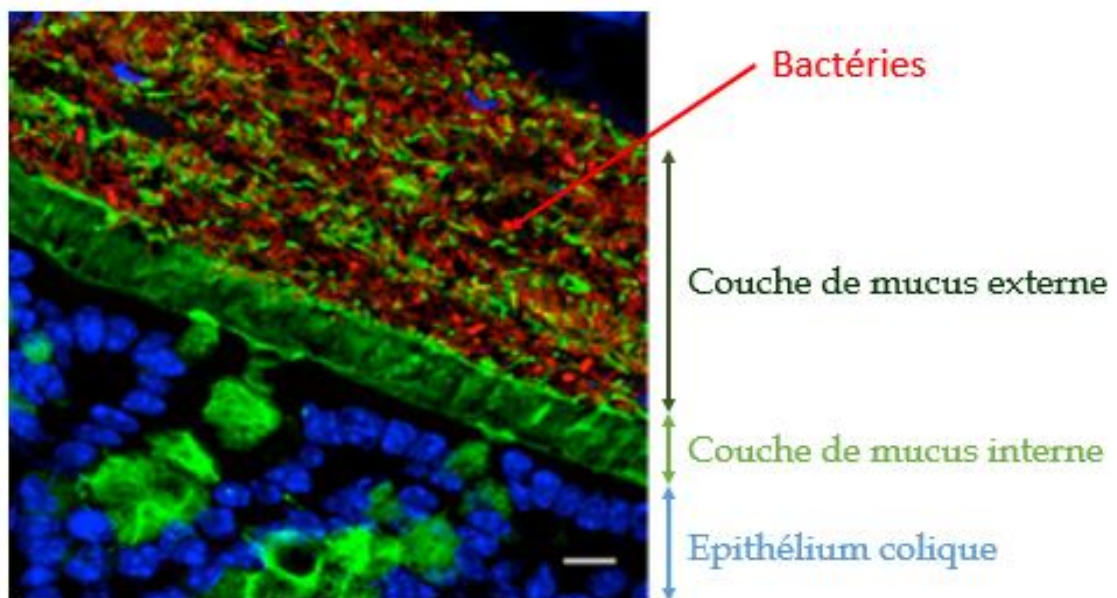


FIGURE 14 : COUPE DE COLON EN FLORESCENCE IN SITU HYBRIDATION (FISH) CHEZ LA SOURIS

(Johansson et al., 2008). La technique du FISH, permet ici de visualiser les bactéries dans une coupe de colon de souris. Les cellules épithéliales sont marquées en bleu (DAPI), les mucines en vert (anticorps fluorescents dirigé contre MUC2) et les bactéries en rouge (anticorps fluorescent dirigé contre l'ARN 16S spécifique et commun à toutes les bactéries). Cette photo nous permet de bien distinguer la couche de mucus interne, dense et dépourvue de bactérie, qui maintient les bactéries à distance des cellules de l'hôte, de la couche de mucus externe plus poreuse et colonisée par le microbiote colique.

c) Interactions entre mucus et bactéries

Le mucus a longtemps été considéré comme un simple lubrifiant visant à faciliter le passage des selles mais il est aujourd'hui reconnu comme un acteur majeur dans l'homéostasie intestinale et notamment dans son rôle « tampon » entre le microbiote et les cellules de l'hôte. L'étude des altérations de la couche de mucus, en lien avec certaines pathologies inflammatoires et métaboliques, a ainsi mis en avant le rôle primordial de cette barrière physico-chimique dans l'homéostasie de l'hôte (Johansson et al., 2014; Swidsinski et al., 2007).

Il existe des variations de diversité et d'abondance des bactéries, appelées diversité longitudinale, selon leur localisation dans le tractus gastro-intestinal (Vaishnava et al., 2011). On retrouve dans l'intestin grêle humain essentiellement des *Firmicutes* et des *Actinobacteria*. Ces bactéries présentent une forte capacité de division afin de survivre au transit alimentaire rapide. Dans le colon, où le transit est plus lent et où la pression des peptides antimicrobiens est moins forte, on retrouve essentiellement des bactéries appartenant au phylum *Bacteroidetes*, à la famille des *Lachnospiraceae* et à l'ordre des *Verrucomicrobiaceae* (Sekirot et al., 2010).

Il a également été rapporté une diversité transversale, de la lumière vers l'épithélium. En effet, dans le colon, la couche de mucus est divisée en deux, une couche interne, organisée en un réseau dense et compact et enrichie en peptides antimicrobiens, dépourvue de bactéries en conditions physiologiques (Johansson et al., 2008) et une couche externe qui représente une véritable niche bactérienne (**Figure 15**). Dans la couche de mucus, on trouve certaines bactéries capables de dégrader les mucines et de les utiliser comme source nutritionnelle, telle que *Akkermansia muciniphila* (Berry et al., 2013). Près de la muqueuse, on va trouver des bactéries capables de résister aux variations d'oxygène imposées par les tissus telles que *Protéobactéries* et *Actinobactéries* (Albenberg et al., 2014).

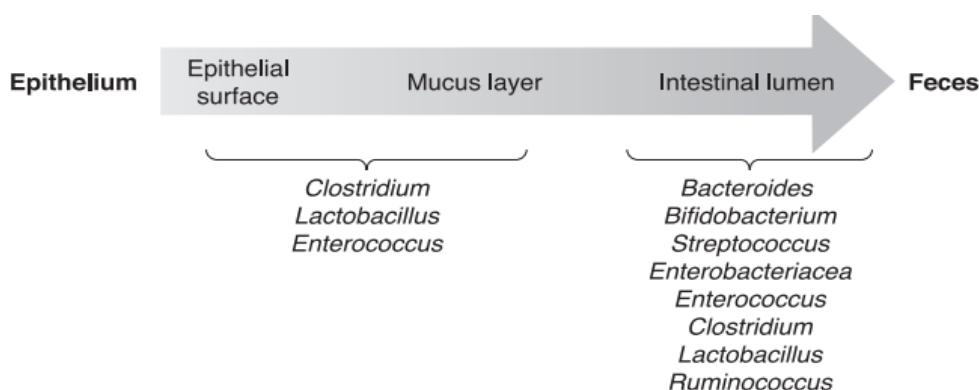


FIGURE 15 : REPARTITION LONGITUDINALE DES BACTERIES DANS LE COLON CHEZ L'HOMME D'APRES (SEKIROV ET AL., 2010).

Plusieurs bactéries peuvent fixer la couche de mucus et ainsi augmenter leurs temps de rétention dans le colon comme des bactéries du genre *Lactobacilles* tels que *L.reuteri*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. grasseri* et *L. plantarum* qui expriment des protéines membranaires à domaine MUB (MUcus Binding) leur permettant de se lier au mucus (Boekhorst et al., 2006). D'autres bactéries telles que *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides bifidum* ou *Bacteroides fragilis* expriment un large éventail d'enzymes telles que des sulphotases, des sialidases et des glycosidases leur permettant de dégrader le mucus et de l'utiliser comme apport nutritionnel (Ouwerkerk et al., 2013).

i. Microbiote intestinal et couche de mucus : des interactions nombreuses et nécessaires.

Bien que la couche de mucus intestinal permette de garder à distance le microbiote de l'épithélium, elle a cependant besoin de lui pour se développer et acquérir une structure fonctionnelle. C'est dans les années 1990 qu'il a été rapporté que les animaux axéniques présentaient une couche de mucus colique interne très fine voire absente (Szentkuti et al., 1990). De plus, il a également été rapporté une diminution du nombre et de la taille des cellules caliciformes caecales (Kandori et al., 1996).

Concernant la fonction barrière de la couche de mucus, il a été rapporté une très grande porosité de celle-ci chez les souris axéniques notamment du fait d'une forte diminution de l'expression de *MUC2*. La colonisation des souris axéniques par un microbiote complexe permet rapidement de rétablir l'imperméabilité de la couche de mucus colique interne (Johansson et al., 2015).

Les AGCC sont également capables de réguler finement l'expression de MUC2. Ainsi, le butyrate permet d'augmenter l'expression de MUC2 via sa fixation sur la protéine AP-1 (Figure 16) (Burger-van Paassen et al., 2009) .

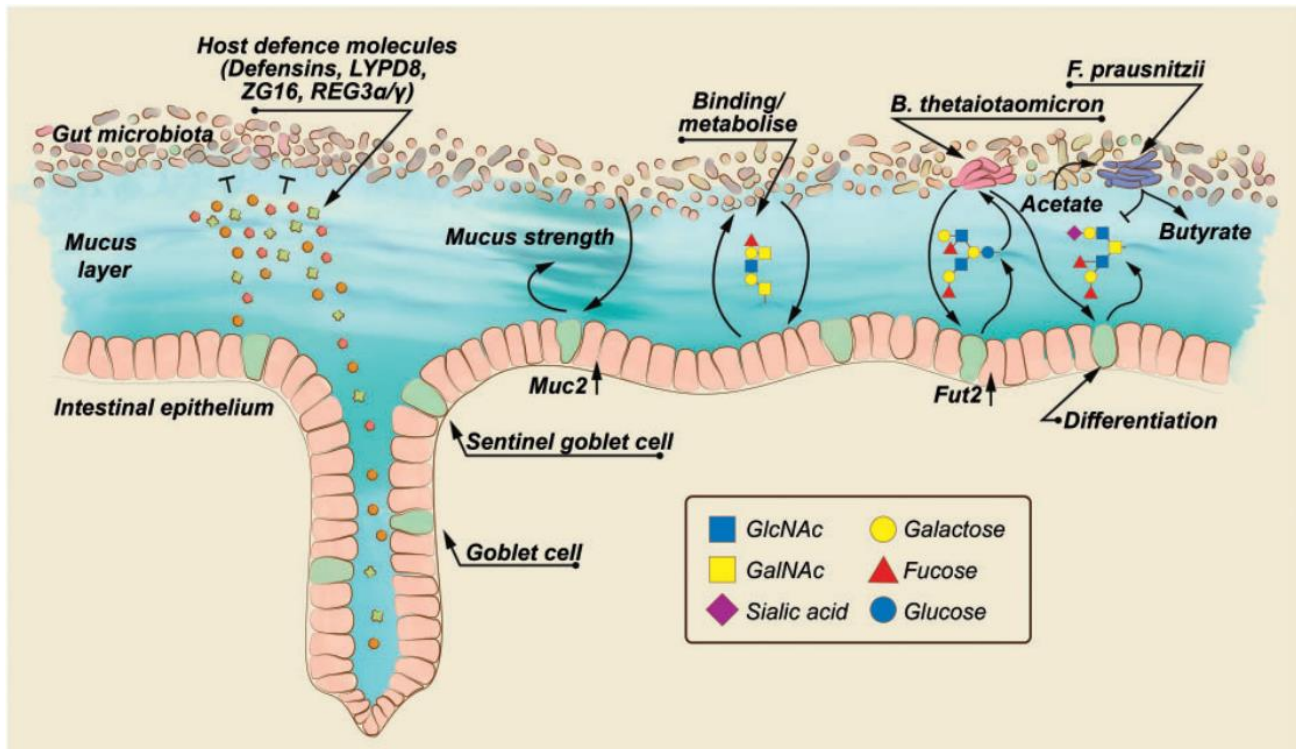


FIGURE 16 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES INTERACTIONS ENTRE LE MICROBIOTE, LA COUCHE DE MUCUS ET L'INTESTIN

D'après (Schroeder, 2019). L'hôte sécrète de nombreux peptides antimicrobiens tels que les défensines, la protéine LYPD8 (LYs6/Plaur Domain containing protein 8), la protéine ZG16 (Zymogen Granulae protein 16), la protéine REG3 (REGenerating islet-derived protein 3) et d'autres. De par ces protéines, l'hôte module et contient les bactéries du microbiote. Le microbiote, par l'intermédiaire de différents métafacteurs tels que les LPS ou d'autres, ou par l'intermédiaire des AGCC, vont moduler l'expression de MUC2 et du gène FUT2 (galactoside-2- α -L-fucosyltransferase 2) et donc moduler la structure et la physiologie de la couche de mucus. La dégradation des mucines par les bactéries va aboutir à la production d'AGCC qui va non seulement moduler les cellules de l'hôte mais également les bactéries elles-mêmes, comme *Faecalibacterium prausnitzii* qui utilise ces métabolites comme source de nutriment principal.

d) Mucus, et obésité alimentaire

Du fait de la place importante que joue la couche de mucus dans le maintien d'une barrière intestinale intègre et fonctionnelle, l'étude de son intégrité dans un contexte d'obésité et de maladies métaboliques a naturellement été étudiée. Plusieurs études ont rapporté une diminution de son épaisseur en lien avec une dysbiose du microbiote intestinal. *Cani* et coll. ont montré qu'un régime obésogène induisait chez la souris une forte diminution de l'épaisseur de la couche de mucus colique interne associée à une diminution de l'abondance d'*Akkermansia muciniphila* et qu'un apport d'*Akkermansia muciniphila* permettait de prévenir l'altération de celle-ci (Everard et al., 2013).

Gulhane et coll. ont rapporté qu'un régime riche en graisses et pauvre en fibres diminuait drastiquement l'expression de *Muc2*, de *Klf4* (facteur de transcription impliqué dans la maturation des cellules caliciformes) et de *Tff3* colique chez la souris. Ces différentes altérations expliqueraient la diminution de près de 50 % de l'épaisseur de la couche de mucus interne dans un contexte obésogène (Gulhane et al., 2016).

Plus récemment, Fredrik Bäckhed et collaborateurs ont étudié l'impact d'un régime obésogène pauvre en fibres sur la structure, la composition et la fonctionnalité de la couche de mucus colique. Ils ont observé dès les premiers jours de régime, une modification rapide de la composition du microbiote intestinal avec une diminution de l'abondance des *Bacteroidetes* et des *Actinobacteria*. Entre 3 et 7 jours de régime, les souris nourries avec un régime riche en graisses présentaient une très forte diminution de l'épaisseur de leur couche de mucus colique interne associée à une diminution de son renouvellement et à une très forte porosité. (Schroeder et al., 2018) (**Figure 17**).

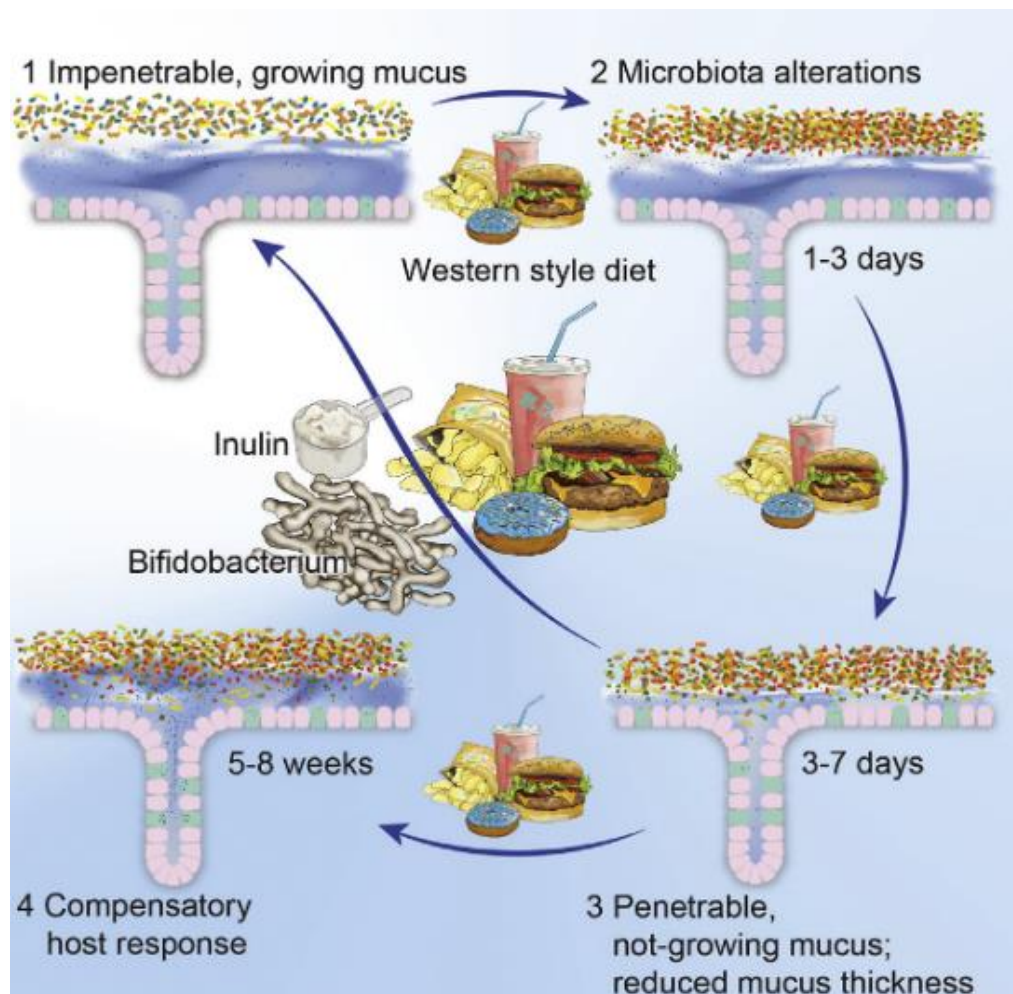


FIGURE 17 : EVOLUTIONS STRUCTURELLE ET FONCTIONNELLE DE LA COUCHE DE MUCUS COLIQUES SELON DIFFERENTS REGIMES ALIMENTAIRES

D'après (Schroeder et al., 2018).

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer les mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération de la couche de mucus colique lors de régimes obésogènes. L'activation du stress du réticulum endoplasmique par les régimes hyperlipidiques est l'une des hypothèses avancées pour expliquer l'accumulation de formes immatures de MUC2 dans les cellules caliciformes, au détriment des formes matures et donc d'une couche de mucus fonctionnelle (Gulhane et al., 2016).

e) Stress du réticulum endoplasmique (RE), obésité et désordres métaboliques associés

i. *Le stress du RE en conditions physiologiques*

Le réticulum endoplasmique est un organite intracellulaire impliqué dans la voie de synthèse et de sécrétion des protéines. Chaque protéine sécrétée transite par le RE pour être dirigée vers l'appareil de Golgi pour sa sécrétion. En cas de mauvaise conformation, les protéines s'accumulent dans le RE pour y être dégradées, par un processus appelé ERAD (ER-associated-degradation). L'accumulation de protéines mal conformées dans le RE active un stress du RE stimulant la réponse UPR (Unfolded Protein Response) en vue de rétablir l'homéostasie de la cellule. Cette réponse UPR permet de (1) ralentir la synthèse protéique afin d'empêcher l'accumulation de nouvelles protéines dans le RE, (2) pousser les protéines mal conformées vers la dégradation, (3) stimuler la synthèse de protéines chaperonnes pour rétablir la bonne conformation des protéines et (4) déclencher un processus d'apoptose si la cellule n'est pas parvenue à rétablir son homéostasie (Oakes and Papa, 2015). Chez les mammifères, la réponse UPR fait intervenir 3 protéines transmembranaires PERK (PKR-like ER-associated protein kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor 6) et IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1), fixées à la membrane du RE par la protéine chaperonne BIP/GRP78. En cas d'afflux massif de protéines mal conformées, la protéine BIP/GRP78 va se dissocier de la membrane du RE pour se fixer sur les protéines en cours de repliement et ainsi permettre la dissociation des protéines du stress du RE qui vont ainsi être activées (Xu et al., 2005).

Lors d'un stress du RE, la kinase PERK se dimérise, s'autophosphoryle en position trans et va ainsi pouvoir phosphoryler le facteur d'initiation de la transcription EIF-2 (Eukaryotic translation Initiation Factor 2) sur le résidu Ser (Wek et al., 2006). Cette phosphorylation inhibe la liaison d'EIF-2 avec les ARNm et empêche l'initiation de la traduction des protéines. Paradoxalement, la traduction de certaines protéines impliquées dans le stress du RE est augmentée malgré la phosphorylation du facteur EIF2, telle la protéine ATF4 (Activating Transcription Factor 4). La traduction d'ATF4 est rendue possible par la présence de séquence uORF (upstream Open Reading Frame) dans la partie 5' de sa séquence, lui permettant ainsi d'être traduite malgré les processus d'inhibition initiés par la cellule (Harding et al., 2000). ATF4 est un facteur de transcription qui va stimuler l'expression de la protéine CHOP qui est impliquée dans l'activation de l'apoptose.

Le stress du RE et la dissociation de la protéine BIP/GRP78, vont entraîner la dissociation du facteur de transcription ATF6 qui va se diriger vers l'appareil de Golgi pour subir un double clivage. Le domaine amino-terminal d'ATF6 va ainsi rejoindre le noyau pour initier la transcription de protéines majeures du stress du RE telles que les protéines chaperonnes BIP/GRP78 et GRP74 ou la protéine PDI (Protein Disulfide Isomerase), ce qui va catalyser la formation des ponts disulfures et donc faciliter le repliement des protéines dans le RE.

L'activation de IRE1 va permettre d'activer sa fonction endo-ribonucléastique et induire l'épissage alternatif de l'ARNm codant pour le facteur de transcription XBP-1 (X-Box Protein 1). XBP-1 va alors initier la transcription de protéines impliquées dans la voie de dégradation ERAD, comme la protéine EDEM1 (ER-Degrading-enhancing- α -mannosidase-like protein 1) qui va reconnaître et dégrader les protéines glycosylées mal conformées (Roth and Zuber, 2017)(Figure 18).

Le stress du RE et les différentes voies de l'UPR sous-jacentes sont extrêmement importants pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, et dans le cas d'une non résolution, de sa mort par apoptose. C'est particulièrement vrai pour les cellules à forte capacité sécrétoire qui seront soumises fréquemment aux stress engendrés par de fortes sécrétions. Dans le cadre des maladies métaboliques, le stress du RE a été particulièrement étudié pour des organes à fortes capacités sécrétoires tels que le foie, le pancréas et plus récemment pour le colon (forte production de mucus).

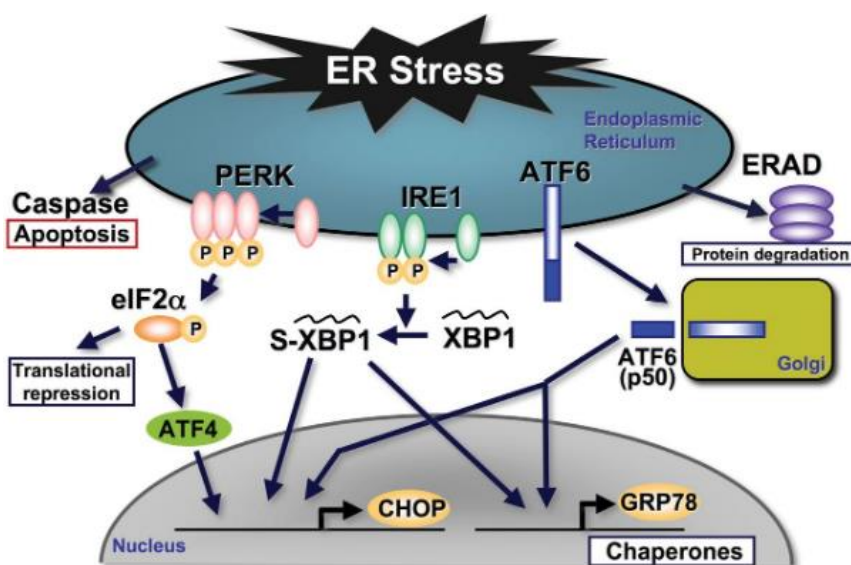


FIGURE 18 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES 3 VOIES IMPLIQUEES DANS LE STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE

(Hosoi and Ozawa, 2010). En condition physiologique PERK, IRE1 et ATF6 sont associées à la membrane du RE. Lors d'un stress, ces protéines sont dissociées de la membrane du RE et vont induire leurs différents effets traductionnels et transcriptionnels afin de rétablir l'homéostasie et en cas d'échec activer la voie de l'apoptose.

ii. *Stress du RE, obésité et diabète de type 2.*

L'implication du stress de RE lors de l'obésité et des désordres qui lui sont associés, est aujourd'hui largement démontrée. Dans le foie, un régime obésogène induit l'activation des voies de l'UPR et serait fortement impliqué dans la physiopathologie de la stéatose hépatique (Tripathi and Pandey, 2012). Il a été montré que des inhibiteurs du stress du RE (4-PBA ou TUDCA) permettent de prévenir partiellement la stéatose hépatique, la prise de poids et la résistance à l'insuline chez la souris *ob/ob* (Özcan et al., 2006). De même, Kawasaki et collaborateurs ont montré une augmentation de l'inflammation et du stress du RE dans le tissu adipeux de souris nourries avec un régime obésogène. Ces auteurs ont également rapporté que l'utilisation du 4-PBA et du TUDCA prévenait non seulement le stress du RE et l'inflammation du tissu adipeux, mais également la prise de poids et l'installation de l'insulino-résistance (Kawasaki et al., 2012).

Des traitements au palmitate (acide gras saturé le plus représenté dans les régimes obésogènes) de modèles cellulaires tels que des adipocytes (Yin et al., 2015), des myocytes (Woodworth-Hobbs et al., 2017), des hépatocytes (Jung et al., 2012) ainsi que des macrophages du système immunitaire (Xiu et al., 2016), ont montré une très forte activation du stress du RE conduisant à une altération fonctionnelle de ces cellules et à terme à l'apoptose. Les mécanismes moléculaires impliqués font intervenir une palmitoylation des protéines aboutissant à des modifications de leur conformation, localisation, trafic intracellulaire, stabilité, agrégation et interaction avec leurs effecteurs générant ainsi un stress cellulaire puis une activation des voies de l'UPR (Pagliassotti et al., 2016).

ii. *Stress du RE et sécrétion des mucines*

Pour atteindre sa conformation finale, la protéine MUC2 (mucine majoritaire de la couche de mucus) subit de nombreuses modifications post-traductionnelles dans le RE et dans l'appareil de Golgi. La complexité de cette mucine et la haute capacité sécrétoire des cellules caliciformes facilitent l'apparition de mauvais repliement et par conséquent une activation du stress du RE (Arike et al., 2017). Hasnain et collaborateurs ont montré, sur des cellules LS174T traitées au palmitate une augmentation du stress du RE, de l'expression de *GRP78* ainsi que de la forme clivée de *XBP1*. Ces auteurs ont également rapporté une diminution de l'expression de *MUC1* et de *KLF4* et une diminution de la forme mature de MUC2 glycosylée (et une accumulation des formes immatures non-glycosylées) ainsi qu'une diminution de la sécrétion de MUC2. Ces différentes données mettent en évidence que le palmitate induit un

stress du RE dans les cellules LS174T, résultant d'une accumulation des mucines mal conformées et conduisant donc à une altération des capacités sécrétoires de ces cellules (Gulhane et al., 2016).

IV. Les acides gras polyinsaturés en n-3

a) Les différents types d'acides gras

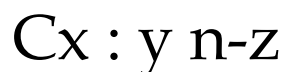
Les lipides constituent un des sept piliers de base de notre alimentation avec les protéines, les glucides, les minéraux, les vitamines, les oligo-éléments et l'eau. Ils constituent environ 18 à 25% de la masse corporelle d'un adulte mince et sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Ce sont d'abord de très bons pourvoyeurs d'énergie, puisque 1g de lipides libère 9 kcal d'énergie, et sont donc essentiels dans notre alimentation. Ils participent également à la fluidité des membranes cellulaires ainsi qu'à de très nombreuses réactions chimiques et fonctions biologiques. Nous nous intéresserons plus particulièrement dans ce chapitre aux acides gras polyinsaturés en n-3, ou oméga 3.

i. *Nomenclature et structure*

C'est Eugène Chevreul, chimiste français, qui décrit pour la première fois le concept d'acides gras en 1813. En 1823, il publie ses « *Recherches chimiques sur les corps gras d'origine animale* » et décrit de nombreux acides gras tels que l'acide butyrique, stéarique et oléique (McNamara et al., 2006).

Un acide gras est un acide carboxylique à chaîne aliphatique avec à chaque extrémité un groupement méthyle ou un groupement carboxylique. Les acides gras diffèrent par leur nombre de carbones, la présence et le nombre de doubles liaisons. On distingue les acides gras saturés (dépourvus de double liaison), les acides gras mono-insaturés (une seule double liaison) et les acides gras polyinsaturés (plusieurs doubles liaisons). La position spatiale des doubles liaisons (cis ou trans) est également un facteur de diversité.

La nomenclature la plus souvent utilisée pour caractériser les acides gras est la suivante :



x représente le nombre de carbones de l'acide gras, y le nombre de doubles liaisons. n - (ou ω) z (a position de la première instauration à partir du groupement méthyle terminal (**Figure 19**).

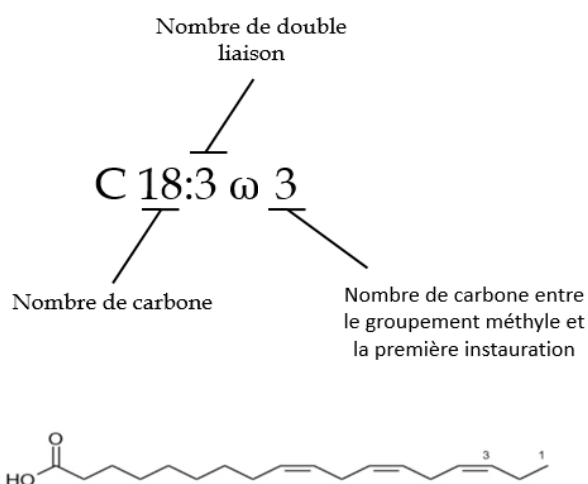


FIGURE 19 : STRUCTURE ET NOMENCLATURE DE L'ACIDE LINOLENIQUE

L'acide linoléique est composé de 18 carbones et de 3 doubles liaisons. En partant du carbone 18 du groupement méthyle terminal on trouve la première insaturation entre les carbones n -3 et n -4, d'où la nomenclature n -3 ou ω 3.

ii. Les acides gras saturés (AGS)

Les AGS sont retrouvés sous la nomenclature suivante : $CH_3-(CH_2)_n-COOH$. Ces acides gras sont dits saturés puisque chaque carbone est occupé par le maximum d'atomes d'hydrogènes possibles. Les plus communs chez les mammifères, sont les acides palmitique ($C_{16}:0$) et stéarique ($C_{18}:0$). Les sources d'AGS peuvent être exogènes (alimentaire), on en retrouve notamment dans l'huile de coco, de palme, dans la viande, le beurre et les fromages et endogènes puisque l'organisme, *via* la voie malonique, est capable de les synthétiser (tableau 3). L'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) recommande une consommation en AGS $\leq$ à 12% de l'apport énergétique total avec

une consommation d'acide laurique, myristique et palmitique $\leq 8\%$ de l'apport énergétique total (**Tableau 2**).

Sous catégorie	Nom	Nombre de carbone	Source alimentaire
Acides gras à chaînes courtes	Acétate Propionate Butyrate	C2 C3 C4	Issus principalement de la digestion des fibres par le microbiote
Acides gras à chaînes moyennes	Caproïque Caprylique Caprique	C6 C8 C10	Huiles, noix de coco et produit laitier
Acides gras à longues chaînes	Laurique Myristique Palmitique Stéarique	C12 C14 C16 C18	Forme la plus retrouvée dans les aliments +++
Acides gras à très longues chaînes	Arachidonique Béhenique Lignocérique	C20 C22 C24	Cacahouète, noix de macadamia

TABLEAU 2: LISTE DES PRINCIPAUX ACIDES GRAS SATURÉS RETROUVÉS DANS L'ALIMENTATION

iii. Les acides gras insaturés

Les acides gras insaturés présentent au moins une double liaison dans leur chaîne carbonée. On distingue les acides gras mono-insaturés, qui comportent une seule double liaison et les acides gras polyinsaturés qui comportent entre 2 et 6 doubles liaisons.

1. Les acides gras mono-insaturés

Les acides gras mono-insaturés sont majoritairement représentés dans le règne animal et végétal par l'acide oléique (C18 :1 ω 9). On le retrouve en grande quantité dans les huiles (oléique vient du latin « *oleum* » qui signifie huile), telles que l'huile de noisette (75.6g/100g), l'huile d'olive (75.2g/100g) et l'huile d'avocat (65.2g/100g). L'acide oléique est synthétisé grâce à une Δ 9 désaturase qui insère une double liaison sur le 9^{ème} carbone d'un acide stéarique. L'ANESSES recommande une consommation d'acide oléique entre 15 et 20% de l'apport énergétique total.

b) Les acides gras polyinsaturés (AGPI) : Biosynthèse et rôle.

i. *Apport et biosynthèse des AGPI*

Les AGPI sont regroupés principalement en deux catégories, les oméga 3 et les oméga 6, qui présentent respectivement leur première double liaison en position 3 et 6, à partir du carbone n terminal. Il existe également un AGPI en oméga 9, le 20 :3 n-9 ou acide de Mead, synthétisé par l'homme et dont une concentration plasmatique élevée met en évidence un déficit en acides gras oméga 3 et oméga 6. Les oméga 3 dérivent de l'acide α -linolénique (ALA 18 :3 n-3) tandis que les oméga 6 dérivent de l'acide linoléique (LA 18 :2 n-6). Pour les mammifères, qui ne possèdent pas les enzymes nécessaires pour introduire une double liaison en n-6 et n-3, et qui sont donc incapables de synthétiser LA et ALA, ces acides gras sont qualifiés d'indispensables, et doivent donc obligatoirement être apportés par l'alimentation. Les mammifères sont en revanche capables de convertir LA et ALA en acides gras plus longs et plus insaturés, par l'intermédiaire d'élongases et de désaturases.

ALA, est principalement retrouvé dans les graines et les huiles de lin, de noisette, de noix et de colza. Une fois dans l'organisme, il va subir une succession d'étapes d'élongation et de désaturation afin de synthétiser entre autres l'acide eicosapentaénoïque (EPA : 20 :5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA : 22 :6 n-3) (Figure 24). EPA et DHA sont retrouvés chez les poissons gras, tels que le saumon, le maquereau et le hareng. Le taux de conversion de ALA en DHA étant chez l'Homme inférieur à 1%, un apport exogène en ces AGPI à longues chaînes est essentiel pour maintenir des taux de DHA et d'EPA physiologiques (Domenichiello et al., 2015).

LA, est quant à lui retrouvé dans les graines et huiles de soja et de tournesol. Comme pour ALA, il va être pris en charge par les désaturases et élongases pour synthétiser des acides gras à plus longues chaînes comme l'acide arachidonique (AA : 20 :4 n-6) (**Figure 20**). On retrouve également AA dans notre alimentation, notamment dans l'œuf et la viande.

Du fait que les mêmes enzymes sont impliquées dans l'élongation et la désaturation de ALA et de LA, il existe une compétition entre ces deux substrats. Ainsi, des apports alimentaires importants en LA vont orienter les désaturases et les élongases vers la synthèse de AA plutôt que vers la synthèse de l'EPA (Domenichiello et al., 2015).

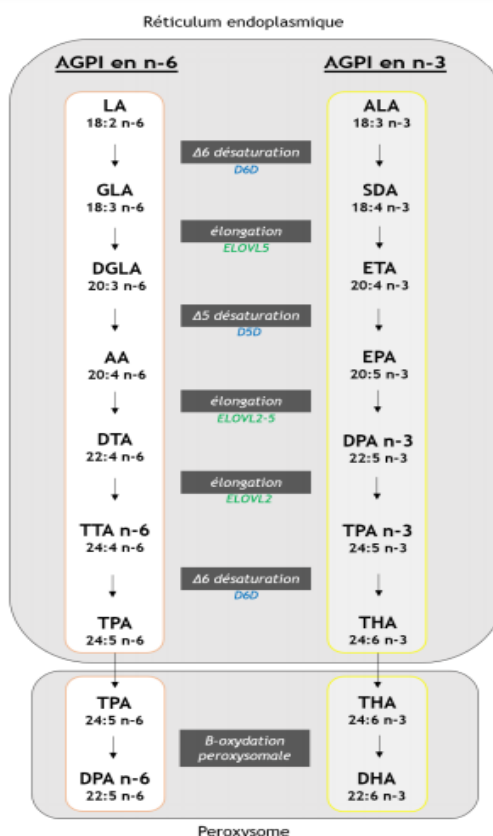


FIGURE 20 : BIOSYNTHESE DES ACIDES GRAS POLYINSATURES CHEZ LES MAMMIFERES

LA : acide linoléique ; GLA : acide γ -linolénique ; DGLA : acide di-homo- γ -linolénique ; AA : acide arachidonique ; DTA : acide docosatétranoïque (ou adrénique) ; TTA : acide tétracasatétranoïque ; TPA : acide tétracosapentaénoïque ; ALA : acide α -linolénique ; SDA : acide stéaridonique ; EPA : acide eicosapentaénoïque ; DPA : acide docosapentaénoïque ; THA : acide tétracosahéxaénoïque ; DHA : acide docosahéxaénoïque.

ii. Désaturation et élongation

Les désaturases sont des enzymes capables d'intégrer une double liaison entre 2 carbones de la chaîne carbonée d'un acide gras. Deux désaturases interviennent dans la synthèse des acides gras polyinsaturés des mammifères : la $\Delta 5$ (FADS1) et la $\Delta 6$ (FADS 2). Les élongases permettent d'ajouter, 2 carbones à la chaîne carbonée de l'acide gras du côté carboxyle.

Les précurseurs des oméga 6 et des oméga 3 subissent, dans le RE, plusieurs étapes successives et alternées de désaturation et d'élongation jusqu'à la synthèse d'AA pour les oméga 6 et d'EPA pour les oméga 3. Les synthèses du DPAn-6 (22 : 4 n-6) et du DHA (22 : 6 n-3), sont plus complexes et font intervenir deux étapes successives d'élongation, une étape de désaturation et une étape finale de β -oxydation peroxysomale. Les cascades de biosynthèse des oméga 6 et des oméga 3 sont distinctes et parallèles, et la conversion d'une voie vers l'autre n'est pas possible chez les mammifères.

iii. Rôles physiologiques des AGPI

Les lipides membranaires constituent 20 à 40% des membranes biologiques et sont essentiels à leur bon fonctionnement. Il existe 3 classes de lipides membranaires : les stérols (majoritairement du cholestérol), les sphingolipides et les phospholipides (PL). Les phospholipides sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée en position sn-1 et sn-2 par deux acides gras, essentiellement par les acides gras LA, AA et DHA, et qui vont attribuer les propriétés hydrophobes au phospholipide. Le glycérol est également composé, en position sn3, d'un acide phosphorique lié, ou non, à un alcool amine qui lui confère ses propriétés hydrophiles. De par leurs propriétés physicochimiques, les phospholipides vont spontanément s'organiser en bicouche lipidique pour former les membranes plasmiques. Les AGPI peuvent impacter la structure et la dynamique des membranes cellulaires par deux moyens. Directement, en participant à la formation de domaines flexibles et peu ordonnés facilitant la mobilité et le changement de conformation des protéines intrinsèques nécessaires à leur activité. Indirectement, en favorisant la ségrégation de domaines membranaires plus ordonnés et enrichis en acides gras saturés, en cholestérols et en DHA appelés radeaux lipidiques. Ces radeaux lipidiques sont associés à des complexes protéiques actifs impliqués dans des mécanismes de signalisations transmembranaires (Pike, 2003). La haute teneur en DHA lui permet d'acquérir dans les membranes une conformation tridimensionnelle différente des autres acides gras (Miles and Calder, 1998). Une propriété représentative du DHA dans l'organisme est son rôle dans la transduction du signal lumineux dans la rétine. Lorsqu'un photon arrive au niveau des cellules photoréceptrices de la rétine, un changement de conformation de la rhodopsine permet la transduction du signal. Ce changement de conformation est rendu possible par la haute teneur en DHA de ces membranes (Niu et al., 2004).

Les AGPI $\omega 3$ et $\omega 6$ peuvent être libérés de la membrane par l'action enzymatique de la phospholipase A2 (PLA2). Une fois libérés, ils vont être métabolisés par différentes enzymes telles que les cyclooxygénases et les lipoxygénases pour synthétiser des médiateurs lipidiques bio actifs appelés eicosanoïdes. Les principaux eicosanoïdes sont les prostanoïdes et les leucotriènes et régulent diverses fonctions physiologiques telles que la reproduction, l'hémostase, la coagulation sanguine, l'inflammation et le fonctionnement de glandes endocrines et exocrines. Concernant l'inflammation, les prostanoïdes de la série 2 et les leucotriènes de la série 4 issus de l'ARA exercent des effets pro-inflammatoires. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des inhibiteurs de COX et préviennent ainsi la

formation des prostaglandines pro-inflammatoires. A l'inverse, les prostanoïdes de la série 3 et les leucotriènes de la série 5, issus de l'EPA, ont des effets pro-inflammatoires limités (Gilroy and Bishop-Bailey, 2019). (Figure 21).

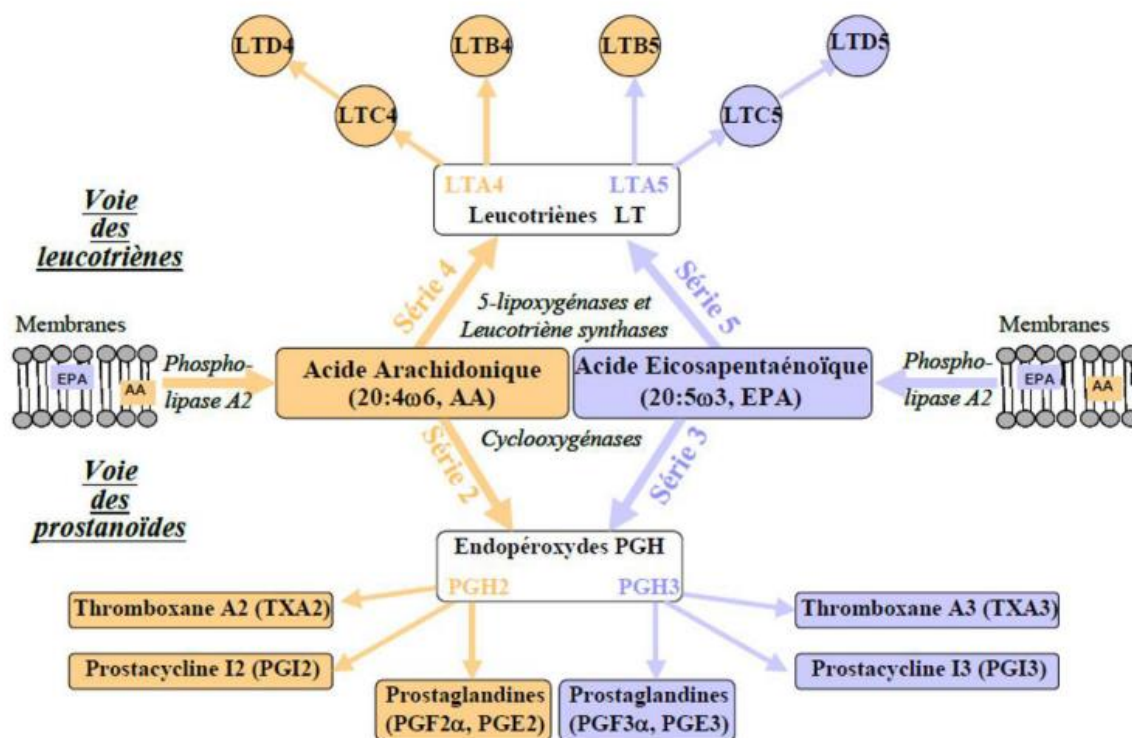


FIGURE 21 : VOIES DE SYNTHÈSES DE CERTAINS LEUCOTRIÈNES (VIA LES LIPOXYGÉNASES) ET DE CERTAINS PROSTANOÏDES (VIA L'ACTION DES CYCLOOXYGÉNASES) À PARTIR DE L'ARA ET DE L'EPA APRES LIBÉRATION PAR LA PLA2 D'APRES (GUESNET ET AL., 2005)

Une des voies de résolution de l'inflammation est la synthèse de médiateurs lipidiques anti-inflammatoires issus du DHA et de l'EPA que sont les résolvines, les marésines et les protectines regroupés sous la dénomination de SPMs (specialized proresolving mediators) (Figure 26). Ces SPMs exercent leurs effets à très faibles concentrations (entre le pico et le nanomolaire) (Serhan, 2014).

Les résolvines principalement produites à partir de l'EPA (résolvines de la série E) et à partir du DHA (résolvines de la série D) ont un puissant effet anti-inflammatoire en limitant notamment l'infiltration de leucocytes sur les sites endommagés (Marcheselli et al., 2003; Serhan et al., 2008).

Les protectines, également issues du DHA, (Serhan et al., 2004) exercent leurs effets anti-inflammatoires puissants en inhibant l'infiltration leucocytaire. Lorsque la biosynthèse se fait dans les tissus cérébraux, on les retrouve sous le nom de neuroprotectine (Serhan et al., 2007).

Les marésines (macrophage mediator in resolving inflammation), issues du DHA et mises en évidence pour la première fois dans une étude sur l'activation des macrophages sont capables d'inhiber l'infiltration leucocytaire et d'induire la phagocytose des macrophages pour résoudre l'inflammation (**Figure 22**).

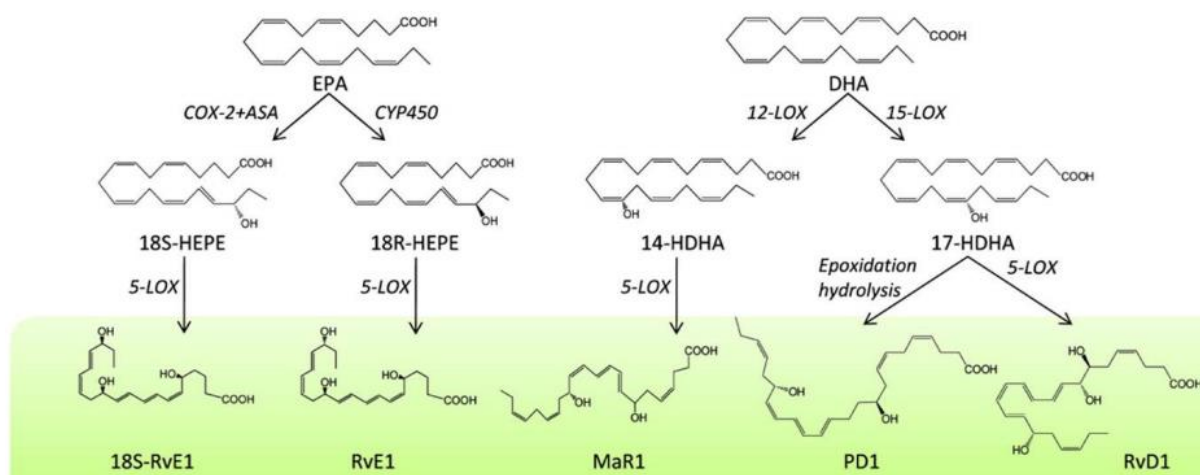


FIGURE 22 : BIOSYNTHESE DE RESOLVINE, DE PROTECTINE ET DE MARESINE A PARTIR DE L'EPA ET DU DHA

L'EPA est converti en 18-hydroxy-EPE (18-HEPE) soit par le cytochrome P450 soit par la COX-2 en présence d'aspirine. Cet intermédiaire est transformé par la 5-LOX en résolvine RvE1. Le DHA est converti en 17-hydroxy-DHA (17-HDHA) par une 15-LOX, puis transformé en protectine PD1 via un époxyde intermédiaire et en résolvine RvD1 par une 5-LOX. Le DHA est également converti par une 12/15-LOX en 14-hydropéroxy-DHA (14-HDHA) puis en marésine MaR1 via un époxyde intermédiaire. D'après (Rius et al., 2012).

Des approches de métabolo-lipidomiques, ont permis de mettre en évidence une altération du profil des SPMs lors de l'obésité (Clària et al., 2012) avec notamment une diminution du précurseur des résolvines et de PD1 (Neuhofer et al., 2013).

Par ailleurs, des SPMs ont été utilisés comme moyen thérapeutique pour lutter contre l'obésité et les troubles métaboliques associés. Ainsi, Gonzalez-Pérez et al ont montré qu'un traitement de souris ob/ob avec ReV1 et PD1 présentait les mêmes effets bénéfiques qu'une supplémentation en oméga 3. ReV1 permet d'augmenter l'expression génique de *PPARδ*,

GLUT4, *IRS-1* et de l'adiponectine dans le tissu adipeux. De plus, l'apport de ReV1 atténue le développement de la stéatose hépatique non alcoolique dans ce modèle de souris (González-Pérez et al., 2009). Plusieurs études ont également rapporté un effet bénéfique sur la sensibilité à l'insuline, une diminution de l'inflammation du tissu adipeux ainsi qu'une augmentation des dérivés issus des oméga 3 et une diminution de ceux issus des oméga 6. (**Tableau 3**)

Type de SPMs	Modèles	Traitements (doses et durées)	Impact	Références
RvD1	Souris Ob/Ob	12 ng/g de PC tous les jours pendant 4 jours	↑ Expression génique de PPARδ, GLUT4 et IRS-1 ↑ Adiponectine ↑ Résolvines et Protectines	A.Gonzalez-Periz et al., 2009
RvD1	Souris Db/Db	2µg/Kg de PC pendant 8 à 16 jours	↑ Tolérance au glucose ↑ Adiponectine ↑ Sensibilité à l'insuline ↓ Expression IL-6	A.Neuhofer et al., 2013
RvD1	Souris C57bl/6J sous régime obésogène	300 ng pendant 24h pendant 3 semaines	↑ Adiponectine ↑ IL-4 et IL-10 ↓ Infiltration macrophagique dans le foie	J.Claria et al., 2012
17-HDHA	Souris Db/Db	50 ng/g de PC pendant 8 jours toutes les 12h	↓ Expression MCP-1, TNFα et IL-6 dans le TA ↑ Adiponectine ↑ Sensibilité à l'insuline	C.N. Serhan et al., 2014
Protectine DX	Souris Db/Db	1 µg en intraveineuse immédiatement et 2,5h après une infusion de lipide pendant 6h	↑ Expression IL6 dans le muscle squelettique ↑ Phosphorylation AMPK dans le muscle ↑ Sensibilité à l'insuline dans le muscle	M.Spite et al., 2014

TABLEAU 3: TABLEAU NON EXHAUSTIF DES ARTICLES ANALYSANTS L'IMPACT DES SPMs SUR LE DEVELOPPEMENT DE L'OBESITE ET DES ALTERATIONS ASSOCIEES

D'après (Martínez-Fernández et al., 2015). ↑ *augmentation*, ↓ *diminution*. PC ; Poids corporel.

iv. Rôles au niveau génique

Les AGPI en n-3 et leurs métabolites régulent l'expression d'un grand nombre de gènes par l'intermédiaire de facteurs de transcription, tels que les PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors), SREBP-1C (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1C) (Dossi et al., 2014), le facteur nucléaire hépatique (HNF4, hepatic nuclear factor 4), le récepteur aux rétinoïdes (RXR, retinoid X receptor) et le récepteur hépatique X (LXR, liver X receptor) (Spector, 1999, Clarke, 2001, Guesnet et al., 2005). Les AGPI vont pouvoir agir soit de façon directe, en liant les récepteurs PPAR ou LXR, ou de façon indirecte en inhibant la transcription de SREBP-1 par exemple. Ainsi, au niveau hépatique, les AGPI vont réduire la synthèse de nouveaux acides gras en inhibant l'expression des protéines impliquées dans la lipogenèse (Jump et al., 2005).

Le DHA et l'EPA sont également capables d'interagir avec le récepteur GPR120 (G-Protein-coupled Receptors 120) qui s'exprime dans différents tissus tels que le cerveau, les poumons et le tissu adipeux et tout particulièrement dans le colon (Iwasaki et al., 2015). Il a également été montré des propriétés anti-inflammatoires des AGPI en n-3 à longue chaîne, dépendantes de GPR120s via une inhibition de la voie NFκB (Ballester et al., 2010; Daak et al., 2015; Zhao et al., 2017) et via une inhibition de TAK1 (Transforming growth factor Beta Activated Kinase 1) (Oh et al., 2010). Enfin, il a été montré que la régulation de la sécrétion d'hormones intestinales telles que le GLP1 (Hirasawa, 2015), les GIP (Gastric Inhibitory Polypeptides) (Iwasaki et al., 2015) ou encore de la CCK (Cholecystokinin) (Sankoda et al., 2017) par les AGPI en n-3 s'effectue via une modulation du récepteur GPR120.

c) Ratio Oméga 6/Oméga 3, obésité et altérations métaboliques et intestinales associées

i. *Ratio Oméga6/Oméga3*

Les régimes alimentaires actuels présentent un ratio oméga 6/oméga 3 élevé dû à de fortes teneurs en oméga 6 diminuant de fait l'apport en oméga 3. Il est actuellement recommandé par l'ANSES que le rapport LA / LNA tende vers 5 dans le but d'éviter une inhibition de la bioconversion du LNA en ses dérivés supérieurs (EPA et DHA). En effet, le LA et le LNA étant en compétition pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse des AGPI à longue chaîne, un apport alimentaire excessif en LA inhibe, par compétition, la synthèse d' EPA et de DHA ainsi que leur incorporation tissulaire. Il est de plus recommandé par l'ANSES des apports directs en acides gras à longue chaîne, dont 0,25 g/jour d' EPA et 0,25 g/jour de DHA. La diminution de l'apport en LNA, et de ses dérivés supérieurs, dans les régimes actuels va diminuer les teneurs en EPA et DHA dans les phospholipides membranaires, remplacés par l'acide arachidonique, modifiant ainsi les propriétés physico-chimiques des membranes (Simopoulos, 2002).

Des apports massifs en oméga 6, induisant une augmentation du ratio oméga 6/oméga 3, favorisent l'installation de l'obésité et du diabète de type 2 (Simopoulos, 2016a). Une augmentation du ratio oméga 6/oméga 3 influence également le développement du tissu adipeux du nouveau-né durant la période prénatale et le prédispose ainsi à l'obésité. Les oméga 6, et notamment leurs dérivés à longues chaînes, stimulent la différenciation adipocytaire dans le tissu adipeux, le rendant ainsi plus efficace dans le stockage d'énergie, au

contraire des oméga 3, qui eux contrecarrent les effets pro-adipocytaires des oméga 6 (Ailhaud et al., 2006).

ii. Oméga 3 et maladies métaboliques

Si l'effet hypo-triglycéridémiant d'un apport en AGPI en n-3 d'origine marine a été de nombreuses fois montré (DHA et/ou EPA) sur des modèles murins (Kasbi Chadli et al., 2012; Rossmeisl et al., 2012), les effets de ces acides gras sur la prise de poids corporel et le développement de la masse adipeuse restent controversés. En effet, certaines études rapportent qu'un apport en AGPI en n-3 prévient la prise de poids (Bertrand et al., 2013; Kasbi Chadli et al., 2012), tandis que d'autres ne rapportent aucun effet (Gillam et al., 2009; Todoric et al., 2006). Concernant les effets sur la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline, *Gillam* et collaborateurs et *Todoric* et collaborateurs ne rapportent aucune amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline lors d'une supplémentation en AGPI en n-3 dans des conditions obésogènes (Gillam et al., 2009; Todoric et al., 2006), tandis qu'une amélioration de ces paramètres, ainsi qu'une amélioration de la glycémie et de l'insulinémie à jeun, lors d'une supplémentation de AGPI en n-3 a été observée par d'autres (Bertrand et al., 2013; Rossmeisl et al., 2012).

Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que certaines études ont utilisé des souris génétiquement obèses (souris *ob/ob* ou *db/db*) et d'autres des souris rendues obèses par un régime alimentaire (Hao et al., 2015). Le type de régime alimentaire utilisé pour induire l'obésité peut être également à l'origine de biais : en effet, les réponses phénotypiques sont différentes selon qu'il s'agisse d'un régime hyperlipidique 72% (72% de l'énergie provient du gras), d'un régime hyperlipidique 45%, ou encore de régimes à la fois hyperlipidiques et hyperglucidiques (Winzell and Ahrén, 2004). La durée du régime importe également puisque les paramètres métaboliques sont différemment modifiés selon que la durée du régime est de 2, 4, 6 ou 12 semaines (Gulhane et al., 2016). D'autre part, les oméga 3 sont très sensibles à l'oxydation, ce qui peut également altérer leur portée selon les conditions d'administration. D'autres paramètres, tels que le sexe (Zore et al., 2018), l'âge ou encore le microbiote peuvent également impacter les résultats (Franklin and Ericsson, 2017).

Pour pallier ces biais, *Kang* et collaborateurs ont développé le modèle de souris transgéniques *fat-1* qui exprime le gène *fat-1*, cloné chez *C.elegans*, codant pour une n-3 fatty acid desaturase, absente chez les mammifères, capable d'introduire une double liaison en

position 3 des n-6. Ainsi ces animaux présentent une diminution drastique du ratio oméga 6/oméga 3 tissulaire ce qui en fait un outil intéressant dans l'étude des effets des oméga 3 sans avoir recours à une intervention nutritionnelle (Kang, 2007). Nous avons montré au laboratoire, que les souris fat-1 nourries avec un régime obésogène sont résistantes au développement de l'obésité. Ces souris sont également protégées des altérations métaboliques (intolérance au glucose, résistance à l'insuline et stéatose hépatique non alcoolique) et intestinales (hyperperméabilité intestinale, endotoxémie métabolique) (Bidu et al., 2018a).

Chez l'homme, une diminution des triglycérides circulants et une augmentation des HDL (Hight Density Lipoprotein) a été observée chez des patients souffrant de diabète de type 2 supplémentés en DHA et EPA alors qu'aucun effet n'est observé avec un apport en huile d'olive (supplémentation de 4g par jour pendant 6 semaines). En revanche, une augmentation de la glycémie à jeun dans les groupes supplémentés avec les AGPI en n-3 a été observée par rapport au groupe placebo ou par rapport au groupe supplémenté avec de l'huile d'olive. (Woodman et al., 2002).

Une autre étude n'a rapporté aucun effet bénéfique d'une supplémentation en huile de lin (17.5g par jour, huile riche en LNA) sur les paramètres glycémiques et insulinémiques chez 60 sujets diabétiques de type 2 (Alekseeva et al., 2000). Plus récemment, une supplémentation en DHA et en EPA (1.2 g par jour pendant 3 mois) ne modifie ni le poids, ni la glycémie ni l'insulino-résistance d'adolescents souffrant d'obésité

En revanche, *Rhee* et collaborateurs ont rapporté des effets bénéfiques d'un apport en huile de lin (40g d'huile de lin par jour pendant 12 jours) sur l'insulino-résistance chez des patients souffrant d'obésité. (Rhee and Brunt, 2011). *Huang* et collaborateurs ont également montré qu'une supplémentation en oméga 3 chez des adolescents obèses, associée à une modification du style de vie (sport, alimentation...), améliorait de façon significative la résistance à l'insuline, l'indice HOMA, ainsi que les altérations de sécrétion d'adipokines par rapport à une modification du style de vie seule (Del-Río-Navarro et al., 2019).

Enfin, une méta-analyse de 79 études randomisées regroupant 112000 participants, a analysé l'impact d'une supplémentation en oméga 3 sur les maladies cardiovasculaires et a montré que la prise de DHA et d'EPA ne réduisait ni le risque, ni la mortalité induite par les maladies cardiovasculaires (Abdelhamid et al., 2018).

d) Oméga 3 et Microbiote intestinal

Différentes études se sont intéressées à l'impact d'acides gras tant saturés qu'insaturés sur la composition et la fonction du microbiote intestinal.

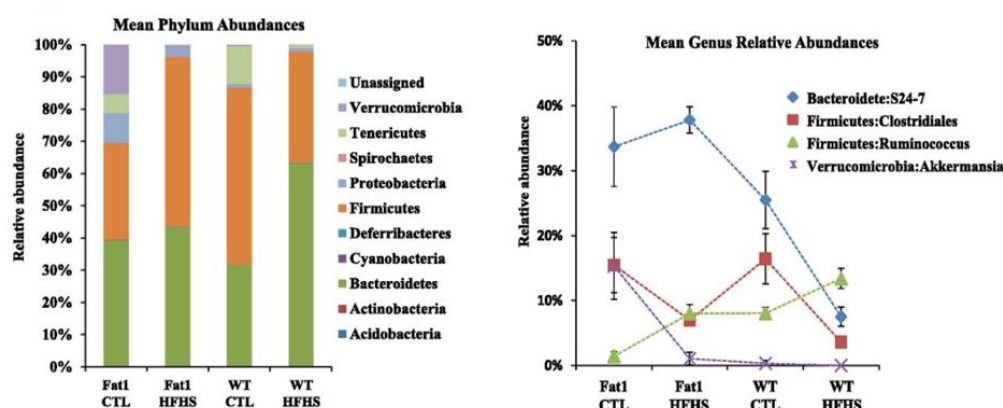
Ainsi, *Patterson* et collaborateurs ont évalué l'effet de régimes enrichis soit en huile d'olive, en acide palmitique, en huile de carthame (enrichis en oméga 6), en huile de lin (riche en ALA) ou en huile de poisson (riche en DHA et EPA) sur le microbiote intestinal chez la souris. Une augmentation des *Firmicutes* a été observée chez les souris nourries avec le régime enrichi en acide palmitique, tandis que le régime enrichi en huile d'olive induit une augmentation des *Bacteroidetes*. Le régime enrichi huile de poisson a significativement augmenté les *Bifidobactéries* (*Patterson et al.*, 2014). Il a également été montré qu'un régime enrichi en huile de lin diminuait l'abondance des *Bacteroidetes* (*Liu et al.*, 2012) tandis qu'un régime enrichi en AGPI en n-3 à longues chaînes diminuait l'abondance des *Firmicutes* (*Yu et al.*, 2014). D'autres études ont également rapporté qu'un régime enrichi en huile de poisson permettait d'augmenter l'abondance de *Lactobacillus* et d'*Akkermansia muciniphila* comparé à un régime riche en acides gras saturés (*Caesar et al.*, 2015).

Modèle utilisé	Régime	Conclusion	Référence
C57BL/6	HFD (45% fat) pendant 21 semaines	Diminution du phylum <i>Bacteroidetes</i> et augmentation des phylums <i>Firmicutes</i> et Protéobactéries	Hildebrandt et al. 2009
C57BL/6	HFD (45% fat) pendant 25 semaines	Augmentation des bactéries réductrice de sulfate et productrices d'endotoxines	Zhang et al. 2010
C57BL/6 germ free mice	Lait, lard ou AGPI pendant 3 semaines	Le lait augmente l'abondance des bactéries du genre <i>Bilophila</i> . Les AGPI augmentent l'abondance du phylum <i>Bacteroidetes</i> et diminue celle des <i>Firmicutes</i> .	Devkota et al. 2012
C57BL/6	Acide gras saturés, AGPI n-6 ou AGPI n-3	Les AGPI en n-6 et en n-3 réduisent les proportions du phylum <i>Bacteroidetes</i>	Liu et al. 2015
C57BL/6	Huile de poisson, 10 mg/Kg ou 5mg/Kg pendant 2 semaines	L'huile de poisson diminue l'abondance des <i>Firmicutes</i>	Yu et al. 2014
C57BL/6	HFD enrichi ou non en huile de poisson	L'huile de poisson augmente l'abondance des genres <i>Lactobacillus</i> et <i>Akkermansia muciniphila</i>	Caesar et al. 2015

TABLEAU 4: PRINCIPALES ETUDES MONTRANT L'IMPACT DE REGIMES ENRICHIS AVEC DIFFERENTS ACIDES GRAS SUR LA COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL

Nous avons récemment mis en évidence une plus forte abondance du phylum *Verrucomicrobia* dans le microbiote intestinal des souris fat-1 nourries avec un régime standard comparativement à des souris de type sauvage. Sous régime hyperlipidique, ce phylum bactérien (majoritairement représenté par le genre *Akkermansia muciniphila*) n'est plus présent chez les souris sauvages, alors qu'il persiste chez les souris fat-1 (**Figure 23**) (Bidu et al., 2018a).

FIGURE 23 : COMPOSITION DU MICROBIOTE DE SOURIS SAUVAGES ET TRANSGENIQUES FAT-1



NOURRIES AVEC UN REGIME STANDARD OU HYPERLIPIDIQUE

(Bidu et al., 2018a). *Fat1 CTL* : Groupe de souris fat-1 nourries avec un régime standard. *Fat1 HFHS* : Groupe de souris fat-1 nourries avec un régime hyperlipidique. *WT CTL* : Groupe de souris sauvages nourries avec un régime standard. *WT HFHS* : Groupe de souris sauvages nourries avec un régime hyperlipidique.

Chez l'Homme, l'analyse de l'impact d'un probiotique commercial (VSL#3) associé ou non à une supplémentation de 180 mg de DHA/EPA chez des sujets en surpoids n'a rapporté aucune différence de composition du microbiote fécal entre les groupes supplémentés ou non en oméga 3. Des réserves peuvent être cependant émises sur cette étude puisque, pour comparer les microbiotes, les auteurs ont seulement compté sur milieux sélectifs les colonies aérobies et anaérobies (Rajkumar et al., 2014). De même, un apport élevé en DHA et EPA (4g/jour) pendant 8 semaines ne modifie pas le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* du microbiote intestinal de volontaires sains (Watson et al. 2017). Cependant, une augmentation des familles *Clostridiaceae*, *Sutterellaceae* et du genre *Akkermansia muciniphila* a été observée. En revanche, ces effets sont réversibles après une période de sevrage en oméga 3. Par ailleurs, une augmentation significative de l'abondance des genres *Bifidobactéries* et *Oscillospira* associée à une diminution des genres *Coprococcus* et *Faecalibacterium* a également été observée lors des supplémentations en oméga 3, persistantes après un temps de sevrage en oméga 3. Les auteurs ont également observé des différences de composition du microbiote en fonction du mode

d'administration des oméga 3. En effet, seule la formule liquide a augmenté l'abondance des genres *Lachnospira* et *Roseburia* et semblerait donc plus efficace en terme d'impact sur le microbiote que son homologue en capsule. Un des messages intéressants de cette étude est que les suppléments en oméga 3 ont permis d'augmenter significativement les concentrations de butyrate circulant.

L'étude COMIT (Canola Oil Multicenter Intervention Trial), a évalué l'impact de 5 mélanges d'huiles alimentaires sur le microbiote intestinal de 25 volontaires sains susceptibles de développer un syndrome métabolique. L'intervention nutritionnelle consistait à apporter 60g par jours, pendant 30 jours, d'huile de colza conventionnelle, d'huile de colza enrichie en DHA (3.48g de DHA/60g), d'huile de colza enrichie en acide oléique (42.88g d'acide oléique/60g), ou d'un mélange d'huile de maïs et d'huile de carthame dans un ratio 25/75 ou d'un mélange d'huile de lin et d'huile de carthame dans un ratio 60/40. La formulation enrichie en acide oléique montre la plus forte abondance en *Faecalibacterium*, contrairement à la formulation enrichie en DHA qui présente l'abondance en *Faecalibacterium* la plus faible. L'huile de colza est fortement corrélée avec l'abondance des familles *Coprobacillus* et *Blautia* l'huile enrichie en DHA est plutôt corrélée avec *Lachnospiraceae* (Pu et al., 2016)

L'étude Pilchardus, a évalué l'impact d'une supplémentation en DHA et EPA sur la composition du microbiote intestinal de patients diabétiques de type 2. Pendant 6 mois, les patients recevaient soit un régime spécifique pour diabétiques (n=17) soit le même régime supplémenté avec 100g de sardines (n=18), 5 fois par semaine, soit un apport d'approximativement 3g en EPA/DHA. Les résultats montrent une diminution de l'abondance des *Firmicutes* dans les deux groupes après 6 mois de régime, mais le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* diminue uniquement dans le groupe « oméga 3 » et dans ce dernier, une augmentation de l'abondance de *Bacteroides-Prevotella* a été observée (Balfegó et al., 2016).

e) Oméga 3 et stress du RE

Différentes études ont évalué l'impact des différents acides gras sur le stress du RE et sur les voies inflammatoires induites par ce stress. Les acides gras saturés, et particulièrement l'acide palmitique, ont été montrés comme étant de puissants inducteurs du stress du RE induisant une inflammation et, à terme, une mort par apoptose (Liang et al., 2011; Zhang et al., 2012b)

Il a par ailleurs été montré, sur différents modèles cellulaires, que les AGPI en n-3 peuvent prévenir le stress du RE induit par des acides gras saturés. Ainsi, sur des hépatocytes primaires

de rat, ALA, permet de prévenir le stress du RE induit par l'acide stéarique (Zhang et al., 2011). D'autre part, il a été montré qu'un traitement au DHA prévenait le stress du RE et la production d'IL1- β induits par l'acide palmitique sur des monocytes (Snodgrass et al, 2016). Un apport d'huile de poisson a permis d'améliorer la sensibilité à l'insuline, la tolérance au glucose et à diminuer le stress du RE chez des souris nourries avec un régime hyperlipidique (Liu et al., 2018; Yang et al., 2017). Une autre étude a également montré que les AGPI en n-3 à longues chaînes prévenaient en partie le stress du RE et l'apoptose des cellules β pancréatiques chez un modèle murin développant spontanément un diabète de type 2 (Jung et al., 2012). Ces effets des n-3 peuvent s'expliquer en partie par la production de seconds messagers comme les résolvines. En effet, un apport de résolvine D1 (10nM) prévient le stress du RE, l'apoptose et l'activité de la caspase 3 induits par l'acide palmitique dans des cellules HepG2. (Jung et al., 2014).

Objectifs

Les données bibliographiques développées ci-dessus rappellent que l'obésité, composante majeure du syndrome métabolique, est associée à une inflammation systémique de bas grade. En effet, la littérature a montré que des régimes hyperlipidiques pouvaient altérer la composition du microbiote intestinal associée à une augmentation de la perméabilité de l'intestin, et par conséquent conduire à une augmentation des taux circulants de lipopolysaccharides (endotoxémie métabolique) pouvant être à l'origine de cette inflammation.

Diverses études, tant chez la souris que chez l'Homme, indiquent qu'une supplémentation en AGPI en n-3 semble capable d'améliorer la fonction barrière de l'intestin et de réduire l'inflammation chronique, lors de régimes hyperlipidiques. Ces effets des AGPI en n-3 passent en partie par une modulation de l'expression des protéines de jonctions serrées telles que zonula-occludens 1 et occludines. D'autre part, cette fonction barrière est renforcée au niveau du colon par une couche de mucus dense, protégeant les cellules de l'épithélium intestinal d'agressions bactériennes. Les composants majeurs de cette épaisse barrière sont les mucines et plus particulièrement la protéine MUC2 produite en continu par les cellules caliciformes. MUC2 est une protéine hautement glycosylée qui doit subir d'importantes modifications post-traductionnelles dans le RE et le Golgi pour être fonctionnelle. Il a été montré qu'une augmentation de masse adipeuse conduisait à un stress du RE au sein du tissu hépatique et adipeux conduisant au développement d'une résistance à l'insuline et d'un diabète de type 2. D'autre part, lors de l'obésité, il a été montré qu'une augmentation des acides gras circulants affectait directement l'épithélium intestinal. En effet, chez la souris, un régime obésogène entraîne une diminution importante de l'épaisseur de la couche de mucus, empêchant ainsi de maintenir les bactéries à distance des cellules épithéliales intestinales aboutissant à une activation du système immunitaire et à une inflammation du colon. Le stress du RE, ainsi induit au niveau des cellules épithéliales, diminue la transcription de protéines telles que MUC2, ainsi que celles du facteur de différenciation des cellules caliciformes, KLF4.

Les acides gras semblent exercer différents effets sur le stress du RE. Alors que les acides gras saturés tels que l'acide palmitique sont capables d'induire un stress du RE, les acides gras polyinsaturés en n-3 tels que le DHA ont été montrés comme pouvant diminuer significativement ce stress dans différents modèles cellulaires. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a évalué les effets des AGPI en n-3 sur le stress du RE induit par l'acide palmitique en lien avec la production de mucines.

Collectivement, ces données indiquent qu'une modulation de la fonction barrière de l'intestin par les AGPI en n-3 reste incomplètement élucidée et que la capacité des AGPI en n-3 à moduler le microbiote intestinal, diminuer la perméabilité induite par le LPS, et préserver l'épaisseur de la couche de mucus lors de l'obésité alimentaire reste à déterminer. Comme, lors d'expériences nutritionnelles, il est difficile de vérifier la contribution per se d'AGPI en n-3 spécifiques, l'utilisation du modèle transgénique fat-1 permet de s'affranchir de suppléments nutritionnelles en n-3, et ainsi d'éviter les effets de facteurs confondants.

Afin de répondre à ces différents aspects, deux études nutritionnelles chez la souris et une étude *in vitro* sur la lignée cellulaire humaine colique LS174T ont été mises en œuvre.

Dans un premier temps, le rôle des AGPI en n-3 dans la prévention de l'obésité alimentaire et des désordres métaboliques associés ont été étudiés chez des souris sauvages et transgéniques fat-1 soumises durant 18 semaines à un régime obésogène (high-fat/high-sucrose, Research diet, D12451) comparativement à des souris nourries avec un régime témoin (Research diet, D12450B).

Lors de cette étude nutritionnelle, le rôle des AGPI en n-3 dans la prévention des altérations du microbiote intestinal, de l'hyperperméabilité intestinale et de l'endotoxémie métabolique a été exploré. Puis une étude de transplantation croisée de matière fécale entre des souris sauvages et transgéniques fat-1 a été réalisée afin de confirmer l'implication directe du microbiote des souris présentant un enrichissement endogène tissulaire en AGPI en n-3 dans la prévention de l'obésité et des désordres métaboliques associés.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'impact de ces AGPI sur la prévention du stress du RE au niveau colique, en lien avec la préservation de l'épaisseur de la couche de mucus. Pour cela, deux études ont été réalisées :

- Dans la première, *in vitro*, utilisant le modèle de cellules caliciformes coliques humaines LS174T sécrétant la mucine MUC2, notre objectif a été d'explorer la capacité de différents acides gras insaturés à contrer le stress du RE et l'altération de la sécrétion de MUC2 induits par l'acide palmitique.
- Dans une étude *in vivo*, nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact d'un enrichissement tissulaire en AGPI en n-3 dans le modèle de souris fat-1, sur l'altération de la couche de mucus colique lors de l'obésité avec, en lien avec cette altération, un focus particulier sur le stress du RE.

Nous nous sommes enfin intéressés au rôle spécifique du microbiote intestinal dans la prévention de l'altération de la couche de mucus colique lors d'un régime obésogène chez la souris fat-1. Pour cela, des souris sauvages, nourries avec un régime obésogène ou un régime standard, ont été transplantées, sans traitement préalable aux antibiotiques, avec du microbiote caecal de souris fat-1.

Chapitre 2 : Prévention de l'obésité et des désordres métaboliques associés par les acides gras polyinsaturés en n-3 chez la souris transgénique fat 1: rôle du microbiote intestinal.

I. Introduction

Une endotoxémie métabolique associée à une dysbiose intestinale a été mise en évidence lors de régimes obésogènes, tant sur des modèles murins que chez l'Homme. De plus, une modification du microbiote induite par des régimes hyperlipidiques augmente la perméabilité intestinale, en diminuant l'expression de gènes codant pour des protéines de jonction telles que ZO1 et occludines. Ces perturbations de la barrière intestinale conduisent à la translocation de bactéries depuis la lumière vers la circulation sanguine, ainsi qu'à une inflammation de bas grade *via* une activation des récepteurs TLR4 par le LPS, et une libération de médiateurs pro-inflammatoires. Il a été montré que les AGPI en n-3, notamment l'EPA et le DHA, étaient capables de préserver l'intégrité de la barrière intestinale et de réduire la libération de cytokines inflammatoires. Ainsi, une supplémentation de modèles animaux en DHA suite à des injections de LPS augmente l'expression de protéines de jonctions serrées et diminue l'expression intestinale de TLR4. Alors que des études récentes suggèrent que les AGPI en n-3 peuvent moduler le microbiote intestinal, certains travaux ne montrent cependant aucun effet de traitements à l'EPA et au DHA sur la dysbiose intestinale.

Récemment, il a été montré que des transplantations de microbiote intestinal pouvaient représenter une stratégie prometteuse pour moduler l'obésité, le remplacement de la population microbienne par une nouvelle apportant des éléments favorables à l'hôte pour réduire la pathologie. L'ensemble de ces données nous a conduits à étudier si la modulation d'un microbiote par un environnement riche en oméga3 pouvait améliorer les altérations métaboliques causées par un régime hyperlipidique. Pour cela, nous avons transplanté le microbiote de souris fat-1 chez des souris sauvages (préalablement traitées aux antibiotiques) que nous avons ensuite nourries avec un régime obésogène pendant 12 semaines. Les résultats montrent que les souris transplantées avec le microbiote de souris fat-1 étaient protégées des altérations métaboliques et intestinales induites par le régime hyperlipidique, alors que le groupe de souris transplantées avec le microbiote de souris sauvages, dans les mêmes conditions nutritionnelles, présentait des altérations de la fonction barrière de l'intestin ainsi que des altérations métaboliques.

II. Article 1

1512

Diabetes Volume 67, August 2018



The Transplantation of ω 3 PUFA-Altered Gut Microbiota of fat-1 Mice to Wild-Type Littermates Prevents Obesity and Associated Metabolic Disorders

Célia Bidu,^{1,2,3} Quentin Escoula,^{1,2,3} Sandrine Bellenger,^{1,2,3} Aymé Spor,⁴ Maxime Galan,⁵ Audrey Geissler,⁶ André Bouchot,⁶ Dominique Dardevet,^{7,8} Béatrice Morio,⁹ Patrice D. Cani,¹⁰ Laurent Lagrost,^{2,3,11} Michel Narce,^{1,2,3} and Jérôme Bellenger^{1,2,3}

Diabetes 2018;67:1512–1523 | <https://doi.org/10.2337/db17-1488>

Altering the gut microbiome may be beneficial to the host and recently arose as a promising strategy to manage obesity. Here, we investigated the relative contribution of ω 3 polyunsaturated fatty acid (PUFA)-mediated alterations in the microbiota to metabolic parameter changes in mice. Four groups were compared: male fat-1 transgenic mice (with constitutive production of ω 3 PUFAs) and male wild-type (WT) littermates fed an obesogenic (high fat/high sucrose [HFHS]) or a control diet. Unlike WT mice, HFHS-fed fat-1 mice were protected against obesity, glucose intolerance, and hepatic steatosis. Unlike WT mice, fat-1 mice maintained a normal barrier function, resulting in a significantly lower metabolic endotoxemia. The fat-1 mice displayed greater phylogenetic diversity in the cecum, and fecal microbiota transplantation from fat-1 to WT mice was able to reverse weight gain and to normalize glucose tolerance and intestinal permeability. We concluded that the ω 3 PUFA-mediated alteration of gut microbiota contributed to the prevention

of metabolic syndrome in fat-1 mice. It occurred independently of changes in the PUFA content of host tissues and may represent a promising strategy to prevent metabolic disease and preserve a lean phenotype.

The association of obesity and related metabolic disorders with low-grade systemic inflammation is now widely recognized (1,2). A strong correlation has been found between increased fat and energy intake and increased plasma concentrations of bacterial lipopolysaccharides (LPSs), a major component of the outer wall of Gram-negative bacteria (3,4). LPSs induce fat accumulation in liver and adipose tissue and cause insulin resistance (5). The molecular origin of this inflammation, however, is not fully elucidated (1). LPS detection involves two coreceptors, cluster of differentiation 14 (CD14) and Toll-like receptor 4 (TLR4). TLR4-knock-out (KO) mice are resistant to high-fat diet-induced inflammation, obesity, and insulin resistance (6). Similarly,

¹University of Bourgogne Franche-Comté, L'Unité de Formation Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement, Lipides Nutrition Cancer UMR1231, Dijon, France

²INSERM, Lipides Nutrition Cancer UMR1231, Dijon, France

³LipSTIC LabEx, Fondation de Coopération Scientifique Bourgogne-Franche Comté, Dijon, France

⁴Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Mixte de Recherche 1347, Agroécologie, Dijon, France

⁵Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Mixte de Recherche 1062 Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (Institut National de la Recherche Agronomique, L'Institut de Recherche pour le Développement, Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Montpellier SupAgro), Montpellier-sur-Lez, France

⁶Cellmap-Cellular Imaging Platform, Faculté de Médecine et Pharmacie, Dijon, France

⁷Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France

⁸Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Mixte de Recherche 1019, Unité de Nutrition Humaine, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, Clermont-Ferrand, France

⁹Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Mixte de Recherche 1397, CarMeN Laboratory, Lyon 1 University, INSERM U1060, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Rockefeller and Charles Merieux Lyon-Sud Medical Universities, Lyon, France

¹⁰Université Catholique de Louvain, Welbio (Walloon Excellence in Life Sciences and Biotechnology), Louvain Drug Research Institute, Metabolism and Nutrition Research Group, Brussels, Belgium

¹¹L'Unité de Formation Médecine, Université de Bourgogne, Dijon, France

Corresponding author: Michel Narce, michel.narce@u-bourgogne.fr, or Jérôme Bellenger, jerome.bellenger@u-bourgogne.fr.

Received 8 December 2017 and accepted 21 April 2018.

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db17-1488/-/DC1>.

C.B. and Q.E. participated equally in the study and share first authorship.

© 2018 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. More information is available at <http://www.diabetesjournals.org/content/license>.

CD14-KO mice are resistant to the development of LPS-induced inflammation compared with wild-type (WT) mice (5).

Endotoxemia has been closely related to intestinal dysbiosis during high-fat feeding in mice (5) and in humans (7). In addition, the modulation of gut microbiota after a high-fat diet increased intestinal permeability by reducing the expression of genes encoding tight junction (TJ) proteins such as zonula-occludens 1 (ZO-1) and occludin (3). Abnormalities in the intestinal barrier result in bacterial translocation, LPS-mediated activation of TLR4 (5), and the release of proinflammatory mediators (1,8). Interestingly, ω 3 fatty acids, notably eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids, were reported to preserve intestinal barrier integrity and to reduce inflammatory cytokines. For example, after intravenous injections of LPS in animal models, dietary DHA supplementation significantly increased the expression of intestinal TJ proteins, such as occludin and claudin-1, and decreased intestinal expression of TLR4 (9). However, whereas recent studies suggested that ω 3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) may influence the content of gut microbiota (10,11), other data showed that EPA- and DHA-treated mice were not protected from gut microbiota dysbiosis (12).

Gut microbiome transplantation recently arose as a successful, new, and promising intervention to manage obesity, suggesting that the replacement of a microbial population by a new one that has been manipulated to include healthy factors should confer a beneficial health effect on the host (13). This led us to investigate whether modified gut microbiome by the ω 3 fatty acid environment might improve metabolic alterations caused by a high fat/high sucrose (HFHS) diet. For that, we used transgenic mice exhibiting endogenously elevated ω 3 PUFA tissue content and a lower ω 6-to- ω 3 PUFA ratio compared with their WT littermates (14) and displaying a reduced endotoxemia and inflammatory status (15).

In the present work, we took advantage of fat-1 mice to study the effect of gut microbiome alteration versus host tissue fatty acid composition on the metabolic phenotype in mice fed an HFHS diet. The fat-1 transgenic mice encoding an n-3 fatty acid desaturase are able to catalyze the conversion of ω 6 to ω 3 PUFA (14), overcoming the use of dietary manipulation. Compared with conventional dietary intervention (introducing potential confounding factors), this approach is more effective in balancing the ω 6-to- ω 3 ratio because it not only elevates tissue concentrations of ω 3 PUFA but also decreases the levels of excessive endogenous ω 6 PUFA (14), which is ideal for identifying the specific roles of ω 3 PUFA and addressing nutrient-gene interactions. Then, this mouse model would represent a useful *in vivo* system for giving new insights of the role of the ω 6-to- ω 3 fatty acid ratio in the context of obesity and associated metabolic disorders.

We evidenced for the first time that a fat-1 microbiome transplanted to WT mice revealed a cause-and-effect relationship between microbiome composition and metabolic

changes that highlights the transmissible trait of such a lean phenotype.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animals

All procedures followed institutional guidelines for the use and care of laboratory animals and were approved by the University of Burgundy Ethics Committee. Male fat-1 homozygous transgenic mice and nontransgenic littermate controls (12–16 weeks old) were fed a control (CTL) diet (D12450B; Research Diets) or an HFHS diet (D12451; Research Diets) *ad libitum* for 18 weeks. Both diets contained 20% protein, 10 and 45% fat, and 70 and 35% carbohydrates, respectively. The ω 6-to- ω 3 ratios in the diets were 16.5 (CTL) and 13.6 (HFHS).

An oral glucose tolerance test (OGTT) was performed at week 16, as described previously (16). In response to the OGTT, insulinemia was determined using an ultrasensitive ELISA kit (Alpco, Salem, NH) according to the manufacturer's protocol. The HOMA of insulin resistance index was calculated based on the following formula: area under the curve (AUC) of glucose $\times$ AUC of insulin $\times 10^{-4}$. Body composition (fat mass and lean mass) was measured in week 1 and 17 by EchoMRI (Echo Medical Systems, Houston, TX). At week 17, intestinal permeability was assessed by force-feeding mice with fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran 4 kDa, collecting blood 4 h after gavage, and measuring plasma fluorescence. At the end of the nutritional study, the fasted mice were killed by lethal intracardiac puncture, and blood was collected for LPS, glucose, and insulin quantification. Liver and adipose tissue and the jejunum and cecum contents were collected, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis.

Ex Vivo Muscle Response to Insulin and Glucose Transport

Gastrocnemius skeletal muscles (200 mg) were dissected intact in the fiber axis to assess skeletal muscle glucose transport as previously described by Dardevet et al. (17).

Histological and Immunohistochemical Analysis

Samples were analyzed at the CellImaP core facility (Faculty of Medicine, Dijon, France). Histological analysis was conducted on formalin-fixed, paraffin-embedded liver sections stained with Oil Red O to study neutral lipid content. Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed organ sections stained with hematoxylin and eosin. Jejuna and adipose tissue were dehydrated and embedded in paraffin. Paraffin blocks were sliced (5- μm -thick slices, two different levels per block), and slices of jejunum and adipose tissue were deposited onto Superfrost Plus slides. ZO-1 and F4/80 (two slides per block at two different levels) immunohistofluorescence or immunohistochemistry were performed as previously described (18).

Lipidomic Analysis

The fatty acid composition of the different sections of the gastrointestinal tract, liver, and muscle was

determined by gas chromatography as described previously (19).

Real-time Quantitative PCR

Quantitative PCRs were performed using the StepOne Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Villebon Sur Yvette, France) (18). Primer sequences for the targeted human and mouse genes are presented in Supplementary Table 1.

Western Blot Analysis

Frozen jejunums were ground to a fine powder under liquid nitrogen and transferred into radioimmunoprecipitation assay protein lysis buffer (50 mmol/L Tris [pH 8.0], 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, and 1% Triton X-100) containing a protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Proteins expression was performed as described previously (18).

Determination of Intestinal Permeability

Intestinal permeability was assessed using FITC-dextran 4. Briefly, mice fasted for 6 h were force-fed with FITC-dextran 4 (600 mg/kg body weight, 120 mg/mL). After 4 h, each mouse was anesthetized with isoflurane (TEM, Bordeaux, France), and 120 μ L blood was collected from the retro-orbital vein. Plasma was analyzed using a fluorescence spectrophotometer to determine FITC-dextran 4 kDa concentrations. Standard curves were produced by serial dilution of FITC-dextran 4 kDa in nontreated plasma.

Plasma LPS Quantification

LPS concentrations were assayed in total serum using a recently published method that is based on the direct quantitation of 3- β -hydroxymyristic acid by gas high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, as previously described (20). This new approach is a relevant method to quantitate endotoxin in a sample and evaluate the proinflammatory potential of LPS *in vivo*.

Cecal Microbiota Analysis

Ceca were recovered quickly after the mice were killed. The contents of each intact cecum were recovered by manual extrusion and snap frozen (-80°C) until use. Frozen cecal samples (~ 100 mg) were used for whole-community DNA extraction in accordance with the guidelines of the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA).

DNA samples were sequenced using universal primers targeting the hypervariable region V4 of the 16S rRNA gene (251 base pairs) via Illumina MiSeq (Illumina) sequencing, as previously described (21), to perform PCR amplification, indexing, pooling, multiplexing, and taxonomic identification using the SILVA SSU Ref NR 119 database (<http://www.arb-silva.de/projects/ssu-ref-nr/>) as a reference.

The paired-end sequences obtained were first quality checked and assembled with PEAR (Paired-End Read Merger) software. The assembled sequences were then denoised and processed with QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) software (22). Briefly, reference-based chimera detection was performed using the Greengenes

representative set of 16S rRNA sequences. Sequences were then clustered in operational taxonomic units (OTUs) at 97% similarity using USEARCH (23). Representative sequences for each OTU were then aligned using Python Nearest Alignment Space Termination (PyNAST) (24), and their taxonomy was assigned using the Greengenes database (<http://greengenes.lbl.gov/Download/>). A phylogenetic tree was then constructed using FastTree.

Diversity metrics (i.e., Faith's Phylogenetic Diversity), richness (observed species), and evenness (Simpson's reciprocal index), which describe the structure of microbial communities, were calculated based on rarefied OTU tables. Differences in α -diversity indexes were tested using ANOVAs, followed by Tukey honest significance difference (HSD) tests. Unweighted and weighted UniFrac distance matrices were also computed to detect global variations in the composition of microbial communities. Principal coordinates analyses (PCoAs) were then calculated and plotted.

Fecal Microbiota Transplantation

The endogenous microbiota of 12-week-old homozygous fat-1 transgenic and WT mice were depleted by treatment with a single dose of streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). This process has previously been validated for fecal microbiota transplantation in conventional mice (25). It can transiently reduce by 90% the density of cecal bacteria recovered using anaerobic culture conditions and is known to return to normal levels within 3–4 days (26). Before each fecal transfer treatment, 1 g fecal pellets were collected from eight naïve donor mice, pooled, and placed in 5 mL Dulbecco's PBS (Life Technologies, Grand Island, NY). The fecal transplantation was performed as described previously (25).

Mice from each group were individually housed from antibiotic treatment to the end of the experiment (fat-1 to WT). Instead of cecal microbiota, fecal microbiota was transplanted for convenience and to minimize the number of animals used as donors. Fecal transplants were initiated 24 h after the oral antibiotic treatment by force-feeding with controlled amounts (200 μ L) of the donor fecal matter ($n = 6$ per group). Control groups of mice ($n = 6$) were force-fed with 200 μ L transfer buffer alone to eliminate the effects of gavage *per se*. Mice underwent transplantation six times during the following 9 days after streptomycin treatment. To provide additional information on the incidence of fecal microbiota transplantation itself on the obese phenotype development in the recipient mice, we also transferred WT fecal microbiota to WT recipients (fecal to stomach) and assert that weight gain was comparable to that of WT mice force-fed with buffer alone.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SEM for each group. Because the limited sample sizes prevented a proper test of parametric test assumptions, groups were compared using the nonparametric Kruskal-Wallis test and the Dunn multiple

comparisons test, except for cecal microbiota analysis, where differences in α -diversity indexes were tested using ANOVAs, followed by Tukey HSD tests. When only two groups were present, they were compared using the Mann-Whitney test. All analyses were performed using GraphPad Prism 6.05 software.

RESULTS

fat-1 Transgenic Mice Maintain a Lean Phenotype When Fed an HFHS Diet

The HFHS diet induced a statistically significant weight gain in WT mice (+20 g relative to controls) (Fig. 1A). Weight gain under the HFHS diet was much lower in fat-1 mice (Fig. 1A and B) and remained comparable to that in their counterparts fed the CTL diet. HFHS-fed fat-1 mice exhibited much less adipose tissue than did WT mice (Supplementary Fig. 1A–C). Moreover, UCP1 mRNA expression in brown adipose tissue was much more elevated in fat-1 mice versus WT (Supplementary Fig. 1D). Food intake did not differ between the two genotypes (Supplementary Fig. 6). This finding provides further support to earlier studies that reported that the endogenous production of ω 3 PUFAs and a reduction in the levels of ω 6 PUFAs could induce increased energy expenditure, with no effect on energy intake (27).

An HFHS diet is known to have deleterious effects on glucose homeostasis and adiposity (28,29). Our results showed that fat-1 mice were protected against the whole-body glucose intolerance observed in WT mice fed the obesogenic diet (Fig. 1B–D and Supplementary Fig. 3A). In accordance with this remarkable resistance to glucose intolerance, ω 3 PUFA enrichment of skeletal muscle (Supplementary Fig. 4) was associated with improved glucose uptake, independently of the presence of insulin (Supplementary Fig. 3C). Moreover, GLUT-1 mRNA expression in skeletal muscle was 2.5-fold higher in fat-1 compared with WT mice (Supplementary Fig. 3B).

Because nonalcoholic fatty liver disease is positively associated with the development of obesity, insulin resistance, and ultimately, type 2 diabetes (30,31), we examined different markers of steatosis. Oil Red O staining revealed significantly fewer and smaller lipid droplets in HFHS-fed fat-1 mice livers than in WT mice livers (Fig. 1D). This was confirmed by the unchanged total liver fatty acid mass in fat-1 mice fed the HFHS diet compared with controls, whereas WT mice fed the HFHS diet exhibited a pronounced accumulation of total liver fatty acids (Supplementary Fig. 5A) and a twofold increase in the level of hepatic oleic acid (a marker of hepatic steatosis). This level was constant in fat-1 mice, whether fed the HFHS diet or not (Supplementary Fig. 5B). In addition, levels of 20:4 and 22:6 in HFHS-fed WT mice were half those in controls. In fat-1 mice, total liver ω 3 and ω 6 PUFA content did not differ whether they were fed the CTL or HFHS diet, but significant increases in 20:4 and 22:6 and decreases in 18:2 and 20:5 levels occurred in fat-1 mice fed the HFHS diet (Supplementary Fig. 5B). mRNA expression of FATCD36

and peroxisome proliferator-activated receptor- γ remained comparable to controls in HFHS-fed fat-1 mouse livers and were 2 and 2.5 times higher in HFHS-fed WT mice, respectively (Supplementary Fig. 5C).

In addition, F4/80 adipose tissue labeling appeared much higher in HFHS-fed WT mice compared with controls but remained remarkably low in fat-1 mice whatever the diet (Supplementary Fig. 2).

fat-1 Mice Are Protected Against Gut Barrier Dysfunction With Consequences on Metabolic Endotoxemia

To bring insights into the beneficial properties of PUFAs in fat-1 mice, intestinal permeability was assessed. As shown in Fig. 2A, a higher flux of 4 kDa FITC-dextran 4 was observed after HFHS feeding in WT mice but not in fat-1 mice. FITC-dextran 4 can be used to assess intestinal permeability but cannot specifically target the lower part of the intestine. Measurements of plasma FITC 4 h after gavage mostly corresponded to the lower part of the gut, that is, ileum, cecum, and proximal colon, where most microbes are located (32,33). Even under the CTL diet, fat-1 mice showed lower permeability values than did their WT counterparts (Fig. 2A).

ZO-1 immunostaining was 70% higher in fat-1 than in WT mice fed the CTL diet. Even if the HFHS diet induced a decrease of ZO-1 expression in WT (3.6 times) and fat-1 (2 times) mice, it remained close to that of WT controls in fat-1 HFHS-fed mice (Fig. 2B).

Quantitation of LPS mass concentration by liquid chromatography–tandem mass spectrometry revealed that fat-1 mice had low plasma LPS concentrations, which were much lower than in WT mice fed the HFHS diet but comparable to values measured in WT animals fed the CTL diet (Fig. 2C).

Major ω 6 and ω 3 Fatty Acid Composition and ω 6-to- ω 3 Fatty Acid Ratio Along the Gastrointestinal Tract of WT and fat-1 Mice Fed the HFHS and CTL Diets

As shown in Fig. 3, fatty acid composition of total lipids revealed higher levels of ω 3 fatty acids in fat-1 transgenic animals than in WT mice fed the CTL or HFHS diet, whereas arachidonic acid (20:4 ω 6) was lower in fat-1 mice than in WT fed the CTL diet. In addition, the ratio of ω 6 PUFA to the long chain ω 3 PUFA was markedly decreased compared with the ratio in WT mice, with consistent data from duodenum to colon. The total lipid level did not differ in the two genotypes whatever the regimen (data not shown).

fat-1 and WT Mice Display Different Proportions of Cecal Microbiota Phyla and Different Expression of Intestinal Antimicrobial Peptides When Fed a CTL or HFHS Diet

We used 16S rDNA sequencing to investigate changes in the cecal microbiota of fat-1 and WT mice fed the CTL or HFHS diet. A PCoA of the unweighted UniFrac distance matrix showed drastic and significant changes (analysis of similarity, $R = 0.78$; $P < 0.001$) in the composition of the cecal microbiota caused by both the mouse genotype and diet (Fig. 4A). Shifts in composition were associated with

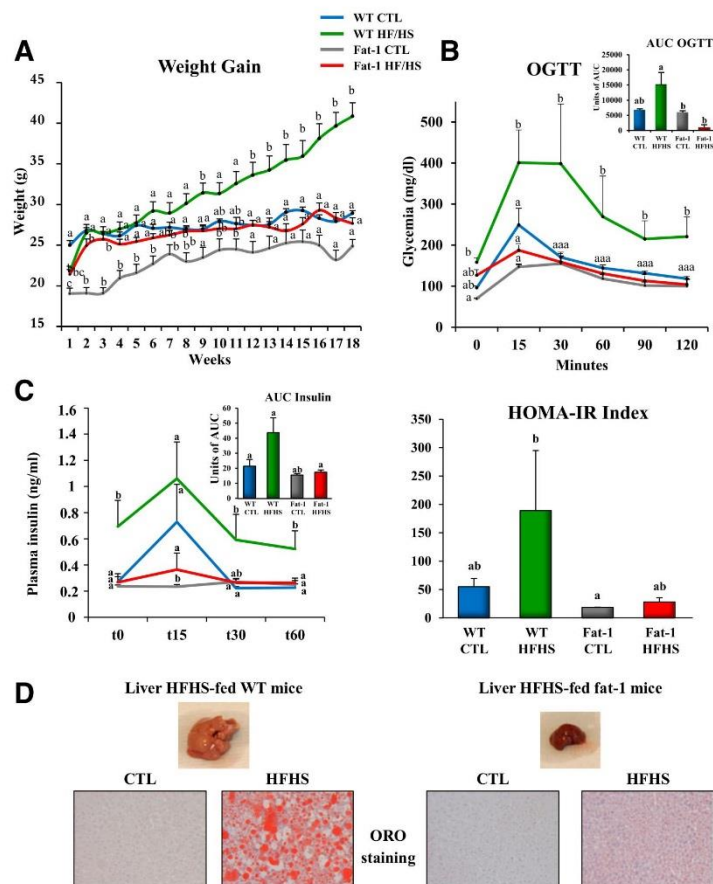


Figure 1—The fat-1 transgenic mice maintain a lean phenotype when fed an HFHS diet. Mice (WT and fat-1 transgenic) were fed a CTL or HFHS diet for 18 weeks. **A**: Weight gain curves ($n = 8$ per group). **B**: OGTT and AUCs for OGTTs. **C**: Insulin response to OGTT. HOMA-IR, HOMA of insulin resistance. **D**: Representative photographs of the liver of WT and fat-1 mice fed an HFHS diet and representative Oil Red O (ORO)-stained liver sections ($n = 8$ per group). Data are expressed as means $\pm$ SEM. Data with different superscript letters are significantly different at $P < 0.05$, according to the post hoc ANOVA statistical analysis. Similar results were obtained in five independent experiments.

significant changes in diversity levels (Faith's Phylogenetic Diversity) and were also influenced by both the mouse genotype and diet ($F_{1,25} = 15.9$, $P = 0.001$). The fat-1 mice fed the HFHS diet displayed a significantly higher diversity level than did WT mice fed the same diet (Tukey HSD test, $P < 0.05$) (Fig. 4B).

At the phylum level (Fig. 4C), differences in OTUs revealed decreases in Tenericutes in fat-1 and WT mice phylum when fed the HFHS diet, with a trend of similar magnitude in both genotypes. A more abundant population of Verrucomicrobia was observed in fat-1 than in WT mice when fed the CTL diet. Under the HFHS diet, the

Verrucomicrobia phylum was substantially reduced in fat-1 mice and completely disappeared in WT mice.

At the genus level, using a supervised classification approach (nearest shrunken centroid), we identified OTUs that were particularly responsive to the interaction between mouse genotype and diet (Fig. 4D). Indeed, as shown in Fig. 4D, the cecal microbiota of fat-1 mice proved to be enriched in OTUs belonging to the *Akkermansia* genus, especially when the mice were fed the CTL diet, compared with WT mice. We also found that OTUs belonging to the *Ruminococcus* genus were particularly responsive to the HFHS diet for both genotypes, but with significantly lower relative

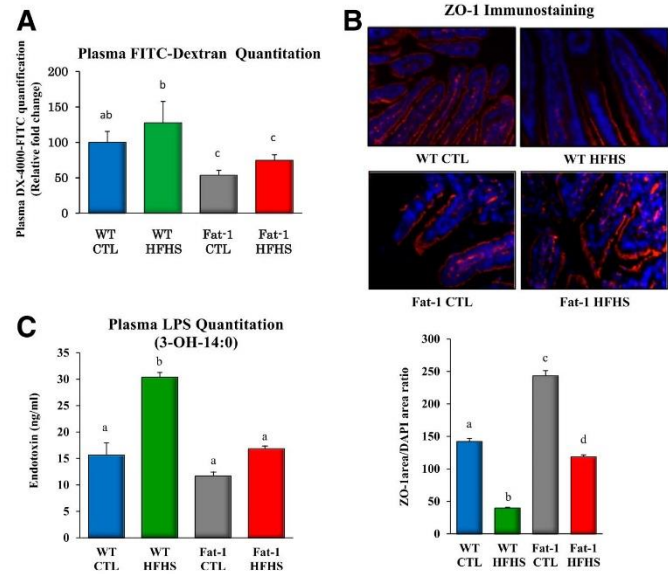


Figure 2—The fat-1 mice are protected against gut barrier dysfunction with consequences on metabolic endotoxemia. **A:** Intestinal permeability assay: plasma FITC-dextran 4 (DX, 4,000 molecular weight) oral challenge was measured in WT and fat-1 mice fed the CTL or HFHS diet for 17 weeks. **B:** Representative immunofluorescence staining for ZO-1 in the jejunum of WT and fat-1 mice fed the CTL or HFHS diet for 18 weeks, and ZO-1 immunostaining quantification of WT and fat-1 mice presented as ZO-1 area-to-DAPI area ratio. **C:** Direct plasma quantitation of 3- β -hydroxymyristic (OH) acid concentration by gas chromatography-mass spectrometry in WT and fat-1 mice fed the CTL or HFHS diet for 18 weeks ($n = 8$ per group). Data are means $\pm$ SEM. Groups with different superscript letters are significantly different at $P < 0.05$, according to the Kruskal-Wallis test and the Dunn multiple comparisons test.

abundance in fat-1 mice than in WT mice. Members of the *Clostridiales* family seemed to be affected by the HFHS diet, with decreasing relative abundance compared with controls for both genotypes. Finally, marked differences were found between WT and fat-1 mice fed the HFHS diet in the relative abundance of members of the S24-7 family. Indeed, although they seemed to be unaffected by the HFHS diet in fat-1 mice, the relative abundance of S24-7 members dramatically dropped in WT mice.

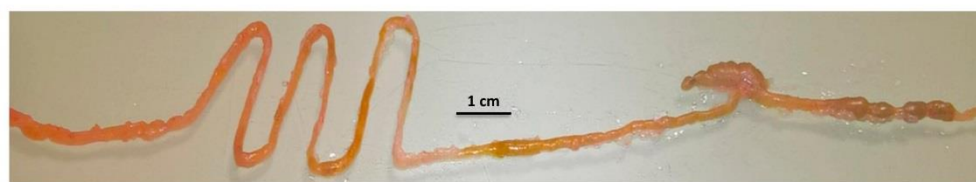
Antimicrobial peptides produced by the host play an important role in maintaining gut microbiota homeostasis and constitute an attractive mechanism for gut ecosystem modulation upon HFHS feeding or upon $\omega 3$ tissue enrichment. Consistent with this hypothesis, we observed that HFHS feeding affected antimicrobial peptide production in the small intestine when $\omega 3$ tissue enrichment preserved it (Supplementary Fig. 10): A dramatic decrease of Reg3g and α -defensin-Defa expressions was observed in the ileum of WT HFHS compared with WT CTL when it was maintained to the level of WT CTL in fat-1 CTL- and HFHS-fed mice. In the jejunum, Reg3g and phospholipase A2 group II (Pla2g2a) were decreased in WT HFHS compared with WT CTL; moreover, Reg3g was increased 2.5-fold in fat-1 mice, and Pla2g2a was at least maintained in fat-1

mice to the levels of WT CTL mice. Therefore, the expression of transcripts for antimicrobial peptides is affected by the HFHS diet in WT mice when it was not in fat-1 mice.

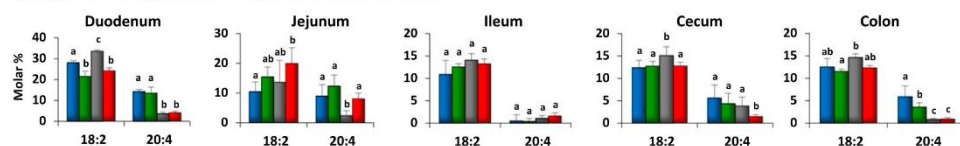
Transplantation of the $\omega 3$ -Modified Fecal Microbiome as a Relevant Way to Preserve a Lean Phenotype in Mice Fed the HFHS Diet

To evaluate the relative contribution of microbiota to the protective effects of $\omega 3$ PUFAs against diet-induced obesity, WT mice underwent transplantation with fat-1 fecal microbiota and were fed an HFHS diet for 17 weeks. Food intake did not differ between WT, fat-1, and fat-1-to-WT mice (Supplementary Fig. 9). After completion of the dietary intervention, WT mice colonized with fat-1 fecal microbiota exhibited a significantly lower total weight gain (-40%) than saline force-fed WT counterparts (10.2 ± 1.1 vs. 16.2 ± 2.3 g, respectively) and a significant improvement in glucose tolerance (Fig. 5A and B). WT fecal microbiota transferred to WT recipients had no effect on the ponderal curve or total weight gain of the animals, which remained highly comparable to those observed in saline buffer force-fed control mice (14.5 ± 1.4 vs. 16.2 ± 2.3 g, respectively).

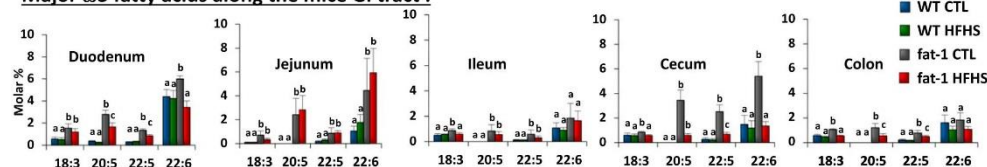
Intestinal permeability in nontransplanted fat-1 mice was 65% lower than in WT mice (Fig. 5C). A comparable



Major ω 6 fatty acids along the mice GI tract :



Major ω 3 fatty acids along the mice GI tract :



ω 6/ ω 3 fatty acid ratio along the mice GI tract :

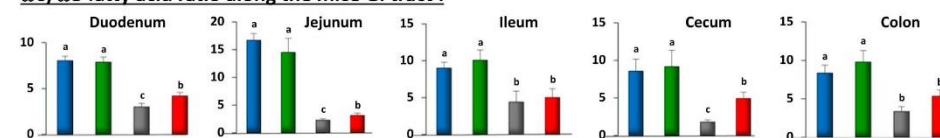


Figure 3—Major ω 6 and ω 3 fatty acid composition and ω 6-to- ω 3 fatty acid ratio along the gastrointestinal (GI) tract of WT and fat-1 mice fed the HFHS and CTL diets. Major fatty acid composition and ω 6-to- ω 3 fatty acid ratios of the different sections of the gastrointestinal tract of WT and fat-1 transgenic mice fed the HFHS and CTL diets (mean $\pm$ SEM). Groups with different superscript letters are significantly different at $P < 0.05$, according to the Kruskal-Wallis test and the Dunn multiple comparisons test ($n = 5$ per group). The ω 6-to- ω 3 ratio is given by $(18:2 \omega 6 + 20:4 \omega 6 + 22:4 \omega 6 + 22:5 \omega 6)/(18:3 \omega 3 + 20:5 \omega 3 + 22:5 \omega 3 + 22:6 \omega 3)$.

reduction was achieved in WT mice after transplantation with fat-1 fecal microbiota, with values that no longer differed from those in nontransplanted fat-1 mice (Fig. 5C).

Finally, we examined changes in the cecal microbiota between the different groups after transplantation. Using PCoA of the weighted UniFrac distance matrix, we detected a strong clustering of mice according to the genotype (Fig. 5D) along the first axis of the PCoA plot that explained 45% of the observed variation in the composition of the cecal microbiota. However, transplanted mice still differed significantly from fat-1 mice in cecal microbial composition (analysis of similarity, $R = 0.47$; $P < 0.001$). Again, and as shown in Fig. 4B, analysis of Faith's Phylogenetic Diversity revealed that fat-1 mice displayed the highest diversity levels (Tukey HSD test, $P < 0.05$) (Fig. 5E).

DISCUSSION

Early studies investigating the effects of dietary supplementation with ω 3 PUFA enrichment (34,35) and of endogenous ω 3 PUFA synthesis in fat-1 transgenic mice

(15,27) identified a role for ω 3 PUFAs in preventing metabolic endotoxemia and low-grade inflammation related to metabolic disorders. The metabolic changes observed in the current study—using a specific diet-induced obesity diet containing only traces of cholesterol (0.14%)—are in agreement with those observed by Li et al. (27), who used a diet recommended for atherosclerosis research containing 0.2% cholesterol. Nevertheless, extending the work of these authors, we focused here on gut microbiota analysis and transplantation studies. We demonstrated that an alteration in the gut microbiota was an important factor contributing to the ω 3 beneficial effects: ω 3 PUFAs increased the phylogenetic diversity of cecal microbiota and reduced endotoxemia. Most importantly, fecal microbiome transplantation from fat-1 to WT mice was able to prevent the metabolic disorders induced by an obesogenic HFHS diet. In addition, ω 3 PUFA enrichment in fat-1 mice was able to dampen intestinal epithelial barrier dysfunction induced by an HFHS diet, despite no direct contribution of host tissue-embedded PUFAs was evidenced.

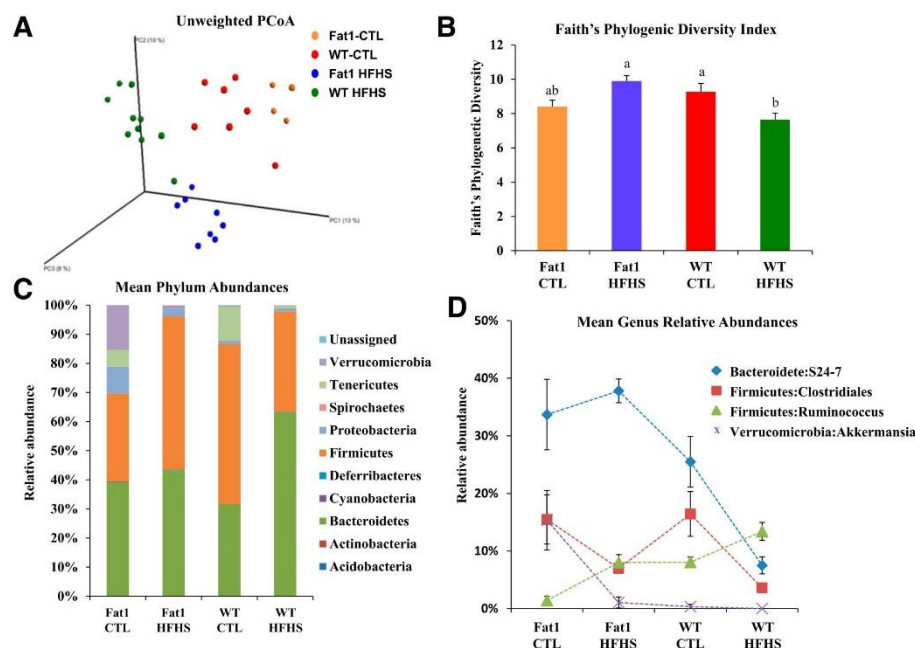


Figure 4—WT and fat-1 mice display different proportions of cecal microbiota phyla when fed a CTL or HFHS diet. A: PCoA of the unweighted UniFrac distance matrix. Red, orange, green, and blue dots represent WT mice fed the CTL diet, fat-1 mice fed the CTL diet, fat-1 mice fed the HFHS diet, and WT mice fed the HFHS diet, respectively. B: Variation between groups of Faith's Phylogenetic Diversity index. Colors are the same as in A. Groups with different letters are significantly different at $P < 0.05$, by the Tukey HSD test. C: Mean phylum abundances across the four treatments. D: Mean relative abundances of the most responding OTUs across the four treatments. Data in B, C, and D are means $\pm$ SEM.

The rapid and severe 80% increase in body weight observed here was of greater magnitude than the moderate increase in body weight of WT mice fed a high $\omega 6$ PUFA diet as reported by Kaliannan et al. (15). Consistent with earlier investigations (27), our data demonstrated the complete prevention of severe diet-induced obesity in fat-1 transgenic mice, an effect that might partly relate to a stimulation of energy expenditure (27) and to an increase of UCP1 expression in brown adipose tissue (Supplementary Fig. 1D). The fat-1 transgenic mice were also protected against the metabolic disorders associated with obesity, namely hepatic steatosis, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation (Fig. 1 and Supplementary Fig. 2). In the current study, endogenously synthesized $\omega 3$ PUFAs prevented HFHS-induced fatty liver, thus extending previous observations by Kim et al. (36) and Li et al. (27), who demonstrated that fat-1 gene expression afforded protection against high-fat diet-induced hypercholesterolemia and hepatic steatosis. Furthermore, we showed that homozygous fat-1 mice exhibited enhanced muscle glucose uptake, independently of the presence of insulin, and a huge decrease in the $\omega 6$ -to- $\omega 3$ ratio compared with WT mice (Supplementary Fig. 4). This protective response might be

attributed to increased docosanoid biosynthesis in muscle (37) of fat-1 mice fed a high-fat diet. Indeed, White et al. (38) evidenced that the proresolving lipid mediator, PD1 (10R,17S-dihydroxydocosa-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-hexaenoic acid) was increased by $\sim 176\%$ in muscle tissue of fat-1 mice versus WT mice. Moreover, these authors demonstrated that administration of PD1 to *db/db* mice substantially improved their insulin sensitivity (38). In the light of these data, we may assume that the high muscle glucose uptake observed in our study could be at least partly due to increased n-3 bioavailability for proresolving mediator synthesis (as PD1) in the muscle of the fat-1 mice.

Chronic low-grade inflammation is a critical factor underlying obesity and type 2 diabetes (39), in which significant alterations in the intestinal barrier occur (5,40), resulting in a two-to-threefold increase in serum LPS concentrations, characterizing metabolic endotoxemia (5). As observed in the current study, high-fat diets in mice increase gut permeability due to reduced expression of TJ proteins (3), resulting in a leaky gut and elevated endotoxin activity (3,40,41).

Whereas high $\omega 6$ PUFA diets increase metabolic endotoxemia, $\omega 3$ PUFAs beneficially affect intestinal permeability and metabolic endotoxemia (9,35). However, whether

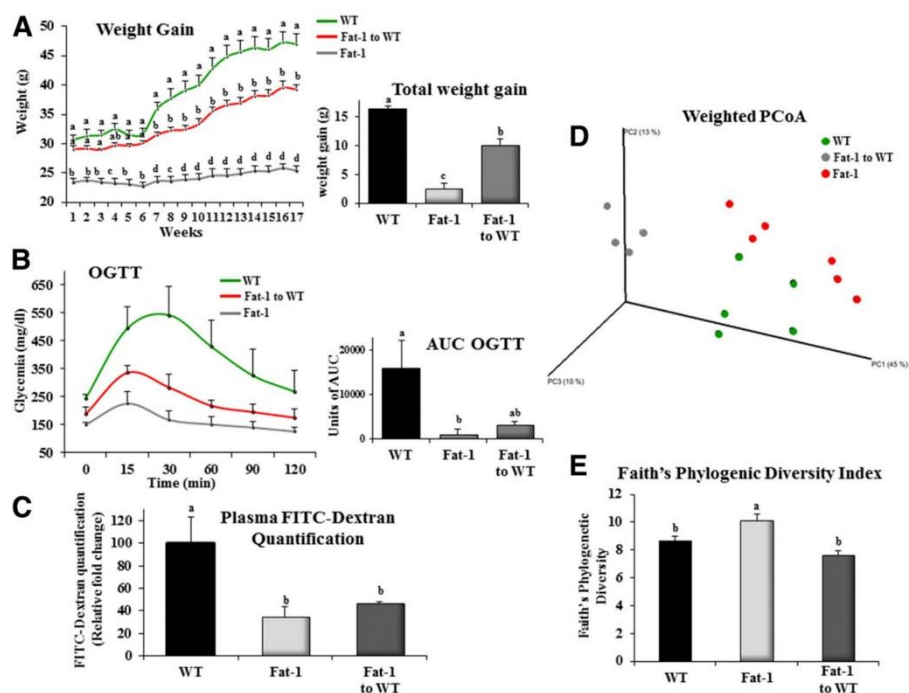


Figure 5—Transplantation of the ω 3-modified microbiome as a relevant way to preserve a lean phenotype in mice fed the HFHS diet. After fecal microbiota transplantation from fat-1 to WT mice, the WT and fat-1 transgenic mice were fed an HFHS diet for 16 weeks. **A:** Weight gain curves ($n = 6$ per group). The inset represents the total body weight gain (g, $n = 6$ per group). **B:** Mice were fasted for 6 h, and an OGTT was performed after gavage with glucose (2 g/kg body weight). The inset represents the AUC of the three different groups. **C:** Plasma FITC-dextran 4 oral challenge was measured for the intestinal permeability assay in WT and fat-1 mice fed an HFHS diet for 16 weeks. **D:** PCoA of the weighted UniFrac distance matrix. **E:** Variation between groups of Faith's Phylogenetic Diversity index. Groups with different superscript letters are significantly different at $P < 0.05$, according to the Kruskal-Wallis test and the Dunn multiple comparisons test.

metabolic endotoxemia is regulated when fat-1 mice are challenged with an obesogenic diet known to disrupt intestinal permeability is unknown. Importantly, we found here that endogenous ω 3 PUFA synthesis in fat-1 mice preserved TJ protein expression, prevented a "leaky" intestinal epithelial barrier, and limited metabolic endotoxemia. The beneficial properties of ω 3 PUFAs could not only be related to the enrichment of the jejunum in DHA, because our *in vitro* experiments with Caco-2/TC7 cells did not result in a significant improvement in TJ protein expression and paracellular permeability. Although previous studies (42–44) reported that DHA may directly affect epithelial cells, our results suggest that another mechanism, independently of the enrichment of host cells with ω 3 PUFAs, has to be considered to account for the potent beneficial effects of ω 3 PUFAs on gut barrier function.

Growing evidence supports the notion that gut microbiota play a pivotal role in energy homeostasis through the modulation of energy balance (45,46), glucose metabolism, and chronic inflammation associated with obesity (3,5,47).

In addition, gut microbiota-derived LPS has been demonstrated to play a driving role in the onset and progression of inflammation and related metabolic diseases (5). We thus investigated the effect of ω 3 PUFA enrichment in fat-1 mice on cecal microbiota. Our results show that besides significant differences in cecal microbiota between the two genotypes, fat-1 mice display significantly greater bacterial phylogenetic diversity than do WT mice when both are fed the HFHS diet. As shown Fig. 3, cells of the gastrointestinal tract—including the lower part of the intestine where the bacteria are the most abundant—are highly enriched in ω 3 fatty acids due to the expression of the fat-1 gene (see Supplementary Fig. 8) (ω 6-to- ω 3 ratios in fat-1 mice are two- to fourfold lower compared with their WT littermates). So, because the intestinal epithelium is continuously renewed, we may speculate that a "cellular" source of long-chain ω 3 fatty acids brought to the microbiota from the intestinal cell shedding would explain how the microbiota would also be "fed" by ω 3 fatty acids and would consequently have a positive effect.

The signaling pathways by which these changes influence obesity and associated metabolic parameters remain to be investigated. In this way, this could explain why some genera (in particular *Akkermansia* and S24-7) previously reported to be protective against weight gain and associated metabolic disorders (46,48) were present at elevated levels in fat-1 mice but not in WT mice. Interestingly, beneficial species such as *Akkermansia* seem to be crucial for the maintenance of mucus layer integrity (49,50), and the administration of *Akkermansia* as a beneficial bacteria has been reported to reduce systemic LPS levels in mice fed a high-fat diet, possibly through the preservation of mucus layer thickness and the prevention of leaky gut and endotoxemia (49). The mechanism by which *Akkermansia* could protect against obesity is not yet well understood, but recent data indicate that a membrane protein from *Akkermansia muciniphila* (Amuc_1100*)—more than the bacteria by itself—could be involved in the protective effects. This hypothesis has been reinforced by the fact that pasteurized bacteria exert similar effects (51).

Because we could not perform microbiota analysis in the upper part of the intestine, due to the paucity of biological material accessible in this specific area, directly linking events occurring in the lower part of the gut with changes observed in the upper part of the gastrointestinal tract is indeed difficult. However, it is important to note, as observed in numerous studies and also in the present one, that changing the cecal microbiota composition from the lower part of the gut (measured in the cecal or in the fecal material) can strongly influence the overall phenotype of the mice, even at distance of the colon. For example, seminal papers from Bäckhed et al. (45) showed that transferring the cecal content from mice into germ-free mice strongly affected liver and lipid metabolism. We and others have shown that changing the microbiota of the cecum and colon by using, for instance, prebiotics, may strongly affect the production of gut peptides such as glucagon-like peptide 2, which is known to directly affect the intestinal permeability of the jejunum (40).

Our data also suggest that under the HFHS diet, the host could contribute to the modulation of the microbial community by modulating the production of antimicrobial peptides (Reg3g, Defa, and Pla2g2a) in the small intestine and that ω 3 tissue enrichment normalized or even increased them. We then postulate that the regulation of antimicrobial peptide expression observed in fat-1 CTL- or HFHS-fed mice may represent a potential mechanism by which the host influences the composition of the microbiota.

A number of diseases (i.e., atopic diseases, inflammatory bowel disease, diabetes, obesity, cancer, and neuropathologies) are known to be associated with a significant decrease in microbiota diversity as well as with altered barrier function and increased permeability of the epithelium (52). In the current study, and to confirm a cause-and-effect relationship between changes in cecal microbiome and the observed metabolic trait, we transferred fat-1 fecal microbiota to WT mice. We used fecal microbiota for

convenience and to minimize the number of animals used as donors. Moreover, the microbiota of fecal samples were similar to those from the lower gastrointestinal tract. The community membership and structure of fecal samples is indistinguishable from samples derived from the lower gastrointestinal tract (53). The results of our fecal microbiota transplantation experiments supported the idea that the fat-1 microbiota were the driving force in lowering total weight gain, normalizing glucose tolerance, and restoring gut permeability. The pronounced effects of ω 3 PUFA-mediated changes in cecal microbiota on body weight and glucose utilization were observable in the present studies in the long-term (after more than 17 weeks of dietary intervention). This suggests that the beneficial effect of ω 3 PUFAs is a transmissible trait that accounts for most of the observed phenotypic differences between fat-1 and WT mice. In parallel, other beneficial effects of ω 3 PUFAs on host tissue homeostasis occur as already reported (18,19,27,37).

As already mentioned in other studies, the transplantation process can affect the immune system (54–56). Thus, such effect on the immune system at the very early stage after transplantation could be responsible for metabolic changes, independently of the implantation of the microbiota. That being said, as mentioned in RESEARCH DESIGN AND METHODS, we showed that WT-to-WT transfer did not affect the phenotype (data not shown). If any effect on the immune system would have explained the phenotype observed in WT mice receiving fat-1 microbiota, this should have been seen in WT-to-WT transplantation. We may then assume that all these kinds of any potential changes were not enough to account for the phenotype observed when fat-1 fecal material was used.

In conclusion, the present transplantation study provides evidence that gut microbiota from fat-1 mice account for the protective effects observed in diet-induced obesity and associated metabolic disorders. This main finding provides strong evidence that modulation of the microbiota by ω 3 PUFAs may improve the metabolic profile in obese individuals and that the microbiome would be a transmissible trait of a lean phenotype. Although future studies are required to decipher the molecular mechanisms involved, fecal microbiota profiling may become a relevant and usable means to evaluate the positive effect of ω 3 PUFAs in individualized medicine.

Acknowledgments. The authors thank Amandine Bataille (University of Bourgogne Franche-Comté), Amandine Chlémaire (University of Bourgogne Franche-Comté), Elise Lalarme (Institut National de la Recherche Agronomique, Dijon), Loïc Roblet (University of Bourgogne Franche-Comté), and Chad Stroud (University of Bourgogne Franche-Comté) for technical assistance. The authors thank Dr. John Seubert (University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada) and Philip Bastable (University Hospital of Dijon, Dijon, France) for manuscript editing and Stéphane Garnier (University of Bourgogne Franche-Comté) for his expertise in statistics analysis.

Funding. This work was supported by INSERM, the Regional Council of Bourgogne, the European Regional Development Fund, the University of Bourgogne, the Fondation de France, a CIFRE grant from Valorex (Combourtillé,

France), and a French government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d’Avenir” with reference ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC LabEx. P.D.C. is research associate at FRS-FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique) and supported by the FRFS-WELBIO under grant WELBIO-CGR-2017-C-02 funds Baillet Labour (grant for Medical Research 2015). P.D.C. is a recipient of an ERC Starting grant.

Duality of Interest. No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

Author Contributions. C.B. and Q.E. performed experiments. S.B. and L.L. analyzed data and wrote the manuscript. A.S. analyzed microbiota data and wrote the manuscript. M.G., A.G., A.B., D.D., and B.M. performed experiments. P.D.C. advised on the experimental design for intestinal studies. M.N. designed research, analyzed data, and wrote the manuscript. J.B. designed research, researched and analyzed data, and wrote the manuscript. C.B., M.N., and J.B. are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

References

- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444:860–867
- Hornig T, Hotamisligil GS. Linking the inflammasome to obesity-related disease. *Nat Med* 2011;17:164–165
- Canl PD, Bibiloni R, Knäuf 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
- Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E740–E747
- Canl PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1761–1772
- Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance [retracted in: *Diabetes* 2016;65:1126–1127]. *Diabetes* 2007;56:1986–1998
- 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
- 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
- Liu Y, Chen F, Odle J, et al. Fish oil enhances intestinal integrity and inhibits TLR4 and NOD2 signaling pathways in weaned pigs after LPS challenge. *J Nutr* 2012;142:2017–2024
- Ghosh S, DeCoffe D, Brown K, et al. Fish oil attenuates omega-6 polyunsaturated fatty acid-induced dysbiosis and infectious colitis but impairs LPS dephosphorylation activity causing sepsis. *PLoS One* 2013;8:e55468
- Yu HN, Zhu J, Pan WS, Shen SR, Shan WG, Das UN. Effects of fish oil with a high content of n-3 polyunsaturated fatty acids on mouse gut microbiota. *Arch Med Res* 2014;45:195–202
- Mujico JR, Baccan GC, Gheorghe A, Diaz LE, Marcos A. Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. *Br J Nutr* 2013;110:711–720
- Jayasinghe TN, Chiavaroli V, Holland DJ, Cutfield WS, O’Sullivan JM. The new era of treatment for obesity and metabolic disorders: evidence and expectations for gut microbiome transplantation. *Front Cell Infect Microbiol* 2016;6:15
- Kang JX, Wang J, Wu L, Kang ZB. Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature* 2004;427:504
- Kaliannan K, Wang B, Li XY, Kim KJ, Kang JX. A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. *Sci Rep* 2015;5:11276
- Fèvre C, Bellenger S, Pierre AS, et al. The metabolic cascade leading to eicosanoid precursors—desaturases, elongases, and phospholipases A2—is altered in Zucker fatty rats. *Biochim Biophys Acta* 2011;1811:409–417
- Dardevet D, Sornet C, Attaix D, Baracos VE, Grizard J. Insulin-like growth factor-1 and insulin resistance in skeletal muscles of adult and old rats. *Endocrinology* 1994;134:1475–1484
- Zou Z, Bellenger S, Massey KA, et al. Inhibition of the HER2 pathway by n-3 polyunsaturated fatty acids prevents breast cancer in fat-1 transgenic mice. *J Lipid Res* 2013;54:3453–3463
- Bellenger J, Bellenger S, Bataille A, et al. High pancreatic n-3 fatty acids prevent STZ-induced diabetes in fat-1 mice: inflammatory pathway inhibition. *Diabetes* 2011;60:1090–1099
- Pais de Barros JP, Gautier T, Sali W, et al. Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amoebocyte lysate assay. *J Lipid Res* 2015;56:1363–1369
- Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:5112–5120
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010;7:335–336
- Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 2010;26:2460–2461
- Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 2010;26:266–267
- Myers-Morales T, Russell KM, D’Orazio SE. Fecal transplantation does not transfer either susceptibility or resistance to food borne listeriosis in C57BL/6 and BALB/c/By mice. *F1000 Res* 2013;2:177
- Stecher B, Robbiani R, Walker AW, et al. Salmonella enterica serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007;5:2177–2189
- Li J, Li FR, Wei D, et al. Endogenous ω -3 polyunsaturated fatty acid production confers resistance to obesity, dyslipidemia, and diabetes in mice. *Mol Endocrinol* 2014;28:1316–1328
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365:1415–1428
- Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* 2007;132:2087–2102
- Jacobs M, van Greevenbroek MM, van der Kallen CJ, et al. The association between the metabolic syndrome and alanine amino transferase is mediated by insulin resistance via related metabolic intermediates (the Cohort on Diabetes and Atherosclerosis Maastricht [CODAM] study). *Metabolism* 2011;60:969–975
- Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr Mol Med* 2009;9:299–314
- Wang Q, Fang CH, Hasselgren PO. Intestinal permeability is reduced and IL-10 levels are increased in septic IL-6 knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281:R1013–R1023
- Padmanabhan P, Grosse J, Asad AB, Radda GK, Golay X. Gastrointestinal transit measurements in mice with ^{99m}Tc-DTPA-labeled activated charcoal using NanoSPECT-CT. *EJNMMI Res* 2013;3:60
- Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr Rev* 2010;68:280–289
- Mani V, Hollis JH, Gabler NK. Dietary oil composition differentially modulates intestinal endotoxin transport and postprandial endotoxemia. *Nutr Metab (Lond)* 2013;10:6
- Kim EH, Bae JS, Hahm KB, Cha JY. Endogenously synthesized n-3 polyunsaturated fatty acids in fat-1 mice ameliorate high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Biochem Pharmacol* 2012;84:1359–1365
- White PJ, Arita M, Taguchi R, Kang JX, Marette A. Transgenic restoration of long-chain n-3 fatty acids in insulin target tissues improves resolution capacity and alleviates obesity-linked inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. *Diabetes* 2010;59:3066–3073

38. White PJ, St-Pierre P, Charbonneau A, et al. Protectin DX alleviates insulin resistance by activating a myokine-liver glucoregulatory axis. *Nat Med* 2014;20:664–669
39. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005;115:1111–1119
40. Cani 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;58:1091–1103
41. Brun P, Castaglini I, Di Leo V, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G518–G525
42. Li Q, Zhang Q, Wang M, Zhao S, Xu G, Li J. n-3 polyunsaturated fatty acids prevent disruption of epithelial barrier function induced by proinflammatory cytokines. *Mol Immunol* 2008;45:1356–1365
43. Willemsen LE, Koetsier MA, Balvers M, Beermann C, Stahl B, van Tol EA. Polyunsaturated fatty acids support epithelial barrier integrity and reduce IL-4 mediated permeability in vitro. *Eur J Nutr* 2008;47:183–191
44. Roig-Pérez S, Guardiola F, Moretó M, Ferrer R. Lipid peroxidation induced by DHA enrichment modifies paracellular permeability in Caco-2 cells: protective role of taurine. *J Lipid Res* 2004;45:1418–1428
45. Bäckhed 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;101:15718–15723
46. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JL. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006;444:1027–1031
47. Cani PD, Neyrinck AM, Maton N, Delzenne NM. Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like peptide-1. *Obes Res* 2005;13:1000–1007
48. Dao MC, Everard A, Aron-Wisniewsky J, et al.; MICRO-Obes Consortium. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* 2016;65:426–436
49. Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:9066–9071
50. Belzer C, de Vos WM. Microbes inside—from diversity to function: the case of *Akkermansia*. *ISME J* 2012;6:1449–1458
51. Plovier H, Everard A, Druart C, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* 2017;23:107–113
52. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, et al. Intestinal permeability—a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol* 2014;14:189
53. Suzuki TA, Nachman MW. Spatial heterogeneity of gut microbial composition along the gastrointestinal tract in natural populations of house mice. *PLoS One* 2016;11:e0163720
54. Ekmekci I, von Klitzing E, Fiebig U, et al. Immune responses to broad-spectrum antibiotic treatment and fecal microbiota transplantation in mice. *Front Immunol* 2017;8:397
55. Ekmekci I, von Klitzing E, Neumann C, et al. Fecal microbiota transplantation, commensal *Escherichia coli* and *Lactobacillus johnsonii* strains differentially restore intestinal and systemic adaptive immune cell populations following broad-spectrum antibiotic treatment. *Front Microbiol* 2017;8:2430
56. Burrello C, Garavaglia F, Cribiù FM, et al. Short-term oral antibiotics treatment promotes inflammatory activation of colonic invariant natural killer T and conventional CD4⁺ T cells. *Front Med (Lausanne)* 2018;5:21

III. Article 2

Biochimie 159 (2019) 66–71



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi



Mini-review

N-3 polyunsaturated fatty acids: An innovative strategy against obesity and related metabolic disorders, intestinal alteration and gut microbiota dysbiosis

Jérôme Bellenger^{a, b, c, *}, Sandrine Bellenger^{a, b, c}, Quentin Escoula^{a, b, c, d}, Célia Bidu^{a, b, c}, Michel Narce^{a, b, c, **}

^a Université de Bourgogne Franche-Comté, UFR Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement, Lipides Nutrition Cancer UMR UMR1231, 6 Boulevard Gabriel, 21000, Dijon, France

^b INSERM, Lipides Nutrition Cancer UMR1231, 21000, Dijon, France

^c LipSTIC LabEx, Fondation de Coopération Scientifique Bourgogne-Franche Comté, 21000, Dijon, France

^d Valorex, La Messayais, 35210, Combourtillé, France



ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 December 2018

Accepted 22 January 2019

Available online 25 January 2019

Keywords:

Dietary obesity

Glucose intolerance

n-3 fatty acids

Metabolic endotoxemia

Microbiota transplantation

ABSTRACT

Obesity is now widely recognized to be associated with low-grade systemic inflammation. It has been shown that high-fat feeding modulates gut microbiota which strongly increased intestinal permeability leading to lipopolysaccharide absorption causing metabolic endotoxemia that triggers inflammation and metabolic disorders. N-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) have been shown associated with anti-obesity properties, but results still remain heterogeneous and very few studies underlined the metabolic pathways involved. Thus, the use of Fat-1 transgenic mice allows to better understanding whether endogenous n-3 PUFAs enrichment contributes to obesity and associated metabolic disorders prevention. It specially evidence that such effects occur through modulations of gut microbiota and intestinal permeability. Then, by remodeling gut microbiota, endogenous n-3 PUFAs improve HF/HS-diet induced features of the metabolic syndrome which in turn affects host metabolism. Thus, increasing anti-obesogenic microbial species in the gut microbiota population (*i.e. Akkermansia*) by appropriate n-3 PUFAs may represent a promising strategy to control or prevent metabolic diseases.

© 2019 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Obesity, defined as an abnormal or excessive fat accumulation, is now recognized as an international public health concern. Indeed, in the world, more than 2.1 billion people have a body mass index (BMI) ≥ 25.0 and ≥ 30.0 in more than half a billion of them with no distinction of age or sex. Although obesity is considered as a multifactorial pathology (genetic predisposition, environmental impact, lack of physical activity ...), the leading cause of obesity

development is the rising consumption of high-fat/high-sucrose (HF/HS) diets –especially in western countries – and efforts still need to be done to identify factors that would prevent or cure this pathology. Obesity is also associated with increased risk of developing a wide cluster of alterations such as insulin resistance (IR), dyslipidemia, hypertension, diabetes known to be the main components of the metabolic syndrome [1] and of non-alcoholic fatty liver diseases [2].

2. Obesity and low grade inflammation: role of LPS

Nowadays, obesity is linked to low-grade systemic inflammation which is identified as a key factor of its development and of related metabolic disorders [3–5], even if the molecular origin of such inflammation is not fully elucidated. Cani and co-workers [6] have identified major bacterial components, lipopolysaccharides (LPS), mainly found in the outer membrane of Gram-negative bacteria, as a triggering factor of metabolic endotoxemia when it

* Corresponding author. Université de Bourgogne Franche-Comté, UFR Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement, Lipides Nutrition Cancer UMR UMR1231, 6 Boulevard Gabriel, F-21000, Dijon, France.

** Corresponding author. Université de Bourgogne Franche-Comté, UFR Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement, Lipides Nutrition Cancer UMR UMR1231, 6 Boulevard Gabriel, F-21000, Dijon, France.

E-mail addresses: jerome.bellenger@u-bourgogne.fr (J. Bellenger), michel.narce@u-bourgogne.fr (M. Narce).

translocates in the bloodstream, which has been associated with an increased risk of obesity and clinical diabetes [7]. A rising of concentration of LPS in plasma and both diet-induced metabolic endotoxemia have been shown to be linked to high fat and high energy diets coupled with enhanced Toll-like receptor (TLR) 4 and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) expressions [6].

Even if the increased level of LPS in plasma is not fully understood, it is closely correlated with an imbalance in bacterial composition (mainly Bacterioides/Firmicutes ratio and defined as intestinal microbiota dysbiosis) during high-fat (HF) feeding in mice [8] and human [9]. Moreover, it has been shown that the gut bacteria changes after HF diet strongly increased gut permeability [10] by downregulating genes encoding for the tight junctions zonula-occludens 1 (ZO-1) and occludin [6]. Next, LPS promotes lipid storage in liver and adipose tissue, triggers inflammatory cytokine expression and causes insulin resistance [8]. Mice invalidated for TLR4 have been shown to be resistant to HF diet-induced inflammation, obesity, and insulin resistance [11]. Moreover, mice invalidated for CD (Cluster of Differentiation) 14 gene (a TLR4 co-receptor) are resistant to the development of LPS-induced inflammation, compared with wild-type (WT) mice [8]. These data suggest a major role of LPS in the pathogenesis of metabolic syndrome.

3. N-3 polyunsaturated fatty acids, obesity and related disorders

In this last decade, many studies both in animal and human have focused on the cardioprotective effects of fish oils. Increasing the feeding of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) represents a promising approach [12] against obesity-associated diseases. Thus, the physiological functions and molecular actions of these unsaturated fatty acids have been investigated in the context of obesity, and thanks to their functional properties they could be considered useful to fight metabolic syndrome in obese animal models. Indeed, administration of marine oils containing n-3 PUFAs in the context of obesity and linked disorders has been reported to improve both glucose [13–16], and lipid metabolism [17,18], and to alleviate liver lipid storage by downregulating lipogenic genes. Interestingly, these beneficial effects of n-3 PUFAs have been associated with reduced adipose inflammation [15,19,20], increased expression and secretion of adiponectin – an insulin sensitizing adipokine – [21] raised adipose mitochondrial activity [22], and inhibition of the remodeling of adipose tissue induced by a HF diet [23]. Furthermore, beneficial effects of n-3 PUFAs on metabolic syndrome and obesity mitigation could be due to their impact on the regulation of transcriptional factors in liver and adipose tissue [19]: among those, n-3 PUFAs, potential endogenous ligands for the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) family nuclear receptors, play a crucial role in adipocyte differentiation and lipid metabolism [21,24].

In addition, nutrigenomic approaches have shown cardioprotective effects of n-3 PUFAs mediated by a decrease of inflammatory markers, an enhanced synthesis of proresolving lipid mediators and a modulation of genes involved in fatty acid synthesis and oxidation [25]. Then, it has been recently shown that feeding eicosapentaenoic acid (EPA) enhances the hepatic content of resolvin (Rv) E1, RvE2, RvD1 and RvD2 in mice fed HF diets, leading to reduction of high-fat diet-induced liver proinflammatory state [26]. In addition, other n-3 PUFA-derived mediators (as protectins and maresins) are also known to be specialized lipid mediators able to dampen inflammation [27] in the context of dietary obesity. Moreover, a recent study demonstrated that administration of protectin D1 (PD1) to obese diabetic *db/db* mice markedly improved their insulin sensitivity [28].

Nevertheless, studies regarding the effects of n-3 PUFAs on

obesity remain controversial: some of them argue that these FA are able to significantly decrease body weight and fat mass [29–31] whereas others did not evidence any significant effect on body weight loss even if adipose fat accumulation decreased in n-3-fed animals [32,33]. More recently, it has been demonstrated that the replacement of lard by fish oil in high-fat diet alleviates systemic and tissue inflammation [34]. In addition, the authors have shown that n-3 PUFAs increased mitochondrial fatty acid oxidation leading to a lower liver lipid accumulation [35]. Nevertheless, very recent meta-analyses did not evidence any positive effects of n-3 [36].

4. N-3 PUFAs, intestinal permeability and microbiota in the context of obesity

Dietary n-3 PUFAs, affecting gut integrity, have been shown to reduce clinical colitis and colonic immunopathology by improving epithelial barrier function in animal models [37,38]. EPA has been shown to up-regulate the expression of tight junctions and to increase the trans-epithelial electrical resistance (TER), thus reducing the permeability of the endothelial cells [39]. EPA and DHA, by lowering permeability-induced inflammatory cytokines such as TNF α , IFN γ and IL-4, can maintain gut barrier integrity [40,41]. In agreement, it has been shown that, following intravenous injections of *E. coli* LPS to animal models, dietary DHA supplementation significantly enhanced the expression of intestinal tight junctions as occludin and claudin-1 and decreased intestinal expression of TLR4 [42]. Very few studies assessed the impact of n-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. Nevertheless, Mani and co-workers [43] have shown in pigs that post-prandial endotoxemia was decreased by fish oil supplementation when it was increased by coconut oil (rich in saturated fatty acids). Recently, enhanced levels of metabolic endotoxemia and systemic low-grade inflammation were observed in high n-6 PUFA-fed mice, whereas these parameters are drastically reduced in transgenic mice able to convert n-6 to n-3 PUFAs in their tissues [44].

It has been recently suggested that n-3 PUFAs may influence the content of gut microbiota [45–47] when another study showed no prevention of gut microbiota dysbiosis in EPA- and DHA-treated mice [48]. N-3 PUFAs, brought by diet, are able to attenuate the decrease of the Bacterioides/Firmicutes ratio observed in high fat-fed mice [46]. These results agree with dietary experimentation conducted by Andersen et al. who reported that, compared with sunflower oil, dietary intake of fish oil impacted most of bacterial phyla [49]. Moreover, Yu et al. showed that fish oil is capable of producing significant changes in gut microbiota, especially suppression of Helicobacter and Firmicutes growth [47], known to be highly involved in the etiology of peptic ulcer disease and obesity respectively. Finally, a just recently published paper showed that a host-microbiome relationship mediates the opposing effects of n-6 and n-3 FA on metabolic endotoxemia [44].

A large amount of interest has been generated these last years by the bacterium *Akkermansia muciniphila*, a highly represented species in human gastrointestinal tract with 5% of the total bacteria in basal conditions. Interestingly, besides the fact that *Akkermansia* uses mucins, it seems to be crucial for the maintenance of mucus layer integrity [49,50]. Increased intestinal abundance of *Akkermansia* can protect against obesity-linked metabolic syndrome, and reduce (brought as a probiotic) systemic LPS levels in high-fat-fed mice [50–53]. Possibly, it occurs through mucus layer thickness prevention, and then reduction of gut permeability and LPS leakage [50]. Moreover, in a study on the effects of a polyphenol-rich cranberry extract, Anhê et al. showed that the putative effects of *Akkermansia* on dysbiosis induced by obesity arises with no major changes in the proportions of Firmicutes and Bacteroidetes [51]. The mechanism by which *Akkermansia* could protect against

obesity is not fully elucidated, but recent data indicate that a membrane protein from *Akkermansia muciniphila* (Amuc_1100*) – more than the bacteria by itself – could be involved in the protective effects. This hypothesis has been reinforced by the fact that data obtained with pasteurized bacteria have shown similar effects [54]. Collectively, these data indicate that modulation of intestinal tight-junction barrier by n-3 PUFAs remains not fully understood and the means by which n-3 PUFAs are able to reduce LPS-induced permeability still needs to be evaluated and more particularly under diet-induced obesity (DIO) conditions. In addition, the complexity to point out the specific effects of n-3 PUFAs per se is reinforced by many potential confounding factors provided by the dietary procedures.

5. The fat-1 mice: an appropriate model for studying obesity

In obesity-related studies, fat-1 mice represent an innovative animal model that overcomes the use of dietary manipulation helpful for avoiding any confounding dietary elements brought by diets. Indeed, these transgenic mice ubiquitously express a gene coming from *C. Elegans*, which encodes for a n-3 fatty acid desaturase able to convert n-6 to n-3 PUFAs [55] leading to a remarkable tissue enrichment in n-3 PUFAs compared with WT. Moreover, in this mouse model, tissue contents in n-3 PUFAs not only increase but the levels of excessive endogenous n-6 PUFAs also decrease resulting in a balanced n-6-to-n-3 ratio [56]. This endogenous synthesis of n-3 PUFAs allows getting away from the use of dietary intervention introducing potential confounding factors and is more effective in balancing the n-6-to-n-3 ratio. This n-3 PUFA enrichment is ideal for identifying their specific roles and addressing nutrient-gene interactions. Then, this mouse model represents a

useful in vivo system for giving new insights of the role of the n-6-to-n-3 fatty acid ratio in the context of obesity and associated metabolic disorders.

We recently took advantage of this model to answer the following questions: does n-3 fatty acids tissue enrichment prevent obesity and associated metabolic disorders? Does such prevention occur through alleviation of intestinal permeability (tight junction protein expression, gut permeability) and metabolic endotoxemia, in association with gut microbiota remodeling?

6. Remodeling gut microbiota by endogenously synthesized n-3 fatty acids prevents high fat/high sucrose diet-induced metabolic endotoxemia and associated metabolic disorders

In the context of obesity, remodeling the gut microbiome could be a promising therapeutic target. Then, it has recently been pointed out in mice the relative contribution of endogenously synthesized n-3 PUFAs in altering gut microbiota in order to change metabolic parameters [28,57].

6.1. Fat-1 mice were protected against obesity, glucose intolerance, and hepatic steatosis

Homozygous fat-1 transgenic mice have been shown totally protected against HF/HS diet-induced obesity (DIO), glucose intolerance and severe hepatic steatosis occurring in obesogenic diet-fed mice (Fig. 1). Moreover, in accordance with such a liver steatosis prevention, the mRNA liver expressions of FATCD36 (a fatty acid transport protein) and PPAR γ (an adipogenic marker) were not altered as usually observed in DIO [57]. These data extend those of Li et al. [28] and Kim et al. [58], who showed that fat-1 gene

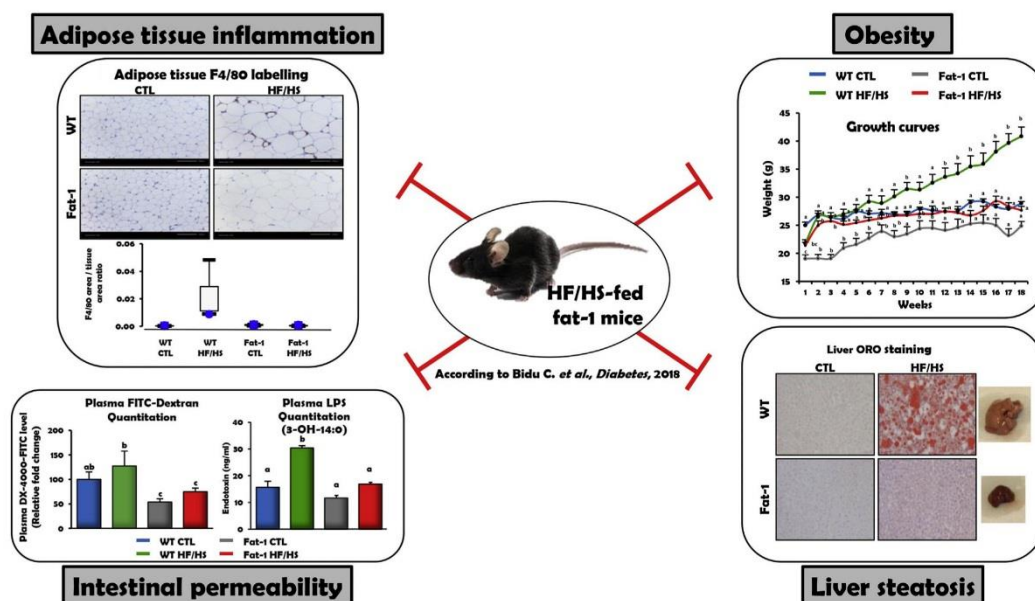


Fig. 1. Fat-1 transgenic mice maintain a lean phenotype when fed an HF/HS diet. The increase of endogenously synthesized n-3 PUFAs in their tissues protects fat-1 mice against obesity induced by high-fat/high-sucrose diet. Moreover, these mice are also protected against liver steatosis and adipose tissue inflammation. Compared with wild-type mice, fat-1 mice fed a HF/HS diet maintained gut epithelium permeability and then exhibit a lower plasma LPS level.

expression provided protection against hypercholesterolemia and hepatic steatosis when mice are fed a high-fat diet. The homozygous status has been revealed essential for obesity protection, as if fat-1 heterozygous mice were protected against obesity-linked inflammation and insulin resistance and exhibited amelioration of non-alcoholic fatty liver disease, no change was observed in their body weight compared to WT mice under DIO [15].

The protection of fat-1 mice against metabolic disorders associated to obesity might be related to the release of anti-inflammatory n-3 PUFAs mediators, as shown by White et al. [15] who pointed out an increase of docosanoid biosynthesis, i.e. the pro-resolving lipid mediator, PD1 (10R,17S-dihydroxydocosa-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-hexaenoic acid) in DIO.

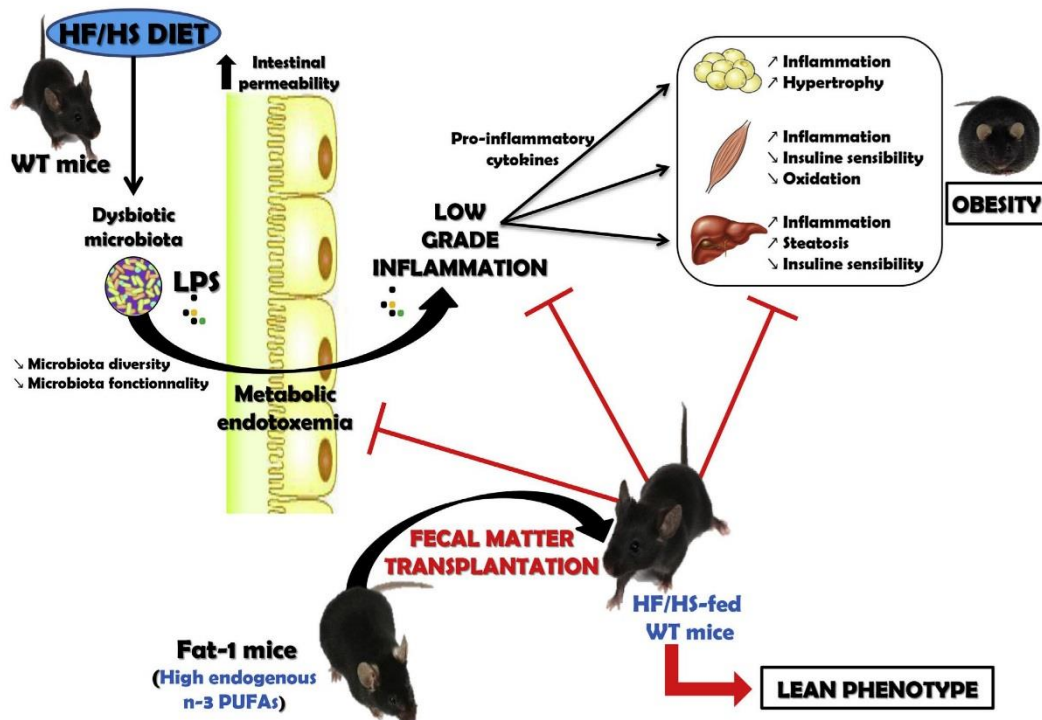
6.2. Unlike WT mice, fat-1 mice maintained a normal barrier function and exhibited a significantly lower metabolic endotoxemia

Low-grade systemic inflammation is now recognized as a crucial factor underlying obesity and type-2 diabetes [59] where significant alterations in the intestinal barrier take place [8,60,61]. Until now, very few *in vivo* studies have investigated the effects of n-3 PUFAs on intestinal permeability and metabolic endotoxemia

[42,43]. A recent study showed high levels of metabolic endotoxemia and systemic low-grade inflammation in WT mice fed a diet high in n-6 FA, whereas endotoxemic and inflammatory status were alleviated in fat-1 mice [44]. We have also reported [57] that fat-1 mice exhibited a decrease of intestinal permeability and metabolic endotoxemia compared with WT mice (Fig. 1).

6.3. Transplantation of fat-1 microbiota to HF/HS-fed wild-type animals decreases metabolic syndrome disorders and maintains gut barrier integrity

The use of reciprocal microbiota transplantation represents an appropriate approach to validate the fact that n-3 PUFA-enrichment in fat-1 mice impacts their gut microbiota by enhancing the proliferation of beneficial bacteria leading to DIO and associated disorders prevention. The transfer of fat-1 fecal microbiota to WT mice was able to strikingly prevent obesity induced by a HF/HS diet and to regularize glucose tolerance and intestinal permeability [57], evidencing that a lean phenotype can be transferred from fat-1 to WT mice and is probably mediated by changes of gut microbiota by n-3 PUFAs (Fig. 2).



According to Bidu C. et al., Diabetes, 2018

Fig. 2. Fecal transplantation of the n-3-modified microbiome as a relevant way to preserve a lean phenotype in mice fed the HF/HS diet. High fat/high sucrose diet is known to be associated with gut microbiota dysbiosis and to lead to increased intestinal paracellular permeability. These alterations will allow the leakage of microbial products (LPS) into the systemic circulation (named as metabolic endotoxemia) resulting in a low-grade systemic inflammation, considered as an important component of the evolution of obesity. The transfer of fat-1 fecal microbiota to WT mice strikingly prevented metabolic endotoxemia and subsequent low-grade inflammation as well as obesity and associated metabolic disorders. Then, preventing a "dysbiotic" microbiota by n-3 PUFAs affects host metabolism and therefore potentially offers an interesting target for therapeutic intervention.

7. Conclusions and future prospects

Altogether, these data evidence that n-3 PUFAs represent a promising approach in the prevention and treatment of obesity and associated disorders. Indeed, by the use of transgenic fat-1 mice avoiding nutritional confounding factors, tissue n-3 PUFAs enrichment indisputably demonstrates that these functional fatty acids prevent weight gain, glucose intolerance, liver steatosis inflammation and leaky gut. Moreover such tissue enrichment unexpectedly change gut microbiota composition (a peculiar increase of Akkermansia) in favor of a lean phenotype. Remarkably, transplanting gut microbes from fat-1 mice into WT replicated this protection against DIO and linked metabolic disorders, unequivocally showing that n-3 PUFAs impact intestinal microbiota that will consequently influence host metabolism.

Although more studies are required to decipher the role of other intestinal components implicated in gut barrier integrity (*i.e.* colonic mucus layer) and the molecular mechanisms involved. Fecal microbiota characterization of obese patients may become a relevant and usable means to evaluate the positive effect of n-3 PUFAs in individualized medicine.

Acknowledgement

This work was supported by INSERM, the Regional Council of Bourgogne, the European Regional Development Fund, the University of Bourgogne, the Fondation de France, a CIFRE grant from Valorex (Combourtillière, France), and a French government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d’Avenir” with reference ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC LabEx.

References

- [1] R. Kahn, Metabolic syndrome—what is the clinical usefulness? *Lancet* 371 (9628) (2008) 1892–1893.
- [2] B.N. Finck, Targeting metabolism, insulin resistance, and diabetes to treat nonalcoholic steatohepatitis, *Diabetes* 67 (12) (2018) 2485–2493.
- [3] G.S. Hotamisligil, Inflammation and metabolic disorders, *Nature* 444 (7121) (2006) 860–867.
- [4] T. Horng, G.S. Hotamisligil, Linking the inflammasome to obesity-related disease, *Nat. Med.* 17 (2) (2011) 164–165.
- [5] J.M. Olefsky, C.K. Glass, Macrophages, inflammation, and insulin resistance, *Annu. Rev. Physiol.* 72 (2010) 219–246.
- [6] P.D. Cani, et al., Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice, *Diabetes* 57 (6) (2008) 1470–1481.
- [7] S.J. Creely, et al., Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292 (3) (2007) E740–E747.
- [8] P.D. Cani, et al., Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance, *Diabetes* 56 (7) (2007) 1761–1772.
- [9] J. Amar, et al., Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men, *Am. J. Clin. Nutr.* 87 (5) (2008) 1219–1223.
- [10] T.F. Teixeira, M.C. Collado, C.L. Ferreira, J. Bressan, C. Peluzio Mdo, Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability, *Nutr. Res. (N.Y.)* 32 (9) (2012) 637–647.
- [11] D.M. Tsukumo, et al., Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance, *Diabetes* 56 (8) (2007) 1986–1998.
- [12] P.J. White, A. Marette, Potential role of omega-3-derived resolution mediators in metabolic inflammation, *Immunol. Cell Biol.* 92 (4) (2014) 324–330.
- [13] S.O. Ebbesson, P.M. Risica, L.O. Ebbesson, J.M. Kennish, M.E. Tejero, Omega-3 fatty acids improve glucose tolerance and components of the metabolic syndrome in Alaskan Eskimos: the Alaska Siberia project, *Int. J. Circumpolar Health* 64 (4) (2005) 396–408.
- [14] C. Popp-Snijders, J.A. Schouten, R.J. Heine, J. van der Meer, E.A. van der Veen, Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids improves insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetes, *Diabetes Res.* 4 (3) (1987) 141–147.
- [15] P.J. White, M. Arita, R. Taguchi, J.X. Kang, A. Marette, Transgenic restoration of long-chain n-3 fatty acids in insulin target tissues improves resolution capacity and alleviates obesity-linked inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice, *Diabetes* 59 (12) (2010) 3066–3073.
- [16] P.J. White, et al., Transgenic omega-3 PUFA enrichment alters morphology and gene expression profile in adipose tissue of obese mice: potential role for protectins, *Metab. Clin. Exp.* 64 (6) (2015) 666–676.
- [17] J. Lu, et al., Chronic dietary n-3 PUFA intervention improves dyslipidaemia and subsequent cardiovascular complications in the JCR:LA-cp rat model of the metabolic syndrome, *Br. J. Nutr.* 105 (11) (2011) 1572–1582.
- [18] L.M. Neff, et al., Algal docosahexaenoic acid affects plasma lipoprotein particle size distribution in overweight and obese adults, *J. Nutr.* 141 (2) (2011) 207–213.
- [19] D.Y. Oh, et al., GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects, *Cell* 142 (5) (2010) 687–698.
- [20] J. Todoric, et al., Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids, *Diabetologia* 49 (9) (2006) 2109–2119.
- [21] S. Neschen, et al., Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent mechanism in mice, *Diabetes* 55 (4) (2006) 924–928.
- [22] P. Flachs, et al., Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat, *Diabetologia* 48 (11) (2005) 2365–2375.
- [23] J. Huber, et al., Prevention of high-fat diet-induced adipose tissue remodeling in obese diabetic mice by n-3 polyunsaturated fatty acids, *Int. J. Obes.* 31 (6) (2007) 1004–1013 (2005).
- [24] B.M. Forman, J. Chen, R.M. Evans, Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94 (9) (1997) 4312–4317.
- [25] M.H. Davidson, Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids, *Am. J. Cardiol.* 98 (4a) (2006) 271–33i.
- [26] F. Echeverria, et al., Reduction of high-fat diet-induced liver proinflammatory state by eicosapentaenoic acid plus hydroxytyrosol supplementation: involvement of resolvins RvE1/2 and RvD1/2, *J. Nutr. Biochem.* 63 (2018) 35–43.
- [27] C.N. Serhan, N.A. Petasis, Resolvins and protectins in inflammation resolution, *Chem. Rev.* 111 (10) (2011) 5922–5943.
- [28] J. Li, et al., Endogenous omega-3 polyunsaturated fatty acid production confers resistance to obesity, dyslipidemia, and diabetes in mice, *Mol. Endocrinol.* 28 (8) (2014) 1316–1328.
- [29] F. Kasbi Chadli, et al., n-3 PUFA prevent metabolic disturbances associated with obesity and improve endothelial function in golden Syrian hamsters fed with a high-fat diet, *Br. J. Nutr.* 107 (9) (2012) 1305–1315.
- [30] C. Bertrand, et al., Effects of dietary eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation in high-fat fed mice on lipid metabolism and apelin/APJ system in skeletal muscle, *PLoS One* 8 (11) (2013), e78874.
- [31] A. Sato, et al., Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis, *Diabetes* 59 (10) (2010) 2495–2504.
- [32] O. Kuda, et al., n-3 fatty acids and rosiglitazone improve insulin sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice fed a high-fat diet, *Diabetologia* 52 (5) (2009) 941–951.
- [33] P. Perez-Matute, N. Perez-Echarri, J.A. Martinez, A. Marti, M.J. Moreno-Aliaga, Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha, *Br. J. Nutr.* 97 (2) (2007) 389–398.
- [34] L. Lionetti, et al., Differential effects of high-fish oil and high-lard diets on cells and cytokines involved in the inflammatory process in rat insulin-sensitive tissues, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2) (2014) 3040–3063.
- [35] L. Lionetti, et al., High-lard and high-fish-oil diets differ in their effects on function and dynamic behaviour of rat hepatic mitochondria, *PLoS One* 9 (3) (2014), e92753.
- [36] T. Aung, et al., Associations of omega-3 fatty acid supplement use with cardiovascular disease risks: meta-analysis of 10 trials involving 77917 individuals, *JAMA Cardiol.* 3 (3) (2018) 225–234.
- [37] C.V. Whiting, P.W. Bland, J.F. Tarrlton, Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids reduce disease and colonic proinflammatory cytokines in a mouse model of colitis, *Inflamm. Bowel Dis.* 11 (4) (2005) 340–349.
- [38] C.A. Hudert, et al., Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103 (30) (2006) 11276–11281.
- [39] W.G. Jiang, R.P. Bryce, D.F. Horrobin, R.E. Mansel, Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244 (2) (1998) 414–420.
- [40] Q. Li, et al., n-3 polyunsaturated fatty acids prevent disruption of epithelial barrier function induced by proinflammatory cytokines, *Mol. Immunol.* 45 (5) (2008) 1356–1365.
- [41] L.E. Willemsen, et al., Polyunsaturated fatty acids support epithelial barrier integrity and reduce IL-4 mediated permeability in vitro, *Eur. J. Nutr.* 47 (4) (2008) 183–191.
- [42] Y. Liu, et al., Fish oil enhances intestinal integrity and inhibits TLR4 and NOD2 signaling pathways in weaned pigs after LPS challenge, *J. Nutr.* 142 (11) (2012) 2017–2024.
- [43] V. Mani, J.H. Hollis, N.K. Gabler, Dietary oil composition differentially modulates intestinal endotoxin transport and postprandial endotoxemia, *Nutr. Metab.* 10 (1) (2013) 6.
- [44] K. Kaliannan, B. Wang, X.Y. Li, K.J. Kim, J.X. Kang, A host-microbiome

- interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia, *Sci. Rep.* 5 (2015) 11276.
- [45] S. Ghosh, et al., Fish oil attenuates omega-6 polyunsaturated fatty acid-induced dysbiosis and infectious colitis but impairs LPS dephosphorylation activity causing sepsis, *PLoS One* 8 (2) (2013), e55468.
- [46] T. Liu, H. Hougén, A.C. Vollmer, S.M. Hiebert, Gut bacteria profiles of *Mus musculus* at the phylum and family levels are influenced by saturation of dietary fatty acids, *Anaerobe* 18 (3) (2012) 331–337.
- [47] H.N. Yu, et al., Effects of fish oil with a high content of n-3 polyunsaturated fatty acids on mouse gut microbiota, *Arch. Med. Res.* 45 (3) (2014) 195–202.
- [48] J.R. Mujico, G.C. Bacan, A. Gheorghe, L.E. Diaz, A. Marcos, Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice, *Br. J. Nutr.* 110 (4) (2013) 711–720.
- [49] A.D. Andersen, L. Molbak, K.F. Michaelsen, L. Lauritzen, Molecular fingerprints of the human fecal microbiota from 9 to 18 months old and the effect of fish oil supplementation, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 53 (3) (2011) 303–309.
- [50] A. Everard, et al., Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (22) (2013) 9066–9071.
- [51] F.F. Anhe, et al., A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice, *Gut* 64 (6) (2015) 872–883.
- [52] N.R. Shin, et al., An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice, *Gut* 63 (5) (2014) 727–735.
- [53] D.E. Roopchand, et al., Dietary polyphenols promote growth of the gut bacterium *akkermansia muciniphila* and attenuate high-fat diet-induced metabolic syndrome, *Diabetes* 64 (8) (2015) 2847–2858.
- [54] H. Plovier, et al., A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice, *Nat. Med.* 23 (1) (2017) 107–113.
- [55] J.P. Spychalla, A.J. Kinney, J. Browse, Identification of an animal omega-3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (4) (1997) 1142–1147.
- [56] J.X. Kang, J. Wang, L. Wu, Z.B. Kang, Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids, *Nature* 427 (6974) (2004) 504.
- [57] C. Bidu, et al., The transplantation of omega3 PUFA-altered gut microbiota of fat-1 mice to wild-type littermates prevents obesity and associated metabolic disorders, *Diabetes* 67 (8) (2018) 1512–1523.
- [58] E.H. Kim, J.S. Bae, K.B. Hahm, J.Y. Cha, Endogenously synthesized n-3 polyunsaturated fatty acids in fat-1 mice ameliorate high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease, *Biochem. Pharmacol.* 84 (10) (2012) 1359–1365.
- [59] K.E. Wellen, G.S. Hotamisligil, Inflammation, stress, and diabetes, *J. Clin. Invest.* 115 (5) (2005) 1111–1119.
- [60] P.D. Cani, et al., Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability, *Gut* 58 (8) (2009) 1091–1103.
- [61] T.H. Frazier, J.K. DiBaise, C.J. McClain, Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury, *J. Parenter. Enteral Nutr.* 35 (5 Suppl) (2011) 14s–20s.

IV. Conclusion

Pour résumer, nous avons montré dans ces travaux qu'un enrichissement tissulaire en oméga 3 permettait non seulement de prévenir les altérations métaboliques et intestinales induites par un régime obésogène mais également de prévenir la dysbiose du microbiote intestinal associée. De plus, nous avons montré que le microbiote de souris fat-1, indépendamment d'un environnement enrichi en oméga 3, était assez « fort » pour prévenir ces altérations lorsqu'il est transplanté dans une souris sauvage. Ces différents résultats présentent ainsi les oméga 3 comme une piste thérapeutique prometteuse, d'une part pour prévenir la dysbiose intestinale induite par un régime obésogène mais également pour prévenir les altérations métaboliques et intestinales induites.

Ces résultats, avec d'autres issus de la littérature scientifique, nous ont également permis d'élaborer la revue scientifique ci-dessus résumant les effets préventifs des oméga 3 contre les altérations métaboliques, intestinales ainsi que contre la dysbiose du microbiote intestinal induite par l'obésité.

Chapitre 3 : Mécanismes

moléculaires impliqués dans la

prévention de l'altération de

sécrétion de MUC2, par le DHA et

l'EPA, induit par l'acide palmitique

dans le modèle cellulaire LS174T.

I. Introduction

Dans ce projet, nous avons voulu comprendre et identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la prévention de l'altération de la couche de mucus colique lors d'un régime obésogène, chez les souris fat-1. Pour cela, nous avons utilisé le modèle cellulaire LS174T, cellules issues de cancer colorectal humain et sécrétrices de la mucine MUC2. Nous avons dans un premier temps, évalué l'impact de l'acide palmitique (acide gras saturé majoritaire des régimes obésogènes) sur la sécrétion de MUC2 ainsi que sur l'induction du stress du réticulum endoplasmique. Nous avons observé qu'un traitement à l'acide palmitique induisait une forte activation du stress du réticulum endoplasmique ainsi qu'une forte diminution de la sécrétion de MUC2 par les cellules LS174T. Pour déterminer l'implication ou non du stress du réticulum endoplasmique dans la perte de sécrétion de la mucine MUC2 par ces cellules, nous avons utilisé l'inhibiteur du stress du réticulum endoplasmique, le 4-phénylbutyrate (4-PBA) : le co-traitement de l'acide palmitique avec le 4-PBA permet de prévenir l'altération de sécrétion de MUC2 mettant en avant ici l'impact délétère direct du stress du réticulum endoplasmique sur la sécrétion de MUC2.

Les acides gras polyinsaturés en n-3 présentent de fortes propriétés anti-inflammatoires mais ont également été montrés comme capables de prévenir l'augmentation du stress du réticulum endoplasmique lors d'un stress nutritionnel (Woodworth-Hobbs et al., 2017). Nous avons donc évalué la capacité de différents acides gras à prévenir ce stress du réticulum endoplasmique induit par l'acide palmitique. Nous avons observé que seuls les acides docosahexaénoïque (DHA) et eicosapentaénoïque (EPA) sont capables de prévenir l'induction du stress du réticulum endoplasmique induit par l'acide palmitique. Les acides α -linoléique (ALA), linoléique (LA), oléique (OA) et arachidonique (ARA) n'ont pas montré d'effet préventif vis-à-vis du stress du réticulum endoplasmique.

Nous avons ensuite évalué la capacité de ces acides gras à prévenir l'altération de la sécrétion de MUC2 lors de co-traitements avec l'acide palmitique. Comme pour la prévention de l'induction du stress du réticulum endoplasmique, seuls le DHA et l'EPA sont capables de prévenir l'altération de sécrétion de MUC2 par l'acide palmitique et de maintenir une expression normale des gènes *MUC2* et *KLF4*.

II. Article 3



Article

Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic Acids Prevent Altered-Muc2 Secretion Induced by Palmitic Acid by Alleviating Endoplasmic Reticulum Stress in LS174T Goblet Cells

Quentin Escoula ^{1,2,3,4}, Sandrine Bellenger ^{1,2,3}, Michel Narce ^{1,2,3,*} and Jérôme Bellenger ^{1,2,3,*}

¹ University of Bourgogne Franche-Comté, UFR Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement, Lipides Nutrition Cancer UMR U1231, 6 Boulevard Gabriel, F-21000 Dijon, France; escoula@hotmail.fr (Q.E.); sandrine.bellenger@u-bourgogne.fr (S.B.)

² INSERM, Lipides Nutrition Cancer UMR1231, F-21000 Dijon, France

³ LipSTIC LabEx, Fondation de Coopération Scientifique Bourgogne-Franche Comté, F-21000 Dijon, France

⁴ Valorex, La Messayais, 35210 Combournillé, France

* Correspondence: michel.narce@u-bourgogne.fr (M.N.); jerome.bellenger@u-bourgogne.fr (J.B.); Tel.: +33-3-80-39-63-17 (M.N.); +33-3-80-39-38-57 (J.B.)

Received: 26 July 2019; Accepted: 8 September 2019; Published: 11 September 2019



Abstract: Diets high in saturated fatty acids (FA) represent a risk factor for the development of obesity and associated metabolic disorders, partly through their impact on the epithelial cell barrier integrity. We hypothesized that unsaturated FA could alleviate saturated FA-induced endoplasmic reticulum (ER) stress occurring in intestinal secretory goblet cells, and consequently the reduced synthesis and secretion of mucins that form the protective mucus barrier. To investigate this hypothesis, we treated well-differentiated human colonic LS174T goblet cells with palmitic acid (PAL)—the most commonly used inducer of lipotoxicity in *in vitro* systems—or *n*-9, *n*-6, or *n*-3 unsaturated fatty acids alone or in co-treatment with PAL, and measured the impact of such treatments on ER stress and Muc2 production. Our results showed that only eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids protect goblet cells against ER stress-mediated altered Muc2 secretion induced by PAL, whereas neither linolenic acid nor *n*-9 and *n*-6 FA are able to provide such protection. We conclude that EPA and DHA could represent potential therapeutic nutrients against the detrimental lipotoxicity of saturated fatty acids, associated with type 2 diabetes and obesity or inflammatory bowel disease. These *in vitro* data remain to be explored *in vivo* in a context of dietary obesity.

Keywords: palmitic acid; *n*-3 fatty acids; gastrointestinal barrier; intestinal goblet cells; endoplasmic reticulum stress; Muc2 secretion

1. Introduction

Obesity is a complex and multifactorial pathology that is linked to low-grade systemic inflammation, which is identified as a key factor in its development and of related metabolic disorders [1,2]. Systemic inflammation has been shown to be closely related to intestinal microbiota dysbiosis during high-fat (HF) feeding in both mice [3] and humans [4]. A strong increase of gut permeability [5,6] associated with systemic inflammation is partly attributed to the downregulation of genes encoding tight junctions, such as zonula-occludens 1 and occludin [6,7]. A dense mucus layer protects the underlying colonic epithelium against injuries from luminal bacteria and the external environment [8]. The major macromolecular component of this thick barrier is the glycoprotein Muc2, produced by the intestinal goblet cells [9]. Muc2 contains a protein core with cysteine-rich and highly

O-glycosylated domains requiring extensive post-translational modifications within the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi body [10].

The high complexity of the Muc2 protein and the strong secretory capacity of goblet cells make Muc2 susceptible to unfolding/misfolding, leading to ER stress [11]. ER stress is emerging as an important contributor to many chronic diseases, such as obesity and obesity-related metabolic disorders, including dyslipidemia and insulin resistance [12,13]. Indeed, studies in both cellular and mouse models [14], as well as obese individuals [15,16], have demonstrated increased fat mass resulting in chronic ER stress in liver and adipose tissues, leading to the development of insulin resistance and type 2 diabetes [17]. Mice fed an HF diet exhibited a significant reduction (−46%) in the intestinal mucus layer, reducing the ability to limit host cells from bacterial infection and resulting in increased colonic and systemic inflammation [18]. Mechanistically, this involves activation of the unfolded protein response (UPR), initiating ER stress in epithelial cells and reducing the transcription of proteins such as Muc2, as well as lowering the expression of the goblet cell differentiation factor KLF4 [11]. Similar phenomena have also been observed with ER stressors [19].

Moreover, prolonged ER stress activates the release of free fatty acids from adipocytes, which may contribute, in addition to a high level of saturated fatty acids (FA) brought by obesogenic diets, to lipotoxicity and insulin resistance [20]. Several mouse models, such as *Winnie*, *Eeyore*, and *Kenny*, exhibiting missense mutations in the Muc2 protein, illustrate the link between intestinal cell ER stress and intestinal inflammation [21–23]. Prolonged HF diets rich in saturated FA induce colonic epithelial cell ER stress and inflammation [11] and exacerbate mucosal tissue damage in mouse models of spontaneous colitis (Muc2^{−/−}, TNF^{ΔARE} mice) [24].

Results over the past decade from both animal and human studies have highlighted the protective effects of *n*-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on obesity and associated metabolic disorders. Thanks to their functional properties, they can be considered useful for fighting metabolic syndrome in obese animal models, since they are able to significantly decrease the body weight and fat mass [25–27] and improve glucose [28] and lipid metabolism [29]. Dietary *n*-3 PUFAs can notably maintain gut integrity by up-regulating the expression of tight junctions [6,30], improving the epithelial barrier function [31] and lowering permeability-induced inflammatory cytokines [32]. Moreover, alterations in gut microbiota represent an important factor contributing to the beneficial effects of *n*-3 PUFAs in reducing endotoxemia [6]. Importantly, fatty acids have differing effects on ER stress and subsequent inflammatory processes, for example, saturated FA (such as palmitic acid) induce ER stress [33–35], while *n*-3 PUFAs (such as docosahexaenoic acid) significantly decrease ER stress in different cellular models [36–38].

While numerous studies have reported the extensive beneficial effects of *n*-3 PUFAs in different conditions, to the best of our knowledge, the effects of *n*-3 PUFAs on palmitic acid-induced ER stress in relation to mucin production remain unknown. Therefore, using the well-differentiated human intestinal goblet LS174T cells secreting the mucin Muc2, the aim of the present study was to explore the effect of different unsaturated FAs (exhibiting various chain lengths and unsaturation degrees) to counteract palmitic acid-induced ER stress in colonic epithelial cells. Our data indicate that palmitic acid-altered Muc2 production is alleviated by eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in LS174T cells and that such regulation is partly mediated through ER stress downregulation.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

Modified Eagle's medium (MEM), trypsin, fetal bovine serum (FBS), glutamine, and antibiotics were purchased from Dutscher Laboratories. All purified FA (palmitic acid, (PAL), DHA, EPA, α -linolenic acid (LNA), oleic acid (OA), arachidonic acid (AA), and linoleic acid (LA)) and FA-free bovine serum albumin (BSA), thapsigargin, and 4-phenyl butyrate acid (PBA) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). The antibodies raised against CCAAT-enhancer-binding

protein homologous protein (CHOP) and activating transcription factor 4 (ATF4) were purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme, France). The horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Interchim, France). The antibody raised against β -actin (C4) HRP was purchased from Santa Cruz. The Muc2 Elisa Kit (Human) was purchased from Aviva Systems Biology (Clinisciences, Nanterre, France).

2.2. Cell Culture and Treatments

The LS174T, a well-differentiated human colonic goblet cell line [19], was purchased from Sigma-Aldrich (product number 87060401-1VL Saint Quentin Fallavier, France). Cells were routinely grown as a monolayer in 75 cm² plastic flasks and cultured at 37 °C in a humid environment containing 5% CO₂ in MEM medium supplemented with 2 mM L-Glutamine (Dutscher, Brumath, France); 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS); 1% non-essential amino acids (Dutsche, Brumath, France); and an antibiotics cocktail containing 100 U/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin and amphotericin B (Dutscher, Brumath, France). Cells were seeded in six-well plates with 4×10^5 cells/well. When cells reached 80% confluence, they were treated with different stimuli. PAL, DHA, EPA, LNA, OA, AA, and LA were dissolved in 100% ethanol at a 1 mM concentration, flushed with nitrogen, and stored at −20 °C until use. Before treatment, fatty acids were placed at room temperature, except for PAL, which was heated in a 40 °C water bath. Fatty acids were added to 1 mL of MEM containing FA-free BSA to be combined at a 4:1 ratio. The specific treatment concentrations and incubation times are shown in the figure legends. For the control, cells were treated with the same quantity of ethanol and MEM-BSA concentrations as cells treated with FA.

2.3. Western Blot Analysis

LS174T cells were washed three times with ice-cold PBS and cell lysates were obtained in RIPA protein lysis buffer containing 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP (4-Nonylphenyl Poly(ethylene glycol)-40, 0.1% SDS, and 0.5% sodium deoxycholate, and a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The cells were kept for 15 min at 4 °C and disrupted by repeated aspiration through a 21-gauge needle. Cell lysates were sonicated and centrifuged at 15,000 g for 15 min at 4 °C and supernatants containing proteins were collected. The protein concentration was determined by a Bicinchoninic acid (BCA) assay. Thirty micrograms of total proteins were subjected to 12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electroblotted to a Protan nitrocellulose membrane (Whatman, Dassel, Germany). After blocking non-specific binding sites with 5% free protease BSA in Tween-Tris-buffered saline (T-TBS, 0.1% Tween-20 in TBS) for 1 h, membranes were probed overnight at 4 °C under gentle agitation with primary CHOP and ATF4 antibodies (Cell Signaling, Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France) and β -actin (C4) HRP (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) at a concentration of 1/1000 and 1/5000, respectively. Blots were then washed three times in T-TBS for 10 min each, and incubated for 1 h at room temperature with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody at a concentration of 1/5000 for all the antibodies, except β -actin (C4), which was HRP conjugated. The detection of proteins was performed using the enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting analysis procedure (Clarity Western ECL, Biorad, Marnes-la-Coquette, France), and their intensity was analyzed with the Chemidoc Imaging System (Biorad, Marnes-la-Coquette, France).

2.4. Muc2 ELISA Quantification

After the different treatments, the supernatant was centrifuged at 1000 g for 20 min at 4 °C to remove cells debris and 100 μ L per sample was immediately used. The Muc2 Elisa Kit, purchased from Aviva Systems Biology (MUC2 ELISA Kit human, #OKEH02839, Clinisciences, Nanterre, France), was used to perform Muc2 quantification in the supernatant of LS174T cell cultures, following the manufacturer's instructions.

2.5. Total RNA Extraction and Real-Time Quantitative PCR

Total RNA extraction and quantitative RT-PCRs (QRT-PCRs) were performed as previously described [6]. Briefly, LS174T cells were washed three times with ice-cold PBS and homogenized in Tri-Reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Total RNA (1 µg) was next reverse transcribed using the High-Capacity RNA-to-cDNA™ kit (Applied Biosystems, France). Q-PCRs were performed using the StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems, France) and were carried out using the following human specific primers synthesized by Eurogentec Company (Angers, France): Muc2 (F-5'CAG CAC CGA TTG CTG AGT TG3', R-5'GCT GGT CAT CTC AAT GGC AG3'), KLF4 (F-5'AGA GGA GCC CAA GCC AAA GA3', R-5'CAG TCA CAG TGG TAA GGT TTC TC3'), glucose-related protein 78 kDa (GRP78) (F-5'TGC TGC TAG GCC TGC TCC GA3', R-5'CGA CCA CCG TGC CCA CAT CC3'), CHOP (F-5'CTG CCT TTC ACC TTG GAG AC3', R-5' CGT TTC CTG GGG ATG AGA TA 3'), ATF4 (F-5'ATG GCC GGC TAT GGA TGA T3', R-5'CGA AGT CAA ACT CTT TCA GAT CCA TT3'), and β-actin (F-5'ATG ATA TCG CCG GGC TCG TCG TC3', R-5'AGG TCC CGG CCA GCC AGG TCCAG3'). Finally, threshold cycle values were calculated by using Step One Software version 2.3 (Life technologies, Illkirch, France). Expression levels of target genes were normalized with the housekeeping gene β-actin and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used to compare the relative expression of gene expression.

2.6. Statistical Analyses

One-way ANOVA was used to determine significance between different conditions. Tukey's multiple comparison test was used as a post-hoc comparison. For stimulation time-dependent gene expression data, one-way ANOVA with a Tukey's multiple comparison test as a post-hoc comparison was used to determine the significance difference of treatment at individual time points. The data collected for the two groups were analyzed by an unpaired two-tailed student T-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). GraphPad Prism version 7.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used for the statistical analysis.

3. Results

3.1. Effects of Palmitic Acid on Muc2 and KLF4 Expression and Muc2 Production in LS174T Cells

Since an HF diet (rich in PAL) was reported to induce a strong colon mucus layer thickness decrease in mice [11,39], we first wanted to assess the effects of PAL on Muc2 and KLF4 mRNA expressions and its impact on Muc2 secretion, the main mucin secreted by the LS174T cell line. We observed that 300 µM of PAL (considered a mildly elevated concentration) downregulated Muc2 mRNA expression after 6 and 24 h of treatment. Moreover, a significant decrease in goblet cell differentiation (KLF4) was observed after 3, 6, and 24 h of treatment with PAL (Figure 1A). Furthermore, to determine whether PAL affects secretion of the Muc2 protein by LS174T cells, Muc2 quantification was performed in the culture medium after 24 h of treatment. The level of the mucous glycoprotein Muc2 was clearly reduced in the culture medium of LS174T cells treated with PAL for 24 h (Figure 1B). These different data showed that PAL altered not only Muc2 and KLF4 expressions, but also Muc2 release by the LS174T cells, with no change in their viability at this concentration (300 µM) of PAL (Figure S1).

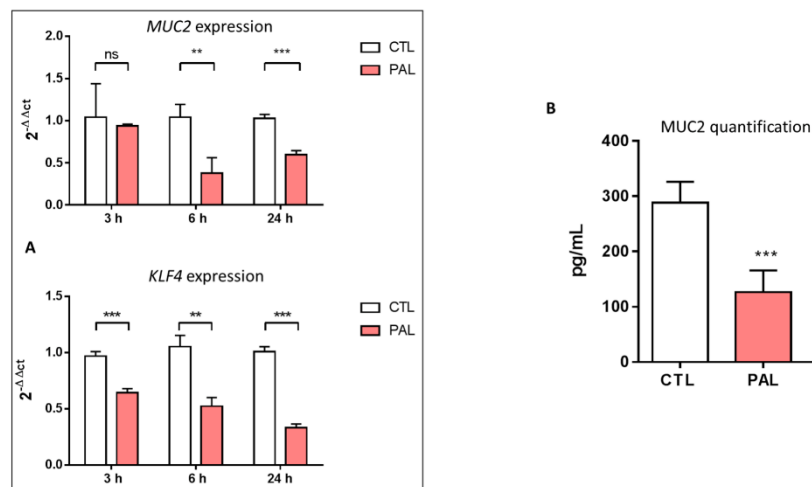


Figure 1. Effects of palmitic acid on *MUC2* and *KLF4* expressions and *MUC2* production in LS174T cells. LS174T cells were incubated for 3, 6, or 24 h with PAL (300 μ M), or BSA as the control. Cells were harvested, the total mRNA was isolated, and the levels of *Muc2* and *KLF4* (A) expressions were analyzed by real-time quantitative PCR. (B): After 24 h of treatment of LS174T cells with PAL, *Muc2* quantification was performed in cell culture supernatants by ELISA. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus CTL-treated groups (Student *t* test). ns: non-significant; CTL: control bovine serum albumin (BSA); PAL: palmitic acid.

3.2. Effects of Palmitic Acid on Endoplasmic Reticulum Stress in LS174T Cells

The high secretory output of the goblet cell makes *Muc2*, containing highly glycosylated domains, prone to misfolding, and failure to resolve this misfolding leads to ER stress, as shown in high-fat diets [11]. With this in mind, we investigated the impact of PAL on ER stress, by treating LS174T cells with PAL at various times ranging from 3 to 24 h and next evaluated markers of ER stress. ATF4 (activating transcription factor 4) and CHOP (CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein) protein expressions were drastically increased in PAL-treated LS174T cells, whatever the duration of the treatment (Figure 2A). Comparable results were observed by the use of thapsigargin as a positive control (Figure 2B). Moreover, whatever the time of treatment, a clear increase in the mRNA expression of ER stress markers, GRP78 (glucose-related protein 78 kDa), and CHOP was observed in LS174T cells treated with PAL (Figure 2C,D). ATF4 gene expression was increased at 6 h after PAL treatment, whereas it remained unchanged at 3 and 24 h (Figure 2E).

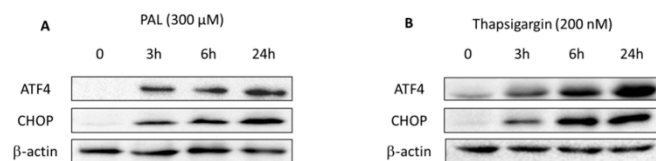


Figure 2. Cont.

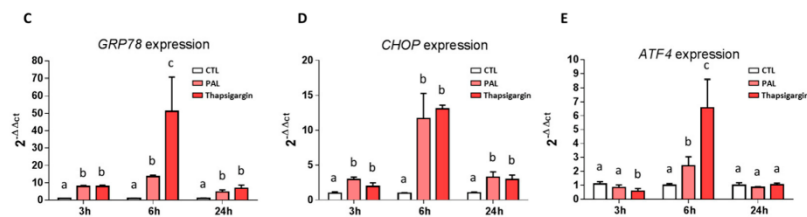


Figure 2. Effects of palmitic acid on endoplasmic reticulum stress in LS174T cells. Cells were treated for 3, 6, or 24 h with PAL (300 μ M) or thapsigargin (200 nM) as a strong inducer of ER stress. BSA was used as the control. Representative western blots for ATF4 and CHOP are shown for PAL (A) and thapsigargin (B) treatments. mRNA expressions of UPR genes GRP78 (C), CHOP (D), and ATF4 (E) in LS174T were measured by quantitative RT-PCR, expressed relatively to CTL and normalized to actin. Data are represented as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. Differences were analyzed by Tukey's multiple comparison test. Bars assigned different superscript letters (a, b, c) were statistically different at $p < 0.05$. ns: non-significant; ATF4: activating transcription factor 4; CHOP: CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein; CTL: control bovine serum albumin (BSA); ER: endoplasmic reticulum; GRP78: glucose-related protein 78 kDa; PAL: palmitic acid.

3.3. Preventing Endoplasmic Reticulum Stress Restores Palmitic Acid-Altered Muc2 Secretion

We next co-treated LS174T cells with PAL and 4-phenylbutyrate (4-PBA), an ER stress inhibitor, in order to verify whether altered Muc2 secretion is due to ER stress induced by PAL. After 24 h of treatment with PAL, the Muc2 concentration significantly decreased in the culture medium of LS174T cells, whereas co-treatment with 4-PBA normalized Muc2 secretion (Figure 3). These results evidenced that the altered Muc2 release observed in PAL-treated LS174T cells mainly occurs through the triggering of ER stress.

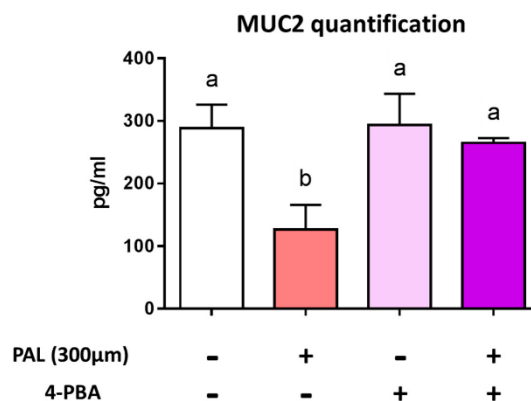


Figure 3. Preventing endoplasmic reticulum stress restores palmitic acid-altered MUC2 secretion. LS174T cells were treated for 24 h with control BSA, 300 μ M PAL, or 500 μ M 4-PBA, or were co-treated with PAL and 4-PBA. After incubation, cell culture supernatants were centrifuged to remove cell debris and the Muc2 protein released by LS174T cells was then quantified by ELISA. Results are presented as the mean $\pm$ SEM. of three independent experiments. Differences were analyzed by Tukey's multiple comparison test. Bars assigned different superscript letters (a, b, c) were statistically different at $p < 0.05$. BSA: bovine serum albumin; PAL: palmitic acid; 4-PBA: 4-phenyl butyrate acid.

3.4. Only EPA and DHA Prevent Endoplasmic Reticulum Stress Induced by Palmitic Acid

As *n*-3 fatty acids have been shown to prevent ER stress in both in vitro [36,40] and in vivo models [41–43], we investigated the interaction between PAL, *n*-3, *n*-6, and monounsaturated FA upon ER stress. As observed above (Figure 2), the protein expression levels of CHOP and ATF4 were increased when LS174T cells were treated with PAL for 6 h. Moreover, co-treatment with PAL and -linolenic acid, linoleic acid, arachidonic acid, or oleic acid (Figure 4A,B) also overexpressed ATF4 and CHOP protein expression. More interestingly, the upregulation observed with PAL was lowered only when PAL was combined with 25 μ M of DHA or EPA (Figure 4A). We next evaluated CHOP and ATF4 mRNA expressions in the same conditions. PAL overexpressed CHOP and similarly tended to increase ATF4, as already observed in Figure 2. Co-treatment of PAL with EPA and DHA alleviated CHOP and tended to reduce ATF4 overexpression, whereas LNA, OA, AA, and LA did not (Figure 4C,D). Similar results were obtained after 3 and 24 h of treatment (Figure S2).

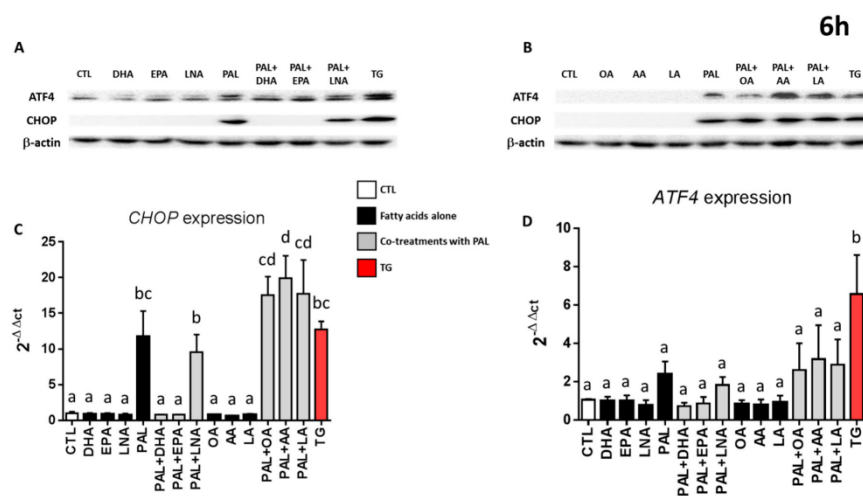


Figure 4. Only EPA and DHA prevent endoplasmic reticulum stress induced by palmitic acid. LS174T cells were treated for 6 h with control BSA, 300 μ M PAL, or 200 nM thapsigargin alone, or with 25 μ M DHA (docosahexaenoic acid), EPA (eicosapentaenoic acid), LNA (linolenic acid), OA (oleic acid), AA (arachidonic acid), or LA (linoleic acid) alone or in co-treatment with 300 μ M PAL. After 6 h of treatment, cell lysates were immunoblotted for ATF4, CHOP, and actin. Representative western blots are presented in (A) and (B). The impact of 6 h of treatment with the different fatty acids and the ER stress inducer thapsigargin on the mRNA expressions of CHOP and ATF4 were analyzed by quantitative RT-PCR. Results are expressed relatively to CTL and normalized to β -actin (C) and (D). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. Differences were analyzed by Tukey's multiple comparison test. Bars assigned different superscript letters (a, b, c) were statistically different at $p < 0.05$. CTL: control bovine serum albumin (BSA); TG, thapsigargin; ATF4: activating transcription factor 4; CHOP: CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein; ER: endoplasmic reticulum.

3.5. EPA and DHA Prevent Palmitic Acid-Altered Muc2 and KLF4 Expressions and Muc2 Production in LS174T Cells

As observed above (Figure 1A), Muc2 and KLF4 mRNA expressions were downregulated when LS174T cells were treated with PAL for 6 h. Co-treatments with PAL and LNA, LA, AA, or OA also significantly decreased Muc2 and KLF4 mRNA expressions. Nevertheless, when EPA and DHA were added to PAL-treated LS174T cells, Muc2 and KLF4 mRNA expressions remained comparable to those of the control (Figure 5A). Similar results were obtained at 24 h of treatment (Figure S3). Lastly, when

the level of the mucous glycoprotein Muc2 in the culture medium of LS174T cells was not affected by treatment with EPA, DHA, or AA alone, it was statistically reduced with PAL and with PAL and AA. In contrast, the secretion of Muc2 remained similar to the control when EPA and DHA were added to PAL (Figure 5B).

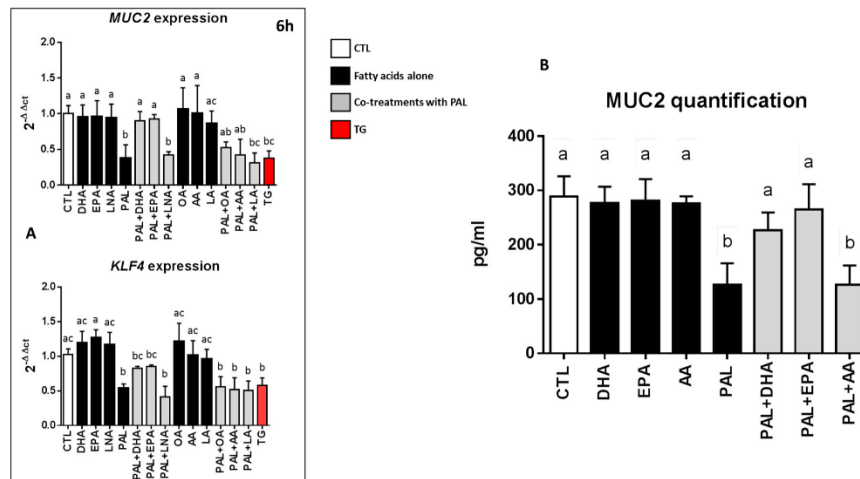


Figure 5. EPA and DHA prevent palmitic acid-altered *MUC2* and *KLF4* expressions and MUC production in LS174T cells. LS174T cells were treated for 6 h with control BSA, 300 μ M PAL, or 200 nM thapsigargin alone, or with 25 μ M DHA, EPA, LNA, OA, AA, or LA alone or in co-treatment with 300 μ M PAL. (A): The mRNA expressions of Muc2 and KLF4 were evaluated by quantitative RT-PCR after 6 h of treatment with the different fatty acids and the ER stress inducer thapsigargin. The mRNA expressions are relative to CTL and normalized to actin. (B): After treatment for 24 h with the different fatty acids, cell culture supernatants were centrifuged to remove cell debris and the Muc2 protein produced by LS174T cells was then quantified by ELISA. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. Differences were analyzed by Tukey's multiple comparison test. Bars assigned different superscript letters (a, b, c) were statistically different at $p < 0.05$. CTL: control bovine serum albumin (BSA); ER: endoplasmic reticulum.

4. Discussion

Obesity is now widely known to be associated with low-grade systemic inflammation. Indeed, it has been shown that HF diets, rich in saturated FA and particularly PAL, strongly increase intestinal permeability, leading to lipopolysaccharide absorption and metabolic endotoxemia that triggers inflammation and metabolic disorders [1,2,44]. The mucus layer, mainly comprised of the glycoprotein Muc2 produced by intestinal goblet cells [45], forming a physical barrier protecting the underlying epithelium against luminal substances and microbes [46,47], has been shown to be considerably altered under diets rich in saturated FA [11,18], exacerbating epithelium leakage and endotoxemia. We and others have evidenced that mice enriched in *n*-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are protected against gut barrier dysfunction, with consequences on metabolic endotoxemia [6,48–50]. However, the effects of *n*-3 PUFAs on the secretory function of intestinal goblet cells remain largely unexplored. Using the well-differentiated human colonic goblet LS174T cell line, the present study shows that PAL decreases Muc2 production, mainly by generating a rise of ER stress in LS174T cells which detrimentally affects the production of the secreted mucosal barrier. More interestingly, we evidenced here, for the first time, that long-chain *n*-3 FA (C20 and C22 carbon chain length) are able to prevent the altered Muc2 production induced by PAL, mainly by alleviating ER stress.

Our results agree with previous reports showing that PAL induces ER stress in many cell types [33,34,51,52] and particularly with the one by Gulhane and co-workers, who showed that 500 μ M of PAL induced significant stress in LS174T cells with a decrease in Muc2 and the goblet cell differentiation transcription factor KLF4 mRNA expressions [11]. These mRNA downregulations were also accompanied in the present study by a significant decrease of the secretion of the Muc2 protein by the cells (Figure 1). This result can be explained by the fact that PAL reduces the production of mature fully glycosylated Muc2 accompanied by an increase of the non-glycosylated Muc2 precursor and a reduction in mature Muc2 secretion, demonstrating protein misfolding consistent with the unfolded protein response (UPR) activation observed [11]. Due to their large size and complexity, mucins are extremely susceptible to misfolding in the ER, which can eventually lead to ER stress. We presently observed that PAL strongly increased ER stress in LS174T cells (Figure 2), which has also been observed with other ER stressors, such as thapsigargin, in the present study or tunicamycin in others [19]. In vivo, a decreased Muc2 secretion resulted in a thinner mucus layer more easily penetrated by diffusing microbial products, and more easily degraded by mucin-degrading bacteria. This is supported by previous studies evidencing that HF diet-induced obese mice exhibit a 50% thinner colon mucus layer [18]. Then, we may assume that the altered thickness of the mucus layer by an obesogenic diet (rich in PAL) could be explained by mucin misfolding leading to ER stress and an UPR-activated inhibition of Muc2 transcription with a downstream effect of reducing Muc2 production. This assumption is strengthened here by the use of the chemical ER chaperone 4-PBA (an ER stress inhibitor), which was able to prevent PAL-induced alteration of Muc2 production by LS174T cells (Figure 3).

To our knowledge, the present study is the first to demonstrate that ER stress produced by PAL in goblet LS174T cells can be significantly reduced by EPA and DHA, two highly unsaturated FA of the *n*-3 series exhibiting strong anti-inflammatory properties [53]. This is mechanistically supported by a decrease in the raised levels of UPR-related gene expression of CHOP and ATF4 associated with PAL in LS174T cells (Figure 4). In vitro studies have already suggested that DHA is able to counteract palmitate-induced ER stress in different cell types, including primary mouse hepatocytes [37], mouse 3T3L1 and rat primary preadipocytes [54], pancreatic cells [36,38], and C2C12 myotubes [40], but it has never been studied in colon cells in relation to mucus secretion. We evidenced in the present study that EPA and DHA are able to prevent altered Muc2 production in PAL-treated LS174T cells (Figure 5B). This protective effect of EPA and DHA can be explained by ER stress alleviation, as shown Figure 4. The well-known anti-inflammatory effects of EPA and DHA can also be involved in the modulation of altered goblet cell homeostasis and the decreased production of mucin. Indeed, resolvins—derived from EPA and DHA—due to their anti-inflammatory properties, have also been suggested to attenuate ER stress-induced apoptosis in HepG2 cells, mainly through the JNK pathway [55]. Moreover, it has also been suggested that *n*-3 PUFA suppression of ER stress was partly due to AMP-activated protein kinase (AMPK) activation. In support of this, compound C (an AMPK inhibitor) is able to block the effects of DHA in PAL-induced ER stress inhibition [41].

LNA was supposed to have a similar efficiency to EPA and DHA against PAL lipotoxicity via reducing ER stress and apoptosis, as already shown in primary rat hepatocytes [56] or renal NRK-52E cells [57]. Unexpectedly, while LNA is also a *n*-3 fatty acid, it failed to prevent PAL alterations, as observed with EPA or DHA. Indeed, the expression of CHOP, ATF4, and Muc2 in LS174T cells co-treated with PAL and LNA remained similar to the one observed with PAL alone, whereas it was changed at least twice when cells were co-treated with PAL and EPA or DHA (Figures 4 and 5). Then, EPA, DHA, and LNA would be able to differently modulate PAL metabolism and consequently its lipotoxic effect. This has already been observed in other cell types, such as C2C12 myoblasts [58] and L6 myotubes [59], where partial and total oxidation were decreased during PAL treatment, which was restored by EPA and DHA, but not with LNA [58,59]. Then, we might expect comparable modulations in the present study. Moreover, besides alterations in its oxidation, it has also been shown that PAL treatment increased the formation of lipotoxic compounds, such as diglycerides and ceramides [60],

and that EPA or DHA were able to 1) reduce such accumulation, 2) enhance triglyceride synthesis, and 3) preferentially address PAL to mitochondrial oxidation [58,61]. In contrast and in agreement with Pinel and coworkers [58], LNA failed to prevent PAL incorporation into cytotoxic diglycerides, and then to reduce the related ER stress activation and finally Muc2 production. Therefore, our results highly suggest that LNA intake in a diet high in *n*-3 fatty acids would not represent an alternative to oily fish consumption (rich in EPA and DHA) with regard to gut barrier integrity and especially to the preservation of the thickness of the mucus layer. In addition, a greater expression (+75%) of CHOP was observed in cells co-treated with PAL and AA compared with PAL alone (Figure 4). This increase could be due to the proinflammatory effects of AA-derived prostanoids and leukotrienes, as previously described [62], and supports the idea that certain *n*-6 fatty acids may have detrimental effects when consumed excessively.

In short, our results suggest that very long-chain *n*-3 PUFAs, by protecting goblet cells against ER stress-mediated altered Muc2 secretion induced by PAL, could be potential therapeutic nutrients used in strategies against the detrimental lipotoxicity of saturated FA, associated with type 2 diabetes and obesity or inflammatory bowel disease. Nevertheless, the relevance of our *in vitro* data remain to be explored *in vivo* in a context of dietary obesity, as well as the efficiency of *n*-3 PUFAs in alleviating the decrease of the thickness of the intestinal mucus layer and consequently preserving gut barrier integrity.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/11/9/2179/s1>: Figure S1: Effect of palmitic acid and thapsigargin treatments on the viability of LS174T cells; Figure S2: EPA and DHA prevent endoplasmic reticulum stress induced by palmitic acid at 3 and 24 h; Figure S3: EPA and DHA prevent palmitic acid-altered Muc2 and KLF4 expressions in LS174T cells at 3 and 24 h.

Author Contributions: Q.E. performed the experiments, designed the research, and contributed to the writing of the manuscript; S.B. analyzed the data and wrote the manuscript; M.N. designed the research, analyzed the data, and wrote the manuscript; J.B. designed the research, analyzed the data, and wrote the manuscript.

Funding: This work was supported by the INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), the Regional Council of Bourgogne, the European Regional Development Fund, the University of Bourgogne, the Fondation de France, and by a French Government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d’Avenir” with the reference ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC LabEx. This work was also supported by Valorex (Combourtillé, France) and the Association Nationale Recherche Technologie (ANRT), who are financing Quentin Escoula with a CIFRE grant.

Acknowledgments: We thank John Seubert (University of Alberta, Edmonton, Canada) and Tony Jourdan (University of Bourgogne Franche Comté) for manuscript editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Hotamisligil, G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **2006**, *444*, 860–867. [CrossRef] [PubMed]
- Horng, T.; Hotamisligil, G.S. Linking the inflammasome to obesity-related disease. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 164–165. [CrossRef] [PubMed]
- Cani, P.D.; Amar, J.; Iglesias, M.A.; Poggi, M.; Knauf, C.; Bastelica, D.; Neyrinck, A.M.; Fava, F.; Tuohy, K.M.; Chabo, C.; et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* **2007**, *56*, 1761–1772. [CrossRef] [PubMed]
- Amar, J.; Burcelin, R.; Ruidavets, J.B.; Cani, P.D.; Fauvel, J.; Alessi, M.C.; Chamontin, B.; Ferrières, J. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *87*, 1219–1223. [CrossRef] [PubMed]
- Teixeira, T.F.; Collado, M.C.; Ferreira, C.L.; Bressan, J.; Peluzio Mdo, C. Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. *Nutr. Res.* **2012**, *32*, 637–647. [CrossRef] [PubMed]
- Bidu, C.; Escoula, Q.; Bellenger, S.; Spor, A.; Galan, M.; Geissler, A.; Bouchot, A.; Dardevet, D.; Morio, B.; Cani, P.D.; et al. The Transplantation of omega3 PUFA-Altered Gut Microbiota of fat-1 Mice to Wild-Type Littermates Prevents Obesity and Associated Metabolic Disorders. *Diabetes* **2018**, *67*, 1512–1523. [CrossRef] [PubMed]

7. Cani, P.D.; Bibiloni, R.; Knaut, C.; Waget, A.; Neyrinck, A.M.; Delzenne, N.M.; Burcelin, R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* **2008**, *57*, 1470–1481. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Pelaseyed, T.; Bergström, J.H.; Gustafsson, J.K.; Ermund, A.; Birchenough, G.M.; Schütte, A.; van der Post, S.; Svensson, F.; Rodriguez-Piñeiro, A.M.; Nyström, E.E.; et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol. Rev.* **2014**, *260*, 8–20. [\[CrossRef\]](#)
9. McGuckin, M.A.; Lindén, S.K.; Sutton, P.; Florin, T.H. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 265–278. [\[CrossRef\]](#)
10. Johansson, M.E.; Larsson, J.M.; Hansson, G.C. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108* (Suppl. S1), 4659–4665. [\[CrossRef\]](#)
11. Gulhane, M.; Murray, L.; Lourie, R.; Tong, H.; Sheng, Y.H.; Wang, R.; Kang, A.; Schreiber, V.; Wong, K.Y.; Magor, G.; et al. High Fat Diets Induce Colonic Epithelial Cell Stress and Inflammation that is Reversed by IL-22. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28990. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Yilmaz, E. Endoplasmic Reticulum Stress and Obesity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *960*, 261–276. [\[PubMed\]](#)
13. Ramos-Lopez, O.; Riezu-Boj, J.I.; Milagro, F.I.; Moreno-Aliaga, M.J.; Martinez, J.A.; project MENA. Endoplasmic reticulum stress epigenetics is related to adiposity, dyslipidemia, and insulin resistance. *Adipocyte* **2018**, *7*, 137–142. [\[PubMed\]](#)
14. Ozcan, U.; Cao, Q.; Yilmaz, E.; Lee, A.H.; Iwakoshi, N.N.; Ozdelen, E.; Tuncman, G.; Görgün, C.; Glimcher, L.H.; Hotamisligil, G.S. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **2004**, *306*, 457–461. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Sharma, N.K.; Das, S.K.; Mondal, A.K.; Hackney, O.G.; Chu, W.S.; Kern, P.A.; Rasouli, N.; Spencer, H.J.; Yao-Borengasser, A.; Elbein, S.C. Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in nondiabetic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *93*, 4532–4541. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Boden, G.; Duan, X.; Homko, C.; Molina, E.J.; Song, W.; Perez, O.; Cheung, P.; Merali, S. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes* **2008**, *57*, 2438–2444. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Salvado, L.; Palomer, X.; Barroso, E.; Vázquez-Carrera, M. Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* **2015**, *26*, 438–448. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Everard, A.; Belzer, C.; Geurts, L.; Ouwerkerk, J.P.; Druart, C.; Bindels, L.B.; Guiot, Y.; Derrien, M.; Muccioli, G.G.; Delzenne, N.M.; et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 9066–9071. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Hasnain, S.Z.; Tauro, S.; Das, I.; Tong, H.; Chen, A.C.; Jeffery, P.L.; McDonald, V.; Florin, T.H.; McGuckin, M.A. IL-10 promotes production of intestinal mucus by suppressing protein misfolding and endoplasmic reticulum stress in goblet cells. *Gastroenterology* **2013**, *144*, 357–368. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Deng, J.; Liu, S.; Zou, L.; Xu, C.; Geng, B.; Xu, G. Lipolysis response to endoplasmic reticulum stress in adipose cells. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 6240–6249. [\[CrossRef\]](#)
21. Hanauer, S.B. Inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm. Bowel Dis.* **2006**, *12* (Suppl. S1), S3–S9. [\[CrossRef\]](#)
22. Kaser, A.; Blumberg, R.S. Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation. *Mucosal. Immunol.* **2010**, *3*, 11–16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Heazlewood, C.K.; Cook, M.C.; Eri, R.; Price, G.R.; Tauro, S.B.; Taupin, D.; Thornton, D.J.; Png, C.W.; Crockford, T.L.; Cornall, R.J. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med.* **2008**, *5*, e54. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Gruber, L.; Kisling, S.; Lichti, P.; Martin, F.P.; May, S.; Klingenspor, M.; Lichtenegger, M.; Rychlik, M.; Haller, D. High fat diet accelerates pathogenesis of murine Crohn's disease-like ileitis independently of obesity. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e71661. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Kasbi Chadli, F.; Andre, A.; Prieur, X.; Loirand, G.; Meynier, A.; Krempf, M.; Nguyen, P.; Ouguerram, K. n-3 PUFA prevent metabolic disturbances associated with obesity and improve endothelial function in golden Syrian hamsters fed with a high-fat diet. *Br. J. Nutr.* **2012**, *107*, 1305–1315. [\[CrossRef\]](#)

26. Bertrand, C.; Pignatola, A.; Wanecq, E.; Rancoule, C.; Batut, A.; Deleruyelle, S.; Lionetti, L.; Valet, P.; Castan-Laurell, I. Effects of dietary eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation in high-fat fed mice on lipid metabolism and apelin/APJ system in skeletal muscle. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e78874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sato, A.; Kawano, H.; Notsu, T.; Ohta, M.; Nakakuki, M.; Mizuguchi, K.; Itoh, M.; Suganami, T.; Ogawa, Y. Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: Importance of hepatic lipogenesis. *Diabetes* **2010**, *59*, 2495–2504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. White, P.J.; Arita, M.; Taguchi, R.; Kang, J.X.; Marette, A. Transgenic restoration of long-chain *n*-3 fatty acids in insulin target tissues improves resolution capacity and alleviates obesity-linked inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. *Diabetes* **2010**, *59*, 3066–3073. [[CrossRef](#)]
29. Lu, J.; Borthwick, F.; Hassanali, Z.; Wang, Y.; Mangat, R.; Ruth, M.; Shi, D.; Jaeschke, A.; Russell, J.C.; Field, C.J.; et al. Chronic dietary *n*-3 PUFA intervention improves dyslipidaemia and subsequent cardiovascular complications in the JCR:LA-cp rat model of the metabolic syndrome. *Br. J. Nutr.* **2011**, *105*, 1572–1582. [[CrossRef](#)]
30. Jiang, W.G.; Bryce, R.P.; Horrobin, D.F.; Mansel, R.E. Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *244*, 414–420. [[CrossRef](#)]
31. Hudert, C.A.; Weylandt, K.H.; Lu, Y.; Wang, J.; Hong, S.; Dignass, A.; Serhan, C.N.; Kang, J.X. Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11276–11281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Willemsen, L.E.; Koetsier, M.A.; Balvers, M.; Beermann, C.; Stahl, B.; Van Tol, E.A. Polyunsaturated fatty acids support epithelial barrier integrity and reduce IL-4 mediated permeability in vitro. *Eur. J. Nutr.* **2008**, *47*, 183–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Lee, H.J.; Cui, R.; Choi, S.E.; Jeon, J.Y.; Kim, H.J.; Kim, T.H.; Kang, Y.; Lee, K.W. Bitter melon extract ameliorates palmitate-induced apoptosis via inhibition of endoplasmic reticulum stress in HepG2 cells and high-fat/high-fructose-diet-induced fatty liver. *Food Nutr. Res.* **2018**, *62*, 1319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hong, S.W.; Lee, J.; Cho, J.H.; Kwon, H.; Park, S.E.; Rhee, E.J.; Park, C.Y.; Oh, K.W.; Park, S.W.; Lee, W.Y. Pioglitazone Attenuates Palmitate-Induced Inflammation and Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic beta-Cells. *Endocrinol. Metab. (Seoul)* **2018**, *33*, 105–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Salvado, L.; Coll, T.; Gómez-Foix, A.M.; Salmerón, E.; Barroso, E.; Palomer, X.; Vázquez-Carrera, M. Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia* **2013**, *56*, 1372–1382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Suzuki, E.; Matsuda, T.; Kawamoto, T.; Takahashi, H.; Mieda, Y.; Matsuura, Y.; Takai, T.; Kanno, A.; Koyanagi-Kimura, M.; Asahara, S.I.; et al. Docosahexaenoic Acid Reduces Palmitic Acid-Induced Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic Beta Cells. *Kobe J. Med. Sci.* **2018**, *64*, E43–E55. [[PubMed](#)]
37. Zheng, J.; Peng, C.; Ai, Y.; Wang, H.; Xiao, X.; Li, J. Docosahexaenoic Acid Ameliorates Fructose-Induced Hepatic Steatosis Involving ER Stress Response in Primary Mouse Hepatocytes. *Nutrients* **2016**, *8*, 55. [[CrossRef](#)]
38. Wang, J.; Song, M.Y.; Bae, U.J.; Lim, J.M.; Kwon, K.S.; Park, B.H. *n*-3 Polyunsaturated fatty acids protect against pancreatic beta-cell damage due to ER stress and prevent diabetes development. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59*, 1791–1802. [[CrossRef](#)]
39. Desai, M.S.; Seekatz, A.M.; Koropatkin, N.M.; Kamada, N.; Hickey, C.A.; Wolter, M.; Pudlo, N.A.; Kitamoto, S.; Terrapon, N.; Muller, A.; et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* **2016**, *167*, 1339–1353. [[CrossRef](#)]
40. Woodworth-Hobbs, M.E.; Perry, B.D.; Rahnert, J.A.; Hudson, M.B.; Zheng, B.; Russ Price, S. Docosahexaenoic acid counteracts palmitate-induced endoplasmic reticulum stress in C2C12 myotubes: Impact on muscle atrophy. *Physiol. Rep.* **2017**, *5*, e13530. [[CrossRef](#)]
41. Yang, W.; Chen, X.; Chen, M.; Li, Y.; Li, Q.; Jiang, X.; Yang, Y.; Ling, W. Fish oil supplementation inhibits endoplasmic reticulum stress and improves insulin resistance: Involvement of AMP-activated protein kinase. *Food Funct.* **2017**, *8*, 1481–1493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Okada, L.; Oliveira, C.P.; Stefano, J.T.; Nogueira, M.A.; Silva, I.D.C.G.D.; Cordeiro, F.B.; Alves, V.A.F.; Torrinhas, R.S.; Carrilho, F.J.; Puri, P.; et al. Omega-3 PUFA modulate lipogenesis, ER stress, and mitochondrial dysfunction markers in NASH - Proteomic and lipidomic insight. *Clin. Nutr.* **2018**, *37*, 1474–1484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

43. Chen, R.; Zhong, W.; Shao, C.; Liu, P.; Wang, C.; Wang, Z.; Jiang, M.; Lu, Y.; Yan, J. Docosahexaenoic acid inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension via attenuating endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2018**, *314*, L243–L255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Olefsky, J.M.; Glass, C.K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* **2010**, *72*, 219–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Johansson, M.E.; Hansson, G.C. Mucus and the goblet cell. *Dig. Dis.* **2013**, *31*, 305–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bansil, R.; Turner, B.S. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *124*, 3–15. [[CrossRef](#)]
47. Johansson, M.E.; Sjövall, H.; Hansson, G.C. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *10*, 352–361. [[CrossRef](#)]
48. Bellenger, J.; Bellenger, S.; Escoula, Q.; Bidu, C.; Narce, M. N-3 polyunsaturated fatty acids: An innovative strategy against obesity and related metabolic disorders, intestinal alteration and gut microbiota dysbiosis. *Biochimie* **2019**, *159*, 66–71. [[CrossRef](#)]
49. Kaliannan, K.; Wang, B.; Li, X.Y.; Kim, K.J.; Kang, J.X. A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11276. [[CrossRef](#)]
50. Mani, V.; Hollis, J.H.; Gabler, N.K. Dietary oil composition differentially modulates intestinal endotoxin transport and postprandial endotoxemia. *Nutr. Metab. (Lond.)* **2013**, *10*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Guo, Q.; Hu, H.; Liu, X.; Yang, D.; Yin, Y.; Zhang, B.; He, H.; Oh, Y.; Wu, Q.; Liu, C.; et al. C/EBP β mediates palmitate-induced myosin expression via the regulation of PERK/ATF4 pathways in myotubes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2019**, *316*, E1081–E1092. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Tse, E.K.; Belsham, D.D. Palmitate induces neuroinflammation, ER stress, and Pomc mRNA expression in hypothalamic mHypoA-POMC/GFP neurons through novel mechanisms that are prevented by oleate. *Mol. Cell Endocrinol.* **2018**, *472*, 40–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Uchiyama, K.; Nakamura, M.; Odahara, S.; Koido, S.; Katahira, K.; Shiraishi, H.; Ohkusa, T.; Fujise, K.; Tajiri, H. N-3 polyunsaturated fatty acid diet therapy for patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2010**, *16*, 1696–1707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Guo, W.; Wong, S.; Xie, W.; Lei, T.; Luo, Z. Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2007**, *293*, E576–E586. [[CrossRef](#)]
55. Jung, T.W.; Hwang, H.J.; Hong, H.C.; Choi, H.Y.; Yoo, H.J.; Baik, S.H.; Choi, K.M. Resolvin D1 reduces ER stress-induced apoptosis and triglyceride accumulation through JNK pathway in HepG2 cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **2014**, *391*, 30–40. [[CrossRef](#)]
56. Zhang, Y.; Dong, L.; Yang, X.; Shi, H.; Zhang, L. Alpha-Linolenic acid prevents endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of stearic acid lipotoxicity on primary rat hepatocytes. *Lipids Health Dis.* **2011**, *10*, 81. [[CrossRef](#)]
57. Katsoulis, E.; Mabley, J.G.; Samai, M.; Green, I.C.; Chatterjee, P.K. Alpha-Linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *623*, 107–112. [[CrossRef](#)]
58. Pinel, A.; Rigaudière, J.P.; Laillet, B.; Pouyet, C.; Malpuech-Brugère, C.; Prip-Buus, C.; Morio, B.; Capel, F. N-3PUFA differentially modulate palmitate-induced lipotoxicity through alterations of its metabolism in C2C12 muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1861*, 12–20. [[CrossRef](#)]
59. Pimenta, A.S.; Gaidhu, M.P.; Habib, S.; So, M.; Fediuc, S.; Mirpourian, M.; Musheev, M.; Curi, R.; Ceddia, R.B. Prolonged exposure to palmitate impairs fatty acid oxidation despite activation of AMP-activated protein kinase in skeletal muscle cells. *J. Cell Physiol.* **2008**, *217*, 478–485. [[CrossRef](#)]
60. Chavez, J.A.; Knotts, T.A.; Wang, L.P.; Li, G.; Dobrowsky, R.T.; Florant, G.L.; Summers, S.A. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 10297–10303. [[CrossRef](#)]

61. Lam, Y.Y.; Hatzinikolas, G.; Weir, J.M.; Janovská, A.; McAinch, A.J.; Game, P.; Meikle, P.J.; Wittert, G.A. Insulin-stimulated glucose uptake and pathways regulating energy metabolism in skeletal muscle cells: The effects of subcutaneous and visceral fat, and long-chain saturated, *n*-3 and *n*-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1811*, 468–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Patterson, E.; Wall, R.; Fitzgerald, G.F.; Ross, R.P.; Stanton, C. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. *J. Nutr. Metab.* **2012**, *2012*, 539426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

III. Conclusion

Durant cette troisième étude, nous avons étudié les mécanismes moléculaires impliqués dans la prévention de l'intégrité de la couche de mucus par les oméga 3. Nous avons montré que l'altération de la sécrétion de MUC2 par l'acide palmitique est la résultante d'une activation du stress du réticulum endoplasmique. L'acide palmitique, en grande quantité, va induire un fort stress du réticulum endoplasmique dans de nombreux types cellulaires (Jung et al., 2012; Woodworth-Hobbs et al., 2017; Yin et al., 2015). Si les mécanismes précis expliquant l'augmentation de ce stress ne sont pas totalement compris, il semblerait que l'excès d'acide palmitique induise une forte augmentation de la palmitoylation des protéines, aboutissant à des modifications de leurs localisations, de leurs structures et de leurs activités. Pour faire face à cette augmentation de protéines mal conformées, l'UPR de la cellule est activée aboutissant à une augmentation du stress du réticulum endoplasmique (Baldwin et al., 2012). L'activation de ce stress induit ainsi une diminution de la transcription et de la traduction des protéines aboutissant à une diminution de l'expression de *Muc2* et de *Klf4* et à une diminution de la sécrétion de MUC2.

Les oméga 3 sont aujourd'hui reconnus comme étant anti-inflammatoires et immuno-modulateurs. Nous avons testé ici la capacité des oméga 3 à prévenir ce stress du réticulum endoplasmique et l'altération de la sécrétion de MUC2 qui en découle, induits par l'acide palmitique. Seuls les oméga 3 à longue chaîne, le DHA et l'EPA ont été capables de prévenir l'induction du stress du réticulum endoplasmique et la perte de sécrétion de MUC2. L'acide linoléique n'a pas montré, sur notre modèle et dans nos conditions expérimentales, d'impact sur le stress du réticulum endoplasmique. Il semblerait que pour impacter le stress du réticulum endoplasmique, l'acide linoléique doive préalablement être métabolisé en EPA ou DHA.

Pour expliquer l'effet de ces oméga 3 sur la modulation du stress du réticulum endoplasmique et la sécrétion de MUC2, plusieurs hypothèses peuvent être proposées :

- la première est l'interaction du DHA et de l'EPA avec son récepteur GPR120. Ce récepteur est exprimé de façon ubiquitaire mais est très fortement exprimé dans le tractus gastro-intestinal, notamment au niveau colique, ce qui laisse supposer que les oméga 3 joueraient un rôle important à ce niveau. Une fois activé, le récepteur GPR120 va être capable de séquestrer la protéine β -arrestine 2, et ainsi bloquer la voie de l'inflammation NF- κ b (Oh et al., 2010).

- les résolvines, les protectines et les marésines sont des métabolites issus des oméga 3 et présentent elles aussi de fortes propriétés anti-inflammatoires, immuno-modulatrices et préventives vis-à-vis du stress du réticulum endoplasmique (Jung et al., 2014; Serhan et al., 2004). La prévention du stress du réticulum endoplasmique et de l'altération de la sécrétion de la couche de mucus par le DHA et l'EPA induit par l'acide palmitique pourrait ainsi passer par ces métabolites.

Chapitre 4 : Prévention de l'altération de la couche de mucus colique induite lors de l'obésité par les oméga 3 : rôle du microbiote intestinal.

I. Introduction

La couche de mucus, principalement constituée par la glycoprotéine MUC2 sécrétée par les cellules caliciformes, est divisée en deux couches distinctes, la couche interne et la couche externe (Johansson et al., 2008). La couche de mucus externe constitue une véritable niche microbienne intestinale permettant d'accueillir et de nourrir de nombreuses bactéries (pour celles possédant l'arsenal enzymatique nécessaire pour dégrader les mucines et les utiliser comme source énergétique). La couche de mucus interne, dépourvue de bactérie en conditions physiologiques, est beaucoup plus compacte et a pour principal rôle de maintenir les bactéries intestinales à distance des cellules de l'hôte afin de prévenir une infection et une activation massive du système immunitaire (Johansson et al., 2014). Plusieurs travaux ont rapporté une altération de cette couche de mucus colique dans des conditions obésogènes, avec notamment une diminution de l'épaisseur de la couche de mucus interne associée à une perte de l'imperméabilité de cette dernière vis-à-vis des bactéries (Everard et al., 2013; Gulhane et al., 2016). Les travaux de *Gulhane* et de son équipe ont également montré que l'altération de la couche de mucus interne lors de l'obésité était fortement associée à un stress du réticulum endoplasmique des cellules coliques (Gulhane et al., 2016).

Dans nos travaux, nous nous sommes intéressés à l'impact d'un enrichissement tissulaire en oméga 3, dans le modèle de souris fat-1, sur l'altération de cette couche de mucus colique lors de l'obésité. Nous avons observé que les souris fat-1, nourries avec un régime obésogène, ne présentaient pas de diminution de l'épaisseur de la couche de mucus interne contrairement aux souris sauvages placées dans les mêmes conditions nutritionnelles. De plus, nous avons observé que les souris fat-1 étaient complètement protégées de l'augmentation du stress du réticulum endoplasmique colique induit par le régime obésogène.

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle spécifique du microbiote intestinal des souris fat-1 dans la prévention de l'altération de la couche de mucus colique lors d'un régime obésogène. Nous avons donc réalisé des transplantations de microbiote de souris fat-1 à des souris sauvages non traitées aux antibiotiques et nourries avec un régime obésogène ou un régime contrôle. Nous avons observé que les souris sauvages transplantées avec le microbiote de souris fat-1, contrairement à celles ayant reçu le microbiote de souris sauvages, étaient protégées des altérations métaboliques et intestinales induites par le régime obésogène mais également de l'altération de la couche de mucus colique et du stress du réticulum endoplasmique associé.

II. Article 4

Microbiota of fat-1 mice transplanted to wild-type littermates protects against colonic mucus layer thickness decrease and endoplasmic reticulum stress induced by high fat diet.

By

Escoula Quentin^{1,2,3,4}, Bellenger Sandrine^{1,2,3}, Audrey Geissler⁵, Kilian Chaumonnot^{2,3,6}, Jacotot Emmanuel⁷, Narce Michel^{1,2,3}, Bellenger Jérôme^{1,2,3}

¹ University of Bourgogne Franche-Comté, UFR Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement, Lipides Nutrition Cancer UMR U1231, 6 Boulevard Gabriel, F-21000 Dijon, France.

² INSERM, Lipides Nutrition Cancer UMR1231, F-21000 Dijon, France.

³ LipSTIC LabEx, Fondation de Coopération Scientifique Bourgogne-Franche Comté, F-21000 Dijon, France.

⁴ Valorex, La Messayais, 35210 Combourtille, France.

⁵ CellImap – Cellular Imaging platform, Faculté de Médecine et Pharmacie, F21000 Dijon, France

⁶ Heat Shock Proteins and Cancer, INSERM, UMR 1231 IFR 100, Faculty of Medicine, Dijon, France

⁷ UMR PAM (Procédés Alimentaires et Microbiologiques), Equipe PMB (Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques), AgroSup Dijon, France

Corresponding authors:

Jérôme Bellenger: University of Bourgogne Franche-Comté, UFR Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement, Lipides Nutrition Cancer UMR U1231, 6 Boulevard Gabriel, F-21000 Dijon, France, Tel : +33 3 80 39 38 57, jerome.bellenger@u-bourgogne.fr

ABSTRACT

High fat diets alter gut barrier integrity leading to endotoxemia by impacting on the epithelial functions and by inducing endoplasmic reticulum (ER) stress in intestinal secretory goblet cells. Indeed ER stress, emerging as an important contributor to many chronic diseases such as obesity and obesity-related disorders, leads to reduced synthesis and secretion of mucins that form the protective mucus barrier. In the present study, we investigated the relative contribution of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-mediated alteration in the microbiota to alleviate the decrease of the intestinal mucus layer thickness and then to preserve gut barrier integrity. Male fat-1 transgenic mice (exhibiting an endogenous n-3 PUFAs tissue enrichment) and male wild-type (WT) littermates were fed an obesogenic (high fat diet, HFD) or a control diet. Unlike WT mice, HFD-fed fat-1 mice were protected against a decrease of the mucus layer thickness as well as ER stress-mediated decreased mucin expression induced by HFD. Moreover, caecal microbiota transplantation from fat-1 to WT mice was able to prevent the decrease of the colonic mucus layer thickness, mainly through colonic ER stress down-regulation. These new findings highlight a novel feature of the preventive effects of n-3 fatty acids against intestinal disorders occurring in obesity-related conditions.

INTRODUCTION

Obesity, now considered as a real worldwide epidemic affecting more than 650 million people around the world, is complex and mainly associated with excessive energy intake and changes in dietary habits favouring the consumption of diets high in saturated fat and sugar (1), but remains not fully understood. This multifactorial pathology is linked to chronic low-grade systemic inflammation contributing to the development of chronic diseases such as diabetes, nonalcoholic fatty liver and cardiovascular diseases (2).

High fat diet (HFD) has been shown to increase intestinal permeability - partly attributed to a downregulation of genes encoding tight junctions such as zonula-occludens 1 and occludin (3) - which modestly increases circulating levels of bacterial lipopolysaccharides (LPS), called metabolic endotoxemia, in response to non-infectious stimuli (4). LPS then bind to Toll-like receptor 4 which initiates an intracellular signalling cascade resulting in downstream activation of inflammatory signalling pathways (5). Metabolic endotoxemia has been shown to be closely related to intestinal microbiota dysbiosis during HF feeding, both in mice (6) and humans (7). In this way, the gut microbiome has recently emerged as a culprit in the development of chronic diseases such as obesity (8, 9) and diabetes (10, 11).

A dense physical mucus barrier, that covers the epithelial cell surface, prevents translocation of commensal and pathogenic microorganisms across the intestinal epithelium, and then protects the host against injuries (12). The mucus barrier is organized in two layers: an inner, stratified, firmly adherent to the epithelial cells that does not allow bacteria to penetrate; and an outer, loose and twice thicker, where commensal bacteria live and thrive (13). The glycoprotein MUC2, secreted by intestinal goblet cells, is the major protein of this thick colonic mucus barrier (14). MUC2 contains cysteine-rich and highly O-glycosylated domains requiring post-translational modifications in endoplasmic reticulum (ER) and Golgi (13), and

is susceptible to unfolding/misfolding which can initiate ER stress and inflammation in stress conditions (15)

ER stress is an important contributor to many chronic diseases such as obesity and obesity-related disorders (16, 17). Indeed, it has been evidenced that fat mass gain in mouse models (18) or obese individuals (19, 20) results in chronic ER stress in liver and adipose tissues leading, among others, to the development of insulin resistance and type 2 diabetes (21). In addition, saturated fatty acids, particularly palmitic acid, have been evidenced to be powerful activators of ER stress in many cells including pancreatic β -cells, muscle cells, hepatocytes and goblet cells (22-25). Furthermore, an increase of the ER stress in the colon of mice fed a HFD alters MUC2 secretion, leading to a significant reduction of the intestinal mucus layer thickness in these animals in which an increase of colonic and systemic inflammation due to bacteria invasion has been observed (26).

N-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), known for their powerful anti-inflammatory properties, have been reported to prevent ER stress induced by palmitic acid in numerous cellular models (27-29). We may then assume that they could represent potential nutritional therapeutic molecules able to prevent ER stress induced by HFD. We previously showed a prevention of obesity and associated metabolic disorders in HFD-fed *fat-1* mice linked to an n-3-PUFA-altered microbiota (3). These mice carry a *C. elegans fat-1* gene encoding an n-3 fatty acid desaturase catalysing the conversion of n-6-to-n-3 PUFAs (30) which not only elevates tissue concentrations of n-3 PUFAs but also decreases the levels of excessive endogenous n-6 PUFAs. Moreover, *fat-1* microbiome transplanted to wild type mice was able to reverse weight gain and normalize intestinal permeability. Then, gut microbiota transplantation emerges as a promising and successful intervention to manage obesity both in animals and humans (3, 31). Consequently this mouse model is understandably ideal for studying the specific roles of n-3

PUFAs in alleviating mucus layer alterations to preserve gut barrier integrity in obesity-related conditions.

Very recently, by the use of the well-differentiated human intestinal goblet LS174T cells secreting the mucin MUC2, we showed that palmitic acid-altered MUC2 production was alleviated by eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and that such prevention was partly mediated through ER stress downregulation (25). Nevertheless, the relevance of such *in vitro* data remained to be explored *in vivo* in a context of dietary obesity, as well as the efficiency of n-3 PUFAs in alleviating the decrease of thickness of the intestinal mucus layer and consequently preserving gut barrier integrity.

We showed here, for the first time, that n-3 fatty acid tissue enrichment prevents alteration of the colonic mucus layer and ER stress activation induced by HFD. Moreover, fat-1 caecal microbiota transplantation in HFD-fed mice prevents the decrease of the thickness of the colonic mucus layer, mainly through colonic ER stress down-regulation. These new findings highlight a novel aspect of the preventive effects of n-3 fatty acids against intestinal disorders occurring in obesity-related conditions.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animals and *in vivo* procedures.

All procedures followed institutional guidelines for the use and care of laboratory animals and were approved by the Ethics Committee of the University of Burgundy. Two experimental procedures have been performed. In the first one, 20 WT mice and 20 fat-1 mice (12-16 weeks old) were housed in individual cages. Animals of each phenotype have been divided in 2 subgroups of 10 animals fed *ad libitum* a control (CTL) diet (D12450B; Research Diets) or a high fat diet (HFD) (D12451; Research Diets) for 9 weeks. The groups were labelled as followed: WT CTL, WT HFD, fat-1 CTL and fat-1 HFD. In the second one, thirty-two WT mice (12-16 weeks old) were housed in individual cages, divided in 2 subgroups of 16 animals. All animals were fed *ad libitum* a control (CTL) diet (D12450B; Research Diets). Each subgroup received caecal microbiota from male fat-1 homozygous transgenic mice or from non-transgenic littermate controls (12-16 weeks old) donors twice a week during the first week (*Fig 1*). Two weeks after microbiota transplantation, each group of 16 animals were divided into 2 groups fed *ad libitum* the control diet (CTL) when the other one fed *ad libitum* a high-fat-diet (HFD) (D12451; Research Diets) for 9 weeks. HFD contained 20% protein, 10 and 45% fat, and 70 and 35% carbohydrates. The n-6-to-n-3 ratios in the diets were 16.5 (CTL) and 13.6 (HFD). The 4 groups were labelled as followed: WT transplanted with WT microbiota fed a CTL diet (WTW CTL), WT transplanted with WT microbiota fed a HFD (WTW HFD), WT transplanted with fat-1 microbiota fed a CTL diet (WTF CTL) and WT transplanted with fat-1 microbiota fed a HFD (WTF HFD).

Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) was performed at week 11 as previously described (32). At week 12, intestinal permeability was assessed by force-feeding mice with fluorescein

isothiocyanate (FITC)-dextran 4 kDa, collecting blood 4h after gavage, and measuring plasma fluorescence of the FITC-Dextran 4kDa flux. At the end of the nutritional period, the fasted mice were killed by lethal intracardiac puncture, and colon was collected, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis.

Plasma LPS quantification

LPS concentration was assayed in total serum using a published method that is based on the direct quantification of 3- β -hydroxymyristic acid (3 β -OH C14:0, 3HM, the most abundant hydroxylated fatty acid of the lipid A moiety of most LPS molecules) by gas high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS), as previously described (33). This approach is a relevant method to quantitate endotoxins in a sample and evaluate the proinflammatory potential of LPS *in vivo*.

Caecal microbiota transplantation

Male donor mice, WT or fat-1, were killed by cervical dislocation. Caecum was ligated, quickly removed from the animal and transferred in an anaerobic chamber in which caecal content was resuspended in 1 ml of Ringer's solution (9g/L NaCl, 0.4g/L KCl, CaCl₂ 0.25g/L, L-Cysteine hydrochloride 0.05%). Each time microbiome was transplanted, caecal contents of 7 WT and 7 fat-1 donors were collected, combined and 200 μ l of the homogenate was administered by gavage to WT recipient mice.

Determination of the thickness of the inner colonic mucus layer

Samples were prepared and analyzed at the CellImaP site of DimaCell core facility, (INSERM U1231, Dijon, France). Distal colons, containing a feces, were collected and immediately placed in Carnoy's fixative solution (60 % ethanol, 30% chloroform and 10% acetic acid) for

4-24h and then transferred in ethanol 100% for 24h. They were then embedded in paraffin and 5- μ m-thick sections (two different levels per block) were deposited onto Superfrost Plus slides. After deparaffinization and rehydration steps, samples were stained in a 0.2% alcian blue solution, rinsed in tap water and counterstained with Harris hematoxylin.

Slides were images on Axioscope A1 microscope (Zeiss France S.A.S., Marly le Roi, France) equipped with a Jenoptic Gryphax camera and using 20x objective. A minimum of 5 images per mouse tissue was acquired and the thickness of the inner mucus layer stained with alcian blue was measured manually using Visilog software and reported in Excel sheet. A minimum of 5 measures was done for each image and the mean thickness for a mouse tissue was calculated. The difference between the different groups was analyzed with the Mann Whitney comparison (Tanagra, Excel add-in).

BiP (Binding immunoglobulin Protein) immunolabeling

Distal colons were formalin-fixed (paraformaldehyde, PFA 4%) and included in paraffin. Paraffin blocks were sectioned (5- μ m-thick slices, two different levels per block), and slices of colon were deposited onto Superfrost Plus slides. BiP (two slides per block at two different levels) immunohistochemistry was performed as previously described (34).

Total RNA extraction and Real-Time Quantitative PCR

Total RNA extraction and quantitative RT-PCRs (QRT-PCRs) were performed as previously described (3). Briefly, colons were homogenized in Tri-Reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France) and 1 μ g of total RNA was next reverse transcribed using the High Capacity RNA-to-cDNA™ kit (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France). Q-PCRs were performed in 96-well plates using the StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) and were carried out with the Power Syber Green

PCR Master mix from Applied Biosystems (#4368708) and the following mouse specific primer sequences synthesized by Eurogentec Company (Angers, France): MUC2 (F-5'CCT GAA GAC TGT CGT GCT GT3', R-5'GGG TAG GGT CAC CTC CAT CT3'), MUC4 (F-5'ACC TGG GGT GAC TTC CAT T3' , R-5'CGT TGG TGT AGG CAT CGT TC3'), KLF4 (F-5'AGC CAC CCA CAC TTG TGA CTA TG3', R-5'AGT GGT AAG GTT TCT CGC CTG TG3'), CHOP (F-5'GGT GGC AGC GAC AGA GCC AG3', R-5'TGC CAT GAC TGC ACG TGG ACC3'), Edem1 (F-5'AAG CCT GCA ATG AAG GAG AA3', R-5'CTA TCA GCA CCT GCA GTC CA3'), Grp78 (F-5'GCG TGT GTG TGA GAC CAG AAC CG3', R-5'CAT CAT GCC GGC GCT GAG GA3') and β -actin (F-5'ATG GAG GGG AAT ACA GCC C3', R-5'TTC TTT GCA GCT CCT TCG TT3'). Finally, threshold cycle values were calculated by using Step One Software version 2.3 (Life technologies, Illkirch, France). Expression levels of target genes were normalized with the housekeeping gene β -actin and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used to compare the relative expression of gene expression.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SEM for each group. Because the limited sample sizes prevented a proper test of parametric test assumptions, groups were compared using the nonparametric Kruskal-Wallis test and the Dunn multiple comparisons test. All analyses were performed using GraphPad Prism 8.3.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTS

Fig 1: HFD-fed fat-1 mice are protected against inner colonic mucus layer alteration.

Previous studies have reported a strong decrease of the inner colonic mucus layer in mice fed a HFD (35, 36). As shown in **Fig. 1A, B**, we first confirm in our experimental conditions that the thickness of the inner mucus layer of the WT mice fed a HFD was twice as thin as the one of the CTL diet -fed mice. By contrast, we evidenced for the first time that the n-3 PUFA tissue enrichment totally prevented the alteration of the mucus layer in fat-1 mice fed the HFD as the thickness of the inner layer remained comparable (it even tended to be greater) to values measured in WT and fat-1 animals fed the CTL diet. Moreover, we also showed that, beside the prevention of the decrease of the thickness of the inner mucus layer, HFD-fed fat-1 mice maintained the expression of *Muc2* and *Muc4* genes as well as *Klf4* (a goblet cell differentiation factor) whereas they were significantly decreased in HFD-fed WT mice (**Fig 1C**).

Figure 1 : HFD-fed fat-1 mice are protected against inner colonic mucus layer alteration

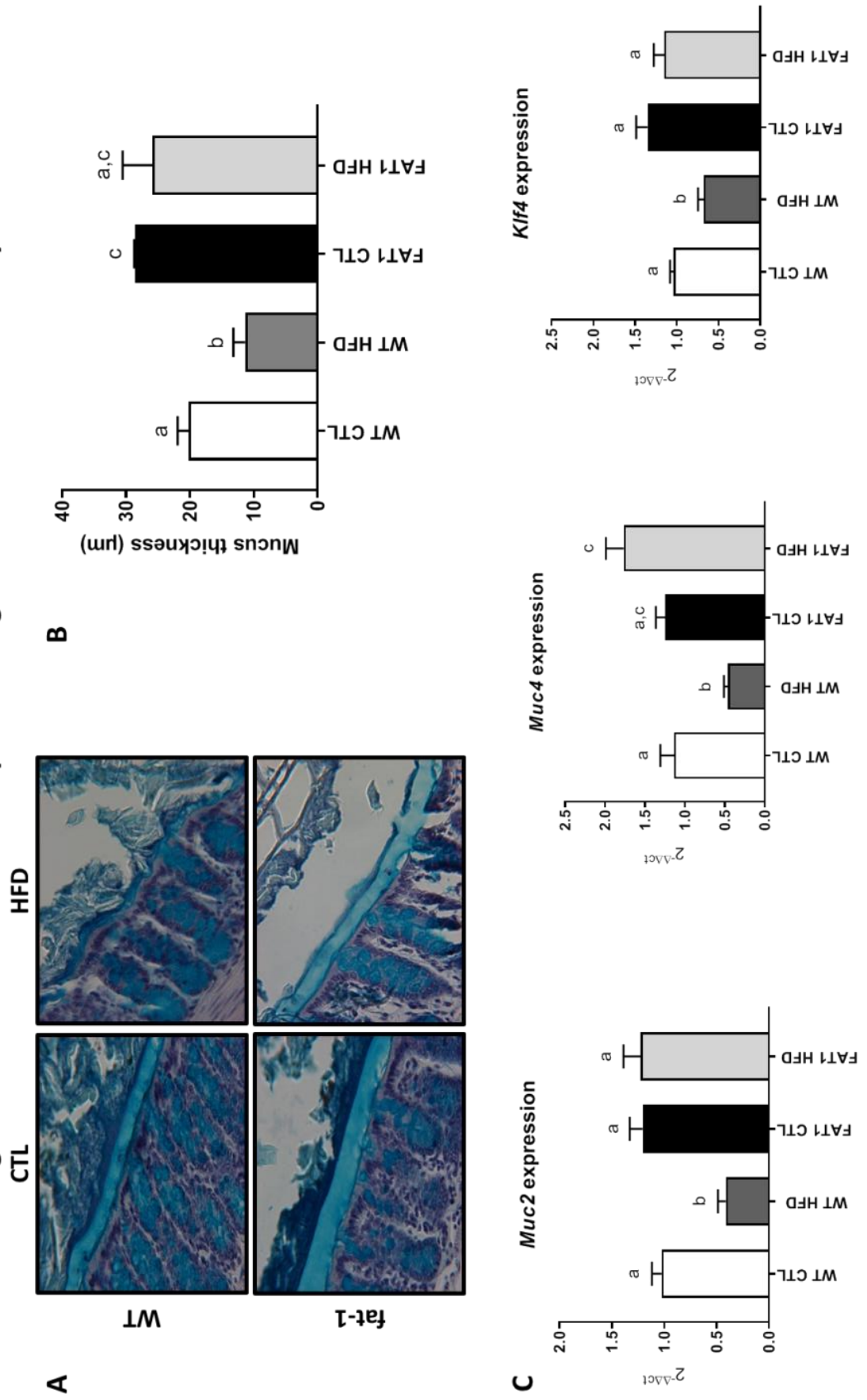


Fig 2: HFD-fed fat-1 mice are protected against reticulum endoplasmic stress increase.

Mucins, large glycoproteins requiring many post-translational modifications, are susceptible to unfolding/misfolding which can, in stressful conditions, initiate ER stress (15); an important contributor to many chronic diseases such as obesity and obesity-related disorders (16, 17). In accordance with these observations, we reported here that BiP immunolabelling (a central regulator for ER stress due to its role as a major ER chaperone) was increased in the colon of HFD-fed WT mice compared to CTL diet-fed WT animals. However, in HFD-fed fat-1 mice, this immunostaining was consistent with that observed in CTL diet-fed animals (**Fig 2A**). In the same way as BiP, colonic mRNA expression of several genes involved in endoplasmic reticulum stress as *Chop*, *Edem 1* and *Grp78* were significantly increased in WT mice fed with the obesogenic diet, while it remained similar to controls in HFD-fed fat-1 mice (**Fig 2B**).

Figure 2 : HFD-fed fat-1 mice are protected against reticulum endoplasmic stress increase

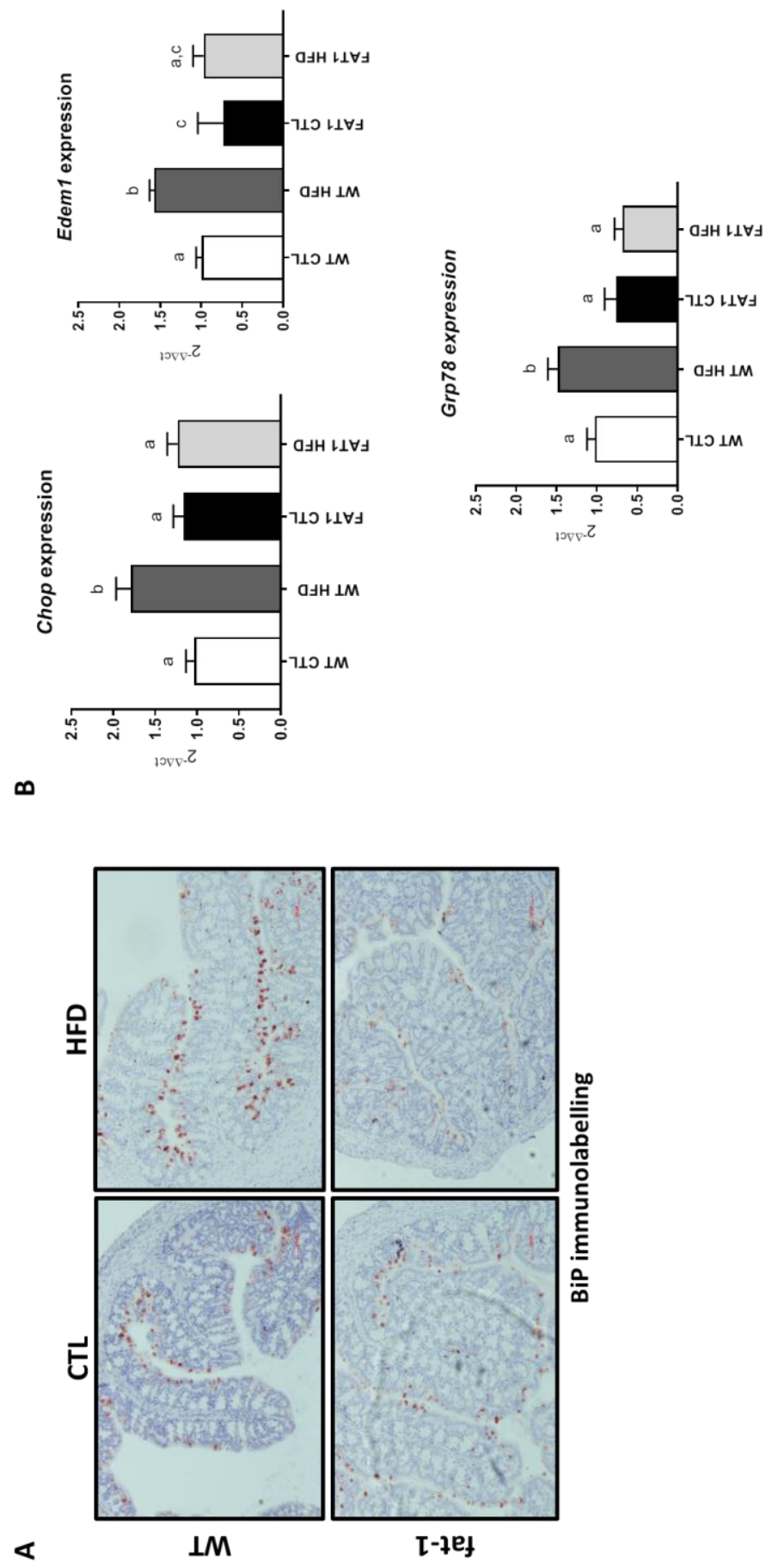


Fig 3: Transplantation of fat-1 microbiome decreases weight gain, enhances metabolic parameters and alleviates intestinal alteration in mice fed the HFD.

To evaluate the relative contribution of microbiota to the protective effects of n-3 PUFAs against HFD-induced obesity, WT mice underwent two transplantations with fat-1 or WT caecal microbiota and were fed an HFD for 12 weeks. Food intake did not differ between WT-to-WT and fat-1-to-WT mice fed the CTL or the HFD (**Fig S2**). After 12 weeks of high fat diet, WT mice transplanted with the fat-1 microbiota exhibited a significantly lower weight gain than WT microbiota force-fed WT counterparts (9.8 ± 2.6 versus 12.9 ± 1.5 respectively) (**Fig 3A**) along with a significant improvement in glucose tolerance (**Fig 3B**) and the unchanged liver weight in WTF HFD compared with control diet-fed animals, whereas WTW HFD animals exhibited a higher mass of liver (**Fig 3C**).

HFD is known to alter gut permeability leading to bacterial component flux, such as LPS, and then metabolic endotoxemia. We showed here that, after 12 weeks of high fat diet, gut permeability was increased in WTW HFD mice whereas mice transplanted with fat-1 microbiota and fed with the HFD exhibited a gut permeability similar to all CTL-fed animals (**Fig 3D**). Moreover, after completion of the dietary intervention, the plasma 3HM quantification revealed a twofold increase of endotoxemia in WT-transplanted WT animals whereas a tendency towards an endotoxin level decrease was observed in mice transplanted with the microbiota of fat-1 mice (**Fig 3E**).

Figure 3 : Transplantation of fat-1 microbiome decreases weight gain, enhances metabolic parameters and alleviates intestinal alteration in mice fed the HFD

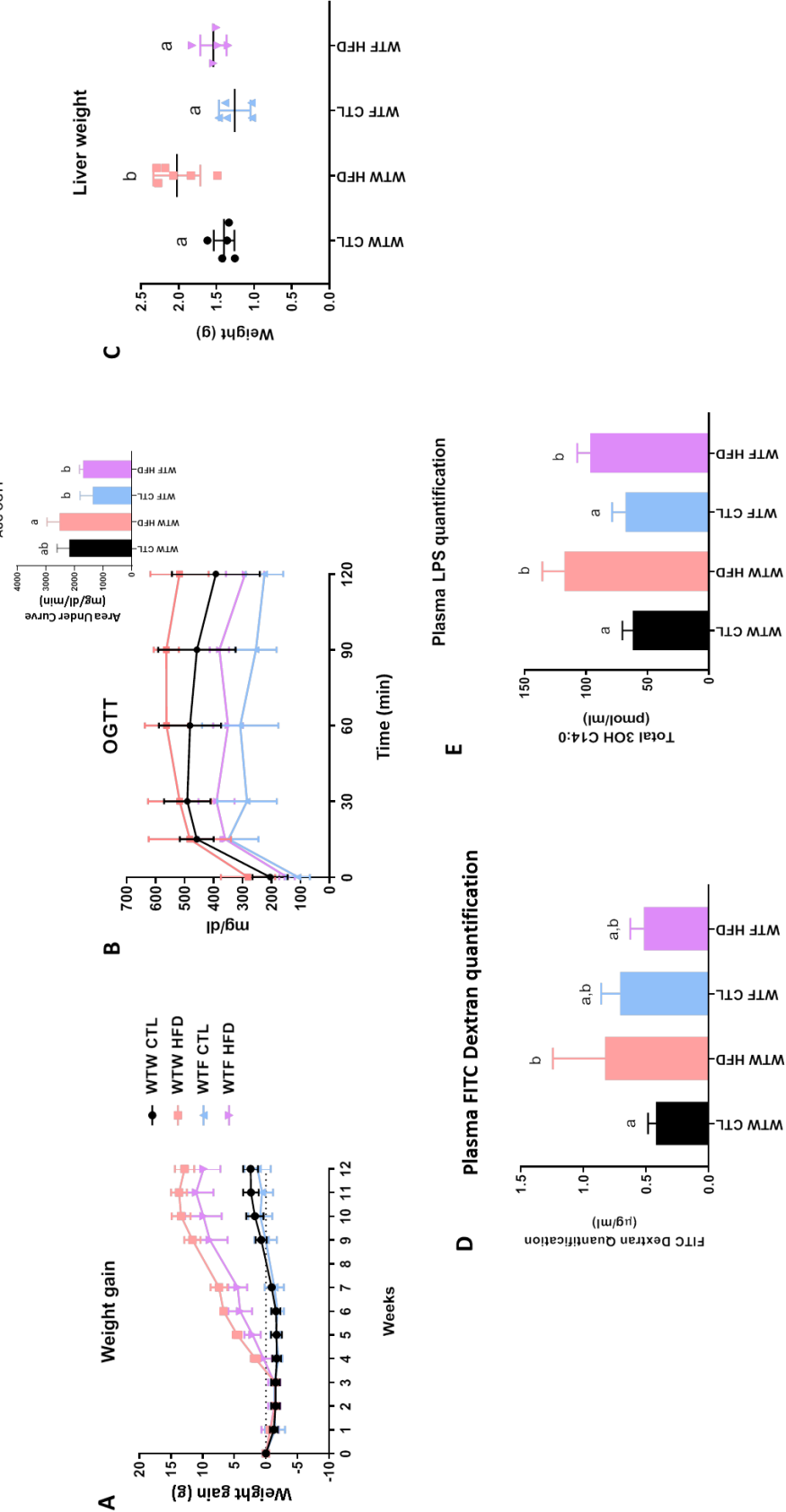


Fig 4: Transplantation of the fat-1 microbiome as a relevant way to preserve the integrity of the inner colonic mucus layer in mice fed the HF diet.

As previously evidenced in the present work, tissue-enrichment of fat-1 mice in n-3 PUFAs protected them against HFD-induced colonic mucus layer alterations. In order to study the role of microbiota in such protection, we evaluated the impact of two transfers of microbiome on the integrity of the mucus layer, a key element of the gut barrier function. While transplanting microbiota of WT mice decreased, as expected, the thickness of the inner mucus layer in HFD conditions, we evidenced that 10 weeks after transplanting only two times the microbiome of fat-1 mice, HFD-fed WT mice exhibited an inner mucus layer as thick as that of CTL-fed animals (**Fig 4A**). Moreover, we also evidenced that the preservation of the integrity of the mucus layer was associated with a sustained expression of *Muc2* gene as well as *Klf4* in HFD-fed mice transplanted with fat-1 microbiome whereas the expression of these genes were significantly decreased in HFD-fed WT mice transplanted with WT microbiome (**Fig 4B and 4C**).

Figure 4 : Transplantation of the fat-1 microbiome as a relevant way to preserve the integrity of the inner colonic mucus layer in mice fed the HF diet

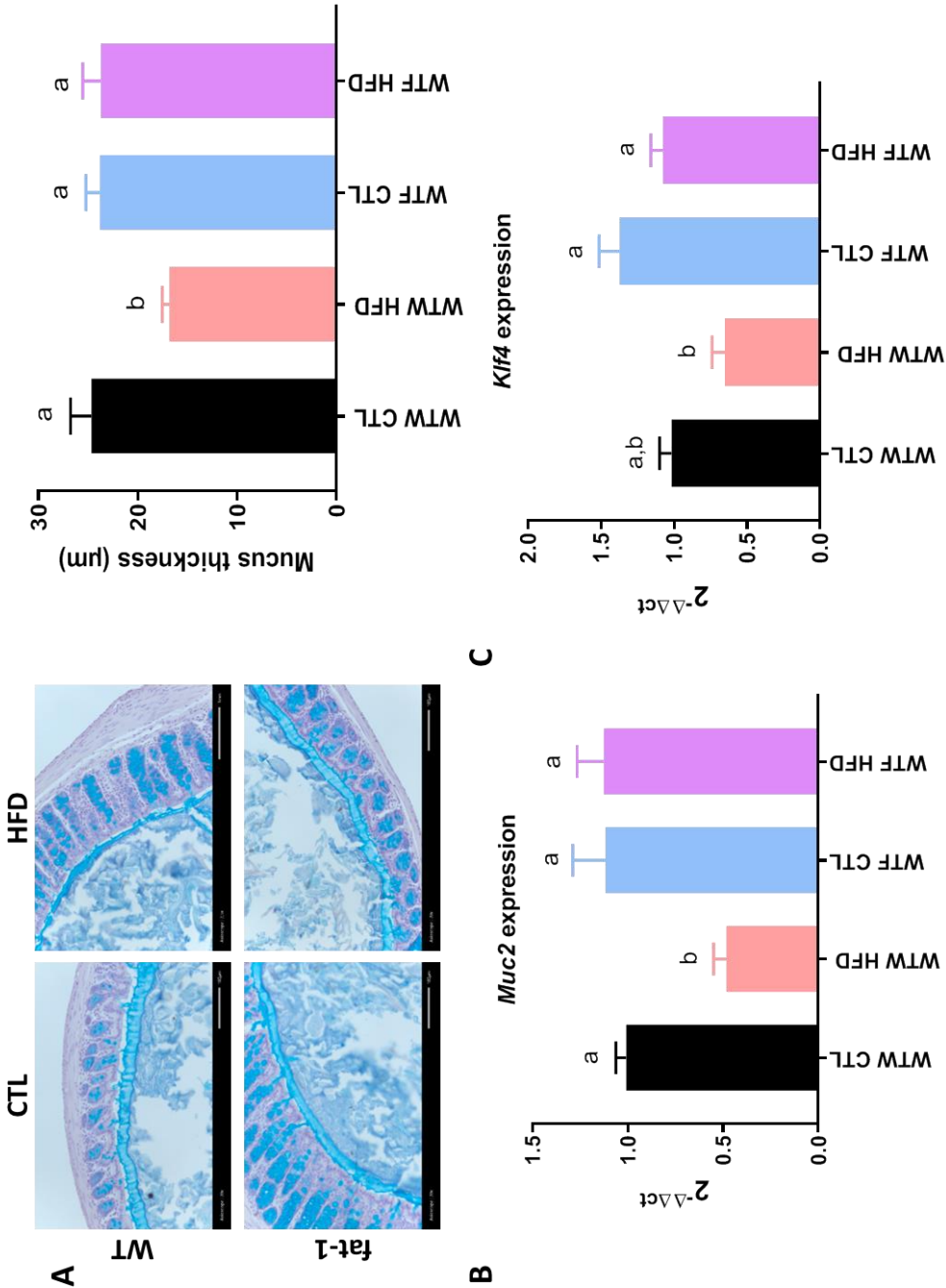
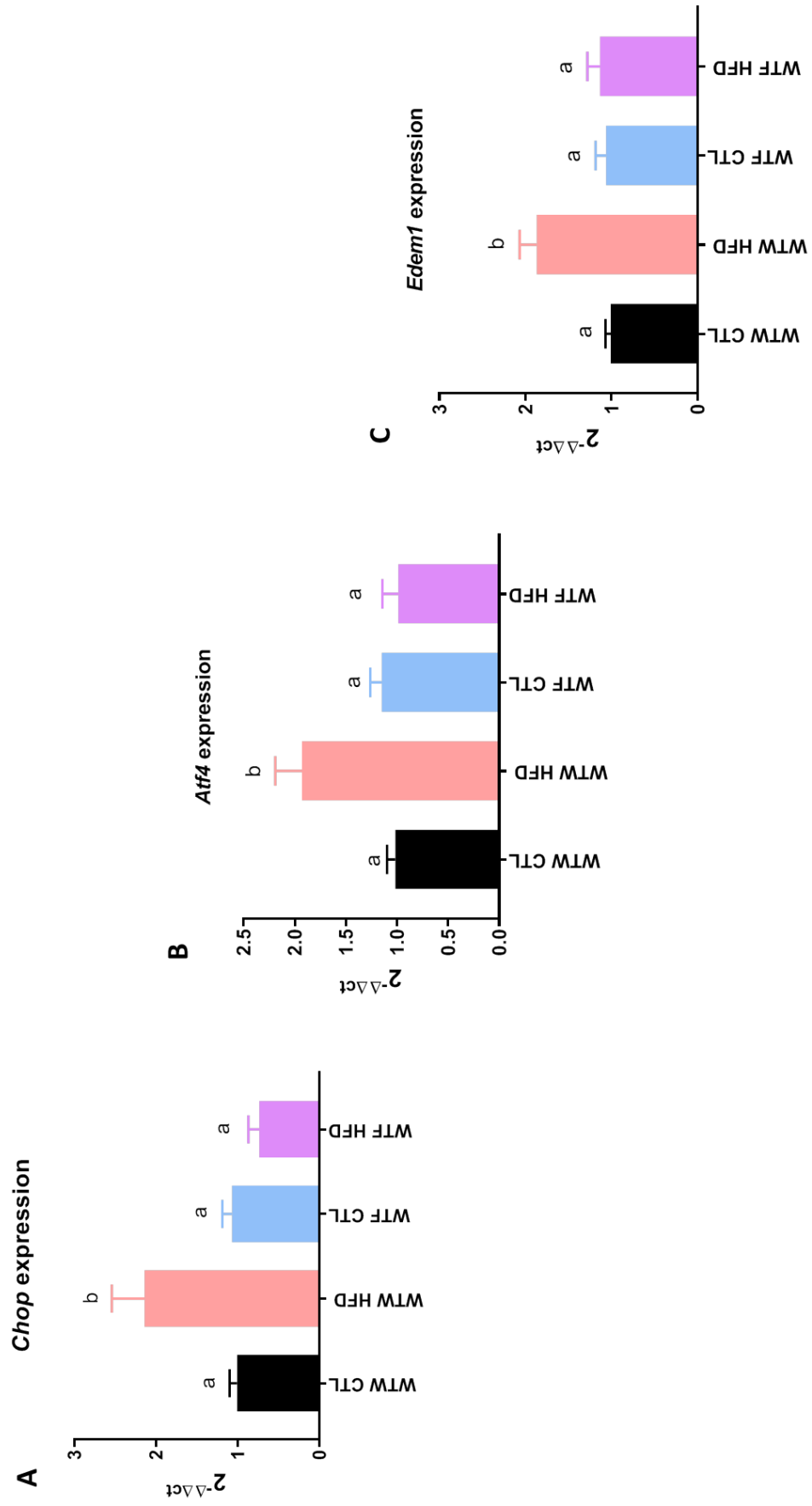


Fig 5: Transplanting fat-1 microbiome protects HFD-fed WT mice against colonic endoplasmic reticulum stress

We previously confirmed that HF feeding induced colonic endoplasmic reticulum stress associated with colonic mucus layer alteration and showed for the first time in the present work that fat-1 mice were protected against colonic endoplasmic reticulum stress. We then investigated the impact of the fat-1 microbiome transplantation in WT mice on HFD-induced endoplasmic reticulum stress. As expected, in WT mice transplanted with WT microbiome a twofold increase of colonic mRNA expressions of *Chop*, *Atf4* and *Edem1* was observed after 10 weeks of HFD. However, in accordance with this remarkable preservation of the integrity of the inner colonic mucus layer, these expressions were not overexpressed in HFD-fed animals transplanted with fat-1 microbiota in which they remained similar to those seen in control groups.

Figure 5 : Transplanting fat-1 microbiome protects HFD-fed WT mice against colonic endoplasmic reticulum stress



DISCUSSION

The mucus layer, which the main protein is the glycoprotein Muc2 produced by intestinal goblet cells (37), forms a physical barrier protecting the underlying epithelium against luminal proinflammatory substances and microbes (38, 39). This mucus layer has been shown to be considerably altered under high fat diets (HFD) (26, 36), which exacerbate alterations of the intestinal barrier, lead to epithelium leakage and then a two-to-threefold increase in serum LPS concentrations, characterizing metabolic endotoxemia (4). Recent data from our team and others, using both dietary supplementation with n-3 PUFAs (40) or the transgenic fat-1 mouse model able to endogenously synthesized n-3 PUFAs (3, 41-43), highlighted that n-3 tissue enrichment protects mice against gut barrier dysfunction and consequently metabolic endotoxemia. Moreover, we very recently evidenced in human colonic goblet LS174T cell line that palmitic acid (abundantly found in HFD) decreases Muc2 production by mainly generating a raise of reticulum endoplasmic stress which detrimentally affects the production of the mucin. Additionally, we showed for the first time, that EPA and DHA were able to prevent the altered Muc2 production induced by palmitic acid, mainly by alleviating reticulum endoplasmic stress (25). Nevertheless, the relevance of such *in vitro* data needed to be explored *in vivo* in a context of dietary obesity. In the present study, we then evidenced that n-3 PUFA enrichment in fat-1 mice was able to protect them against HFD-mediated inner colonic mucus layer alteration. In addition, this protection seemed to occur partly through colonic reticulum stress alleviation. Last but not least, the transfer of caecal microbiome from fat-1 mice was able to prevent the decrease of the inner colonic mucus layer thickness and alleviate colonic ER stress of WT mice fed a HFD.

These data agree with previous studies demonstrating that HFD-induced obesity resulted in a loss of gut barrier integrity including inner colonic mucus layer reduction (26, 44). This has been further supported by the present data showing a downregulation of the major mucus-

forming mucin within the colon - Muc2, Muc4- as well as a decline in goblet cell differentiation factor KLF4 in HFD mice, indicating a direct inhibitory effect by this diet. Indeed, dietary factors influencing mucus synthesis and secretion have already been reported in obese mice and in mice fed a fiber-free diet (35, 45). In accordance with Gulhane and coworkers (36), we also showed that HFD led to ER stress in colonic tissue. This parallels recent evidence pointing to the ability of dietary fats to modulate the composition and function of the mucus layer. For example, mice fed a HFD (rich in saturated fatty acids known to directly initiate ER stress in intestinal epithelial cells) stimulated the goblet cell unfolded protein response (UPR) pathway *via* localized generation of ER stress, resulting in enhanced misfolding of Muc2 and a degeneration of the goblet cell morphology (36). Then, decreased Muc2 secretion will result in a thinner mucus layer (more easily penetrated by diffusing microbial products and more easily degraded by mucin-degrading bacteria) which is supported by the present data and previous reports showing that HFD-induced obese mice display a 50% thinner mucus layer in the proximal colon (26).

Growing evidence supports the idea that gut microbiome plays crucial role in energy homeostasis (46) and chronic inflammation associated with obesity (4, 6). We recently showed that transferring the gut microbiome of fat-1 mice to WT littermates was able to reverse weight gain and to normalize glucose tolerance and intestinal permeability (3). Encouraged by these first successful results, we now focused this work on the mucus layer integrity and hypothesized that n-3-modified microbiome would modulate colonic mucus layer to control gut barrier integrity and diet-induced obesity. In order to develop this assumption, we reiterated the manipulation of the WT gut microbiota by transferring fat-1 microbiome as performed previously (3), except that we used here recipient WT mice never previously treated with antibiotics. Indeed, it has been reported that antibiotics can selectively deplete components of the microbiota due to specific mechanisms of action (47) or even limit the establishment of an

exogenous microbiota as recently discussed (48). We evidenced here that only two transfers of microbiota without prior antibiotic treatment was not only able to alleviate weight gain, improve glucose tolerance and gut barrier function (Fig 3) but also to remarkably preserve the integrity of the inner colonic mucus layer in mice fed the HF diet. This was associated with a prevention of altered-*Muc2* and *Klf4* expressions induced by HFD (Fig 4). These data not only confirm that transferring fat-1 microbiota confers to WT mice protection against metabolic syndrome and intestinal permeability (3) but shed new light on the impact of n-3-altered gut microbiota on gut barrier function in terms of mucus layer preservation. Long term pronounced effects of fat-1 microbiome on such mucus layer protection occurred after only two transfers. This suggests fat-1 microbiome to be powerful enough to reshape durably the WT microbiome and transmit the beneficial effects of n-3 PUFAs. Another novel finding of the present study is that the caecal microbiome transplantation of fat-1 mice to WT totally prevented HFD-induced ER stress in colonic tissues. This can be related to the fact that fat-1 mouse model displays significant differences in caecal microbiota, with elevated levels of *A. muciniphila* species (3), shown to significantly inhibit ER stress when administered to mice (49). *A. muciniphila* is also crucial for the maintenance of mucus layer integrity to reduce systemic LPS levels in mice fed a HFD (26, 50). Moreover, we and others have shown that transplanting microbiota from fat-1 (3) or fish-oil-fed mice (51) protected against adiposity, inflammation and intestinal permeability and highlighted *Akkermansia* as a potential mediator of the improved inflammatory and metabolic phenotype of mice enriched in n-3 PUFAs. Recent data indicated that a membrane protein from *Akkermansia* (Amuc_1100) is involved in such protections (45, 52). We may then assume that n-3-modified microbiome of fat-1 mice rich in *A. muciniphila* would partly prevent mucin misfolding, the subsequent colonic ER stress and an UPR-activated inhibition of *Muc2* transcription with a downstream effect on *Muc2* production in order to maintain gut barrier function in a dietary obesity background.

Taken together, our data suggest that a crosstalk between n-3-modified gut microbiota and the host recipient colonic mucus layer protects against HFD-altered intestinal permeability, metabolic endotoxemia and then associated metabolic perturbations. Then, dietary EPA and DHA supplementation could represent a potential therapeutic nutrient strategy to reduce ER stress-mediated human diseases involving protein misfolding and to preserve colonic epithelial cells in order to prevent obesity and the risk of chronic inflammatory diseases

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), the Regional Council of Bourgogne, the European Regional Development Fund, the University of Bourgogne, the Fondation de France, and by a French Government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d'Avenir” with reference ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC LabEx.

This work was also supported by Valorex, (Combourtillé, France) and the Association Nationale Recherche Technologie (ANRT) for financing the PhD of Quentin Escoula with a CIFRE grant.

Guarantor Statement. Q.E., S.B., M.N. and J.B. are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

“The authors declare no conflict of interest.”

FIGURE LEGENDS

Fig 1: HFD-fed fat-1 mice are protected against inner colonic mucus layer alteration.

Mice (fat-1 transgenic and WT littermates) were fed a CTL or HF diet for 9 weeks. **A:** Representative photographs of Carnoy fixed colonic tissue sections stained with alcian blue/periodic acid-Schiff of WT (*top*) and fat-1 (*bottom*) mice fed a CTL or HF diet (n=8 per group) that were used for mucus layer thickness measurements (Scale bars, 100µm). **B:** Thickness of the adherent inner mucus layer in the colon of WT or fat-1 mice fed a CTL or HF diet and measured by histological analysis after alcian blue staining. **C:** Colonic mRNA expressions of *Muc2*, *Muc4* and the goblet cell differentiation factor *Klf4* (n=8 per group). Data are shown as mean ± SEM, differences were analyzed by Tukey's multiple comparison test and bars assigned different superscript letters (a, b, c) are statistically different at P<0.05. KLF4: Krüppel-like factor 4.

Fig 2: HFD-fed fat-1 mice are protected against reticulum endoplasmic stress increase.

Mice (fat-1 transgenic and WT littermates) were fed a CTL or HF diet for 9 weeks. **A:** Representative photographs (20x objective) of immunohistochemistry for BiP in the distal colon of WT (*top*) and fat-1 mice (*bottom*) fed a CTL or HF diet. **B:** Colonic mRNA expressions of *Chop*, *Edem1* and *Grp78* (n=8 per group). Data are shown as mean ± SEM, differences were analyzed by Tukey's multiple comparison test and bars assigned different superscript letters (a, b, c) are statistically different at P<0.05. Edem1: ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1; BiP: binding immunoglobulin protein; CHOP: C/EBP Homologous Protein.

Fig 3: Transplantation of fat-1 microbiome decreases weight gain, enhances metabolic parameters and alleviates intestinal alteration in mice fed the HFD.

WT mice were transplanted with microbiome of WT or fat-1 mice and fed a CTL or HF diet for 9 weeks. **A:** Weight gain curves (n=8 per group). **B:** OGTT and (inset) mean area under the curve (AUC) measured between 0 and 120min after glucose load (n=6 per group). **C:** Average mass of liver tissue. **D:** Intestinal permeability assay: plasma FITC-dextran 4 (DX, 4,000 molecular weight) oral challenge was measured in mice (n=8 per group) fed the CTL or HF diet for 11 weeks. **E:** Direct plasma quantitation of 3- β -hydroxymyristic (OH) acid concentration by gas chromatography-mass spectrometry in mice fed the CTL or HF diet for 12 weeks (n=8 per group). Data are shown as mean $\pm$ SEM, differences were analyzed by Tukey's multiple comparison test and data with different superscript letters (a, b, c) are significantly different at $P < 0.05$. WTW CTL: WT mice transplanted with microbiota of WT mice fed a CTL diet, WTW HFD: WT mice transplanted with microbiota of WT mice fed a HFD, WTF CTL: WT mice transplanted with microbiota of fat-1 mice fed a CTL diet and WTF HFD: WT mice transplanted with microbiota of fat-1 mice fed a HFD.

Fig 4: Transplantation of the fat-1 microbiome as a relevant way to preserve the integrity of the inner colonic mucus layer in mice fed the HF diet.

WT mice were transplanted with microbiome of WT or fat-1 mice and fed a CTL or HF diet for 9 weeks. **A:** Representative photographs of Carnoy fixed colonic tissue sections stained with alcian blue/periodic acid-Schiff of mice transplanted with the microbiome of WT or fat-1 mice and fed a CTL or HF diet (n=8 per group) that were used for mucus layer thickness measurements (Scale bars, 100 μ m). **B:** Thickness of the adherent inner mucus layer in the colon of WT mice transplanted with the microbiome of WT or fat-1 mice and fed a CTL or HF diet and measured by histological analysis after alcian blue staining. **C:** Colonic mRNA expressions of *Muc2* and *Klf4* (n=8 per group). Data are shown as mean $\pm$ SEM, differences were analyzed by Tukey's multiple comparison test and bars assigned different superscript letters (a, b, c) are

statistically different at $P < 0.05$. WTW CTL: WT mice transplanted with microbiota of WT mice fed a CTL diet, WTW HFD: WT mice transplanted with microbiota of WT mice fed a HFD, WTF CTL: WT mice transplanted with microbiota of fat-1 mice fed a CTL diet and WTF HFD: WT mice transplanted with microbiota of fat-1 mice fed a HFD. KLF4: Krüppel-like factor 4.

Fig 5: Transplanting fat-1 microbiome protects HFD-fed WT mice against colonic endoplasmic reticulum stress

WT mice were transplanted with microbiome of WT or fat-1 mice and fed a CTL or HF diet for 9 weeks. Colonic mRNA expressions of *Chop* (**A**), *Atf4* (**B**) and *Edem1 I* (**C**) (n=8 per group). Data are shown as mean $\pm$ SEM, differences were analyzed by Tukey's multiple comparison test and bars assigned different superscript letters (a, b, c) are statistically different at $P < 0.05$. WTW CTL: WT mice transplanted with microbiota of WT mice fed a CTL diet, WTW HFD: WT mice transplanted with microbiota of WT mice fed a HFD, WTF CTL: WT mice transplanted with microbiota of fat-1 mice fed a CTL diet and WTF HFD: WT mice transplanted with microbiota of fat-1 mice fed a HFD.

REFERENCES

1. Pereira-Lancha LO, Campos-Ferraz PL, & Lancha AH, Jr. (2012) Obesity: considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy* 5:75-87.
2. Maury E & Brichard SM (2010) Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and cellular endocrinology* 314(1):1-16.
3. Bidu C, *et al.* (2018) The Transplantation of omega3 PUFA-Altered Gut Microbiota of fat-1 Mice to Wild-Type Littermates Prevents Obesity and Associated Metabolic Disorders. *Diabetes* 67(8):1512-1523.
4. Cani PD, *et al.* (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56(7):1761-1772.
5. Shoelson SE, Lee J, & Goldfine AB (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116(7):1793-1801.
6. Cani PD, *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.
7. Amar J, *et al.* (2008) Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *The American journal of clinical nutrition* 87(5):1219-1223.
8. Turnbaugh PJ, *et al.* (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457(7228):480-484.
9. Murphy EF, *et al.* (2013) Antimicrobials: Strategies for targeting obesity and metabolic health? *Gut Microbes* 4(1):48-53.
10. Larsen N, *et al.* (2010) Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PloS one* 5(2):e9085.
11. Qin J, *et al.* (2012) A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490(7418):55-60.
12. Schroeder BO (2019) Fight them or feed them: how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterology report* 7(1):3-12.
13. Johansson ME, Larsson JM, & Hansson GC (2011) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 Suppl 1:4659-4665.
14. Pelaseyed T, *et al.* (2014) The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological reviews* 260(1):8-20.
15. Hasnain SZ, *et al.* (2013) IL-10 promotes production of intestinal mucus by suppressing protein misfolding and endoplasmic reticulum stress in goblet cells. *Gastroenterology* 144(2):357-368.e359.
16. Yilmaz E (2017) Endoplasmic Reticulum Stress and Obesity. *Advances in experimental medicine and biology* 960:261-276.
17. Ramos-Lopez O, Riezu-Boj JI, Milagro FI, Moreno-Aliaga MJ, & Martinez JA (2018) Endoplasmic reticulum stress epigenetics is related to adiposity, dyslipidemia, and insulin resistance. *Adipocyte* 7(2):137-142.
18. Ozcan U, *et al.* (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306(5695):457-461.
19. Sharma NK, *et al.* (2008) Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 93(11):4532-4541.
20. Boden G, *et al.* (2008) Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes* 57(9):2438-2444.
21. Salvado L, Palomer X, Barroso E, & Vazquez-Carrera M (2015) Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 26(8):438-448.

22. Green CD & Olson LK (2011) Modulation of palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in pancreatic beta-cells by stearoyl-CoA desaturase and Elovl6. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300(4):E640-649.
23. Peng G, *et al.* (2011) Oleate blocks palmitate-induced abnormal lipid distribution, endoplasmic reticulum expansion and stress, and insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology* 152(6):2206-2218.
24. Pfaffenbach KT, *et al.* (2010) Linking endoplasmic reticulum stress to cell death in hepatocytes: roles of C/EBP homologous protein and chemical chaperones in palmitate-mediated cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(5):E1027-1035.
25. Escoula Q, Bellenger S, Narce M, & Bellenger J (2019) Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic Acids Prevent Altered-Muc2 Secretion Induced by Palmitic Acid by Alleviating Endoplasmic Reticulum Stress in LS174T Goblet Cells. *Nutrients* 11(9).
26. Everard A, *et al.* (2013) Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(22):9066-9071.
27. Katsoulis E, Mabley JG, Samai M, Green IC, & Chatterjee PK (2009) alpha-Linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *European journal of pharmacology* 623(1-3):107-112.
28. Snodgrass RG, *et al.* (2016) Docosahexaenoic acid and palmitic acid reciprocally modulate monocyte activation in part through endoplasmic reticulum stress. *The Journal of nutritional biochemistry* 32:39-45.
29. Zhang Y, Dong L, Yang X, Shi H, & Zhang L (2011) alpha-Linolenic acid prevents endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of stearic acid lipotoxicity on primary rat hepatocytes. *Lipids in health and disease* 10:81.
30. Kang JX, Wang J, Wu L, & Kang ZB (2004) Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature* 427(6974):504.
31. Allegretti JR, *et al.* (2019) Effects of Fecal Microbiota Transplantation With Oral Capsules in Obese Patients. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*.
32. Fevre C, *et al.* (2011) The metabolic cascade leading to eicosanoid precursors--desaturases, elongases, and phospholipases A2--is altered in Zucker fatty rats. *Biochimica et biophysica acta* 1811(6):409-417.
33. Pais de Barros JP, *et al.* (2015) Quantitative lipopolysaccharide analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its combination with the limulus amoebocyte lysate assay. *Journal of lipid research*.
34. Zou Z, *et al.* (2013) Inhibition of the HER2 pathway by n-3 polyunsaturated fatty acids prevents breast cancer in fat-1 transgenic mice. *Journal of lipid research* 54(12):3453-3463.
35. Desai MS, *et al.* (2016) A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* 167(5):1339-1353.e1321.
36. Gulhane M, *et al.* (2016) High Fat Diets Induce Colonic Epithelial Cell Stress and Inflammation that is Reversed by IL-22. *Sci Rep* 6:28990.
37. Johansson ME & Hansson GC (2013) Mucus and the goblet cell. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 31(3-4):305-309.
38. Bansil R & Turner BS (2018) The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Advanced drug delivery reviews* 124:3-15.
39. Johansson ME, Sjövall H, & Hansson GC (2013) The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 10(6):352-361.
40. Mani V, Hollis JH, & Gabler NK (2013) Dietary oil composition differentially modulates intestinal endotoxin transport and postprandial endotoxemia. *Nutr Metab (Lond)* 10(1):6.
41. Kaliannan K, Wang B, Li XY, Kim KJ, & Kang JX (2015) A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. *Sci Rep* 5:11276.
42. Li J, *et al.* (2014) Endogenous omega-3 polyunsaturated fatty acid production confers resistance to obesity, dyslipidemia, and diabetes in mice. *Molecular endocrinology* 28(8):1316-1328.

43. Bellenger J, Bellenger S, Escoula Q, Bidu C, & Narce M (2019) N-3 polyunsaturated fatty acids: an innovative strategy against obesity and related metabolic disorders, intestinal alteration and gut microbiota dysbiosis. *Biochimie*.
44. Turnbaugh PJ, *et al.* (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444(7122):1027-1031.
45. Plovier H, *et al.* (2017) A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nature medicine* 23(1):107-113.
46. Backhed F, *et al.* (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(44):15718-15723.
47. Manichanh C, *et al.* (2010) Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake. *Genome research* 20(10):1411-1419.
48. Kennedy EA, King KY, & Baldridge MT (2018) Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria. *Frontiers in physiology* 9:1534.
49. Zhao S, *et al.* (2017) *Akkermansia muciniphila* improves metabolic profiles by reducing inflammation in chow diet-fed mice. *Journal of molecular endocrinology* 58(1):1-14.
50. Belzer C & de Vos WM (2012) Microbes inside--from diversity to function: the case of *Akkermansia*. *ISME J* 6(8):1449-1458.
51. Caesar R, Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Cani PD, & Backhed F (2015) Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell metabolism* 22(4):658-668.
52. Depommier C, *et al.* (2019) Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nature medicine* 25(7):1096-1103.

III. Conclusion

Dans cet article, nous nous sommes focalisés sur une partie bien spécifique de la barrière intestinale : la couche de mucus colique. Nous avons observé qu'un enrichissement tissulaire en oméga 3 permettait de prévenir l'altération de la couche de mucus colique interne induite par un régime riche en graisses. Afin de comprendre le rôle du microbiote intestinal des souris fat-1 dans leur capacité à maintenir l'intégrité de leur couche de mucus en conditions obésogéniques, nous avons transplanté le microbiote de ces souris à des souris sauvages que nous avons ensuite nourries avec un régime contrôle ou un régime obésogène. Nous avons choisi ici de ne pas traiter préalablement les souris receveuses aux antibiotiques mais d'apporter directement le microbiote. En effet, l'utilisation d'antibiotiques est de plus en plus critiquée dans les études du microbiote car ils orienteraient la composition du microbiote transplanté (Lundberg et al., 2016) et impacteraient également défavorablement la fonction barrière de l'intestin (Feng et al., 2019). Nous avons observé que l'apport du microbiote de souris fat-1 à des souris sauvages, permettait en partie de prévenir la prise de poids, les altérations métaboliques et intestinales induites par le régime obésogène.

Nous avons également observé que le microbiote de souris de fat-1, transplanté dans des souris sauvages nourries avec un régime obésogène, permettait de prévenir la diminution de l'épaisseur de la couche de mucus colique ainsi que la diminution de l'expression des gènes *Muc2* et *Klf4*. De plus, les souris transplantées avec le microbiote de souris fat-1 sont protégées de l'augmentation du stress du réticulum endoplasmique colique induit par le régime obésogène.

Ces résultats nous permettent de mieux comprendre comment le microbiote de souris fat-1 participe à prévenir l'altération de la fonction barrière de l'intestin. Nous mettons en avant ici la capacité du microbiote de souris fat-1, modulé par les oméga 3, à maintenir l'intégrité de la couche de mucus colique en conditions obésogéniques. De plus, nous avons montré que, pour que la transplantation soit efficace, il n'était pas nécessaire d'avoir recours au préalable à des antibiotiques, ce qui ouvre de nouvelles possibilités quant à l'utilisation de ces transplantations à visée thérapeutique, notamment dans la prise en charge des maladies métaboliques.

Ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives et notamment celle de déterminer les espèces bactériennes, ou métabolites bactériens, expliquant la transmission du phénotype mince des souris fat-1 et la résistance de celles-ci vis-à-vis des maladies métaboliques.

Chapitre 5 : Discussion générale, conclusions et Perspectives

Un effet préventif d'un enrichissement en n-3 (lors de suppléments nutritionnelles ou dans le modèle de souris fat-1) vis-à-vis de l'endotoxémie métabolique et de l'inflammation de bas grade associées aux maladies métaboliques a été rapporté récemment (Simopoulos, 2016; Bidu et al., 2018). En accord avec de précédents travaux (Kim et al., 2012; Li et al., 2014), nous avons montré que la souris fat-1 était protégée d'une prise de poids induite par un régime obésogène. Cette protection est en partie due à une augmentation de la dépense énergétique (Li et al., 2014) et à une augmentation de l'expression d'UCP1 dans le tissu adipeux (Bidu et al., 2018). Nous avons également observé que la souris fat-1 était protégée des altérations métaboliques induites par un régime obésogène, notamment de la stéatose hépatique, l'intolérance au glucose et l'inflammation du tissu adipeux. Ces résultats sont en accord avec ceux de Kim et collaborateurs et Li et collaborateurs qui ont montré une prévention de l'accumulation de lipides hépatiques et de l'hypercholestérolémie induites par un régime obésogène chez la souris fat-1 (Kim et al., 2012; Li et al., 2014). De plus, comparativement à la souris de type sauvage, la souris fat-1 présente, en association à une forte diminution du ratio n-6/n-3, une augmentation de la captation musculaire du glucose circulant indépendamment de la présence d'insuline. Cet effet protecteur pourrait être attribué à une augmentation de la synthèse musculaire de docosanoïdes. En effet, White et collaborateurs ont rapporté une augmentation de 176% de la teneur en résolvine PD1 dans le tissu musculaire de souris fat-1 par rapport à celui de souris sauvages (White et al., 2014). De même, il a été rapporté, dans la même étude, une augmentation de la sensibilité à l'insuline chez des souris db/db supplémentées en PD1.

L'endotoxémie métabolique, associée à l'inflammation chronique de bas grade observée lors de l'obésité (Cani et al., 2007b), résulte d'une altération de la perméabilité intestinale (Brun et al., 2007). En effet, il a notamment été montré que lors de la consommation d'un régime obésogène, l'expression de protéines de jonction (ZO-1 notamment) est diminuée, conduisant à une perte de cohésion des cellules de l'épithélium intestinal et donc à une augmentation de la perméabilité (Ahmad et al., 2017). Nos travaux ont mis en évidence que, lors de la consommation d'un régime riche en graisses, les souris fat-1 sont protégées d'une altération de la barrière intestinale et de l'endotoxémie métabolique associée. Ainsi, l'enrichissement tissulaire en n-3 permet de prévenir la diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées, telles que ZO-1, observée en conditions obésogènes et de maintenir l'intégrité de la barrière intestinale.

Le microbiote intestinal est reconnu comme étant un acteur majeur de l'homéostasie intestinale (Zhang et al., 2018) et énergétique (Bäckhed et al., 2004). C'est pourquoi nous avons étudié l'implication du microbiote intestinal dans les effets préventifs des AGPI en n-3 chez la souris fat-1 lors de l'obésité et des effets métaboliques associés. Une analyse de la composition du microbiote caecal nous a permis de mettre en évidence que les souris fat-1 présentaient une plus grande diversité phylogénique bactérienne que les souris sauvages nourries avec le même régime obésogène, avec notamment une plus grande abondance du genre *Bacteroidetes*. Nous avons également observé une augmentation de l'abondance de l'espèce *Akkermansia muciniphila* dans le groupe fat-1, bactérie connue pour ses effets préventifs vis-à-vis de l'obésité et des altérations métaboliques (Everard et al., 2013) et intestinales associées (Plovier et al., 2017), comme discuté dans le chapitre 2. La modulation du microbiote par un enrichissement tissulaire en n-3 pourrait s'expliquer en partie par le fait que les bactéries intestinales s'enrichiraient en oméga 3 en se nourrissant de cellules épithéliales en constant renouvellement, pouvant conduire ainsi à des modifications compositionnelles et fonctionnelles du microbiote. De plus, l'enrichissement tissulaire en n-3 permettrait également d'activer des « systèmes de défense antibactériens » tels que les défensines (voir chapitre 2), lysozymes ou sécrétion de mucus colique (voir chapitre 3) qui peuvent à leur tour moduler le microbiote.

Afin d'évaluer le rôle du microbiote intestinal dans le maintien du phénotype mince de la souris fat-1 sous régime obésogène, nous avons transplanté le microbiote de souris fat-1 chez des souris sauvages préalablement traitées à la streptomycine afin de très fortement diminuer le microbiote résidant et faciliter l'installation du microbiote exogène. Nous avons montré que ce transfert de microbiote chez des souris sauvages les protégeait en partie des altérations métaboliques et intestinales induites par 18 semaines de régime obésogène. Ces expériences de transplantation ont ainsi permis de mettre en évidence l'effet préventif du microbiote intestinal modulé par les n-3, vis-à-vis de l'obésité et des troubles associés.

Cependant, des études complémentaires doivent être conduites afin de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués, et identifier des espèces bactériennes, ou leurs métabolites, qui pourraient être impliquées dans le maintien d'un phénotype mince en présence d'un régime obésogène.

Après nous être intéressés à la composante épithéliale, nous nous sommes intéressés à la couche de mucus intestinal, composante importante de la fonction barrière de l'intestin. Il est aujourd'hui clairement démontré que lors d'un régime obésogène riche en acides gras

saturés (notamment en acide palmitique), l'épaisseur de la couche de mucus intestinal, dont la glycoprotéine MUC2 produite par les cellules caliciformes est la protéine principale, est diminuée, favorisant ainsi une augmentation de la perméabilité intestinale et l'installation d'une endotoxémie métabolique (Cani et al., 2007b; Gulhane et al., 2016). A notre connaissance, aucune étude ne s'était intéressée jusqu'alors au potentiel rôle préventif des AGPI en n-3 sur l'altération de la couche de mucus lors d'un régime obésogène. Pour cela, nous avons utilisé deux approches : une première, *in vitro* utilisant un modèle cellulaire humain LS174T, issu de cellules cancéreuses coliques humaines, et une seconde *in vivo*, utilisant le modèle de souris transgéniques fat-1.

Dans la première approche, nous avons tout d'abord montré qu'un traitement des cellules LS174T avec de l'acide palmitique diminuait la sécrétion de MUC2 associée à une augmentation du stress du RE et que seuls l'EPA et le DHA étaient capables de prévenir ce stress et de rétablir la sécrétion de la protéine MUC2.

Ces résultats sont en accord avec de précédentes études montrant que l'acide palmitique induisait une augmentation du stress du RE dans de nombreux modèles cellulaires (Jung et al., 2012; Lee et al., 2018; Zhang et al., 2012) et une diminution de l'expression génique de *Muc2* et de *Klf4* associée à une diminution de la synthèse de MUC2 dans des cellules LS174T traitées avec 500 μ m d'acide palmitique (Gulhane et al. 2016). Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'acide palmitique induit un stress cellulaire qui active le système Unfold Protein Response (UPR) conduisant, en cas de non résolution, à l'activation de protéines du stress du RE (Karagöz et al., 2019). Il a par ailleurs été montré que l'activation du système UPR diminuait la production de la forme mature de MUC2 (hautement glycosylée) au profit de forme immature non-glycosylée (Gulhane et al., 2016). Nous avons montré dans notre étude que l'acide palmitique induisait un stress du RE dans le modèle LS174T, comparable à celui obtenu avec des activateurs pharmacologiques tels que la thapsigargine, ou la tunicamycine (Guha et al., 2017). Nous avons ensuite montré qu'une inhibition de ce stress par la protéine chaperonne 4-PBA permettait de maintenir la sécrétion de MUC2 malgré la présence d'acide palmitique, confirmant ainsi le lien direct entre stress du RE et altération de la production de MUC2.

A notre connaissance, cette étude est la première à montrer que l'EPA et le DHA sont capables de prévenir du stress du RE induit par l'acide palmitique dans les cellules LS174T. Ces résultats sont en accord avec d'autres études ayant montré l'effet préventif du DHA vis-à-vis du stress du RE induit par l'acide palmitique dans des hépatocytes primaires murins (Zheng et al., 2016), des pré-adipocytes murins (Woodworth-Hobbs et al., 2017) et des cellules

musculaires C2C12 (Guo et al., 2007). Cette prévention du stress du RE permet le maintien de la sécrétion de MUC2 et pourrait s'expliquer par les propriétés anti-inflammatoires de médiateurs lipidiques de l'EPA et/ou du DHA (résolvines, protectines). En effet, de tels effets ont été montrés dans des cellules HepG2, *via* l'activation de la voie JNK (Jung et al., 2014). De plus, cette prévention du stress du RE pourrait également passer en partie par une activation de l'activated protein kinase (AMPK) par l'EPA et le DHA tel que suggéré par les travaux de Yang et collaborateurs (Yang et al., 2017).

Contrairement à des travaux antérieurs rapportés dans la littérature (Katsoulis et al., 2009; Zhang et al., 2011) nous n'avons pas observé d'effet préventif de l'acide α -linoléique vis-à-vis du stress du RE, ni par conséquent de l'altération de la sécrétion de MUC2 induite par l'acide palmitique. Plusieurs études ont rapporté des effets différents du DHA et du LNA, notamment vis-à-vis de l'oxydation induite par l'acide palmitique dans des myoblastes C2C12 (Pinel et al., 2016) ou des myotubes L6 (Pimenta et al., 2008) : l'oxydation induite par l'acide palmitique est diminuée par l'EPA et le DHA mais pas par le LNA. De plus, il a été montré que l'acide palmitique induit la formation de composés lipotoxiques – diglycérides, céramides - (Chavez et al., 2003) qui peut être diminuée par l'EPA et le DHA. Ces derniers induisent également la synthèse de triglycérides et l'oxydation mitochondriale de l'acide palmitique. En accord avec les résultats de Pinel et collaborateurs, le LNA ne permettrait donc pas de prévenir l'incorporation d'acide palmitique dans les diglycérides, de réduire le stress du RE et par conséquent, de prévenir l'altération de la sécrétion de MUC2. Ces résultats indiquent donc qu'un régime enrichi en LNA ne représenterait pas une alternative à l'utilisation d'une huile de poisson (riche en DHA et EPA) afin de maintenir une sécrétion normale de MUC2 en conditions obésogènes.

Lors de l'obésité alimentaire, plusieurs études ont rapporté, chez la souris, une diminution de l'épaisseur et une altération de la fonction barrière de la couche de mucus colique (Gulhane et al., 2016; Schroeder, 2019) notamment via une augmentation du stress du réticulum endoplasmique des cellules coliques.

Dans la seconde approche, nous avons confirmé que des souris de type sauvage, nourries avec un régime obésogène, présentaient une diminution de moitié de l'épaisseur de la couche de mucus interne et montrons, pour la première fois, que l'épaisseur de cette couche de mucus est préservée (voire renforcée) chez la souris fat-1, s'accompagnant également d'un

maintien de l'expression de *Muc2* et *Klf4* ainsi que d'une prévention du stress du RE colique induites par le régime obésogène. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus *in vitro*.

Nous avons ensuite cherché à comprendre le rôle du microbiote intestinal des souris fat-1 lors de la prévention des altérations de l'épaisseur de la couche de mucus colique. Pour cela, nous avons évalué l'impact d'un transfert de microbiote de souris fat-1 à des souris sauvages, nourries ensuite avec un régime obésogène. Contrairement à l'étude précédente de transplantation de microbiote, nous avons fait le choix de ne pas traiter préalablement les souris receveuses aux antibiotiques. En effet, ces derniers peuvent favoriser des compétitions entre cellules transplantées et résidentes ou des comportements opportunistes (Kennedy et al., 2018) et ainsi entraîner des biais expérimentaux. Ainsi, deux transferts de microbiote caecal de souris sauvages ou de souris fat-1 ont été réalisés à une semaine d'intervalle, chez des souris sauvages nourries avec un régime contrôle. Deux semaines plus tard, la moitié des souris a été nourrie avec un régime obésogène et l'autre moitié a été maintenue au régime contrôle.

Nos résultats ont montré que deux transferts de microbiote de souris fat-1, sans traitement antibiotique, permettaient de prévenir en partie la prise de poids et les altérations métaboliques induites par un régime obésogène et de protéger d'une altération de la perméabilité intestinale, en particulier *via* une préservation de l'épaisseur de la couche de mucus colique. Au contraire, deux transferts de microbiote de souris sauvages restent sans effet préventif. Nous avons également montré que ce maintien de l'épaisseur de la couche de mucus colique après transfert de microbiote de souris fat-1 est lié à un maintien de l'expression de *Muc2* et de *Klf4* ainsi qu'à une prévention du stress du RE de l'épithélium colique.

Une étude complémentaire a ensuite été effectuée avec une transplantation de microbiote toutes les deux semaines durant les 18 semaines de régime afin de tenter d'exacerber le phénotype. Les résultats n'ont cependant pas mis en évidence d'effets plus marqués que lors de deux transferts de microbiote.

L'ensemble de ces résultats nous permet de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'altération de la couche de mucus en conditions obésogènes. Nous avons en effet montré que :

- l'acide palmitique induit une augmentation du stress du RE conduisant à une diminution de la sécrétion de MUC2 dans les cellules LS174T.
- l'EPA et le DHA permettent de prévenir l'induction du stress du RE et de maintenir une sécrétion de MUC2 normale malgré la présence d'acide palmitique.

- l'épaisseur de la couche de mucus colique est diminuée par un régime obésogène en lien avec un stress du RE chez les souris sauvages. Les souris fat-1, enrichies en AGPI en n-3, sont quant à elles protégées de cette diminution et sont également préservées d'une induction du stress du RE.
- le microbiote de souris fat-1, transplanté chez des souris sauvages, permet de prévenir la diminution de l'épaisseur de la couche de mucus colique et le stress du RE induits par un régime obésogène.

En perspectives de ce travail, il conviendrait désormais de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans ces effets préventifs de l'EPA et du DHA, et notamment de déterminer si cette protection pourrait passer par une activation du récepteur GPR120 (Oh et al., 2010), par l'effet de médiateurs lipidiques anti-inflammatoires issus de l'EPA et/ou du DHA (résolvines, protectines) (Jung et al., 2014) ou encore par la modulation des membranes cellulaires et notamment des radeaux lipidiques qui sont impliqués dans de nombreuses cascades de signalisation (Stillwell, 2006).

Il conviendrait également de déterminer les voies par lesquelles les AGPI en n-3 modulent le microbiote intestinal : soit par un effet direct sur les bactéries, soit par une modulation au niveau de l'hôte, via une sécrétion de peptides antimicrobiens ou une modulation du mucus, qui indirectement modulerait la composition et la fonction du microbiote.

Il serait ensuite intéressant de déterminer « qui » ou « quoi » au niveau du microbiote des souris fat-1 est impliqué dans le maintien de l'épaisseur de la couche de mucus et de la prévention du stress du RE induit par un régime obésogénique. En effet, il serait intéressant d'identifier des bactéries impliquées dans ces effets préventifs du microbiote des souris fat-1 par des transplantations de suspensions ne contenant qu'un seul type de bactérie pour évaluer l'effet spécifique de cette bactérie sur l'hôte. Nous pourrions également déterminer si ces effets préventifs du microbiote proviendraient non pas de l'installation d'un type de bactérie mais de la présence de certains métabolites ou protéines bactériennes. Dans ce sens, Cani et collaborateurs ont montré que les effets protecteurs de la bactérie *Akkermansia muciniphila* ne nécessitaient pas la présence de la bactérie vivante (Plovier et al., 2017). En effet, ces auteurs ont montré que l'effet protecteur était maintenu, voir exacerbé, lorsque la bactérie était pasteurisée avant inoculation. De plus ils ont identifié la protéine Amuc_1100, composante de la paroi d'*Akkermansia muciniphila*, comme suffisante pour prévenir les altérations métaboliques et intestinales induites par un régime obésogène. Il serait donc intéressant d'identifier des protéines ou métabolites bactériens impliqués dans l'effet préventif du

microbiote de souris fat-1 vis-à-vis des altérations métaboliques et intestinales induites par un régime obésogène.

Chapitre 6 : Bibliographie

- Abdallah Ismail, N., Ragab, S.H., Abd Elbaky, A., Shoeib, A.R.S., Alhosary, Y., and Fekry, D. (2011). Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. *Arch Med Sci* 7, 501–507.
- Abdelhamid, A.S., Brown, T.J., Brainard, J.S., Biswas, P., Thorpe, G.C., Moore, H.J., Deane, K.H., AlAbdulghafoor, F.K., Summerbell, C.D., Worthington, H.V., et al. (2018). Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Aguiar-Pulido, V., Huang, W., Suarez-Ulloa, V., Cickovski, T., Mathee, K., and Narasimhan, G. (2016). Metagenomics, Metatranscriptomics, and Metabolomics Approaches for Microbiome Analysis. *Evol Bioinform Online* 12, 5–16.
- Ahmad, R., Rah, B., Bastola, D., Dhawan, P., and Singh, A.B. (2017). Obesity-induces Organ and Tissue Specific Tight Junction Restructuring and Barrier Deregulation by Claudin Switching. *Sci Rep* 7, 5125.
- Ailhaud, G., Massiera, F., Weill, P., Legrand, P., Alessandri, J.-M., and Guesnet, P. (2006). Temporal changes in dietary fats: role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity. *Prog. Lipid Res.* 45, 203–236.
- Albenberg, L., Esipova, T.V., Judge, C.P., Bittinger, K., Chen, J., Laughlin, A., Grunberg, S., Baldassano, R.N., Lewis, J.D., Li, H., et al. (2014). Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology* 147, 1055-1063.e8.
- Alekseeva, R.I., Sharafetdinov, K.K., Plotnikova, O.A., Meshcheriakova, V.A., Mal'tsev, G.I., and Kulakova, S.N. (2000). [Effects of a diet including linseed oil on clinical and metabolic parameters in patients with type 2 diabetes mellitus]. *Vopr Pitan* 69, 32–35.
- An, R., Ji, M., Yan, H., and Guan, C. (2018). Impact of ambient air pollution on obesity: a systematic review. *Int J Obes (Lond)* 42, 1112–1126.
- Andrianifahanana, M., Moniaux, N., and Batra, S.K. (2006). Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1765, 189–222.
- Anhê, F.F., Varin, T.V., Le Barz, M., Desjardins, Y., Levy, E., Roy, D., and Marette, A. (2015). Gut Microbiota Dysbiosis in Obesity-Linked Metabolic Diseases and Prebiotic Potential of Polyphenol-Rich Extracts. *Curr Obes Rep* 4, 389–400.
- Arbolea, S., Solís, G., Fernández, N., de los Reyes-Gavilán, C.G., and Gueimonde, M. (2012). Facultative to strict anaerobes ratio in the preterm infant microbiota: a target for intervention? *Gut Microbes* 3, 583–588.
- Arike, L., Holmén-Larsson, J., and Hansson, G.C. (2017). Intestinal Muc2 mucin O-glycosylation is affected by microbiota and regulated by differential expression of glycosyltransferases. *Glycobiology* 27, 318–328.
- Asarat, M., Apostolopoulos, V., Vasiljevic, T., and Donkor, O. (2016). Short-Chain Fatty Acids Regulate Cytokines and Th17/Treg Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells in vitro. *Immunol. Invest.* 45, 205–222.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *PNAS* 101, 15718–15723.
- Bafna, S., Singh, A.P., Moniaux, N., Eudy, J.D., Meza, J.L., and Batra, S.K. (2008). MUC4, a Multifunctional Transmembrane Glycoprotein, Induces Oncogenic Transformation of NIH3T3 Mouse Fibroblast Cells. *Cancer Res* 68, 9231–9238.
- Bahceci, M., Gokalp, D., Bahceci, S., Tuzcu, A., Atmaca, S., and Arikan, S. (2007). The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults? *J. Endocrinol. Invest.* 30, 210–214.

- Baldwin, A.C., Green, C.D., Olson, L.K., Moxley, M.A., and Corbett, J.A. (2012). A role for aberrant protein palmitoylation in FFA-induced ER stress and β -cell death. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **302**, E1390-1398.
- Balfegó, M., Canivell, S., Hanzu, F.A., Sala-Vila, A., Martínez-Medina, M., Murillo, S., Mur, T., Ruano, E.G., Linares, F., Porras, N., et al. (2016). Effects of sardine-enriched diet on metabolic control, inflammation and gut microbiota in drug-naïve patients with type 2 diabetes: a pilot randomized trial. *Lipids Health Dis* **15**.
- Ballester, O.F.F., Fahrman, J., Witte, T., Ballester, G., and Hardman, W.E. (2010). Oral Supplementation with Omega3 Fatty Acids Inhibits NFkB Activation In Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Cells. *Blood* **116**, 4607–4607.
- Bansil, R., and Turner, B.S. (2018). The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **124**, 3–15.
- Basu, S., Haghiac, M., Surace, P., Challier, J.-C., Guerre-Millo, M., Singh, K., Waters, T., Minium, J., Presley, L., Catalano, P.M., et al. (2011). Pregravid obesity associates with increased maternal endotoxemia and metabolic inflammation. *Obesity (Silver Spring)* **19**, 476–482.
- Beccuti, G., and Pannain, S. (2011). Sleep and obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **14**, 402–412.
- Berry, D., Stecher, B., Schintlmeister, A., Reichert, J., Brugiroux, S., Wild, B., Wanek, W., Richter, A., Rauch, I., Decker, T., et al. (2013). Host-compound foraging by intestinal microbiota revealed by single-cell stable isotope probing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 4720–4725.
- Bertrand, C., Pignalosa, A., Wanecq, E., Rancoule, C., Batut, A., Deleruyelle, S., Lionetti, L., Valet, P., and Castan-Laurell, I. (2013). Effects of dietary eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation in high-fat fed mice on lipid metabolism and apelin/APJ system in skeletal muscle. *PLoS ONE* **8**, e78874.
- Biasucci, G., Rubini, M., Riboni, S., Morelli, L., Bessi, E., and Retetangos, C. (2010). Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum. Dev.* **86 Suppl 1**, 13–15.
- Bidu, C., Escoula, Q., Bellenger, S., Spor, A., Galan, M., Geissler, A., Bouchot, A., Dardevet, D., Morio, B., Cani, P.D., et al. (2018a). The Transplantation of ω 3 PUFA-Altered Gut Microbiota of fat-1 Mice to Wild-Type Littermates Prevents Obesity and Associated Metabolic Disorders. *Diabetes* **67**, 1512–1523.
- Bidu, C., Escoula, Q., Bellenger, S., Spor, A., Galan, M., Geissler, A., Bouchot, A., Dardevet, D., Morio, B., Cani, P.D., et al. (2018b). The Transplantation of ω 3 PUFA-Altered Gut Microbiota of fat-1 Mice to Wild-Type Littermates Prevents Obesity and Associated Metabolic Disorders. *Diabetes* **67**, 1512–1523.
- Birchenough, G.M.H., Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., Bergström, J.H., and Hansson, G.C. (2015). New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol* **8**, 712–719.
- Blasco-Baque, V., Garidou, L., Pomié, C., Escoula, Q., Loubieres, P., Le Gall-David, S., Lemaitre, M., Nicolas, S., Klopp, P., Waget, A., et al. (2017). Periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. *Gut* **66**, 872–885.
- Boekhorst, J., Helmer, Q., Kleerebezem, M., and Siezen, R.J. (2006). Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology (Reading, Engl.)* **152**, 273–280.
- Bouskra, D., Brézillon, C., Bérard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I.G., and Eberl, G. (2008). Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* **456**, 507–510.
- Boutagy, N.E., McMillan, R.P., Frisard, M.I., and Hulver, M.W. (2016). Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? *Biochimie* **124**, 11–20.
- Brandl, K., and Schnabl, B. (2017). The intestinal microbiota and NASH. *Curr Opin Gastroenterol* **33**, 128–133.

- Brignardello, J., Morales, P., Diaz, E., Romero, J., Brunser, O., and Gotteland, M. (2010). Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 32, 1307–1314.
- Brun, P., Castagliuolo, I., Di Leo, V., Buda, A., Pinzani, M., Palù, G., and Martines, D. (2007). Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G518-525.
- Burger-van Paassen, N., Vincent, A., Puiman, P.J., van der Sluis, M., Bouma, J., Boehm, G., van Goudoever, J.B., van Seuningen, I., and Renes, I.B. (2009). The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem. J.* 420, 211–219.
- Caesar, R., Tremaroli, V., Kovatcheva-Datchary, P., Cani, P.D., and Bäckhed, F. (2015). Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metab.* 22, 658–668.
- Cai, D., Yuan, M., Frantz, D.F., Melendez, P.A., Hansen, L., Lee, J., and Shoelson, S.E. (2005). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat. Med.* 11, 183–190.
- Campeotto, F., Waligora-Dupriet, A.-J., Doucet-Populaire, F., Kalach, N., Dupont, C., and Butel, M.-J. (2007). [Establishment of the intestinal microflora in neonates]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 31, 533–542.
- Canfora, E.E., Meex, R.C.R., Venema, K., and Blaak, E.E. (2019). Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nat Rev Endocrinol.*
- Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., et al. (2007a). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761–1772.
- Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., et al. (2007b). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761–1772.
- Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., and Burcelin, R. (2008). Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* 57, 1470–1481.
- Cattaneo, A., Cattane, N., Galluzzi, S., Provasi, S., Lopizzo, N., Festari, C., Ferrari, C., Guerra, U.P., Paghera, B., Muscio, C., et al. (2017). Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol. Aging* 49, 60–68.
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J.E., Diehl, A.M., Brunt, E.M., Cusi, K., Charlton, M., Sanyal, A.J., American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, et al. (2012). The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology* 142, 1592–1609.
- Chambers, E.S., Preston, T., Frost, G., and Morrison, D.J. (2018). Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. *Curr Nutr Rep* 7, 198–206.
- Chavez, J.A., Knotts, T.A., Wang, L.-P., Li, G., Dobrowsky, R.T., Florant, G.L., and Summers, S.A. (2003). A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 278, 10297–10303.
- Chelakkot, C., Ghim, J., and Ryu, S.H. (2018). Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med* 50, 1–9.

- Cheru, L., Saylor, C.F., and Lo, J. (2019). Gastrointestinal Barrier Breakdown and Adipose Tissue Inflammation. *Curr Obes Rep* 8, 165–174.
- Chimerel, C., Emery, E., Summers, D.K., Keyser, U., Gribble, F.M., and Reimann, F. (2014). Bacterial Metabolite Indole Modulates Incretin Secretion from Intestinal Enteroendocrine L Cells. *Cell Rep* 9, 1202–1208.
- Choi, J., Joseph, L., and Pilote, L. (2013). Obesity and C-reactive protein in various populations: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 14, 232–244.
- Chopra, M., Galbraith, S., and Darnton-Hill, I. (2002). A global response to a global problem: the epidemic of overnutrition. *Bulletin of the World Health Organization* 7.
- Christiansen, C.B., Gabe, M.B.N., Svendsen, B., Dragsted, L.O., Rosenkilde, M.M., and Holst, J.J. (2018). The impact of short-chain fatty acids on GLP-1 and PYY secretion from the isolated perfused rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 315, G53–G65.
- Clària, J., Dalli, J., Yacoubian, S., Gao, F., and Serhan, C.N. (2012). Resolvin D1 and Resolvin D2 Govern Local Inflammatory Tone in Obese Fat. *The Journal of Immunology* 189, 2597–2605.
- Clemente-Postigo, M., Oliva-Olivera, W., Coin-Aragüez, L., Ramos-Molina, B., Giraldez-Perez, R.M., Lhamyani, S., Alcaide-Torres, J., Perez-Martinez, P., El Bekay, R., Cardona, F., et al. (2019). Metabolic endotoxemia promotes adipose dysfunction and inflammation in human obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 316, E319–E332.
- Clevers, H.C., and Bevins, C.L. (2013). Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 289–311.
- Cordain, L., Eaton, S.B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B.A., O’Keefe, J.H., and Brand-Miller, J. (2005). Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81, 341–354.
- Costa, F., Mumolo, M.G., Ceccarelli, L., Bellini, M., Romano, M.R., Sterpi, C., Ricchiuti, A., Marchi, S., and Bottai, M. (2005). Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn’s disease. *Gut* 54, 364–368.
- Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P., and Macfarlane, G.T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28, 1221–1227.
- Daak, A.A., Elderderly, A.Y., Elbashir, L.M., Mariniello, K., Mills, J., Scarlett, G., Elbashir, M.I., and Ghebremeskel, K. (2015). Omega 3 (n-3) fatty acids down-regulate nuclear factor-kappa B (NF-κB) gene and blood cell adhesion molecule expression in patients with homozygous sickle cell disease. *Blood Cells Mol. Dis.* 55, 48–55.
- De La Cochetière, M.F., Durand, T., Lepage, P., Bourreille, A., Galmiche, J.P., and Doré, J. (2005). Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5588–5592.
- De Lorenzo, A., Gratteri, S., Gualtieri, P., Cammarano, A., Bertucci, P., and Di Renzo, L. (2019). Why primary obesity is a disease? *J Transl Med* 17, 169.
- Dehlawi, M.S., Mahida, Y.R., Hughes, K., and Wakelin, D. (2006). Effects of *Trichinella spiralis* infection on intestinal pathology in mice lacking interleukin-4 (IL-4) or intestinal trefoil factor (ITF/TFF3). *Parasitology International* 55, 207–211.
- Delarue, J., Allain, G., and Guillerme, S. (2006). Le syndrome métabolique. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 20, 114–117.

- Del-Río-Navarro, B.E., Miranda-Lora, A.L., Huang, F., Hall-Mondragon, M.S., and Leija-Martínez, J.J. (2019). Effect of supplementation with omega-3 fatty acids on hypertriglyceridemia in pediatric patients with obesity. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 32, 811–819.
- Derrien, M., Vaughan, E.E., Plugge, C.M., and de Vos, W.M. (2004). *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1469–1476.
- Dodiya, H.B., Forsyth, C.B., Voigt, R.M., Engen, P.A., Patel, J., Shaikh, M., Green, S.J., Naqib, A., Roy, A., Kordower, J.H., et al. (2018). Chronic stress-induced gut dysfunction exacerbates Parkinson's disease phenotype and pathology in a rotenone-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.*
- Domenichiello, A.F., Kitson, A.P., and Bazinet, R.P. (2015). Is docosahexaenoic acid synthesis from α -linolenic acid sufficient to supply the adult brain? *Progress in Lipid Research* 59, 54–66.
- Donaldson, G.P., Lee, S.M., and Mazmanian, S.K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 20–32.
- Dossi, C.G., Tapia, G.S., Espinosa, A., Videla, L.A., and D'Espessailles, A. (2014). Reversal of high-fat diet-induced hepatic steatosis by n-3 LCPUFA: role of PPAR- α and SREBP-1c. *J. Nutr. Biochem.* 25, 977–984.
- Dudele, A., Fischer, C.W., Elfving, B., Wegener, G., Wang, T., and Lund, S. (2015). Chronic exposure to low doses of lipopolysaccharide and high-fat feeding increases body mass without affecting glucose tolerance in female rats. *Physiol Rep* 3.
- Duncan, S.H., and Flint, H.J. (2008). Proposal of a neotype strain (A1-86) for *Eubacterium rectale*. Request for an opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1735–1736.
- Dusko Ehrlich, S., and MetaHIT consortium (2010). [Metagenomics of the intestinal microbiota: potential applications]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 34 Suppl 1, S23-28.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–1638.
- Escoula, Q., Bellenger, S., Narce, M., and Bellenger, J. (2019). Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic Acids Prevent Altered-Muc2 Secretion Induced by Palmitic Acid by Alleviating Endoplasmic Reticulum Stress in LS174T Goblet Cells. *Nutrients* 11, 2179.
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J.P., Druart, C., Bindels, L.B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M., et al. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 9066–9071.
- Fasano, A. (2012). Intestinal permeability and its regulation by zonulin: diagnostic and therapeutic implications. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 1096–1100.
- Feng, Y., Wang, Y., Wang, P., Huang, Y., and Wang, F. (2018). Short-Chain Fatty Acids Manifest Stimulative and Protective Effects on Intestinal Barrier Function Through the Inhibition of NLRP3 Inflammasome and Autophagy. *Cell. Physiol. Biochem.* 49, 190–205.
- Feng, Y., Huang, Y., Wang, Y., Wang, P., Song, H., and Wang, F. (2019). Antibiotics induced intestinal tight junction barrier dysfunction is associated with microbiota dysbiosis, activated NLRP3 inflammasome and autophagy. *PLoS ONE* 14, e0218384.
- Franklin, C.L., and Ericsson, A.C. (2017). Microbiota and reproducibility of rodent models. *Lab Anim (NY)* 46, 114–122.

- Gaggini, M., Morelli, M., Buzzigoli, E., DeFronzo, R.A., Bugianesi, E., and Gastaldelli, A. (2013). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients* 5, 1544–1560.
- Gallo, R.L., and Hooper, L.V. (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 503–516.
- Ganesan, K., Chung, S.K., Vanamala, J., and Xu, B. (2018). Causal Relationship between Diet-Induced Gut Microbiota Changes and Diabetes: A Novel Strategy to Transplant *Faecalibacterium prausnitzii* in Preventing Diabetes. *Int J Mol Sci* 19.
- Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Ward, R.E., Martin, R.J., Lefevre, M., Cefalu, W.T., and Ye, J. (2009). Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* 58, 1509–1517.
- Genser, L., Poitou, C., Brot-Laroche, É., Rousset, M., Vaillant, J.-C., Clément, K., Thenet, S., and Leturque, A. (2016). L'altération de la perméabilité intestinale : chaînon manquant entre dysbiose et inflammation au cours de l'obésité ? *Med Sci (Paris)* 32, 461–469.
- Gillam, M., Noto, A., Zahradka, P., and Taylor, C.G. (2009). Improved n-3 fatty acid status does not modulate insulin resistance in fa/fa Zucker rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 81, 331–339.
- Gilroy, D.W., and Bishop-Bailey, D. (2019). Lipid mediators in immune regulation and resolution. *Br. J. Pharmacol.* 176, 1009–1023.
- González-Pérez, A., Horrillo, R., Ferré, N., Gronert, K., Dong, B., Morán-Salvador, E., Titos, E., Martínez-Clemente, M., López-Parra, M., Arroyo, V., et al. (2009). Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J.* 23, 1946–1957.
- Goran, M.I., and Treuth, M.S. (2001). ENERGY EXPENDITURE, PHYSICAL ACTIVITY, AND OBESITY IN CHILDREN. *Pediatric Clinics of North America* 48, 931–953.
- Grasset, E., Puel, A., Charpentier, J., Collet, X., Christensen, J.E., Tercé, F., and Burcelin, R. (2017). A Specific Gut Microbiota Dysbiosis of Type 2 Diabetic Mice Induces GLP-1 Resistance through an Enteric NO-Dependent and Gut-Brain Axis Mechanism. *Cell Metabolism* 25, 1075-1090.e5.
- de Groot, P.F., Frissen, M.N., de Clercq, N.C., and Nieuwdorp, M. (2017). Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: History, present and future. *Gut Microbes* 8, 253–267.
- Gu, S., Chen, D., Zhang, J.-N., Lv, X., Wang, K., Duan, L.-P., Nie, Y., and Wu, X.-L. (2013). Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract. *PLoS ONE* 8, e74957.
- Guaraldi, F., and Salvatori, G. (2012). Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. *Front Cell Infect Microbiol* 2, 94.
- Guha, P., Kaptan, E., Gade, P., Kalvakolanu, D.V., and Ahmed, H. (2017). Tunicamycin induced endoplasmic reticulum stress promotes apoptosis of prostate cancer cells by activating mTORC1. *Oncotarget* 8, 68191–68207.
- Gulhane, M., Murray, L., Lourie, R., Tong, H., Sheng, Y.H., Wang, R., Kang, A., Schreiber, V., Wong, K.Y., Magor, G., et al. (2016). High Fat Diets Induce Colonic Epithelial Cell Stress and Inflammation that is Reversed by IL-22. *Scientific Reports* 6, 28990.
- Gummesson, A., Carlsson, L.M.S., Storlien, L.H., Bäckhed, F., Lundin, P., Löfgren, L., Stenlöf, K., Lam, Y.Y., Fagerberg, B., and Carlsson, B. (2011). Intestinal permeability is associated with visceral adiposity in healthy women. *Obesity (Silver Spring)* 19, 2280–2282.

- Guo, W., Wong, S., Xie, W., Lei, T., and Luo, Z. (2007). Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E576-586.
- Hamer, H.M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F.J., and Brummer, R.-J. (2008). Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 27, 104–119.
- Hamer, H.M., Jonkers, D.M.A.E., Bast, A., Vanhoutvin, S.A.L.W., Fischer, M.A.J.G., Kodde, A., Troost, F.J., Venema, K., and Brummer, R.-J.M. (2009). Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clin Nutr* 28, 88–93.
- Hao, Z., Münzberg, H., Rezai-Zadeh, K., Keenan, M., Coulon, D., Lu, H., Berthoud, H.-R., and Ye, J. (2015). Leptin deficient ob/ob mice and diet-induced obese mice responded differently to Roux-en-Y bypass surgery. *Int J Obes (Lond)* 39, 798–805.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., and Ron, D. (2000). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell* 5, 897–904.
- Hartmann, P., Haimerl, M., Mazagova, M., Brenner, D.A., and Schnabl, B. (2012). Toll-like receptor 2-mediated intestinal injury and enteric tumor necrosis factor receptor I contribute to liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 143, 1330-1340.e1.
- Hayes, C.L., Dong, J., Galipeau, H.J., Jury, J., McCarville, J., Huang, X., Wang, X.-Y., Naidoo, A., Anbazhagan, A.N., Libertucci, J., et al. (2018). Commensal microbiota induces colonic barrier structure and functions that contribute to homeostasis. *Sci Rep* 8.
- Haziot, A., Ferrero, E., Lin, X.Y., Stewart, C.L., and Goyert, S.M. (1995). CD14-deficient mice are exquisitely insensitive to the effects of LPS. *Prog. Clin. Biol. Res.* 392, 349–351.
- Hevia, A., Delgado, S., Sánchez, B., and Margolles, A. (2015). Molecular Players Involved in the Interaction Between Beneficial Bacteria and the Immune System. *Front. Microbiol.* 6.
- Hiippala, K., Jouhten, H., Ronkainen, A., Hartikainen, A., Kainulainen, V., Jalanka, J., and Satokari, R. (2018). The Potential of Gut Commensals in Reinforcing Intestinal Barrier Function and Alleviating Inflammation. *Nutrients* 10.
- Hirasawa, A. (2015). [Free Fatty Acid Receptor Family: A New Therapeutic Target for Metabolic Diseases]. *Yakugaku Zasshi* 135, 769–777.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 162, 3749–3752.
- Hu, F.B., van Dam, R.M., and Liu, S. (2001). Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia* 44, 805–817.
- Inoue, R., Yajima, T., and Tsukahara, T. (2017). Expression of TLR2 and TLR4 in murine small intestine during postnatal development. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 81, 350–358.
- Islam, K.B.M.S., Fukiya, S., Hagio, M., Fujii, N., Ishizuka, S., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T., and Yokota, A. (2011). Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology* 141, 1773–1781.
- Isolauri, E. (2017). Microbiota and Obesity. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 88, 95–105.

- Iwasaki, K., Harada, N., Sasaki, K., Yamane, S., Iida, K., Suzuki, K., Hamasaki, A., Nasteska, D., Shibue, K., Joo, E., et al. (2015). Free fatty acid receptor GPR120 is highly expressed in enteroendocrine K cells of the upper small intestine and has a critical role in GIP secretion after fat ingestion. *Endocrinology* 156, 837–846.
- Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15064–15069.
- Johansson, M.E.V., Ambort, D., Pelaseyed, T., Schütte, A., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Subramani, D.B., Holmén-Larsson, J.M., Thomsson, K.A., Bergström, J.H., et al. (2011a). Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 3635–3641.
- Johansson, M.E.V., Larsson, J.M.H., and Hansson, G.C. (2011b). The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host–microbial interactions. *PNAS* 108, 4659–4665.
- Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., Holmén-Larsson, J., Jabbar, K.S., Xia, L., Xu, H., Ghishan, F.K., Carvalho, F.A., Gewirtz, A.T., Sjövall, H., et al. (2014). Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut* 63, 281–291.
- Johansson, M.E.V., Jakobsson, H.E., Holmén-Larsson, J., Schütte, A., Ermund, A., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Arike, L., Wising, C., Svensson, F., Bäckhed, F., et al. (2015). Normalization of Host Intestinal Mucus Layers Requires Long-Term Microbial Colonization. *Cell Host Microbe* 18, 582–592.
- Johne, B., Fagerhol, M.K., Lyberg, T., Prydz, H., Brandtzaeg, P., Naess-Andresen, C.F., and Dale, I. (1997). Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *MP, Mol. Pathol.* 50, 113–123.
- Johnson, A.M.F., Costanzo, A., Gareau, M.G., Armando, A.M., Quehenberger, O., Jameson, J.M., and Olefsky, J.M. (2015). High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability. *PLoS ONE* 10, e0122195.
- Jump, D.B., Botolin, D., Wang, Y., Xu, J., Christian, B., and Demeure, O. (2005). Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *J. Nutr.* 135, 2503–2506.
- Jumpertz, R., Le, D.S., Turnbaugh, P.J., Trinidad, C., Bogardus, C., Gordon, J.I., and Krakoff, J. (2011). Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 94, 58–65.
- Jung, T.W., Lee, K.-T., Lee, M.W., and Ka, K.-H. (2012). SIRT1 attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in HepG2 cells via induction of oxygen-regulated protein 150. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422, 229–232.
- Jung, T.W., Hwang, H.-J., Hong, H.C., Choi, H.Y., Yoo, H.J., Baik, S.H., and Choi, K.M. (2014). Resolvin D1 reduces ER stress-induced apoptosis and triglyceride accumulation through JNK pathway in HepG2 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 391, 30–40.
- Kahn, S.E., Cooper, M.E., and Del Prato, S. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet* 383, 1068–1083.
- Kaji, I., Karaki, S., and Kuwahara, A. (2014). Short-chain fatty acid receptor and its contribution to glucagon-like peptide-1 release. *Digestion* 89, 31–36.
- Kallio, K.A.E., Hätönen, K.A., Lehto, M., Salomaa, V., Männistö, S., and Pussinen, P.J. (2015). Endotoxemia, nutrition, and cardiometabolic disorders. *Acta Diabetol* 52, 395–404.
- Kandori, H., Hirayama, K., Takeda, M., and Doi, K. (1996). Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germfree and conventional mice. *Exp. Anim.* 45, 155–160.

- Kang, J.X. (2007). Fat-1 transgenic mice: a new model for omega-3 research. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 77, 263–267.
- Karagöz, G.E., Acosta-Alvear, D., and Walter, P. (2019). The Unfolded Protein Response: Detecting and Responding to Fluctuations in the Protein-Folding Capacity of the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11.
- Karam, S.M. (1999). Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front. Biosci.* 4, D286–298.
- Karlsson, F.H., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C.J., Fagerberg, B., Nielsen, J., and Bäckhed, F. (2013). Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 498, 99–103.
- Kasbi Chadli, F., Andre, A., Prieur, X., Loirand, G., Meynier, A., Krempf, M., Nguyen, P., and Ouguerram, K. (2012). n-3 PUFA prevent metabolic disturbances associated with obesity and improve endothelial function in golden Syrian hamsters fed with a high-fat diet. *Br. J. Nutr.* 107, 1305–1315.
- Katsoulis, E., Mabley, J.G., Samai, M., Green, I.C., and Chatterjee, P.K. (2009). alpha-Linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Eur. J. Pharmacol.* 623, 107–112.
- Katsuma, S., Hirasawa, A., and Tsujimoto, G. (2005). Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 386–390.
- Kawasaki, N., Asada, R., Saito, A., Kanemoto, S., and Imaizumi, K. (2012). Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Sci Rep* 2, 799.
- Keita, A.V., and Söderholm, J.D. (2010). The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol. Motil.* 22, 718–733.
- Kennedy, E.A., King, K.Y., and Baldridge, M.T. (2018). Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria. *Front Physiol* 9.
- Khanna, S., Vazquez-Baeza, Y., González, A., Weiss, S., Schmidt, B., Muñoz-Pedrogo, D.A., Rainey, J.F., Kammer, P., Nelson, H., Sadowsky, M., et al. (2017). Changes in microbial ecology after fecal microbiota transplantation for recurrent *C. difficile* infection affected by underlying inflammatory bowel disease. *Microbiome* 5, 55.
- Kiela, P.R., and Ghishan, F.K. (2016). Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 30, 145–159.
- Kim, E.-H., Bae, J.-S., Hahm, K.B., and Cha, J.-Y. (2012). Endogenously synthesized n-3 polyunsaturated fatty acids in fat-1 mice ameliorate high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Biochemical Pharmacology* 84, 1359–1365.
- Kim, F., Pham, M., Luttrell, I., Bannerman, D.D., Tupper, J., Thaler, J., Hawn, T.R., Raines, E.W., and Schwartz, M.W. (2007). Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ. Res.* 100, 1589–1596.
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., and Bäckhed, F. (2016). From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* 165, 1332–1345.
- Konstantinov, S.R., Kuipers, E.J., and Peppelenbosch, M.P. (2013). Functional genomic analyses of the gut microbiota for CRC screening. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 741–745.

- Langille, M.G.I., Zaneveld, J., Caporaso, J.G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J.A., Clemente, J.C., Burkepile, D.E., Vega Thurber, R.L., Knight, R., et al. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology* 31, 814–821.
- Larraufie, P., Martin-Gallausiaux, C., Lapaque, N., Dore, J., Gribble, F.M., Reimann, F., and Blottiere, H.M. (2018). SCFAs strongly stimulate PYY production in human enteroendocrine cells. *Sci Rep* 8, 74.
- Lavelle, A., Lennon, G., O'Sullivan, O., Docherty, N., Balfe, A., Maguire, A., Mulcahy, H.E., Doherty, G., O'Donoghue, D., Hyland, J., et al. (2015). Spatial variation of the colonic microbiota in patients with ulcerative colitis and control volunteers. *Gut* 64, 1553–1561.
- Lee, H.J., Cui, R., Choi, S.-E., Jeon, J.Y., Kim, H.J., Kim, T.H., Kang, Y., and Lee, K.-W. (2018a). Bitter melon extract ameliorates palmitate-induced apoptosis via inhibition of endoplasmic reticulum stress in HepG2 cells and high-fat/high-fructose-diet-induced fatty liver. *Food Nutr Res* 62.
- Lee, M., Lee, Y., Song, J., Lee, J., and Chang, S.-Y. (2018b). Tissue-specific Role of CX3CR1 Expressing Immune Cells and Their Relationships with Human Disease. *Immune Netw* 18.
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., and Gordon, J.I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023.
- Li, H., Limenitakis, J.P., Fuhrer, T., Geuking, M.B., Lawson, M.A., Wyss, M., Brugiroux, S., Keller, I., Macpherson, J.A., Rupp, S., et al. (2015). The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nat Commun* 6, 8292.
- Li, J., Li, F.R., Wei, D., Jia, W., Kang, J.X., Stefanovic-Racic, M., Dai, Y., and Zhao, A.Z. (2014). Endogenous ω -3 polyunsaturated fatty acid production confers resistance to obesity, dyslipidemia, and diabetes in mice. *Mol. Endocrinol.* 28, 1316–1328.
- Liang, H., Zhong, Y., Zhou, S., and Li, Q.Q. (2011). Palmitic acid-induced apoptosis in pancreatic β -cells is increased by liver X receptor agonist and attenuated by eicosapentaenoate. *In Vivo* 25, 711–718.
- Lippert, K., Kedenko, L., Antonielli, L., Kedenko, I., Gemeier, C., Leitner, M., Kautzky-Willer, A., Paulweber, B., and Hackl, E. (2017). Gut microbiota dysbiosis associated with glucose metabolism disorders and the metabolic syndrome in older adults. *Benef Microbes* 8, 545–556.
- Liu, J.-Q., Zhang, L., Yao, J., Yao, S., and Yuan, T. (2018). AMPK alleviates endoplasmic reticulum stress by inducing the ER-chaperone ORP150 via FOXO1 to protect human bronchial cells from apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 497, 564–570.
- Liu, T., Hougen, H., Vollmer, A.C., and Hiebert, S.M. (2012). Gut bacteria profiles of *Mus musculus* at the phylum and family levels are influenced by saturation of dietary fatty acids. *Anaerobe* 18, 331–337.
- Lloret-Linares, C., and Oppert, J.-M. (2009). La mesure de la composition corporelle: nouveaux aspects. *Sang thrombose vaisseaux* 232–239.
- Loonen, L.M.P., Stolte, E.H., Jaklofsky, M.T.J., Meijerink, M., Dekker, J., van Baarlen, P., and Wells, J.M. (2014). REG3 γ -deficient mice have altered mucus distribution and increased mucosal inflammatory responses to the microbiota and enteric pathogens in the ileum. *Mucosal Immunol* 7, 939–947.
- Louis, P., Young, P., Holtrop, G., and Flint, H.J. (2010). Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environ. Microbiol.* 12, 304–314.
- van der Lugt, B., van Beek, A.A., Aalvink, S., Meijer, B., Sovran, B., Vermeij, W.P., Brandt, R.M.C., de Vos, W.M., Savelkoul, H.F.J., Steegenga, W.T., et al. (2019). *Akkermansia muciniphila* ameliorates the age-related decline in colonic mucus thickness and attenuates immune activation in accelerated aging *Ercc1- Δ 7* mice. *Immun Ageing* 16.

- Lundberg, R., Toft, M.F., August, B., Hansen, A.K., and Hansen, C.H.F. (2016). Antibiotic-treated versus germ-free rodents for microbiota transplantation studies. *Gut Microbes* 7, 68–74.
- Macfarlane, G.T., and Macfarlane, S. (2012). Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *J AOAC Int* 95, 50–60.
- Machiels, K., Joossens, M., Sabino, J., De Preter, V., Arijis, I., Eeckhaut, V., Ballet, V., Claes, K., Van Immerseel, F., Verbeke, K., et al. (2014). A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 63, 1275–1283.
- Mallmann, N.H., Lima, E.S., and Lalwani, P. (2018). Dysregulation of Tryptophan Catabolism in Metabolic Syndrome. *Metab Syndr Relat Disord* 16, 135–142.
- Marcheselli, V.L., Hong, S., Lukiw, W.J., Tian, X.H., Gronert, K., Musto, A., Hardy, M., Gimenez, J.M., Chiang, N., Serhan, C.N., et al. (2003). Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J. Biol. Chem.* 278, 43807–43817.
- Martínez-Fernández, L., Laiglesia, L.M., Huerta, A.E., Martínez, J.A., and Moreno-Aliaga, M.J. (2015). Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 121, 24–41.
- McNamara, J.R., Warnick, G.R., and Cooper, G.R. (2006). A brief history of lipid and lipoprotein measurements and their contribution to clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* 369, 158–167.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. (2000). Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 343, 338–344.
- Miles, E.A., and Calder, P.C. (1998). Modulation of immune function by dietary fatty acids. *Proc Nutr Soc* 57, 277–292.
- Min, Y.W., and Rhee, P.-L. (2015). The Role of Microbiota on the Gut Immunology. *Clin Ther* 37, 968–975.
- Miquel, S., Leclerc, M., Martin, R., Chain, F., Lenoir, M., Raguideau, S., Hudault, S., Bridonneau, C., Northen, T., Bowen, B., et al. (2015). Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. *MBio* 6.
- Mohammadkhah, A.I., Simpson, E.B., Patterson, S.G., and Ferguson, J.F. (2018). Development of the Gut Microbiome in Children, and Lifetime Implications for Obesity and Cardiometabolic Disease. *Children (Basel)* 5.
- Moore, K.J., Andersson, L.P., Ingalls, R.R., Monks, B.G., Li, R., Arnaout, M.A., Golenbock, D.T., and Freeman, M.W. (2000). Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages. *J. Immunol.* 165, 4272–4280.
- Moreira, A.P.B., Texeira, T.F.S., Ferreira, A.B., Peluzio, M. do C.G., and Alfenas, R. de C.G. (2012). Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br. J. Nutr.* 108, 801–809.
- Morrison, D.J., and Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 7, 189–200.
- Murphy, E.F., Cotter, P.D., Healy, S., Marques, T.M., O’Sullivan, O., Fouhy, F., Clarke, S.F., O’Toole, P.W., Quigley, E.M., Stanton, C., et al. (2010). Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut* 59, 1635–1642.
- Murugesan, S., Ulloa-Martínez, M., Martínez-Rojano, H., Galván-Rodríguez, F.M., Miranda-Brito, C., Romano, M.C., Piña-Escobedo, A., Pizano-Zárate, M.L., Hoyo-Vadillo, C., and García-Mena, J. (2015). Study of the diversity and short-chain fatty acids production by the bacterial community in overweight and obese Mexican children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 1337–1346.

- Nakajima, A., Vogelzang, A., Maruya, M., Miyajima, M., Murata, M., Son, A., Kuwahara, T., Tsuruyama, T., Yamada, S., Matsuura, M., et al. (2018). IgA regulates the composition and metabolic function of gut microbiota by promoting symbiosis between bacteria. *Journal of Experimental Medicine* 215, 2019–2034.
- Neuhofer, A., Zeyda, M., Mascher, D., Itariu, B.K., Murano, I., Leitner, L., Hochbrugger, E.E., Fraisl, P., Cinti, S., Serhan, C.N., et al. (2013). Impaired Local Production of Proresolving Lipid Mediators in Obesity and 17-HDHA as a Potential Treatment for Obesity-Associated Inflammation. *Diabetes* 62, 1945–1956.
- Niu, S.-L., Mitchell, D.C., Lim, S.-Y., Wen, Z.-M., Kim, H.-Y., Salem, N., and Litman, B.J. (2004). Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency. *J. Biol. Chem.* 279, 31098–31104.
- Nobel, Y.R., Cox, L.M., Kirigin, F.F., Bokulich, N.A., Yamanishi, S., Teitler, I., Chung, J., Sohn, J., Barber, C.M., Goldfarb, D.S., et al. (2015). Metabolic and metagenomic outcomes from early-life pulsed antibiotic treatment. *Nat Commun* 6, 7486.
- van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E.G., de Vos, W.M., Visser, C.E., Kuijper, E.J., Bartelsman, J.F.W.M., Tijssen, J.G.P., et al. (2013). Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.* 368, 407–415.
- Oakes, S.A., and Papa, F.R. (2015). The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 10, 173–194.
- Odenwald, M.A., and Turner, J.R. (2017). The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 9–21.
- Oh, D.Y., Talukdar, S., Bae, E.J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W., Li, P., Lu, W.J., Watkins, S.M., and Olefsky, J.M. (2010). GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell* 142, 687–698.
- Ostaff, M.J., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2013). Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Mol Med* 5, 1465–1483.
- Ottman, N., Geerlings, S.Y., Aalvink, S., de Vos, W.M., and Belzer, C. (2017). Action and function of *Akkermansia muciniphila* in microbiome ecology, health and disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 31, 637–642.
- Ouwerkerk, J.P., de Vos, W.M., and Belzer, C. (2013). Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 27, 25–38.
- Özcan, U., Yilmaz, E., Özcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R.O., Görgün, C.Z., and Hotamisligil, G.S. (2006). Chemical Chaperones Reduce ER Stress and Restore Glucose Homeostasis in a Mouse Model of Type 2 Diabetes. *Science* 313, 1137–1140.
- Paek, J.K., and Lee, S.Y. (2018). Can Gut Microbiota Modulation Be Used as a Practical Treatment for Obesity? *J Obes Metab Syndr* 27, 75–77.
- Pagliassotti, M.J., Kim, P.Y., Estrada, A.L., Stewart, C.M., and Gentile, C.L. (2016). Endoplasmic reticulum stress in obesity and obesity-related disorders: An expanded view. *Metab. Clin. Exp.* 65, 1238–1246.
- Patterson, E., O’ Doherty, R.M., Murphy, E.F., Wall, R., O’ Sullivan, O., Nilaweera, K., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., Ross, R.P., and Stanton, C. (2014). Impact of dietary fatty acids on metabolic activity and host intestinal microbiota composition in C57BL/6J mice. *Br. J. Nutr.* 111, 1905–1917.
- Pelaseyed, T., Bergström, J.H., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Birchenough, G.M.H., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñero, A.M., Nyström, E.E.L., et al. (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol. Rev.* 260, 8–20.

Pendyala, S., Walker, J.M., and Holt, P.R. (2012). A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology* 142, 1100-1101.e2.

Perry, R.J., Peng, L., Barry, N.A., Cline, G.W., Zhang, D., Cardone, R.L., Petersen, K.F., Kibbey, R.G., Goodman, A.L., and Shulman, G.I. (2016). Acetate mediates a microbiome–brain– β -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature* 534, 213–217.

Pike, L.J. (2003). Lipid rafts bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* 44, 655–667.

Pimenta, A.S., Gaidhu, M.P., Habib, S., So, M., Fediuc, S., Mirpourian, M., Musheev, M., Curi, R., and Ceddia, R.B. (2008). Prolonged exposure to palmitate impairs fatty acid oxidation despite activation of AMP-activated protein kinase in skeletal muscle cells. *J. Cell. Physiol.* 217, 478–485.

Pinel, A., Rigaudière, J.-P., Laillet, B., Pouyet, C., Malpuech-Brugère, C., Prip-Buus, C., Morio, B., and Capel, F. (2016). N-3PUFA differentially modulate palmitate-induced lipotoxicity through alterations of its metabolism in C2C12 muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1861, 12–20.

Plovier, H., Everard, A., Druart, C., Depommier, C., Van Hul, M., Geurts, L., Chilloux, J., Ottman, N., Duparc, T., Lichtenstein, L., et al. (2017). A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat. Med.* 23, 107–113.

Poirier Paul, Giles Thomas D., Bray George A., Hong Yuling, Stern Judith S., Pi-Sunyer F. Xavier, and Eckel Robert H. (2006). Obesity and Cardiovascular Disease: Pathophysiology, Evaluation, and Effect of Weight Loss. *Circulation* 113, 898–918.

Poretzky, R., Rodriguez-R, L.M., Luo, C., Tsementzi, D., and Konstantinidis, K.T. (2014). Strengths and Limitations of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing in Revealing Temporal Microbial Community Dynamics. *PLOS ONE* 9, e93827.

Pu, S., Khazanehei, H., Jones, P.J., and Khafipour, E. (2016). Interactions between Obesity Status and Dietary Intake of Monounsaturated and Polyunsaturated Oils on Human Gut Microbiome Profiles in the Canola Oil Multicenter Intervention Trial (COMIT). *Front Microbiol* 7, 1612.

Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., et al. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490, 55–60.

Quince, C., Walker, A.W., Simpson, J.T., Loman, N.J., and Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology* 35, 833–844.

Rajkumar, H., Mahmood, N., Kumar, M., Varikuti, S.R., Challa, H.R., and Myakala, S.P. (2014). Effect of probiotic (VSL#3) and omega-3 on lipid profile, insulin sensitivity, inflammatory markers, and gut colonization in overweight adults: a randomized, controlled trial. *Mediators Inflamm.* 2014, 348959.

Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229–241.

Ramirez-Farias, C., Slezak, K., Fuller, Z., Duncan, A., Holtrop, G., and Louis, P. (2009). Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *Br. J. Nutr.* 101, 541–550.

Rankinen, T., and Bouchard, C. (2006). Genetics of food intake and eating behavior phenotypes in humans. *Annu. Rev. Nutr.* 26, 413–434.

Ress, C., and Kaser, S. (2016). Mechanisms of intrahepatic triglyceride accumulation. *World J. Gastroenterol.* 22, 1664–1673.

- Rhee, Y., and Brunt, A. (2011). Flaxseed supplementation improved insulin resistance in obese glucose intolerant people: a randomized crossover design. *Nutr J* 10, 44.
- Rius, B., López-Vicario, C., González-Pérez, A., Morán-Salvador, E., García-Alonso, V., Clària, J., and Titos, E. (2012). Resolution of inflammation in obesity-induced liver disease. *Front Immunol* 3, 257.
- Rossmeisl, M., Jilkova, Z.M., Kuda, O., Jelenik, T., Medrikova, D., Stankova, B., Kristinsson, B., Haraldsson, G.G., Svensen, H., Stoknes, I., et al. (2012). Metabolic effects of n-3 PUFA as phospholipids are superior to triglycerides in mice fed a high-fat diet: possible role of endocannabinoids. *PLoS ONE* 7, e38834.
- Roth, J., and Zuber, C. (2017). Quality control of glycoprotein folding and ERAD: the role of N-glycan handling, EDEM1 and OS-9. *Histochem. Cell Biol.* 147, 269–284.
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., and Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr* 57, 1–24.
- Ruhl, C.E., and Everhart, J.E. (2004). Epidemiology of nonalcoholic fatty liver. *Clin Liver Dis* 8, 501–519, vii.
- Russell, W.R., Gratz, S.W., Duncan, S.H., Holtrop, G., Ince, J., Scobbie, L., Duncan, G., Johnstone, A.M., Lobley, G.E., Wallace, R.J., et al. (2011). High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *Am. J. Clin. Nutr.* 93, 1062–1072.
- Sankoda, A., Harada, N., Iwasaki, K., Yamane, S., Murata, Y., Shibue, K., Thewjitcharoen, Y., Suzuki, K., Harada, T., Kanemaru, Y., et al. (2017). Long-Chain Free Fatty Acid Receptor GPR120 Mediates Oil-Induced GIP Secretion Through CCK in Male Mice. *Endocrinology* 158, 1172–1180.
- Sato, J., Kanazawa, A., Ikeda, F., Yoshihara, T., Goto, H., Abe, H., Komiyama, K., Kawaguchi, M., Shimizu, T., Ogihara, T., et al. (2014). Gut dysbiosis and detection of “live gut bacteria” in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 37, 2343–2350.
- Schroeder, B.O. (2019). Fight them or feed them: how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterol Rep (Oxf)* 7, 3–12.
- Schroeder, B.O., Birchenough, G.M.H., Ståhlman, M., Arike, L., Johansson, M.E.V., Hansson, G.C., and Bäckhed, F. (2018). Bifidobacteria or Fiber Protects against Diet-Induced Microbiota-Mediated Colonic Mucus Deterioration. *Cell Host Microbe* 23, 27–40.e7.
- Schwan, A., Sjölin, S., Trottestam, U., and Aronsson, B. (1983). Relapsing clostridium difficile enterocolitis cured by rectal infusion of homologous faeces. *Lancet* 2, 845.
- Schwiertz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N.A., Donus, C., and Hardt, P.D. (2010). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)* 18, 190–195.
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., and Finlay, B.B. (2010). Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev* 90, 46.
- Serhan, C.N. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510, 92–101.
- Serhan, C.N., Gotlinger, K., Hong, S., and Arita, M. (2004). Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 73, 155–172.
- Serhan, C.N., Brain, S.D., Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Haslett, C., O’Neill, L.A.J., Perretti, M., Rossi, A.G., and Wallace, J.L. (2007). Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* 21, 325–332.
- Serhan, C.N., Chiang, N., and Van Dyke, T.E. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 349–361.

- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* *189*, 1777–1782.
- Shin, N.-R., Lee, J.-C., Lee, H.-Y., Kim, M.-S., Whon, T.W., Lee, M.-S., and Bae, J.-W. (2014). An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut* *63*, 727–735.
- Sicard, J.-F., Le Bihan, G., Vogeleeer, P., Jacques, M., and Harel, J. (2017). Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Front Cell Infect Microbiol* *7*.
- Simopoulos, A.P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* *56*, 365–379.
- Simopoulos, A.P. (2016a). An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients* *8*.
- Simopoulos, A.P. (2016b). An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients* *8*.
- Smith, null, and Macfarlane, null (1997). Formation of Phenolic and Indolic Compounds by Anaerobic Bacteria in the Human Large Intestine. *Microb. Ecol.* *33*, 180–188.
- Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., Cosnes, J., Corthier, G., Marteau, P., and Doré, J. (2009). Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm. Bowel Dis.* *15*, 1183–1189.
- Sommer, F., and Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology* *11*, 227–238.
- Sonnenburg, E.D., Smits, S.A., Tikhonov, M., Higginbottom, S.K., Wingreen, N.S., and Sonnenburg, J.L. (2016). Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature* *529*, 212–215.
- Stenman, L.K., Holma, R., Gylling, H., and Korpela, R. (2013). Genetically obese mice do not show increased gut permeability or faecal bile acid hydrophobicity. *Br. J. Nutr.* *110*, 1157–1164.
- Stillwell, W. (2006). The role of polyunsaturated lipids in membrane raft function. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition* *50*, 107–113.
- Suzuki, T., and Hara, H. (2010). Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutr Metab (Lond)* *7*, 19.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Theissig, F., Engelhardt, H., Bengmark, S., Koch, S., Lochs, H., and Dörffel, Y. (2007). Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut* *56*, 343–350.
- Szentkuti, L., Riedesel, H., Enss, M.L., Gaertner, K., and Von Engelhardt, W. (1990). Pre-epithelial mucus layer in the colon of conventional and germ-free rats. *Histochem. J.* *22*, 491–497.
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A.N., Mackay, C.R., and Macia, L. (2014). The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv. Immunol.* *121*, 91–119.
- Tauxe, W.M., Dhere, T., Ward, A., Racs, L.D., Varkey, J.B., and Kraft, C.S. (2015). Fecal Microbiota Transplant Protocol for *Clostridium Difficile* Infection. *Lab Med* *46*, e19–e23.
- Teixeira, T.F.S., Souza, N.C.S., Chiarello, P.G., Franceschini, S.C.C., Bressan, J., Ferreira, C.L.L.F., and Peluzio, M. do C.G. (2012). Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. *Clin Nutr* *31*, 735–740.

- Thaiss, C.A., Levy, M., Grosheva, I., Zheng, D., Soffer, E., Blacher, E., Braverman, S., Tengeler, A.C., Barak, O., Elazar, M., et al. (2018). Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science* 359, 1376–1383.
- Todoric, J., Löffler, M., Huber, J., Bilban, M., Reimers, M., Kadl, A., Zeyda, M., Waldhäusl, W., and Stulnig, T.M. (2006). Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia* 49, 2109–2119.
- Tripathi, Y.B.T., and Pandey, V.P. (2012). Obesity and endoplasmic reticulum (ER) stresses. *Front. Immunol.* 3.
- Tseng, C.-H., and Wu, C.-Y. (2019). The gut microbiome in obesity. *Journal of the Formosan Medical Association* 118, S3–S9.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1031.
- Turner, J.R., Buschmann, M.M., Romero-Calvo, I., Sailer, A., and Shen, L. (2014). The role of molecular remodeling in differential regulation of tight junction permeability. *Semin. Cell Dev. Biol.* 36, 204–212.
- Vaishnava, S., Yamamoto, M., Severson, K.M., Ruhn, K.A., Yu, X., Koren, O., Ley, R., Wakeland, E.K., and Hooper, L.V. (2011). The antibacterial lectin RegIIIγ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* 334, 255–258.
- van der Valk, E.S., Savas, M., and van Rossum, E.F.C. (2018). Stress and Obesity: Are There More Susceptible Individuals? *Curr Obes Rep* 7, 193–203.
- Velazquez-Villegas, L.A., Perino, A., Lemos, V., Zietak, M., Nomura, M., Pols, T.W.H., and Schoonjans, K. (2018). TGR5 signalling promotes mitochondrial fission and beige remodelling of white adipose tissue. *Nat Commun* 9, 245.
- Volynets, V., Reichold, A., Bárdos, G., Rings, A., Bleich, A., and Bischoff, S.C. (2016). Assessment of the Intestinal Barrier with Five Different Permeability Tests in Healthy C57BL/6J and BALB/cJ Mice. *Dig. Dis. Sci.* 61, 737–746.
- Walker, R.W., Clemente, J.C., Peter, I., and Loos, R.J.F. (2017). The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero? *Pediatr Obes* 12 Suppl 1, 3–17.
- Wang, W., Uzzau, S., Goldblum, S.E., and Fasano, A. (2000). Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J. Cell. Sci.* 113 Pt 24, 4435–4440.
- Wearing, S.C., Hennig, E.M., Byrne, N.M., Steele, J.R., and Hills, A.P. (2006). Musculoskeletal disorders associated with obesity: a biomechanical perspective. *Obes Rev* 7, 239–250.
- Wek, R.C., Jiang, H.-Y., and Anthony, T.G. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 7–11.
- White, P.J., St-Pierre, P., Charbonneau, A., Mitchell, P.L., St-Amand, E., Marcotte, B., and Marette, A. (2014). Protectin DX alleviates insulin resistance by activating a myokine-liver glucoregulatory axis. *Nat. Med.* 20, 664–669.
- Wilson, B.C., Vatanen, T., Cutfield, W.S., and O’Sullivan, J.M. (2019). The Super-Donor Phenomenon in Fecal Microbiota Transplantation. *Front Cell Infect Microbiol* 9.
- Winzell, M.S., and Ahren, B. (2004). The High-Fat Diet-Fed Mouse: A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes. *Diabetes* 53, S215–S219.

- Woodman, R.J., Mori, T.A., Burke, V., Puddey, I.B., Watts, G.F., and Beilin, L.J. (2002). Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on glycemic control, blood pressure, and serum lipids in type 2 diabetic patients with treated hypertension. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 1007–1015.
- Woodworth-Hobbs, M.E., Perry, B.D., Rahnert, J.A., Hudson, M.B., Zheng, B., and Russ Price, S. (2017). Docosahexaenoic acid counteracts palmitate-induced endoplasmic reticulum stress in C2C12 myotubes: Impact on muscle atrophy. *Physiol Rep* **5**.
- Wullaert, A., Bonnet, M.C., and Pasparakis, M. (2011). NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res* **21**, 146–158.
- Xiu, F., Diao, L., Qi, P., Catapano, M., and Jeschke, M.G. (2016). Palmitate differentially regulates the polarization of differentiating and differentiated macrophages. *Immunology* **147**, 82–96.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., and Reed, J.C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* **115**, 2656–2664.
- Yamashita, H., Fujisawa, K., Ito, E., Idei, S., Kawaguchi, N., Kimoto, M., Hiemori, M., and Tsuji, H. (2007). Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in Type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1236–1243.
- Yang, W., Chen, X., Chen, M., Li, Y., Li, Q., Jiang, X., Yang, Y., and Ling, W. (2017). Fish oil supplementation inhibits endoplasmic reticulum stress and improves insulin resistance: involvement of AMP-activated protein kinase. *Food Funct* **8**, 1481–1493.
- Yatsunencko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222–227.
- Yin, J., Wang, Y., Gu, L., Fan, N., Ma, Y., and Peng, Y. (2015). Palmitate induces endoplasmic reticulum stress and autophagy in mature adipocytes: implications for apoptosis and inflammation. *Int. J. Mol. Med.* **35**, 932–940.
- Yki-Järvinen, H., Kauppinen-Mäkelin, R., Tiikkainen, M., Vähätalo, M., Virtamo, H., Nikkilä, K., Tulokas, T., Hulme, S., Hardy, K., McNulty, S., et al. (2006). Insulin glargine or NPH combined with metformin in type 2 diabetes: the LANMET study. *Diabetologia* **49**, 442–451.
- Yu, H.-N., Zhu, J., Pan, W., Shen, S.-R., Shan, W.-G., and Das, U.N. (2014). Effects of fish oil with a high content of n-3 polyunsaturated fatty acids on mouse gut microbiota. *Arch. Med. Res.* **45**, 195–202.
- Zhang, F., Luo, W., Shi, Y., Fan, Z., and Ji, G. (2012a). Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation? *Am. J. Gastroenterol.* **107**, 1755; author reply p.1755-1756.
- Zhang, P., Meng, X., Li, D., Calderone, R., Mao, D., and Sui, B. (2018). Commensal Homeostasis of Gut Microbiota-Host for the Impact of Obesity. *Front. Physiol.* **8**.
- Zhang, Y., Dong, L., Yang, X., Shi, H., and Zhang, L. (2011). α -Linolenic acid prevents endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of stearic acid lipotoxicity on primary rat hepatocytes. *Lipids Health Dis* **10**, 81.
- Zhang, Y., Xue, R., Zhang, Z., Yang, X., and Shi, H. (2012b). Palmitic and linoleic acids induce ER stress and apoptosis in hepatoma cells. *Lipids Health Dis* **11**, 1.
- Zhao, J., Wang, H., Shi, P., Wang, W., and Sun, Y. (2017). GPR120, a potential therapeutic target for experimental colitis in IL-10 deficient mice. *Oncotarget* **8**, 8397–8405.
- Zhao, Y., Chen, F., Wu, W., Sun, M., Bilotta, A.J., Yao, S., Xiao, Y., Huang, X., Eaves-Pyles, T.D., Golovko, G., et al. (2018). GPR43 mediates microbiota metabolite SCFA regulation of antimicrobial peptide expression in intestinal epithelial cells via activation of mTOR and STAT3. *Mucosal Immunol* **11**, 752–762.

- Zheng, J., Peng, C., Ai, Y., Wang, H., Xiao, X., and Li, J. (2016). Docosahexaenoic Acid Ameliorates Fructose-Induced Hepatic Steatosis Involving ER Stress Response in Primary Mouse Hepatocytes. *Nutrients* 8.
- Zheng, L., Kelly, C.J., Battista, K.D., Schaefer, R., Lanis, J.M., Alexeev, E.E., Wang, R.X., Onyiah, J.C., Kominsky, D.J., and Colgan, S.P. (2017). Microbial-Derived Butyrate Promotes Epithelial Barrier Function through IL-10 Receptor-Dependent Repression of Claudin-2. *J. Immunol.* 199, 2976–2984.
- Zimmet, P., Alberti, K.G., and Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782–787.
- Zoetendal, E.G., Raes, J., van den Bogert, B., Arumugam, M., Booiijink, C.C.G.M., Troost, F.J., Bork, P., Wels, M., de Vos, W.M., and Kleerebezem, M. (2012). The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *ISME J* 6, 1415–1426.
- Zore, T., Palafox, M., and Reue, K. (2018). Sex differences in obesity, lipid metabolism, and inflammation—A role for the sex chromosomes? *Mol Metab* 15, 35–44.

Annexe 1 : Liste des publications, présentations scientifiques et prix issues des travaux de thèse.

- **Articles à comité de relecture international.**

- Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic Acids Prevent Altered-Muc2 Secretion Induced by Palmitic Acid by Alleviating Endoplasmic Reticulum Stress in LS174T Goblet Cells. **Nutrient**, 2019, **Escoula Q**, Bellenger S, Narce M, Bellenger J.
- N-3 polyunsaturated fatty acids: An innovative strategy against obesity and related metabolic disorders, intestinal alteration and gut microbiota dysbiosis. **Biochimie**, 2019, Bellenger J, Bellenger S, **Escoula Q**, Bidu C, Narce M.
- Gut microbiota remediation by ω 3 PUFA is a transmissible trait to prevent obesity and associated metabolic disorders in fat-1 mice, **Diabetes**, 2018, **Escoula Q***, Bidu C*, Bellenger S., Spor A., Galan M., Geissler A., Dardevet D., Morio-Liondor B. , Cani PD., Lagrost L. , Narce M. , Bellenger J.

- **Communication orale.**

- Forum des jeunes chercheurs, Besançon, 2018.
- International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL), Las Vegas, 2018.
- Journée francophone de la nutrition, Nantes, 2017.
- Présentation devant le conseil scientifique de l'association Bleu, Blanc, Cœur, 2017.
- Gerli, Dijon, 2017.

- **Récompenses et prix.**

- Bourse de mobilité attribué par l'école doctorale « Environnement Santé ».
- Travel Award attribué par le comité scientifique de l'ISSFAL.
- Travel Award attribué par le comité scientifique d'Alaska Omega.
- Bourse de mobilité attribuée par le comité scientifique de la Société Francophone de Nutrition (SFN).