

Contribution du microbiote intestinal aux effets bénéfiques des acides gras polyinsaturés en n-3 lors de l'obésité alimentaire chez la souris fat-1 [☆], ^{☆☆}

Jérôme Bellenger^{1,2,3,*}, Sandrine Bellenger^{1,2,3}, Amina Bourragat^{1,2,3}, Quentin Escoula^{1,2,3,4}, Pierre Weill⁴ et Michel Narce^{1,2,3}

¹ 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

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

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

⁴ Valorex, La Messayais, 35210 Combourtille, France

Reçu le 11 septembre 2020 – Accepté le 22 janvier 2021

Résumé – L'obésité, aujourd'hui considérée comme une pandémie affectant plus de 650 millions de personnes à travers le monde, est une pathologie complexe principalement associée à un excès d'apport énergétique et des modifications des habitudes alimentaires favorisant l'ingestion d'aliments riches en acides gras saturés et en sucres. Cette pathologie multifactorielle est liée entre autre à une inflammation chronique de bas grade. En effet, un régime obésogène entraîne une dysbiose du microbiote intestinal conduisant à une augmentation de la perméabilité de l'intestin (en partie attribuée à une diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées) conduisant à une augmentation du taux circulant de lipopolysaccharides (LPS) définie sous le terme d'endotoxémie métabolique. Différentes études ont montré que les acides gras polyinsaturés (AGPI) en n-3 alimentaires participent à la prévention de l'obésité et de l'insulino-résistance *via* en particulier la production de médiateurs lipidiques résolvants. Alors que des données suggèrent que les AGPI en n-3 peuvent moduler le microbiote intestinal, d'autres études ne montrent aucun effet de traitements aux n-3 sur la dysbiose intestinale. Dans ce travail, nous avons montré que sous régime hypercalorique obésogène, comparativement à des souris de type sauvage, les souris transgéniques fat-1 (aux teneurs tissulaires élevées en AGPI en n-3 conséquence de la synthèse constitutive d'AGPI en n-3 à partir des AGPI en n-6) résistent à l'obésité alimentaire et aux désordres métaboliques associés, conserve une fonction barrière de l'intestin efficace et présente un microbiote de plus grande diversité phylogénique. De plus, une transplantation fécale de souris fat-1 à des souris de type sauvage placées sous régime hyperlipidique obésogène est capable de limiter la prise de poids, de normaliser la tolérance au glucose et la perméabilité intestinale avec une prévention de l'altération de la couche de mucus colique. Nous en concluons qu'une modulation du microbiote intestinal par les AGPI en n-3 contribue à la prévention du syndrome métabolique chez la souris fat-1 et pourrait représenter une stratégie prometteuse pour prévenir le développement de maladies métaboliques et préserver un phénotype mince.

Mots clés : Obésité alimentaire / acides gras polyinsaturés en n-3 / endotoxémie métabolique / microbiote / transplantation fécale

Abstract – **Intestinal microbiota mediates the beneficial effects of n-3 polyunsaturated fatty acids during dietary obesity.** 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

[☆] Contribution to the Topical Issue "Microbiota, Nutrition and Lipids: Consequences on Health".

^{☆☆} Le texte complet en anglais est disponible sur : <https://doi.org/10.1051/ocl/2021006>.

*Correspondance : jerome.bellenger@u-bourgogne.fr

changes in dietary habits favouring the consumption of diets rich in saturated fat and sugar. This multifactorial pathology is linked to a chronic low grade systemic inflammation. Indeed, high fat diet (HFD) leads to intestinal microbiota dysbiosis increasing gut permeability (partly attributed to a downregulation of genes encoding tight junction proteins) leading to the increase of the level of bacterial lipopolysaccharides (LPS) so-called metabolic endotoxemia. Studies have shown that n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are involved in the prevention of obesity and insulin resistance partly through synthesis of lipid mediators. While studies would suggest that n-3 PUFAs are able to modulate the gut microbiota, others do not exhibit any effect of n-3 treatments on intestinal homeostasis. In the present work, we have shown that when fed an hypercaloric and obsogenic diet, compared with wild-type (WT) mice, fat-1 mice (with constitutive production of n-3 PUFAs) resist to dietary obesity and associated metabolic disorders, maintain an efficient gut barrier function and display greater phylogenetic diversity. Moreover, fecal microbiota transplantation from fat-1 to WT mice was able to reverse body weight gain, normalize glucose tolerance and intestinal permeability in association with a prevention of the alteration of the colon mucus layer. We may conclude that the n-3 PUFA-mediated alterations of gut microbiota contribute to the prevention of metabolic syndrome in fat-1 mice and may represent a promising strategy to prevent metabolic disease and preserve a lean phenotype (Le texte complet est disponible en anglais sur <https://www.ocl-journal.org/10.1051/oc/2021006>).

Keywords: Dietary obesity / n-3 polyunsaturated fatty acids / metabolic endotoxemia / microbiota / fecal transplantation

1 Introduction

De nos jours, le surpoids et l'obésité (pathologie complexe associée à de nombreux désordres métaboliques) représentent un enjeu majeur de santé publique à la fois dans les pays industrialisés et ceux en voie de développement. L'obésité est une pathologie multifactorielle causant 3,4 millions de décès par an et constituant la 5^e cause de mortalité mondiale. À l'échelle mondiale, en 2017, 12 % des adultes avaient un IMC (indice de masse corporel) supérieur à 30 kg/m² et cette prévalence a doublé depuis les années 1980 (Afshin *et al.*, 2017). L'étude de cohorte française « Constances », a récemment estimé à 15,7 % la prévalence de l'obésité chez les adultes de plus de 30 ans (Feral-Pierssens *et al.*, 2018). La tranche d'âge 55/64 ans est particulièrement exposée, avec 20 % de personnes obèses.

Depuis plusieurs années, les troubles de la perméabilité intestinale en lien avec l'obésité sont particulièrement étudiés. En effet, il a été mis en évidence chez des modèles murins génétiquement obèses ou rendus obèses par l'utilisation de régimes hypercaloriques une hyperperméabilité intestinale (Moreira *et al.*, 2012 ; Johnson *et al.*, 2015). Si des équipes ont montré une forte altération de la fonction des protéines de jonctions serrées intestinales (Chelakkot *et al.*, 2018 ; Thaïss *et al.*, 2018) d'autres ont mis en évidence l'implication du microbiote intestinal (Cani *et al.*, 2008). S'il est aujourd'hui largement admis que les régimes hypercaloriques obésogènes sont responsables d'une hyperperméabilité intestinale dans les modèles murins, les données chez l'homme sont en revanche parfois contradictoires. Ainsi, Brignardello *et al.* n'ont observé aucune modification de la perméabilité intestinale chez des sujets obèses (Brignardello *et al.*, 2010). En revanche, une étude similaire a rapporté une altération de la fonction barrière de l'intestinale de sujets obèses (Teixeira *et al.*, 2012). De plus, le projet européen MétaCardis, lancé en 2012, a mis en évidence une moindre diversité de ce microbiote chez les personnes atteintes d'obésité et cet appauvrissement s'aggrave avec l'obésité (Vieira-Silva *et al.*, 2020).

Diverses études, tant chez la souris que chez l'Homme, indiquent qu'une supplémentation en n-3 semble capable d'améliorer la fonction barrière de l'intestin et de réduire

l'inflammation chronique, lors de régimes hyperlipidiques et hypercaloriques. Nos études *in vitro* et *in vivo* présentées dans ce travail ont pour but de caractériser l'effet d'acides gras polyinsaturés (AGPI) en n-3, sur la perméabilité intestinale, l'impact sur le microbiote intestinal et la sécrétion du mucus associé à la protection entérocytaire et ce dans un contexte d'obésité alimentaire.

2 Obésité et inflammation de bas grade : implication du microbiote et des lipopolysaccharides

Parmi les causes environnementales de l'obésité, le microbiote intestinal est un facteur qui est particulièrement étudié depuis une quinzaine d'années. En effet, lors de la consommation d'un régime obésogène hypercalorique, une dysbiose du microbiote intestinal – altération tant qualitative que fonctionnelle du microbiote – s'installe avec une diminution de sa diversité (Turnbaugh *et al.*, 2008 ; Gérard, 2016). Ce dernier, constitué d'environ 10¹⁴ bactéries spécifiques à chaque individu, est réparti en quatre grands *phyla* bactériens (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria*), *Firmicutes* et *Bacteroidetes* étant majoritaires.

Le microbiote intestinal contribue également au maintien de l'intégrité de la fonction barrière intestinale. Cette dernière est assurée d'une part par des protéines de jonctions serrées (Zonula Occludens (ZO)-1 et Claudine1 par exemple) qui scellent les cellules épithéliales et endothéliales entre elles et d'autre part par le microbiote, dont l'altération (dysbiose), entraîne une augmentation de la perméabilité de l'intestin facilitant ainsi le passage de lipopolysaccharides (LPS), composants membranaires des bactéries gram négatives, depuis la lumière intestinale vers la circulation sanguine. Ce passage de LPS, appelé endotoxémie métabolique, provoque un phénomène inflammatoire *in situ* mais également au niveau de tissus tels que le foie, le muscle ou le tissu adipeux (Saad *et al.*, 2016). En effet, les LPS se lient notamment au récepteur TLR4 (Toll Like Receptor 4) qui appartient à la famille des récepteurs ubiquitaires TLR agissant comme des interfaces

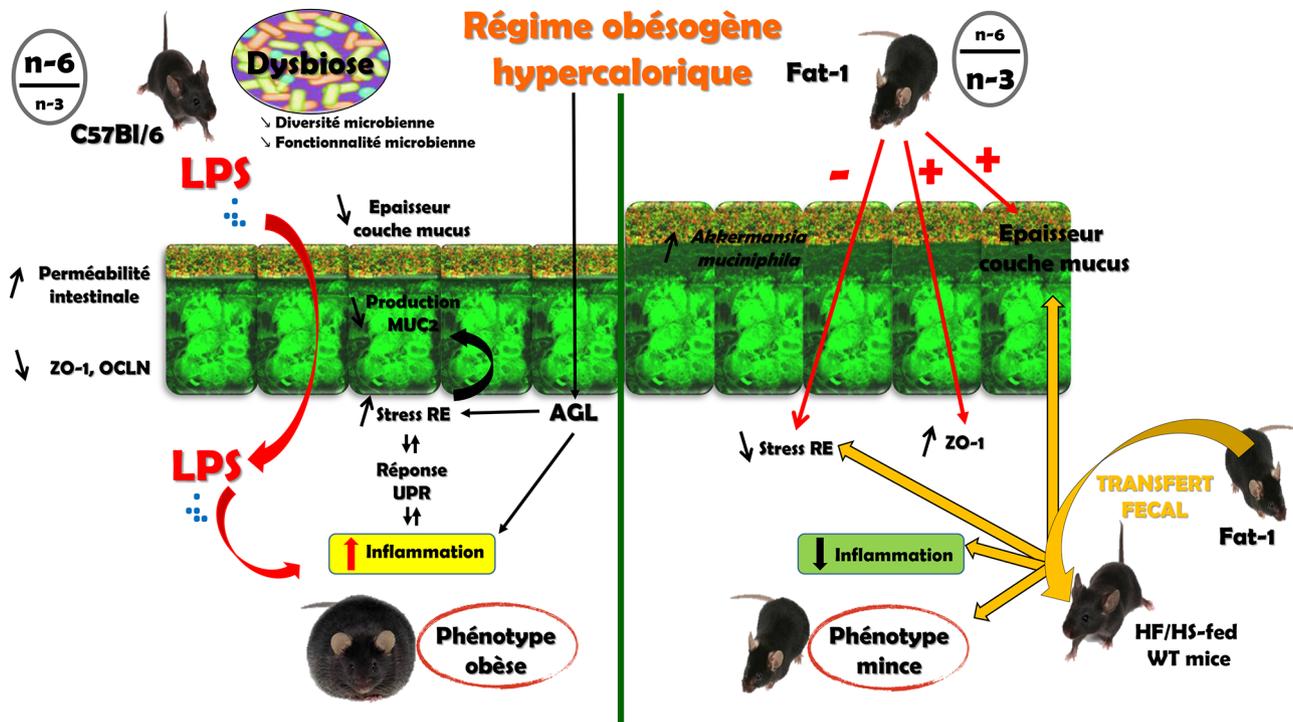


Figure 1. Lors de la consommation d'un régime hyperlipidique obésogène, des souris de type sauvage présentent une dysbiose du microbiote intestinal ainsi qu'une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal en partie due à une diminution de l'expression de protéines de jonctions serrées mais également à une diminution de l'épaisseur de la couche de mucus colique interne en lien avec un stress du réticulum endoplasmique. Cette hyperperméabilité intestinale facilite ainsi le passage des LPS participant à l'inflammation à bas bruit retrouvée chez un individu obèse. Au contraire, nous avons montré que la souris fat-1 était protégée de la dysbiose et de l'hyperperméabilité intestinale *via* une augmentation de l'expression des protéines de jonction serrées et un maintien de l'épaisseur de la couche de mucus colique, qui peut s'expliquer en partie chez les souris fat-1 par une prévention du stress du réticulum ainsi que par l'augmentation de l'espèce *Akkermansia muciniphila*, leur permettant de maintenir un phénotype mince. De plus, le transfert de microbiote caecal de souris fat-1 à des souris de type sauvage permet à ces dernières de maintenir l'épaisseur de leur couche de mucus colique et de totalement empêcher l'activation du stress du réticulum endoplasmique du tissu colique lorsque ces souris sont nourries avec un régime hyperlipidique obésogène à l'issue de la transplantation bactérienne. AGL : acides gras libres ; HF/HS : high fat/high sucrose ; LPS : lipopolysaccharides ; MUC2 : mucine 2 ; OCLN : occludine ; RE : réticulum endoplasmique ; UPR : unfolded protein response ; WT : wild type ; ZO-1 : zonula occludens-1.

moléculaires de reconnaissance des agents pathogènes et entraînant la production d'une réponse immunitaire protectrice (Płóciennikowska *et al.*, 2015). Cette activation du récepteur TLR4, exprimé à la surface de nombreuses cellules comme les cellules de l'immunité, le muscle, le foie et les adipocytes, déclenche une réaction inflammatoire métabolique *via* la production de cytokines pro-inflammatoires participant à l'inflammation des tissus périphériques en lien avec l'obésité et des désordres métaboliques associés. Dans les adipocytes par exemple, cette réponse inflammatoire se fait en activant le facteur nucléaire NF-κB et en augmentant l'expression des gènes pro-inflammatoires aboutissant à la libération des cytokines (Davis *et al.*, 2008). Ainsi, il a été montré que l'inactivation du gène codant pour TLR4 ou de son co-récepteur CD-14 (cluster de différenciation 14) protège les souris de l'obésité induite par un régime hypercalorique obésogène (Davis *et al.*, 2008). De plus, il a été observé chez la souris, que la perfusion de LPS pendant 4 semaines, mime les effets métaboliques inflammatoires induits par la consommation d'un régime hyperlipidique et hypercalorique (Cani *et al.*, 2007).

3 Impact des acides gras polyinsaturés en n-3 sur la perméabilité intestinale et le microbiote intestinal dans un contexte d'obésité alimentaire

De nombreuses études, tant chez l'Homme que chez l'animal, ont montré que les AGPI en n-3 alimentaires sont capables de participer à la prévention de l'obésité et de l'insulino-résistance *via* en particulier la production de médiateurs lipidiques résolvents (White et Marette, 2014). Des approches nutriginomiques ont mis en évidence des effets cardioprotecteurs des AGPI en n-3 attribués à une diminution de marqueurs inflammatoires, une synthèse augmentée de médiateurs lipidiques pro-résolvants ainsi qu'à une modulation de gènes impliqués dans la synthèse et l'oxydation des acides gras (Davidson, 2006). Il a ainsi été récemment montré que la supplémentation alimentaire en acide eicosapentaénoïque (EPA) augmente le contenu hépatique en résolvines (Rv) E1, RvE2, RvD1 et RvD2 chez des souris nourries avec un

régime hyperlipidique et hypercalorique, conduisant ainsi à une diminution du statut pro-inflammatoire hépatique de ces animaux (Echeverría *et al.*, 2019). D'autres médiateurs lipidiques dérivés des AGPI à longue chaîne (LC) en n-3 (tels que les protectines et marésines) sont également connus comme étant capables d'atténuer l'inflammation dans un contexte d'obésité alimentaire. Enfin, une étude récente a montré que l'administration de protectine D1 (PD1) à des souris diabétiques *db/db* améliore nettement leur sensibilité à l'insuline (Li *et al.*, 2014). Cependant, de nombreuses études montrent également des effets hétérogènes (voir contradictoires) des AGPI en n-3 sur l'obésité. En effet, certaines soutiennent que ces acides gras (AG) sont capables de diminuer significativement la masse grasse corporelle alors que d'autres ne montrent aucun effet significatif sur la perte de poids corporel même si l'accumulation de masse grasse est diminuée chez des animaux supplémentés en AGPI en n-3. Il n'en reste pas moins qu'une méta-analyse très récente a montré qu'aucun effet bénéfique ne pouvait être attribué à ces AG (Aung *et al.*, 2018).

Les AGPI en n-3 alimentaires, de par leur incidence sur l'intégrité intestinale, sont capables de diminuer des colites et des immuno-pathologies du colon en augmentant la fonction barrière de l'épithélium intestinal dans divers modèles animaux. Il a en effet été montré que l'EPA augmente l'expression de protéines de jonctions ainsi que la résistance électrique trans-épithéliale (TER), diminuant ainsi la perméabilité des cellules endothéliales intestinales (Jiang *et al.*, 1998). Même si très peu d'études ont évalué l'impact des AGPI en n-3 sur l'endotoxémie métabolique, il semble que la fonction barrière de l'intestin soit différemment modulée en fonction de la nature des lipides ingérés. Mani *et al.* ont montré, chez le porc, que l'huile de poisson (riche en AGPI en n-3 tels que l'EPA et le DHA, acide docosahexaénoïque) diminue l'endotoxémie post-prandiale, que l'huile de noix de coco (riche en acides gras saturés) l'augmente tandis que l'huile d'olive (riche en acides gras insaturés) n'a aucun effet sur la perméabilité aux endotoxines (Mani *et al.*, 2013).

Il a récemment été suggéré que les AGPI en n-3 pouvaient influencer le contenu du microbiote intestinal. Une étude nutritionnelle menée par Andersen *et al.* montre, chez l'Homme, que comparativement à l'huile de tournesol, une supplémentation alimentaire en huile de poisson impacte la plupart des *phyla* bactériens (Andersen *et al.*, 2011). Chez la souris, Liu *et al.* ont observé de profondes modifications du microbiote intestinal en fonction du degré d'insaturation des acides gras alimentaires. (Liu *et al.*, 2012). Ils ont en effet montré que la proportion de *Bacteroidetes* est diminuée de 28 % lors d'un régime riche en acides saturés, de 10 % lors d'un régime en AGPI en n-3 et de 12 % avec un régime riche en AGPI en n-6. Au niveau des familles, ces auteurs ont également observé une diminution significative de la proportion de *Porphyromonadaceae* chez les souris nourries avec le régime riche en n-6 et de *Lachnospiraceae* chez les souris nourries avec le régime enrichi en acides gras saturés. De plus, Yu *et al.* ont montré que l'huile de poisson est capable d'entraîner de profondes modifications du microbiote intestinal notamment en supprimant la croissance d'*Helicobacter* et de *Firmicutes* (Yu *et al.*, 2014), connus pour être fortement impliqués dans l'étiologie de l'ulcère gastro-duodéal et l'obésité. Enfin, une étude a montré des effets opposés des

AGPI en n-6 et n-3 sur l'endotoxémie métabolique, dépendants de la relation microbiote-hôte (Kaliannan *et al.*, 2015). Ces études confirment bien la relation qu'il existe entre le contenu alimentaire en acides gras et leur influence sur le microbiote intestinal.

L'ensemble de ces résultats laisse transparaître que la modulation de la fonction barrière de l'intestin par les AGPI en n-3 reste encore bien peu comprise et que le moyen par lequel ces acides gras sont capables de lutter contre l'augmentation de la perméabilité intestinale, observée dans un contexte d'obésité alimentaire, nécessite d'être encore étudié. Cependant, la complexité de cibler les effets spécifiques des AGPI en n-3 est renforcée par le fait qu'il existe également dans ces études de nombreux facteurs confondants liés aux procédures expérimentales. Par conséquent, l'utilisation d'un modèle permettant d'éviter l'utilisation de régimes alimentaires semble nécessaire pour éviter ces biais et clarifier les interprétations.

Le modèle murin transgénique *fat-1* a été créé par l'insertion aléatoire dans le génome de souris C57BL/6 du gène *fat-1*, présent chez *Caenorabditis elegans*, codant pour une désaturase capable de convertir les AGPI n-6 en AGPI n-3. Il représente de ce fait une approche alternative qui permet 1) de s'affranchir de l'utilisation de régimes alimentaires à l'origine de nombreux facteurs confondants et 2) de pouvoir rapidement et efficacement augmenter les teneurs cellulaires en AGPI n-3 tout en diminuant le rapport n-6/n-3 (ratio n-6/n-3 = 2 à 5), comparativement aux souris sauvages (ratio n-6/n-3 = 20 à 50). De plus, l'utilisation du phénotype homozygote de la souris *fat-1* dans nos études est primordial. En effet, des travaux utilisant des souris transgéniques *fat-1* hétérozygotes (White *et al.*, 2010) ont montré que ces animaux nourris avec un régime obésogène hypercalorique (55 % kcal) développent une obésité alimentaire comparable à celle de souris de type sauvage alors que d'autres études utilisant des souris homozygotes pour ce transgène montrent que ces dernières sont protégées de l'obésité alimentaire (Li *et al.*, 2014 ; Bidu *et al.*, 2018). Ceci laisse donc supposer que la présence du transgène sur un seul allèle ne semble pas suffisant pour empêcher la prise de poids de ces souris. Ainsi, l'enrichissement endogène en AGPI-LC en n-3 chez les souris *fat-1* est dépendant de leur activité de conversion des AGPI en n-6 en AGPI en n-3. Il a de plus été rapporté que ce taux de conversion est également grandement dépendant de l'apport en substrat en AGPI en n-6 (Li *et al.*, 2014).

Nous avons donc utilisé ce modèle murin afin de tenter de répondre aux questions suivantes : est-ce que l'enrichissement tissulaire en AGPI-LC en n-3 protège la souris *fat-1* de l'obésité alimentaire et des désordres métaboliques associés ? Est-ce qu'une telle prévention se produit notamment grâce à une diminution de la perméabilité intestinale et de l'endotoxémie métabolique en lien avec une modulation du microbiote ?

4 La modulation du microbiote intestinal de la souris *fat-1* par les AGPI-LC en n-3 endogènes la protège d'une obésité alimentaire et des désordres métaboliques associés

Pour tenter de répondre à ces questions, des souris de type sauvage et transgéniques *fat-1* ont été nourries avec un régime de type cafétéria (45 % de la ration énergétique apportée par

des lipides) durant douze semaines. En accord avec de précédents travaux (Kim *et al.*, 2012 ; Li *et al.*, 2014), nous avons montré que la souris fat-1 est protégée d'une prise de poids induite par un régime obésogène et hypercalorique, en partie dû à une augmentation de sa dépense énergétique en lien avec une augmentation de l'expression de la protéine découplante UCP1 au niveau du tissu adipeux (Bidu *et al.*, 2018). Nous avons également observé que la souris fat-1 est protégée de certaines altérations métaboliques liées à l'obésité, notamment de la stéatose hépatique, de l'intolérance au glucose et de l'inflammation du tissu adipeux. 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 docosanoides. En effet, White *et al.* 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 Marette, 2014). Nos travaux ont également mis en évidence que, lors de la consommation de ce régime hyperlipidique et hypercalorique, les souris fat-1 sont protégées d'une augmentation de la perméabilité intestinale et de l'endotoxémie métabolique associée (Fig. 1). Ainsi, l'enrichissement tissulaire en AGPI-LC en n-3 permet de prévenir la diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées, telles que ZO-1, et de maintenir l'intégrité de la fonction barrière de l'intestin (Bidu *et al.*, 2018).

Le microbiote intestinal étant reconnu comme un acteur majeur de l'homéostasie intestinale et énergétique (Backhed *et al.*, 2004), nous avons ensuite étudié son implication dans les effets préventifs des AGPI-LC 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 présentent une plus grande diversité phylogénique bactérienne que les souris sauvages nourries avec le même régime obésogène, avec notamment une plus grande abondance du genre *Bacteroides*. Nous avons également observé une augmentation de l'abondance de l'espèce *Akkermansia muciniphila* dans le groupe fat-1 (Bidu *et al.*, 2018), 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). 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 n-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, lysozymes ou sécrétion de mucus colique qui pourraient 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 et hypercalorique, nous avons transplanté le microbiote de souris fat-1 à des souris sauvages préalablement traitées à la streptomycine afin de très fortement diminuer le microbiote résidant et faciliter ainsi l'implantation du microbiote exogène. Nous avons montré que ce transfert de microbiote chez des souris sauvages les protège de la prise de

poids et d'une partie des altérations métaboliques et intestinales induites par 18 semaines de régime obésogène et hypercalorique (Bidu *et al.*, 2018). Ces expériences de transplantation ont ainsi permis de mettre en évidence l'effet préventif du microbiote intestinal modulé par les AGPI-LC en n-3 vis-à-vis de l'obésité et des troubles associés (Fig. 1).

5 AGPI en n-3 et mucus colique

Après la composante épithéliale, nous nous sommes intéressés au rôle de la couche de mucus intestinal, composante également importante de la fonction barrière de l'intestin à l'interface entre le microbiote intestinal et les cellules endothéliales coliques. Il est aujourd'hui clairement établi 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 (mucine-2) produite par les cellules caliciformes est la protéine principale, est drastiquement diminuée, favorisant ainsi une augmentation de la perméabilité intestinale et l'installation d'une endotoxémie métabolique (Cani *et al.*, 2007 ; Gulhane *et al.*, 2016). Il a de plus été montré qu'un régime hyperlipidique hypercalorique entraîne un stress du réticulum endoplasmique (RE) au niveau des cellules épithéliales intestinales, diminuant la production de MUC2 et ainsi secondairement l'épaisseur de la couche de mucus, ce qui permet une augmentation du passage des molécules de LPS conduisant à l'inflammation de bas grade. Les acides gras libres apportés par ce régime alimentaire (mais également ceux libérés par le tissu adipeux lors de la lipolyse) semblent être des activateurs directs du stress du RE au niveau des cellules caliciformes coliques productrices de mucus (Gulhane *et al.*, 2016). À notre connaissance, aucune étude ne s'est encore intéressée au potentiel rôle préventif des AGPI-LC en n-3 sur l'altération de la couche de mucus lors d'un régime obésogène et hypercalorique. Pour cela, nous avons développé deux approches : une première, *in vitro* avec un modèle de cellules épithéliales coliques humaines (LS174T), et une seconde *in vivo* (travaux non encore publiés) avec le modèle de souris transgéniques fat-1.

Dans la première approche, nous avons d'abord montré qu'un traitement des cellules LS174T avec de l'acide palmitique diminue la sécrétion de MUC2 associée à une augmentation du stress du RE et que seuls l'EPA et le DHA sont capables de prévenir ce stress et de rétablir la sécrétion de la protéine MUC2 (Escoula *et al.*, 2019). Nous avons montré que l'acide palmitique induit un stress du RE, 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 permet 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 (Escoula *et al.*, 2019). 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'AMP-

activated protein kinase α (AMPK) par l'EPA et le DHA telle que suggérée par les travaux de Yang *et al.* (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 (ALA) 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 de l'ALA, 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 l'ALA. 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 al.* (Pinel *et al.*, 2016), l'ALA ne permet 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 que, contrairement à l'EPA et au DHA, l'ALA n'a pas, par lui-même, d'effet direct sur le maintien d'une sécrétion normale de MUC2.

Néanmoins, la pertinence de nos résultats *in vitro* nécessite d'être évaluée *in vivo* dans un contexte d'obésité alimentaire, ainsi que l'efficacité des AGPI-LC en n-3 à prévenir de la diminution de l'épaisseur de la couche de mucus et par conséquent à préserver l'intégrité de la barrière intestinale.

Ainsi, dans une seconde approche (non encore publiée), nous avons tout d'abord confirmé ce qui est décrit dans la littérature : des souris de type sauvage rendues obèses par un régime obésogène et hypercalorique présentent une diminution de moitié de l'épaisseur de la couche interne de mucus. Par ailleurs, nous avons montré, pour la première fois, que l'épaisseur de cette couche interne de mucus est préservée chez la souris fat-1 nourrie avec le même régime. Ceci s'accompagne du maintien de l'expression de *MUC2* et *Klf4* (facteur de différenciation des cellules caliciformes) ainsi que d'une prévention du stress du RE colique induit par ce régime. Afin de comprendre le potentiel rôle du microbiote intestinal des souris fat-1 lors de la prévention des altérations de l'épaisseur de la couche de mucus colique, nous avons évalué l'impact d'un transfert de microbiote de souris fat-1 à des souris sauvages, nourries ensuite avec un régime hypercalorique obésogène sur le maintien de l'épaisseur de la couche de mucus. Nous avons observé (résultats non publiés) que ce transfert de microbiote, permet 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, le transfert de microbiote de souris sauvages reste sans effet préventif chez les souris sauvages nourries avec le régime hypercalorique obésogène. Nous avons également observé 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 (Fig. 1).

6 Conclusion

L'ensemble de ces données nous a permis de confirmer le rôle important des AGPI-LC en n-3 dans la lutte contre l'obésité et surtout de mettre en évidence le rôle préventif du microbiote intestinal des souris fat-1. Ces données nous ont également permis de mieux appréhender comment le microbiote intestinal de souris transgénique fat-1, dont les tissus sont enrichis de façon endogène en AGPI-LC en n-3, participe à prévenir l'altération de la fonction barrière de l'intestin et *in fine* l'installation d'une obésité liée à l'alimentation. Nous mettons en évidence dans ce travail la capacité du microbiote de souris fat-1, modulé par les n-3, à maintenir l'intégrité de la couche de mucus colique en conditions obésogéniques et hypercaloriques, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives quant à l'utilisation des transplantations fécales à visée thérapeutique, dans la prise en charge des maladies métaboliques (Fig. 1).

Par ailleurs, ces travaux ouvrent également des perspectives de recherche, notamment celles de déterminer les espèces bactériennes, ou métabolites bactériens, impliqués dans la transmission du phénotype mince des souris fat-1 et la résistance de celles-ci vis-à-vis des maladies métaboliques.

Déclaration d'intérêt

L'auteur déclare n'avoir aucun conflit d'intérêt.

Remerciements. Ce travail a été soutenu par l'INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), le Conseil Régional de Bourgogne, le Fond de Développement Régional Européen, l'Université de Bourgogne, la Fondation de France, et par l'Agence Nationale de la Recherche sous le programme « Investissements d'Avenir » avec la référence ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC LabEx. Ce projet a également été soutenu par Valorex (Combourtillé, France) et l'Association Nationale de la Recherche Technologique (ANRT) avec un financement de thèse CIFRE.

Références

- Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, *et al.* 2017. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med* 377(1): 13–27.
- Andersen AD, Molbak L, Michaelsen KF, Lauritzen L. 2011. 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): 303–309.
- Aung T, Halsey J, Kromhout D, *et al.* 2018. Associations of Omega-3 Fatty Acid Supplement Use With Cardiovascular Disease Risks: Meta-analysis of 10 Trials Involving 77917 Individuals. *JAMA Cardiol* 3(3): 225–234.
- Backhed F, Ding H, Wang T, *et al.* 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(44): 15718–15723.
- Bidu C, Escoula Q, Bellenger S, *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.

- Brignardello J, Morales P, Diaz E, Romero J, Brunser O, 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 (11-12): 1307–1314.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, *et al.* 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56(7): 1761–1772.
- Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, *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.
- Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, *et al.* 2003. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem* 278(12): 10297–10303.
- Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. 2018. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med* 50(8): 103.
- Davidson MH. 2006. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol* 98(4a): 27i–33i.
- Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, Spurlock ME. 2008. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring)* 16(6): 1248–1255.
- Echeverría F, Valenzuela R, Espinosa A, *et al.* 2019. 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: 35–43.
- 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): 2179.
- Everard A, Belzer C, Geurts L, *et al.* 2013. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(22): 9066–9071.
- Feral-Pierssens AL, Carette C, Rives-Lange C, *et al.* 2018. Obesity and emergency care in the French CONSTANCES cohort. *PLoS One* 13(3): e0194831.
- Gérard P. 2016. Gut microbiota and obesity. *Cell Mol Life Sci* 73(1): 147–162.
- Guha P, Kaptan E, Gade P, Kalvakolanu DV, 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, *et al.* 2016. High Fat Diets Induce Colonic Epithelial Cell Stress and Inflammation that is Reversed by IL-22. *Sci Rep* 6: 28990.
- Jiang WG, Bryce RP, Horrobin DF, Mansel RE. 1998. Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 244(2): 414–420.
- Johnson AM, Costanzo A, Gareau MG, *et al.* 2015. High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability. *PLoS One* 10(4): e0122195.
- Jung TW, Hwang HJ, Hong HC, *et al.* 2014. Resolvin D1 reduces ER stress-induced apoptosis and triglyceride accumulation through JNK pathway in HepG2 cells. *Mol Cell Endocrinol* 391(1-2): 30–40.
- 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.
- 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. *Eur J Pharmacol* 623(1-3): 107–112.
- Kim EH, Bae JS, Hahm KB, Cha JY. 2012. 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): 1359–1365.
- Li J, Li FR, Wei D, *et al.* 2014. Endogenous omega-3 polyunsaturated fatty acid production confers resistance to obesity, dyslipidemia, and diabetes in mice. *Mol Endocrinol* 28(8): 1316–1328.
- Liu T, Hougen H, Vollmer AC, Hiebert SM. 2012. Gut bacteria profiles of *Mus musculus* at the phylum and family levels are influenced by saturation of dietary fatty acids. *Anaerobe* 18(3): 331–337.
- Mani V, Hollis JH, Gabler NK. 2013. Dietary oil composition differentially modulates intestinal endotoxin transport and postprandial endotoxemia. *Nutr Metab (Lond)* 10(1): 6.
- Moreira AP, Texeira TF, Ferreira AB, Mdo Peluzio C, Alfnas Rde C. 2012. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr* 108(5): 801–809.
- Pimenta AS, Gaidhu MP, Habib S, *et al.* 2008. Prolonged exposure to palmitate impairs fatty acid oxidation despite activation of AMP-activated protein kinase in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol* 217(2): 478–485.
- Pinel A, Rigaudiere JP, Laillet B, *et al.* 2016. N-3PUFA differentially modulate palmitate-induced lipotoxicity through alterations of its metabolism in C2C12 muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1861(1): 12–20.
- Plóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, Kwiatkowska K. 2015. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci* 72(3): 557–581.
- Plovier H, Everard A, Druart C, *et al.* 2017. A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* 23(1): 107–113.
- Saad MJ, Santos A, Prada PO. 2016. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology (Bethesda)* 31(4): 283–293.
- Teixeira TF, Souza NC, Chiarello PG, *et al.* 2012. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. *Clin Nutr* 31(5): 735–740.
- Thaiss CA, Levy M, Grosheva I, *et al.* 2018. Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science* 359(6382): 1376–1383.
- Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 3(4): 213–223.
- Vieira-Silva S, Falony G, Belda E, *et al.* 2020. Statin therapy is associated with lower prevalence of gut microbiota dysbiosis. *Nature* 581(7808): 310–315.
- White PJ, Marette A. 2014. Potential role of omega-3-derived resolution mediators in metabolic inflammation. *Immunol Cell Biol* 92(4): 324–330.
- White PJ, Arita M, Taguchi R, Kang JX, Marette A. 2010. 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: 3066–3073.
- Yang W, Chen X, Chen M, *et al.* 2017. Fish oil supplementation inhibits endoplasmic reticulum stress and improves insulin resistance: involvement of AMP-activated protein kinase. *Food Funct* 8(4): 1481–1493.

- Yu HN, Zhu J, Pan WS, *et al.* 2014. Effects of fish oil with a high content of n-3 polyunsaturated fatty acids on mouse gut microbiota. *Arch Med Res* 45(3): 195–202.
- 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 Health Dis* 10: 81.

Citation de l'article : Bellenger J, Bellenger S, Bourragat A, Escoula Q, Weill P, Narce M. 2021. Contribution du microbiote intestinal aux effets bénéfiques des acides gras polyinsaturés en n-3 lors de l'obésité alimentaire chez la souris fat-1. *OCL*, <https://doi.org/10.1051/ocl/2021006>