Université de Bourgogne Franche-Comté

École doctorale n°554 « ED-ES, Environnements – Santé »
Centre de recherche INSERM U1231
Équipe D. Masson « Lipoprotéines et Transfert des Lipides dans l'Inflammation Stérile et Septique »

Thèse de doctorat

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Spécialité : Biochimie, Biologie cellulaire et moléculaire, Physiologie et Nutrition

---

Inflammation et maladies métaboliques : analyse du métabolisme des lipopolysaccharides d'origine intestinale ou péritonéale et de leur prise en charge par les lipoprotéines

---

Par

Gaëtan Pallot

Dirigée par les Dr. Jacques Grober et Dr. Thomas Gautier

Thèse présentée et soutenue publiquement à Dijon, le 13 décembre 2021

Composition du Jury :

Pr. SAAS Philippe	Université de Bourgogne Franche-Comté	Président
Dr. DEMIGNOT Sylvie	EPHE U938	Rapporteur
Dr. FOUFELLE Fabienne	INSERM U1138	Rapporteur
Pr. CASTAN-LAURELL Isabelle	INSERM U1040	Examinateur
Dr. GAUTIER Thomas	Université de Bourgogne Franche-Comté	Co-directeur
Dr. GROBER Jacques	Université de Bourgogne Franche-Comté	Co-directeur

Remerciements

Je remercie très sincèrement le Dr. *Fabienne Foufelle* et le Dr. *Sylvie Demignot* pour l'intérêt porté à ce manuscrit de thèse et à la pertinence de leurs remarques qui ont permis d'apporter des modifications afin de l'améliorer.

Je tiens également à remercier le Pr. *Isabelle Castan-Laurell*, qui a accepté d'évaluer ce travail de thèse en faisant partie des membres du jury. Je remercie également vivement le Pr. *Philippe Saas*, qui en plus d'avoir accepté d'être membre du jury, m'a donné de précieux conseils durant mes comités de suivi de thèse.
Un grand merci au Dr. *Fabienne Laugerette* qui m'a apporté de nombreux conseils et pistes de réflexion durant mes comités de suivi de thèse.

Un énorme merci à mes deux directeurs de thèse qui m'ont encadré : les Dr. *Jacques Grober* et Dr. *Thomas Gautier*, qui durant ces 3 années passées au laboratoire, m'ont permis de développer mon autonomie, ma créativité, ma rigueur scientifique. Vos conseils, votre patience, votre disponibilité et votre soutien ont fortement contribué à mon épanouissement aussi bien personnel que professionnel et m'ont poussé à poursuivre mon chemin dans ce domaine. Je vous remercie pour tout ce que vous avez pu m'apporter durant ce doctorat.

Je tiens également à remercier le Pr. *David Masson* de m'avoir accueilli lors de mon arrivée au laboratoire et de m'avoir fait confiance.

Sans les citer car elles sont nombreuses, je remercie toutes les personnes avec qui j'ai eu l'opportunité de collaborer durant ces toutes ces années de thèse.

Je remercie vivement la *plateforme Cellimap*, la *plateforme de lipidomique*, le *centre de Zootechnie* et en particulier *Valérie Saint-Giorgio* qui ont tous été bienveillants et indispensables au bon déroulement de ce projet.

Tous les membres de l'équipe Lipness, actuels comme anciens : des anciens doctorants, les Dr. *Antoine Jalil*, Dr. *Thibaut Bourgeois*, Dr. *Aloïs Dusuel*, aux derniers arrivés, *Adrien Vouilloz*, *Thomas Pilot* et en passant par les personnes qui sont là depuis (très) longtemps : merci à vous, sans qui cette thèse n'aurait pas été tout à fait pareille. Un grand merci à *Lucile Fuselier* et *Alexandrine Fraichard*, secrétaires de notre UMR, pour leur professionnalisme, leur efficacité et leur écoute. Et je remercie tout particulièrement *Naig Le Guern*, indispensable à

ce laboratoire et qui a contribué à mettre une très bonne ambiance dans notre fameux bureau R21 !

Un remerciement tout particulier aux Dr. *Maxime Nguyen* et Dr. *Annabelle Tavernier* pour toutes les manipulations réalisées ensemble, vos conseils, votre bonne humeur : vive la « *Dream Team* ». Sans vous, ce projet n'aurait pas pu être aussi bien mené.

Je remercie également le Dr. *Lorène Lebrun* pour ses conseils, sa patience et son travail impressionnant durant sa thèse, qui nous a permis de rédiger notre publication.

Merci aussi au Dr. *Louise Ménégaut* pour tout son soutien durant ces derniers mois !

Je remercie vivement *Eve Rigal*, pour nos échanges scientifiques mais aussi pour tous ces fous-rires dans le bureau de la « poilade » qui m'ont énormément apporté durant cette thèse.

Enfin, je ne remercierai jamais assez mes amis (*Fanny*, *Maëva, Charlie*, *Marion*, *Clément* pour ne citer qu'eux) et évidemment ma mère qui ont fait preuve d'une patience légendaire, qui m'ont soutenu et à qui je dédie l'ensemble de ce travail de thèse. Merci !

Résumé

Les LPS (lipopolysaccharides), endotoxines provenant des bactéries à Gram négatif, sont connus pour avoir la capacité d'interagir avec la barrière intestinale et provoquer la désorganisation de cette dernière. Ces molécules sont ensuite capables de passer dans le compartiment sanguin (endotoxémie) pour provoquer une inflammation métabolique à bas bruit ou un syndrome inflammatoire aigu. Cependant, certaines protéines circulantes telles que la PLTP (Protéine de Transfert des Phospholipides) permettent de transférer les LPS aux lipoprotéines circulantes dans le sang afin de procéder à leur détoxification.

Les objectifs principaux de ces travaux de recherche étaient d'étudier le devenir métabolique des LPS d'origine intestinale ou injectés dans la cavité péritonéale ainsi que l'influence de la PLTP sur ces LPS dans un contexte de maladies inflammatoires et infectieuses telles que l'obésité, le diabète de type 2 (DT2) ou encore une péritonite. Des souris type-sauvage (présence de PLTP endogène active) ont été comparées à des souris génétiquement modifiées déficientes en PLTP après administration de LPS par voie orale ou intrapéritonéale. Au niveau intestinal, la déficience en PLTP est associée à une augmentation de la translocation des LPS de la lumière intestinale vers la circulation, où leur association aux lipoprotéines plasmatique est diminuée en parallèle à un défaut de clairance des lipoprotéines riches en triglycérides (TRL) causé par une diminution de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme clé nécessaire à l'hydrolyse des triglycérides. Au niveau de la cavité péritonéale, l'absence de PLTP diminue la liaison des LPS aux lipoprotéines de haute densité (HDL) *in situ* empêchant ainsi leur inactivation précoce et *in fine*, leur détoxification par la voie hépatobiliaire. L'absence de PLTP induit ainsi une forte incapacité à détoxifier efficacement les LPS d'origine intestinale et péritonéale, conduisant à une augmentation de la réponse inflammatoire et à de possibles complications plus sévères (obésité, insulinorésistance, syndrome inflammatoire systémique). La PLTP possède donc un rôle majeur dans la neutralisation précoce des LPS dans la cavité abdominale, faisant d'elle une cible thérapeutique intéressante dans le traitement des maladies métaboliques et infectieuses.

Abstract

LPS (lipopolysaccharides) are endotoxins originating from Gram-negative bacteria. They have been extensively described for their ability to interact with and disrupt the intestinal barrier. These toxins are able to cross the gut barrier and to pass into the blood (endotoxemia), leading to low-grade metabolic inflammation or to a severe inflammatory syndrome (SIRS). Fortunately, some circulating proteins such as PLTP (Phospholipid Transfer Protein) are able to transfer LPS to plasma lipoproteins in order to inactivate and detoxify them.

The main goals of this study were to investigate the metabolic fate of LPS from the gut and peritoneal cavity but also the influence of PLTP on these toxins in a context of inflammatory and infectious diseases such as obesity, type 2 diabetes (T2D) or peritonitis. Wild-type mice (presence of active endogenous PLTP) were compared with PLTP-deficient genetically engineered mice after oral or intraperitoneal administration of LPS.

After oral administration of LPS, PLTP deficiency leads to increased translocation of LPS from the gut lumen to the circulation, where its association with plasma lipoproteins is strongly decreased together with a defect of clearance of triglyceride-rich lipoproteins (TRL) due to decreased lipoprotein lipase (LPL) activity, a key enzyme involved in triglycerides hydrolysis. After intraperitoneal administration of LPS, the absence of PLTP leads to a decrease binding of LPS to high-density lipoproteins (HDL) *in situ*, preventing their early inactivation and their detoxification by the hepatobiliary pathway.

The absence of PLTP is associated with a strong inability to efficiently detoxify LPS originating from the gut or from peritoneal cavity leading to an increased inflammatory response and potential more severe complications (obesity, insulin resistance, systemic acute inflammatory syndrome). Thus, PLTP plays a major role in the early neutralization of LPS in abdominal cavity and it could be an interesting therapeutic target in the treatment of metabolic and infectious diseases.

Liste des publications et communications écrites et orales **8**

Liste des tableaux et figures **10**

Liste des abréviations **11**

INTRODUCTION ***14***

CHAPITRE 1 : MALADIES METABOLIQUES **16**
A. Surpoids et obésité 17
1. Épidémiologie, prévalence dans le monde et en France 18
2. Conséquences physiopathologiques 20
B. Diabète de type 2 (DT2) 22
1. Épidémiologie dans le monde et en France… 23
2. Conséquences physiopathologiques 24

CHAPITRE 2 : L'INTESTIN : PHYSIOLOGIE ET RÔLE BARRIERE(S) **27**
A. Anatomie fonctionnelle de l'intestin 28
B. Intestin et diversité cellulaire 32
C. L'intestin : une barrière polyvalente et sélective 33
1. Barrière chimique 33
2. Barrière physique 33
2.1. Intestin et perméabilité 34
2.1.1. Jonctions cellulaires et perméabilité paracellulaire 34
a. Les jonctions serrées 35
b. Les jonctions adhérentes 35
c. Les desmosomes 36
2.1.2. Contrôle de la perméabilité intestinale et dérégulation 38
a. Rôle des cytokines 38
b. Rôle de l'autophagie 40
c. Rôle de l'alimentation et des lipides 40
3. Barrière immunologique 42
4. Barrière microbiologique : l'intestin, un lieu de cohabitation 43
4.1. Notion de microbiote 43
4.2. Notion de tolérance : cohabitation hôte- bactéries 43
4.3. Origine, localisation et composition du microbiote 44
4.3.1. Origine 44
4.3.2. Localisation et composition 45
4.4. Fonctions du microbiote 47
4.4.1. Installation et développement du système immunitaire 47
4.4.2. Rempart contre les pathogènes 48
4.4.3. Digestion des aliments 48
4.5. Dysbiose 49
4.6. Translocation intestinale 51

CHAPITRE 3. LES LIPOPOLYSACCHARIDES (LPS). **53**
A. Un petit rappel historique concernant les LPS… 54
B. Localisation, caractérisation et composition des LPS 55
1. Localisation et caractérisation des LPS 55
2. Composition et structure des LPS 56
2.1. L'antigène O 57
2.2. Le noyau 57
2.3. Le lipide A 58
C. Endotoxémie et l'inflammation provoquée par les LPS 59
1. Reconnaissance des LPS par la voie canonique 59
1.1. La voie LBP/CD14 dépendante 60
1.2. La voie LBP/CD14 non-dépendante 60
1.3. La voie LBP dépendante et CD14 indépendante 61
1.4. Formation du complexe TLR4/MD-2 et cascades de signalisation 61

1.4.1. Le complexe TLR4/MD-2 ... 61
1.4.2. Les cascades de signalisation ... 62
2. Prise en charge des LPS par la voie des caspases ... 64
3. Médiateurs de l'inflammation ... 66
3.1. Médiateurs lipidiques ... 67
3.2. Autres médiateurs ... 68
3.2.1. L'histamine ... 68
3.2.2. Les cytokines ... 68
3.2.3. Les chimiokines ... 69
3.2.4. Les protéines de phase aigüe ... 69
3.2.5. Le cas particulier du Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) : médiateur ou biomarqueur ? ... 69
4. Le développement du sepsis ... 70
4.1. Épidémiologies mondiale et nationale... ... 71
4.2. Physiopathologie ... 71

CHAPITRE 4. NEUTRALISATION ET ÉLIMINATION DES LPS : IMPLICATIONS DES PROTÉINES DE LA FAMILLE LT/LBP ET DES LIPOPROTÉINES ... 74
A. Les lipoprotéines ... 75
1. Que ce sont les lipoprotéines ? ... 75
2. Métabolisme des lipoprotéines ... 77
3. Implication des lipoprotéines dans le développement de pathologies cardiovasculaires ... 78
4. Inactivation des LPS ... 79
B. Protéines de la famille LT/LBP : une prise en charge efficace ... 80
1. Les membres de la famille LT/LBP ... 80
2. Implication de la protéine de transfert des phospholipides (PLTP) ... 81
2.1. Structure et fonctions principales de la PLTP ... 81
2.2 Mécanismes de prise en charge des LPS par la PLTP ... 82
C. Élimination des LPS ... 84
1. Transport inverse des LPS ... 84
2. Effet du premier passage hépatique ... 84
3. Voie annexe de détoxification : différentes enzymes impliquées ... 85

CHAPITRE 5. LIEN ENTRE PLTP ET MALADIES METABOLIQUES ET INFLAMMATION ... 87
A. PLTP : obésité et diabète ... 88
B. PLTP : maladies cardiovasculaires ... 89
C. PLTP : endotoxémie et inflammation ... 90

OBJECTIFS ... 92

RÉSULTATS ... 95

ARTICLE 1 (soumis à Diabetes) ... 97
A. Introduction et objectifs ... 97
B. Publication scientifique ... 98
1. Authors and affiliations ... 98
2. Summary ... 99
3. Abbreviations ... 99
4. Introduction ... 100
5. Methods ... 102
6. Results ... 106
7. Discussion ... 120
8. Author contributions ... 124
9. Acknowledgments ... 124
10. Conflict of interest statement ... 124
11. Funding ... 124
12. References ... 126
13. Supplemental data ... 132
C. Principaux résultats et éléments de discussion ... 137

ARTICLE 2 (publié dans Frontiers in immunology) 142
A. Introduction et objectifs 142
B. Principaux résultats et discussion 154

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 156

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 162

ANNEXES 193
Annexe 1 : Sécrétion de GLP-1 altérée chez les souris *Pltp*-KO 195
Annexe 2 : Poster NSFA 2021 (prix poster) 196
Annexe 3 : Participation à une étude sur la Covid-19 197

Liste des publications et communications écrites et orales

Publication scientifique en premier auteur (soumis – résultats Article 1)

"Increased weight gain and insulin resistance in HF-fed PLTP deficient mice is related to altered inflammatory response and plasma transport of gut-derived LPS", 2021, soumis à Diabetes.

Lorène J Lebrun[1,2,3*], Gaëtan Pallot[1,2*], Maxime Nguyen[1,2,4], Annabelle Tavernier[1,2,3], Alois Dusuel[1,2], Thomas Pilot[1,2], Valérie Deckert[1,2], Isabelle Dugail[7], Naig Le Guern[1,2], Jean-Paul Pais De Barros[1,2,6], Hélène Choubley[1,2,6], Laurent Lagrost[1,2], David Masson[1,2,5], Thomas Gautier[1,2#], Jacques Grober[1,2,3#].

Publication scientifique en second auteur (publié – résultats Article 2)

"Intra-abdominal lipopolysaccharide clearance and inactivation in peritonitis: key roles for lipoproteins and the phospholipid transfer protein", 2021, Frontiers in immunology.

Maxime Nguyen[1,2,3,4], Gaëtan Pallot[3,4], Antoine Jalil[3,4], Annabelle Tavernier[3,4], Alois Dusuel[3,4], Naig Le Guern[3,4], Laurent Lagrost[2,3,4], Jean-Paul Pais de Barros[3,6], Helene Choubley[3,6], Victoria Bergas[3,6], Pierre-Grégoire Guinot[1,2,3,4], David Masson[2,3,4,5], Belaid Bouhemad[1,2,3,4], Thomas Gautier[2,3,4].

Publications scientifiques, participation en tant que co-auteur

"Increased phospholipid transfer protein (PLTP) activity is associated with markers of enhanced lipopolysaccharide (LPS) clearance in human during cardiopulmonary bypass", 2021, Frontiers in Cardiovascular Medicine.

Maxime Nguyen, [1,2,3,4,*] Thomas Gautier, [2,3,4] Guillaume Réocreux, [1] Gaëtan Pallot, [3] Guillaume Maquart, [3] Pierre-Alain Bahr, [1,3] Annabelle Tavernier, [3] Jacques Grober, [2,3,4,5] David Masson, [2,3,4] Belaid Bouhemad, [1,2,3,4] and Pierre-Grégoire Guinot [1,2,3,4].

"High plasma concentration of non-esterified polyunstatured fatty acids is a specific feature of severe COVID-19 pneumonia", 2021, Scientific reports (Annexe 3).

Maxime Nguyen, Abderrahmane Bourredjem, Lionel Piroth, Bélaïd Bouhemad, Antoine Jalil, Gaëtan Pallot, Naig Le Guern, Charles Thomas, Thomas Pilot, Victoria Bergas, Hélène Choubley, Jean-Pierre Quenot, Pierre-Emmanuel Charles, Laurent Lagrost, Valerie Deckert, Jean-Paul Pais de Barros, Pierre-Grégoire Guinot, David Masson, Christine Binquet, Thomas Gautier, Mathieu Blot & Lymphonie study group.

"Evidence for constitutive microbiota-dependent short-term control of food intake in mice: Is there a link with inflammation, oxidative stress, endotoxemia, and Glp-1?" soumis à Antioxidants & Redox Signaling (collaboration avec le CSGA, Dijon).

"HDL infusion protects from acute graft-versus-host disease in experimental allogeneic hematopoietic cell transplantation" soumis à American Journal of Transplantation.

"Intestinal epithelial CD36 protects from obesity and endotoxemia associated with lipid absorption", en cours de publication (Collaboration avec Agrosup Dijon, équipe Nutox).

Communications orales scientifiques

NSFA (Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose), en ligne, juin 2021.

Séminaire de l'UMR 1231 Lipide, Nutrition, Cancer, juin 2021.

Communications scientifiques affichées

NSFA (Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose), en ligne, juin 2021.

AFERO (Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité), poster sélectionné pour le congrès des 27 et 28 janvier 2022 à Nice.

Liste des tableaux et figures

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification du surpoids et de l'obésité en fonction de l'IMC, d'après l'OMS 18
Tableau 2. Caractéristiques et compositions des lipoprotéines. 77
Tableau 3. Récapitulatifs des fonctions des protéines de la famille LT/LBP dans le métabolisme des LPS 81
Tableau 4. Corrélation entre l'activité PLTP et le développement de maladies cardiométaboliques... 90

Liste des figures

Figure 1. Analyses de la prévalence de l'obésité en France en 2012 et en 2020 selon les régions ... 20
Figure 2. Éléments clés de la physiopathologie du diabète de type 2. 23
Figure 3. Relation entre diabète, inflammation et risques cardiovasculaires 26
Figure 4. Anatomie du tractus gastro-intestinal 29
Figure 5. Localisation et structure de l'intestin grêle 30
Figure 6. Représentation schématique de l'épithélium de l'intestine grêle 31
Figure 7. Structure moléculaire de la jonction intercellulaire des cellules épithéliales intestinales..... 37
Figure 8. Paramètres affectant la perméabilité intestinale 42
Figure 9. Développement et maintien du microbiote au cours du temps en fonction des facteurs environnementaux 45
Figure 10. Variations du nombre et de la composition bactérienne le long du tractus gastro-intestinal 46
Figure 11. Variation latitudinale intestinale de la composition bactérienne..... 46
Figure 12. Association de la dysbiose avec le développement de maladies intestinales chroniques . 50
Figure 13. Voies de translocation intestinale : l'exemple des lipopolysaccharides 52
Figure 14. Représentation schématique de la structure des LPS 56
Figure 15. Représentation schématique des structures du lipide A de E. Coli et Salmonella spp 58
Figure 16. Activation du récepteur TLR4 par les LPS et cascade de signalisation..... 63
Figure 17. Activation de la voie des caspases par les LPS..... 65
Figure 18. Libération des médiateurs de l'inflammation par les cellules immunitaires lors d'une infection 66
Figure 19. Synthèse des médiateurs lipidiques pro-résolvants..... 67
Figure 20. Description du score SOFA..... 72
Figure 21. Lien entre inflammation à bas bruit, sepsis et choc septique : comparaison des niveaux de gravité croissant de la pathologie infectieuse..... 73
Figure 22. Représentation schématique d'une lipoprotéine 76
Figure 23. Représentation schématique du métabolisme des lipoprotéines, de leur rôle dans le transport des lipides 78
Figure 24. Structure de la PLTP 82
Figure 25. Représentation schématique de l'implication des lipoprotéines et de la PLTP dans l'inactivation des LPS 83
Figure 26. Voie de transport inverse des LPS..... 84
Figure 27. Effets du premier passage hépatique..... 85
Figure 28. Vue d'ensemble des résultats obtenus pour l'article 1 : implication de la PLTP, des lipoprotéines et de la LPL dans la neutralisation des LPS d'origine intestinale. 141
Figure 29. Vue d'ensemble des résultats obtenus pour l'article 2 : implication de la PLTP et des lipoprotéines dans la neutralisation des LPS originaires de la cavité péritonéale. 155
Figure 30. Vue d'ensemble des travaux de thèse (modèle obésité et modèle péritonite). 161

Liste des abréviations

3-HM	3-hydroxymyristate
AGL	Acides gras libres
AP-1	Activator protein 1
ApoA	Apolipoprotéine A
ApoB	Apolipoprotéine B
ApoCII	Apolipoprotéine CII
ApoCIII	Apolipoprotéine CIII
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ASC	C-terminal caspase recruitment domain
AUT	Aliments ultra-transformés
AVC	Accident vasculaire cérébral
BPI	Bactericidal permeability increasing protein
CARD	Caspase-associated recruitment domains
CASP1	Caspase 1
CD	Cluster de différenciation
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
CM	Chylomicrons
COX	Cyclo-oxygénases
CRP	C-reactive protein
DAMPs	Damage associated molecular patterns
DT2	Diabète de type 2
E.Coli	*Escherichia coli*
FiO_2	Fraction inspirée en oxygène
GALT	Gut-associated lymphoid tissue
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
HDL	High-density lipoprotein
HDLc	Cholestérol HDL
HF	High-fat
HL	Lipase hépatique
HPLC/MS/MS	Chromatographie liquide haute performance couplée à spectrométrie de masse en tandem
IDL	Intermediate density lipoproteins
IFN	Interféron
IKK	IκB kinase

IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporelle
IP	Intrapéritonéale
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
IRF	Interferon regulatory factor
IV	Intraveineuse
JAM-A	Junctional adhesion molecule A
JNK	C-Jun N-terminal kinase
KDO	Acide 3 déoxy-D-manno-octulosonique
LBP	Lipopolysaccharide binding protein
LDL	Low-density lipoprotein
LDLc	Cholestérol LDL
LDLR	Récepteur aux LDL
LF	Low-fat
LOX	Lipoxygénases
LPL	Lipoprotéine lipase
LPLi	Inhibiteur de la LPL
LPS	Lipopolysaccharides
LRP	LDL receptor-related protein
LTA	Acides lipotéichoïques
LT/LBP	Lipid transfer / LBP
LX	Lipoxines
MAL	MyD88 adaptor-like protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MD-2	Myeloid differentiation factor 2
MG	Monoglycérides
MICI	Maladies intestinales chroniques inflammatoires
MKK	MAP kinase kinase
MLCK	Myosin light-chain kinase
MyD88	Myeloid differentiation 88
NEMO	NF-κB essential modulator
NFκB	Nuclear factor κB
NLR	Nod-like receptor
NOD	Nucleotid-binding Oligomerization Domain proteins
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OMVs	Outer membrane vesicles

PAM	Pression artérielle moyenne
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PaO_2	Pression artérielle en oxygène
PLTP	Phospholipid transfer protein
PLTP-KO	PLTP knockout (souris déficiente en PLTP)
PRR	Pattern recognition receptor
RIP1	Receptor-interacting protein 1
SEM	Écart standard à la moyenne
SISG	Sécrétion d'insuline stimulée par le glucose
SOFA	Sequential organ failure assessment score
SR-B1	Scavenger receptor class B type 1
TAB	TAK1-binding protein
TAK1	Transforming growth factor β-activated kinase 1
TBK	TANK-binding kinase
TG	Triglycérides
TLR	Toll-like receptor
TRL	Triglyceride-rich lipoprotein
TNF-α	Tumor necrosis factor α
TRAF	TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon β
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
VLDL	Very low-density lipoprotein
WT	Wild-type (souris type sauvage)
ZO-1	Zonula occludens-1

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : MALADIES METABOLIQUES

Afin de débuter ce premier chapitre de thèse, je vous propose en premier lieu de nous attarder sur la description, la définition mais également la liste (non exhaustive) de maladies métaboliques pouvant engendrer une réponse inflammatoire à bas bruit et/ou chronique. Une maladie métabolique peut-être définie comme étant un trouble médical capable d'affecter les fonctions métaboliques au sein d'une cellule et plus particulièrement sa production d'énergie. Certaines de ces maladies métaboliques peuvent être génétiques mais pas seulement (Bouchard, 1991). En effet, le développement de telles maladies peut être induit par le régime alimentaire, des agents toxiques ou encore diverses infections à l'origine de la présence d'endotoxines dans le milieu intérieur (endotoxémie). Cependant, le lien de causalité entre le développement de maladies métaboliques telles que l'obésité ou l'insulinorésistance, le diabète de type II (DT2) et le développement d'une endotoxémie métabolique reste encore controversé (Cani *et al,* 2007, Ding & Lund, 2011). Dans ces travaux de recherche, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux maladies métaboliques non génétiques, déclenchant une inflammation chronique à bas bruit tels que le DT2 ou l'obésité. Nous allons ainsi décrire brièvement l'épidémiologie mondiale et nationale, les causes et les conséquences physiopathologiques de ces diverses maladies que nous avons étudiées durant ce projet de thèse.

A. Surpoids et obésité

L'obésité et le surpoids sont généralement caractérisés comme étant « une accumulation anormale et excessive de graisse pouvant impacter l'état de santé global de l'hôte » (Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2020). Un individu en situation d'obésité diffère d'un individu atteint de surpoids de par la différence de masse grasse accumulée au niveau du tissu adipeux aboutissant à l'augmentation importante de la masse corporelle, au dysfonctionnement progressif de différents organes et métabolismes cellulaires mais également au développement d'inflammation chronique. La façon la plus courante de classifier et de déterminer le surpoids et l'obésité chez l'adulte est le calcul de l'indice de masse corporelle (l'IMC). Cet indice est calculé en divisant le poids d'un individu en kilogrammes (kg) par le carré de sa taille en mètres (m^2). D'après la définition de l'OMS, une personne en surpoids aura un IMC égal ou supérieur à 25 tandis qu'une personne atteinte d'obésité aura un IMC égal ou supérieur à 30. De plus, l'obésité peut être classée en 3 catégories selon l'IMC. En effet, si l'IMC est compris entre 30 et 34,9, l'obésité est dite de « classe I », entre 35 et 39,9 elle est de « classe » II et elle sera dite de classe III (ou « morbide ») si l'IMC est supérieur ou égal à 40 (**Tableau 1**). Plus la classe est importante (plus l'IMC est élevé), plus le risque de mortalité d'un individu en situation d'obésité augmente. Pour lutter contre cette maladie, plusieurs essais comprenant des substances médicamenteuses ont eu lieu mais ne se sont

pas révélés efficaces. Cependant, plusieurs études plus ou moins récentes ont démontré le potentiel des analogues du glucagon-like peptide-1 (GLP-1), hormone intestinale (dont nous reparlerons dans la partie 3 de cette thèse consacrée aux lipopolysaccharides), comme étant des molécules intéressantes pour traiter l'obésité (Torekov *et al.,* 2011 ; Zoicas *et al.,* 2013). D'autres solutions « non médicamenteuses » peuvent également être envisagées à savoir : les cures thermales ou de la chirurgie bariatrique (« bypass gastrique », « sleeve gastrectomy » ou encore anneau gastrique) qui pourront être proposées en fonction de l'individu et de la situation d'obésité dans laquelle il se trouve.

Classification en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC)	
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

Tableau 1. Classification du surpoids et de l'obésité en fonction de l'IMC, d'après l'OMS

1. Épidémiologie, prévalence dans le monde et en France

En 2016, d'après l'OMS, près de 2 milliards d'adultes étaient en situation de surpoids. Sur l'ensemble de ces individus, plus de 650 millions se trouvaient en situation d'obésité. De manière plus générale, environ 13% de la population adulte dans le monde (11% des hommes et 15% des femmes) étaient en situation d'obésité en 2016. Concernant le surpoids, près de 39% des adultes (39% des hommes et 40% des femmes) étaient quant à eux concernés. Fait important, nous pouvons ajouter que la prévalence de l'obésité a quasiment triplé au niveau mondial en 40 ans (entre 1975 et 2016).

En 2019, quelque 40 millions d'enfants de moins de 5 ans étaient en surpoids ou en situation d'obésité. Si l'obésité et le surpoids touchaient principalement les pays développés avec des hauts revenus, ces maladies sont désormais en augmentation dans les pays à revenu plus faible (et intermédiaire), plus particulièrement en milieu urbain. A titre d'exemple, en Afrique, le nombre d'enfants en surpoids ou obèses a augmenté de près de 24% depuis les années 2000. Plus de 340 millions d'enfants et d'adolescents âgés de 5 à 19 ans étaient en surpoids ou obèses en 2016. La prévalence du surpoids et de l'obésité chez les enfants et les adolescents âgés de 5 à 19 ans a augmenté de façon très importante, passant d'à peine

5% en 1975 à un peu plus de 18% en 2016. L'augmentation a été la même chez les garçons que chez les filles : en 2016, 18% des filles et 19% des garçons étaient en surpoids (EASD, 2015).

À l'échelle mondiale, le surpoids et l'obésité sont liés à davantage de décès que l'insuffisance pondérale. Il y a plus de personnes obèses qu'en insuffisance pondérale, et ce dans toutes les régions à l'exception de certaines parties de l'Afrique et de l'Asie. Comme ces chiffres indiqués par l'OMS le démontrent : l'obésité est devenue au fil des décennies une véritable pandémie qui est provoquée par diverses causes et notamment un déséquilibre énergétique entre les calories consommées et dépensées. En effet, des augmentations conjointes de la consommation d'aliments très caloriques riches en lipides et une augmentation et du manque d'activité physique sont responsables du développement de cette maladie. Au-delà de la quantité de calories, il est également important de préciser que la qualité des aliments ingérés est également un facteur important pouvant aboutir au développement de l'obésité. En effet, un essai randomisé contrôlé réalisé sur les aliments ultra-transformés (AUT) en 2019 aux Etats-Unis a par exemple démontré qu'ils participent de façon importante aux apports énergétiques totaux et peuvent favoriser la prise de poids et ainsi le développement de l'obésité (Hall *et al.,* 2019).

Malheureusement, notre pays n'échappe pas à la hausse constante et progressive de personnes atteintes de surpoids ou en situation d'obésité. En effet, la prévalence des personnes concernées par cette maladie n'a cessé d'augmenter depuis les années 1990. Pour la première fois en France, une enquête nationale a été réalisée entre 1997 et 2012. Nommée OBÉPI, elle a permis de collecter des données sur tout le territoire et de réaliser des statistiques démographiques précises. Cette étude a permis de conclure qu'environ 15% de la population était en situation de surpoids ou/et d'obésité (OBÉPI-ROCHE, 2012). Une version actualisée de cette étude a même déterminé qu'en 2020 près de 17% de la population était concernée (OBÉPI-ROCHE 2020) (**Figure 1**). Ces travaux ont également démontré une hétérogénéité de l'épidémie d'obésité en France selon :

- Le sexe : les femmes sont davantage touchées que les hommes (17,4% contre 16,7%).
- La localisation géographique : les populations vivant dans le sud du pays semblent être plus épargnées par cette maladie que les populations vivant dans les régions du nord et de l'est du territoire métropolitain (22,1% dans les Hauts-de-France, suivis par le Grand-Est avec 20,2% et la Normandie avec 19,8%).
- Le milieu social : l'obésité est environ deux fois plus élevée chez les catégories dites populaires avec 18% (ouvriers, employés…) que chez les cadres (9,9%).

- L'âge : plus la population vieillit, plus elle a tendance à être sujette au développement de l'obésité malgré une forte augmentation du pourcentage d'obésité chez les personnes les plus jeunes ces dernières années (5,4% en 2012 contre 9,2% en 2020 chez les 18-24 ans).

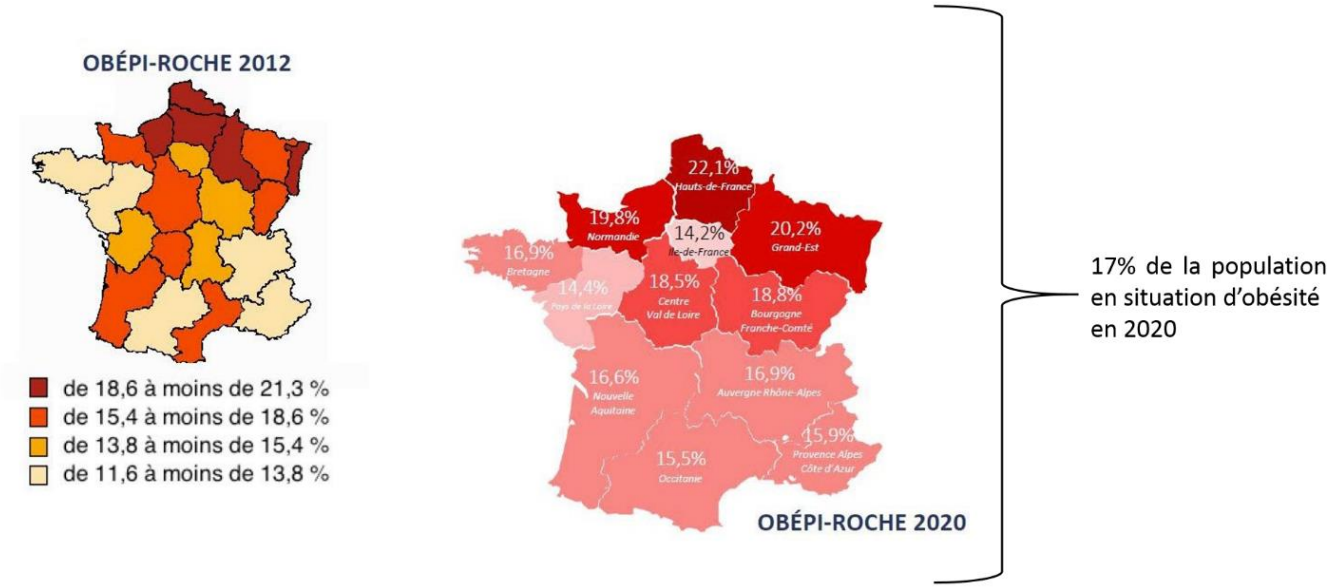


Figure 1. Analyses de la prévalence de l'obésité en France en 2012 et en 2020 selon les régions

Comme nous avons pu le voir, malgré quelques disparités, l'obésité est une épidémie en forte progression partout dans le monde et touche l'ensemble des classes d'âges. De plus, la situation sanitaire liée à la pandémie du nouveau coronavirus n'a rien arrangé ces derniers mois. En effet, de nombreuses études ont démontré un réel effet négatif des confinements successifs sur les changements de poids corporels et d'habitudes nutritionnelles chez les personnes en situation d'obésité. Par exemple, en Italie, une étude a démontré l'augmentation du poids corporel d'environ 1,5 kg chez les personnes atteinte d'obésité confinées seulement un mois (Pellegrini *et al.,* 2020). Une autre étude sur environ dix mille jeunes chinois avant et après confinement a démontré une augmentation de la prévalence de surpoids (21,3% avant contre 25,1% après confinement) et une augmentation de la prévalence d'obésité (10,5% avant contre 12,9%) (Yang *et al.,* 2020).

2. Conséquences physiopathologiques

Le développement de l'obésité, autrement dit l'excès de masse grasse associée à l'augmentation de l'IMC, est un véritable facteur de risque pour certaines maladies chroniques

non transmissibles telles que les maladies cardiovasculaires - principalement les cardiopathies et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) -, le développement du diabète, les troubles musculo-squelettiques tels que l'arthrose ou encore l'apparition de certains cancers (sein, ovaire, prostate, foie, vésicule biliaire, rein ou encore colon). En plus de ces risques pour l'avenir, les enfants obèses peuvent avoir des difficultés respiratoires, un risque accru de fractures, une hypertension artérielle, une apparition des premiers marqueurs de maladie cardiovasculaire, une résistance à l'insuline ou encore des problèmes psychologiques (Purder & Munsch, 2010 ; Katz *et al.,* 2017). L'obésité de l'enfant est donc associée à un risque accru de décès prématuré et d'incapacité, notamment par le développement de problèmes de déplacement liés aux contraintes exercées sur les articulations, à l'âge adulte (Franks *et al.,* 2010).

Le surpoids et l'obésité sont habituellement associés avec l'augmentation de la prévalence de certaines comorbidités telles l'hypertension ou encore la dyslipidémie (augmentation des niveaux de cholestérol et de triglycérides dans le sang) pouvant provoquer l'apparition de maladies cardiovasculaires (Brown *et al.,* 2000).

Des études datant des années 90 ont déjà mis en évidence une relation étroite entre l'obésité et le développement d'une inflammation à bas bruit et chronique (Hotamisligil *et al.,* 1993 ; Hotamisligil *et al.,* 1994). Ce lien existant entre obésité et inflammation a également été décrit plus précisément dans des études plus récemment publiées (Dalmas *et al.,* 2011 ; Laugerette *et al.,* 2011 ; Vernon *et al.,* 2011 ; Magalhaes *et al.,* 2015) mais le lien de causalité entre ces deux phénomènes reste encore à déterminer et très controversé. Est-ce le développement de l'obésité qui induit une inflammation ou est-ce l'inflammation qui initie la prise de poids et le développement de l'obésité ? La question reste entière. Néanmoins, le stade d'inflammation est caractérisé par une augmentation de « biomarqueurs » (ou médiateurs) de l'inflammation à la fois du système immunitaire inné mais également adaptatif telle que l'activation de cellules immunitaires (Ellulu *et al.,* 2017) ou encore d'hormones telles que le Glucagon-like peptide (GLP-1) (Madsbad, 2014). De plus, des travaux menés par Cani *et al*, en 2008, ont très largement démontré les conséquences physiologiques que peut avoir l'obésité chez des rongeurs, à savoir : le recrutement de cellules immunitaires, une modification de la perméabilité intestinale, un changement du microbiote conduisant ainsi au développement de complications métaboliques. L'obésité induit donc une modification structurale et fonctionnelle au niveau de l'intestin et provoque des maladies gastro-intestinales (Teixeira *et al.,* 2012 ; Acosta & Camilleri, 2014) : des problèmes digestifs, des perturbations liées à l'absorption de l'alimentation ou encore une composition microbienne de l'intestin altérée (Scarpellini *et al.,* 2010 ; Bischoff, 2011). Ces complications déclenchent ainsi une altération de la fonction barrière de l'intestin pouvant conduire à la translocation accrue

d'endotoxines bactériennes, les lipopolysaccharides (LPS), de la lumière intestinale vers le compartiment sanguin *via* une voie paracellulaire (dite passive) ou transcellulaire (dite active) (Guerville & Boudry, 2016). Diverses études ont également démontré que l'administration d'un régime gras obésogène chez des souris a pour effet d'augmenter la perméabilité intestinale, de diminuer sa fonction barrière mais aussi de développer une endotoxémie *via* le recrutement de cellules pro-inflammatoires telles que les cytokines (Meyer *et al*., 1995 ; Cani *et al.,* 2007, Cani *et al.,* 2008). Les endotoxines présentes dans la circulation possèdent ainsi un fort pouvoir inflammatoire que nous décrirons en détails dans le chapitre III de cette thèse (Terawaki *et al.,* 2010).

La plupart des individus en situation d'obésité sont également susceptibles de développer une autre maladie métabolique, le DT2 que nous allons détailler dans la partie suivante.

B. Diabète de type 2 (DT2)

Ce type de diabète, également appelé diabète non insulino-dépendant, survient lorsque les cellules β des ilots de Langerhans du pancréas, sécrétrices d'insuline, s'épuisent (Calle & Fernandez, 2012). En effet, la consommation excessive d'aliments riches en lipides ou AUT ainsi qu'une activité physique réduite provoque une augmentation de la masse corporelle. Un phénomène d'insulinorésistance s'installe alors. En effet et pour rappel, l'insuline est bien connue comme étant une des hormones régulatrices de la glycémie. Lorsque la maladie s'installe, le pancréas est toujours en mesure de produire correctement de l'insuline. Cependant, la prise de poids de l'individu va ainsi préférentiellement stimuler les cellules musculaires qui utilisent des acides gras comme source d'énergie. Les cellules en charge de la captation du glucose vont ainsi progressivement devenir insensibles à l'insuline. Le glucose ne pouvant plus entrer dans ces cellules, les cellules β pancréatiques vont donc stimuler leur métabolisme et ainsi sécréter davantage d'insuline afin de compenser ce phénomène et de « contraindre » les cellules de l'organisme à absorber le glucose. La glycémie va ensuite augmenter jusqu'à devenir toxique pour l'individu. On parle généralement de « glucotoxicité » (**Figure 2**).

Cette hyperglycémie (la concentration trop élevée de glucose dans le sang) est un effet fréquent du diabète, qui entraîne avec le temps des atteintes graves de nombreuses parties de l'organisme et plus particulièrement des nerfs et des vaisseaux sanguins.

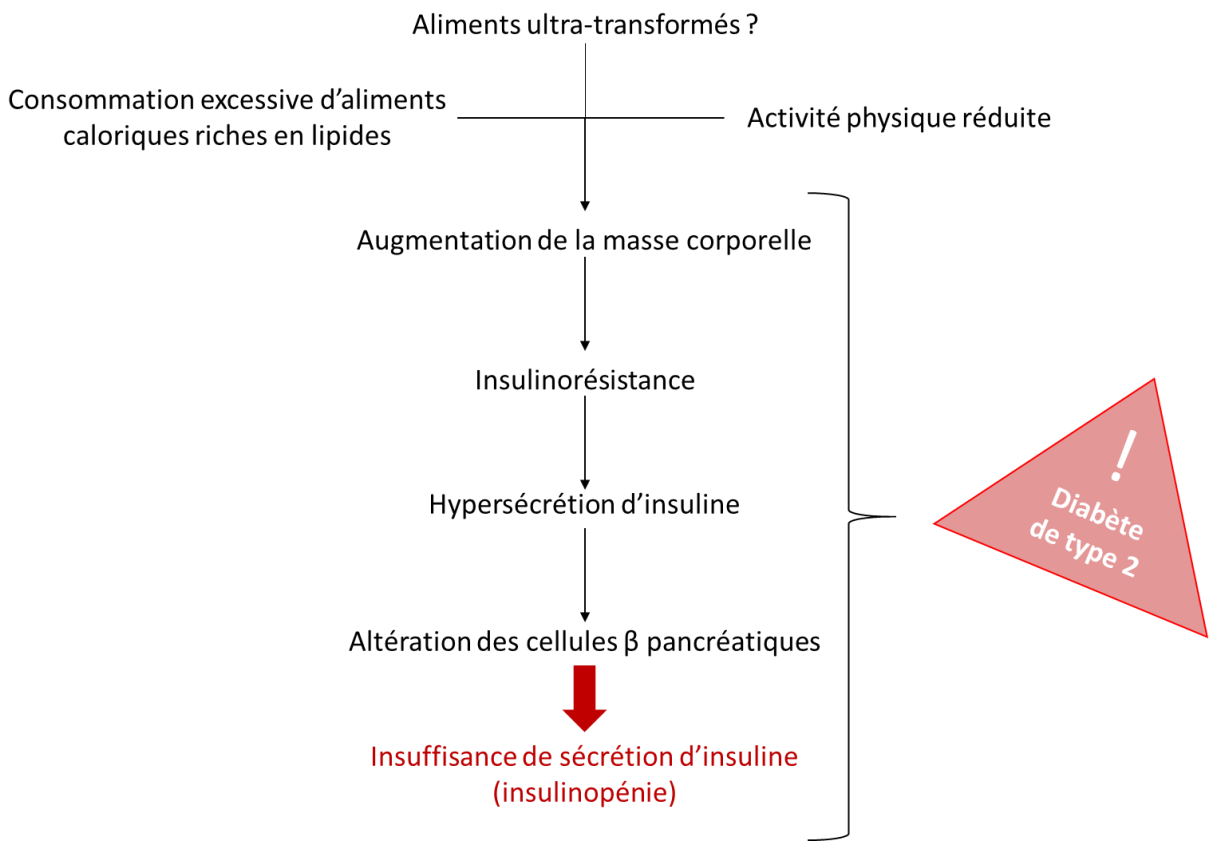


Figure 2. Éléments clés de la physiopathologie du diabète de type 2.

La consommation excessive d'aliments riches en lipides ou ultra-transformés combinée à un manque d'activités physique et sportive aboutit à une prise de masse grasse. Cette prise de poids est directement liée au développement de l'insulinorésistance qui conduit à un épuisement des cellules pancréatiques, incapables de produire en quantité suffisante l'hormone glucorégulatrice qu'est l'insuline. De là, un phénomène d'insulinopénie se met en place, dernière étape de la physiopathologie du DT2.
D'après la thèse de Lorène Lebrun, 2016.

1. Épidémiologie dans le monde et en France…

Le DT2 représente la majorité des cas de diabète : il est estimé que 90% des personnes diabétiques sont atteintes de DT2 (Eschwege *et al.,* 2015) et est la conséquence, en grande partie, d'une surcharge pondérale et d'un manque d'activité physique. Ses symptômes peuvent être similaires à ceux du diabète de type 1 ou diabète insulino-dépendant (qui ne sera pas décrit ici) mais sont souvent moins marqués. De ce fait, la maladie peut être diagnostiquée plusieurs années après son apparition, une fois les symptômes les plus marqués et complications déjà présentes. En 2014, environ 8,5 % des adultes de 18 ans et plus étaient atteints de diabète dans le monde. En 2019, le diabète a été la cause directe de 1,5 million de décès. Environ 2,2 millions de décès étaient attribuables à l'hyperglycémie en 2012. Entre 2000 et 2016, la mortalité prématurée attribuable au diabète a augmenté de 5 %. Dans les pays à revenu élevé, le taux de mortalité prématurée due au diabète a diminué entre

2000 et 2010, mais a ensuite augmenté sur la période 2010-2016. Dans les pays à revenu intermédiaire de la tranche inférieure, le taux de mortalité prématurée due au diabète a augmenté au cours de ces deux périodes (OMS, 2021).

Tout comme pour le surpoids et l'obésité, le nombre de personnes atteintes de diabète et notamment de DT2 a fortement augmenté en France. Ainsi, en dix ans à peine, la croissance du taux de prévalence du diabète en France a même accéléré, le nombre de personnes atteintes du diabète est passé de 1,6 millions en 2000 à plus de 3,5 millions en 2009 (*BEH Invs, 42-43, novembre 2010)*.

De même que pour l'obésité, il existe des disparités du développement du diabète selon :

- Le sexe : les hommes sont globalement plus touchés par cette maladie que les femmes.
- Le milieu social : les personnes en situation de précarité sont davantage touchées par le diabète que les personnes plus favorisées la prévalence du diabète chez les hommes vivant dans des communes moins favorisées est 1,3 fois plus élevée que les hommes vivants dans des communes les plus favorisées (ce chiffre monte jusqu'à 1,7 pour les femmes).
- La localisation géographique : le diabète est davantage présent dans les régions du Nord (prévalence de 6%) et certains territoires d'Outre-Mer tels que la Guadeloupe et la Réunion (prévalences respectives de 9 et 10% environ) contrairement aux régions de l'Ouest ou du Sud où la prévalence n'est que de 3 ou 4%. *(BEH, Santé Publique France, 27-28, novembre 2017*).

2. Conséquences physiopathologiques

Au cours du temps, le DT2 peut conduire à l'apparition de lésions de plusieurs organes et notamment des lésions cardiaques, oculaires, rénales voire nerveuses. Chez une personne adulte, le diabète multiplie environ par 2 le risque d'infarctus du myocarde et d'accident vasculaire cérébral (Sarwar *et al.,* 2010). Il peut être associé à une diminution du flux sanguin, notamment au niveau des membres inférieurs, pouvant aller jusqu'à l'amputation et est l'une des principales causes d'insuffisance rénale (USRDS annual data report : Epidemiology of kidney disease in the United States, 2014).

Plusieurs études ont déjà démontré la relation de causalité qui existait entre l'apparition du DT2 et le développement de l'inflammation chez les individus concernés. En effet, le DT2 va déclencher une importante stimulation du système immunitaire et *in fine*, une libération de molécules pro-inflammatoires au niveau du tissu adipeux blanc et plus particulièrement du

tissu adipeux abdominal. Différentes substances peuvent ainsi être sécrétées telles que des cytokines : Tumor Necrosis Factor α (TNF-α), les interleukines 1 et 6 (IL-1 et IL-6) mais également certaines protéines comme la leptine, le « monocyte chemoattractant protein-1 » (MCP-1) ou encore l'angiotensine. Le DT2 découlant généralement de l'obésité, l'expansion du tissu adipeux va favoriser l'infiltration de macrophages et de cellules immunes (Calle & Fernandez, 2012). L'inflammation observée au cours du diabète va également concerner le pancréas avec une infiltration conjointe de cellules immunitaires, de cytokines (principalement IL-1) et d'adipokines (Larsen *et al.,* 2007 ; Ricker *et al.,* 2012). Enfin, cette inflammation se marque également par une forte augmentation du nombre de globules blancs, du fibrinogène et de la protéine C-réactive (CRP) qui est par ailleurs un facteur de prédiction de la survenue du DT2 chez les personnes déjà atteintes de surpoids ou d'obésité (Calle & Fernandez, 2012) (**Figure 3**).

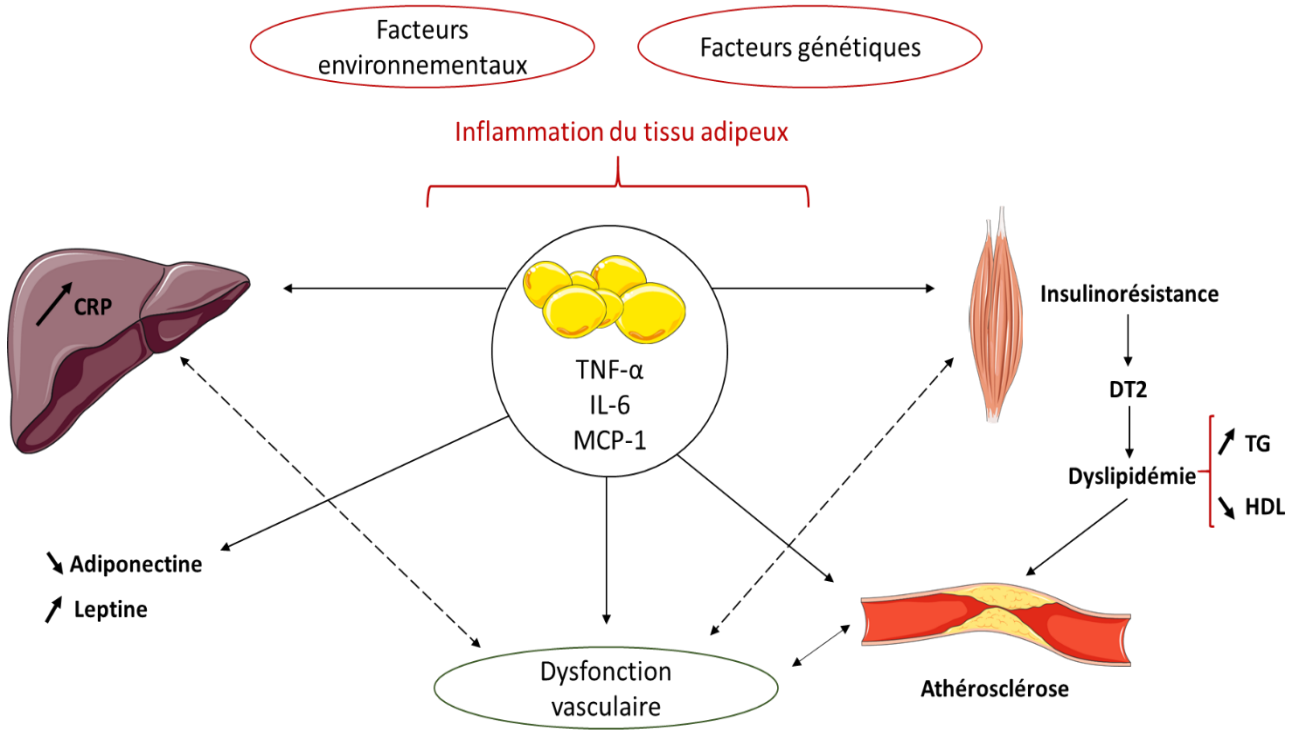


Figure 3. Relation entre diabète, inflammation et risques cardiovasculaires

Des facteurs environnementaux et génétiques défavorables vont être en mesure de provoquer une prise de poids, puis une inflammation du tissu adipeux et vont ensuite déclencher une infiltration de cytokines pro-inflammatoires. Cette inflammation va avoir des impacts sur divers organes : une augmentation de la CRP au niveau hépatique, une diminution de l'adiponectine (hormone dite « anti-inflammatoire » et une augmentation de la leptine (hormone de la satiété).

L'insulinorésistance va également se développer après épuisement des cellules β-pancréatiques, provoquant le développement du DT2 et une dyslipidémie (augmentation des TG et cholestérol plasmatique, diminution des HDL). Cette altération plasmatique des lipides va ainsi contribuer à la formation d'un dépôt de plaques au niveau des artères (développement de l'athérosclérose). Une dysfonction vasculaire générale peut alors apparaître et provoquer des troubles cardiovasculaires.

Adapté de Calle & Fernandez, 2012.

Abréviations : TNF-α : Tumor necrosis factor α ; IL-6 : Interleukine 6 ; MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1 ; DT2 : Diabète de type 2 ; TG : Triglycérides ; HDL : High-density lipoprotein.

CHAPITRE 2 : L'INTESTIN : PHYSIOLOGIE ET RÔLE BARRIERE(S)

Nous avons donc vu dans ce premier chapitre le lien qui existait entre les différentes maladies métaboliques décrites ainsi que leurs conséquences sur la santé de l'hôte. Nous allons maintenant décrire l'anatomie, les fonctions de l'organe principalement impacté par les maladies précédemment décrites : l'intestin.

Le tractus gastro-intestinal est un organe possédant une structure complexe, assurant de multiples fonctions et divers rôles physiologiques. En réalité, il s'agit d'un véritable écosystème composé de trois principaux composants : des cellules hôtes, le microbiote et diverses molécules provenant de l'environnement telles que les nutriments. Il est bien connu que l'une des fonctions principales de ce tractus est d'absorber les nutriments nécessaires à l'organisme. Diverses études ont néanmoins démontré d'autres fonctions primordiales de l'intestin et notamment son rôle prépondérant dans la défense contre les toxines naturelles ou artificielles. Il contient plusieurs milliards de bactéries permettant d'assurer un maintien de l'homéostasie ainsi qu'un équilibre fin entre des signaux tolérogènes et inflammatoires. De par sa taille l'intestin est également connu comme étant l'organe endocrine le plus vaste du corps humain aussi bien par la quantité mais aussi par la diversité des molécules de signalisation sécrétées assurant la communication avec le reste de notre corps. Des études récentes ont également mis en évidence l'importance de l'axe de communication intestin-cerveau depuis quelques années (Mayer *et al.,* 2015). Toutes les fonctions assurées par l'intestin sont finement régulées par sa structure et sa morphologie particulière.

A. Anatomie fonctionnelle de l'intestin

Anatomiquement, le système digestif démarre au niveau de la cavité buccale, se poursuit par le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle comprenant trois sections (le duodénum, le jéjunum et l'iléon), puis le colon et enfin le rectum et l'anus (**Figure 4**). De plus, l'ensemble de ce tractus est fortement lié au foie, à la vésicule biliaire et au pancréas, organes impliqués dans différents processus physiologiques, notamment durant la digestion *via* la sécrétion de diverses hormones et enzymes.

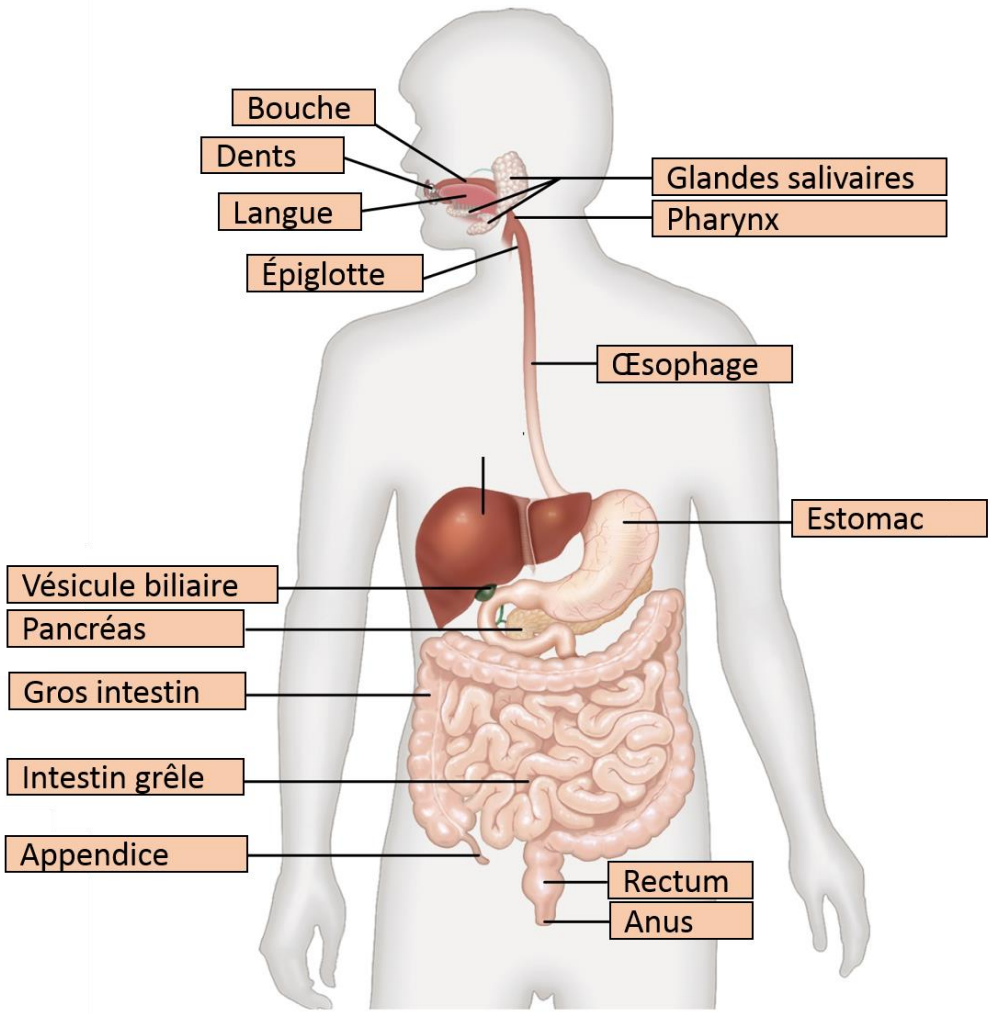


Figure 4. Anatomie du tractus gastro-intestinal

Représentation schématique du tube digestif (canal alimentaire), par lequel la nourriture est ingérée et les déchets solides sont éliminés. Ce tractus inclut la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le colon (gros intestin), le rectum et l'anus.
Adapté de l'encyclopédie Britannica, 2014 : https://www.britannica.com/science/gastrointestinal-tract.

Comme décrit précédemment, chez l'Homme et une majorité de mammifères, le tractus intestinal peut être compartimenté en deux grands segments : l'intestin grêle (lui-même divisé en trois segments distincts : le duodénum, le jéjunum et l'iléon) et le gros intestin (comprenant le caecum et le colon). Chez l'Homme, l'intestin grêle mesure environ 6 m de long avec un diamètre de 2 cm tandis que le gros intestin mesure 1,5 m de long pour un diamètre d'environ 4 cm. Chez la souris, notre modèle animal expérimental, l'intestin grêle mesure environ 40 cm et le gros intestin 10 cm. Deux conduits débouchent dans le premier segment (duodénum) de l'intestin grêle, l'un provenant du pancréas et l'autre du foie et de la vésicule biliaire. La bile stockée dans cette dernière et acheminée *via* le canal cholédoque est relarguée dans la partie proximale du duodénum permettant ainsi la solubilisation des graisses et l'action des enzymes

digestives, telles que les lipases. Le pancréas, pour sa part, joue le rôle d'"usine à enzymes" car il en produit environ 1,5 litre par jour de suc pancréatique. Ces enzymes, inactives dans le pancréas, ne sont opérationnelles qu'une fois arrivées dans l'intestin grêle où elles hydrolysent graisses, protéines et sucres. Le jéjunum, quant à lui, est le principal lieu d'absorption de ces macronutriments. L'iléon, dans le prolongement du rôle tenu par le jéjunum, assure la continuité de l'absorption des nutriments (eau, vitamines, électrolytes ou encore sels biliaires) tandis que le colon assure l'absorption des électrolytes et de l'eau (**Figure 4**). Les composés non absorbés (qui sont donc non essentiels) vont former les fèces qui vont passer dans le rectum puis être excrétés par l'anus. Comme nous le verrons ultérieurement, ce qui n'est pas absorbé ni digéré pourra être utilisé par les bactéries présentes dans l'intestin comme substrat. Le tractus gastro-intestinal contient également un grand réseau neuronal capable de moduler la fonction digestive.

La morphologie des cellules intestinales varie tout le long de ce tractus malgré la présence de structures communes dans tous les segments, tous très innervés et vascularisés grâce aux vaisseaux lymphatiques et aux micro vaisseaux sanguins. En coupe transversale, depuis la séreuse externe jusqu'à la lumière intestinale, l'intestin est constitué de deux couches musculaires recouvertes de muqueuse. La muqueuse, entre la lumière intestinale et la couche interne, est composée de l'épithélium, la lamina propria et la lamina muscularis mucosae (**Figure 5**).

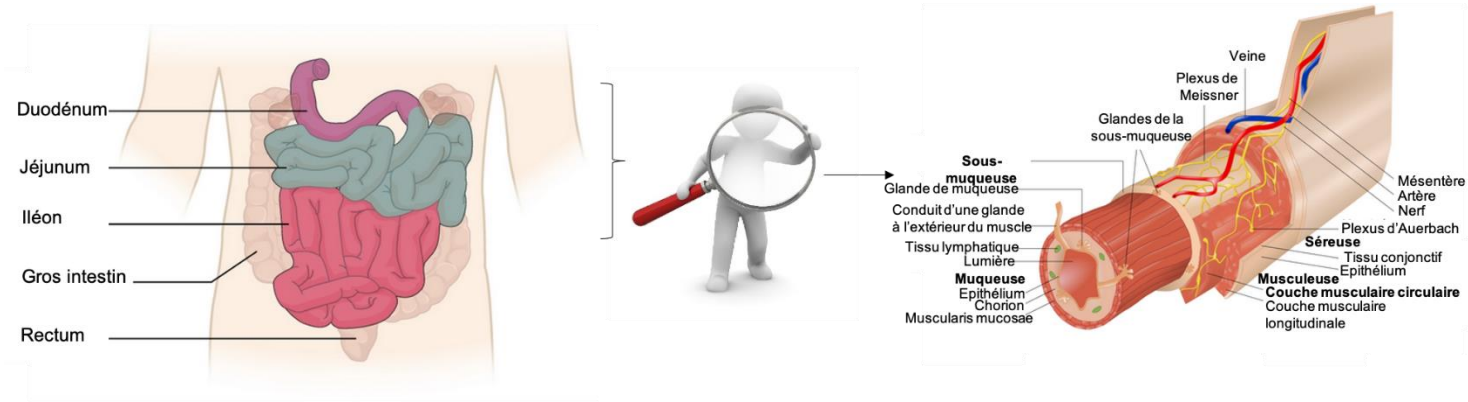


Figure 5. Localisation et structure de l'intestin grêle

Localisation du duodénum, du jéjunum et de l'iléon et composition structurale de ces différents segments. Adapté de Phil Schatz, lecurio.com.

La surface de l'intestin grêle est fortement élargie grâce à des protubérances, les villosités. Les cellules naissantes provenant de ces cellules souches sont ensuite en mesure de migrer le long de l'axe crypto-villositaire afin de se différencier en plusieurs types cellulaires nécessaires au bon fonctionnement de notre intestin (Buts *et al.,* 1990 ; Petit *et al.,* 2007). Les

cellules migrent ainsi depuis le compartiment prolifératif de la crypte jusqu'aux extrémités de la villosité où elles subissent le remplacement de l'épithélium *via* un phénomène d'apoptose déclenché par le manque d'adhésion entre les cellules et la matrice extracellulaire au niveau de l'apex des villosités. Ces cellules sont ensuite relâchées dans la lumière intestinale pour une élimination définitive. Le renouvellement de l'épithélium prend approximativement cinq jours chez l'Homme par le biais des cryptes de Lieberkühn qui permettent un renouvellement constant (Raven *et al.,* 2014).

L'intestin est une réelle interface entre l'hôte et l'environnement : il permet les échanges de nutriments, assure une fonction barrière contre les substances nocives et est une véritable « usine à hormones » favorisant une bonne digestion. (**Figure 6**). Le renouvellement permanent des cellules épithéliales évoqués précédemment est ainsi nécessaire à la fonction de barrière de l'intestin afin de maintenir une intégrité suffisante et optimale contre les agressions physiques, chimiques, biologiques et microbiologiques.

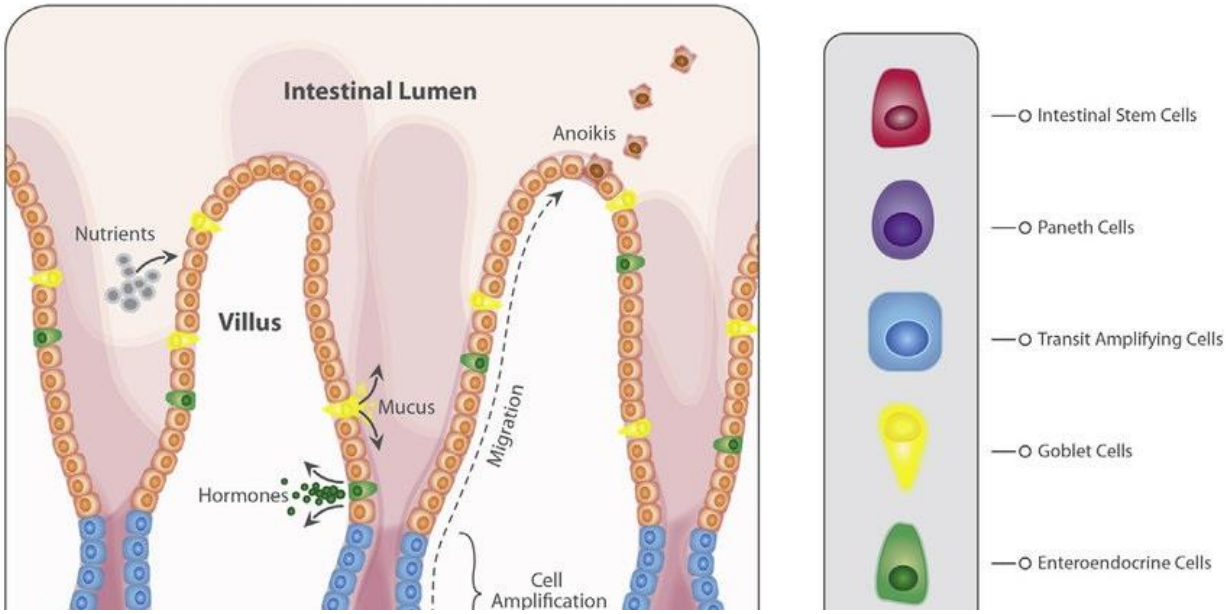


Figure 6. Représentation schématique de l'épithélium de l'intestin grêle

Épithélium de l'intestin grêle mettant en évidence l'identité et la disposition spatiale des principaux types de cellules épithéliales.

D'après Dey & Bradbury, 2018.

B. Intestin et diversité cellulaire

Les différentes cellules présentes au niveau des villosités sont les suivantes : les entérocytes, les cellules M (« microfold cells »), les cellules caliciformes, les cellules « tuft » et les cellules entéroendocrines.

- Les entérocytes sont les cellules les plus nombreuses et les plus internes de l'intestin grêle en contact avec le chyme assurant une fonction de transit sélectif des nutriments de la lumière de l'intestin grêle vers le milieu intérieur (Snoeck *et al.,* 2005).
- Les cellules M ont pour rôle de présenter les antigènes aux cellules immunitaires et agissent également comme une sorte de passerelle pour les micro-organismes. Elles permettent ainsi le transfert de l'information de la présence d'un pathogène ainsi que son passage dans le milieu intérieur (Trier, 1991 ; Corr *et al.,* 2008).
- Les cellules caliciformes ont pour principale fonction de produire le mucus tapissant la cavité intestinale. Elles sont également appelées « cellules à mucus » ou « cellules en gobelet » (Specian & Oliver, 1991).
- Les cellules tuft sont des cellules « sentinelles », rares, permettant une régulation fine de l'immunité de type 2 en coopérant étroitement avec le système immunitaire favorisant ainsi l'élimination des parasites (Gerbe *et al.,* 2012).
- Les cellules entéroendocrines (présentes à la fois dans l'intestin, l'estomac et le pancréas) produisent des peptides et hormones gastro-intestinales en réponse à diverses stimulations. Ces molécules sont ensuite libérées dans le sang afin d'atteindre le cerveau. Ces cellules agissent comme des chimiorécepteurs afin de favoriser des actions digestives *via* la détection de substances nocives. Une réponse adaptée et protectrice sera alors mise en place (Gribble & Reimann, 2016).

C. L'intestin : une barrière polyvalente et sélective

Dans cette partie, nous allons maintenant détailler l'un des rôles primordiaux de l'intestin grêle : ses multiples fonctions barrières permettant d'assurer une homéostasie optimale.

1. Barrière chimique

La première défense de l'intestin au niveau de l'épithélium est formée par le mucus permettant de limiter l'exposition des cellules épithéliales intestinales au microbiome. Il s'agit en réalité d'un mélange d'eau, d'électrolytes, de lipides, d'immunoglobulines, de peptides antimicrobiens et de glycoprotéines (également appelées mucines). Cette substance est sécrétée de façon continue par les cellules en gobelet qui permettent ainsi son renouvellement (Cornick *et al.,* 2015). L'épaisseur de la couche de mucus est déterminée par l'équilibre entre son niveau de synthèse, de sécrétion et de dégradation et diffère tout au long du tractus digestif. L'intestin grêle possède une seule couche de mucus tandis que le colon en possède deux. Cette première couche est une couche adhérente interne attachée solidement aux cellules épithéliales tandis que la seconde couche externe est quant à elle colonisée par les bactéries commensales. Plusieurs facteurs tels que les hormones, les neuropeptides ou encore les médiateurs de l'inflammation sont en mesure de moduler l'épaisseur de cette couche de mucus par stimulation de sécrétion de mucines (Kim & Ho, 2010). La couche de mucus contribue à la protection de l'épithélium et protège les cellules épithéliales contre les substances nocives mais également les pathogènes. Il s'agit d'une véritable barrière dynamique de défense contenant des peptides antimicrobiens permettant d'empêcher le contact entre les cellules intestinales et les bactéries.

2. Barrière physique

Cette barrière est fonctionnelle grâce à la monocouche des cellules épithéliales intestinales étroitement connectées entre elles *via* des jonctions intercellulaires mais aussi la couche de mucus (composé présent au niveau de la barrière chimique également). L'épithélium intestinal assure plusieurs fonctions, notamment le contrôle de la communication entre la lumière intestinale et notre corps. Cette fonction est essentielle afin d'empêcher le passage de microorganismes ou de leurs toxines dans le compartiment sanguin (Baumgart & Dignass, 2002). La seconde fonction primordiale de cette barrière est la perméabilité sélective afin de permettre la translocation d'éléments nutritifs, d'électrolytes et d'eau de la lumière intestinale à la circulation sanguine. L'épithélium intestinal permet ce passage sélectif de

composés grâce à deux voies majeures : paracellulaire et transcellulaire (Komarova & Malik, 2009 ; Karasov, 2017). La perméabilité transcellulaire est généralement impliquée dans l'absorption et le transport de nutriments tels que les sucres, les acides aminés, peptides, électrolytes, acides gras à courtes chaînes (qui sont absorbés plus facilement que les acides gras à longues chaines qui eux nécessitent des transporteurs spécifiques pour une meilleure captation), minéraux et vitamines à travers les cellules épithéliales. Comme les membranes cellulaires sont imperméables, ce processus est réalisé grâce à des transporteurs spécifiques ou des canaux situés aux pôles apical et basolatéral. La perméabilité paracellulaire est quant à elle permise grâce à un transport passif au niveau de l'espace présent entre les cellules épithéliales. Ce passage reste néanmoins régulé de façon sélective afin de permettre le transport de certains solutés et divers fluides. Il est assuré par les jonctions intercellulaires localisées au pôle apical de la membrane latérale (Rho *et al.,* 2017).

2.1. Intestin et perméabilité

Les jonctions intercellulaires décrites précédemment possèdent un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité de l'organisation tissulaire et donc le maintien d'une bonne perméabilité intestinale. Elles reçoivent de multiples signaux les guidant dans ce processus d'interaction mais également dans le but de pouvoir initier les connections présentes au sein du cytosquelette. Elles se comportent également comme des capteurs permettant de renvoyer au noyau les signaux à propos de la localisation des cellules et de leur environnement immédiat. La barrière intestinale est sensible aux variations de microenvironnement de la lumière intestinale (nutriments, microbiote), au compartiment sanguin (cytokines, hormones) et aux changements du nombre ou de la fonction des cellules immunitaires de la muqueuse (Fasano & Shea Donohue, 2011).

2.1.1. Jonctions cellulaires et perméabilité paracellulaire

Les cellules épithéliales intestinales et plus particulièrement les entérocytes sont spécialisées et vont pouvoir acquérir un phénotype hautement polarisé après différenciation. Les cellules épithéliales intestinales établissent de fortes jonctions entre elles. Ces jonctions intercellulaires sont essentielles pour l'intégrité de l'organe mais sont également d'importantes plateformes de signalisation. Il existe quatre types de jonctions intercellulaires : les jonctions de communication (autrement appelées « gap junctions »), les desmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées. Les desmosomes, les jonctions adhérentes et serrées sont toutes les trois connectées au cytosquelette et impliquées dans l'adhésion intercellulaire (**Figure 7**).

Au pôle apical des cellules, la mise en place des jonctions serrées permet une délimitation entre le pôle apical et le pôle basolatéral de la membrane plasmique et confère à l'intestin une fonction barrière face aux agressions extérieures. Ces jonctions sont flexibles, dynamiques et hautement régulées et jouent un rôle primordial dans le renouvellement de l'épithélium intestinal (Rho *et al.,* 2017).

a. Les jonctions serrées

Ces jonctions, qui permettent le contrôle du passage des molécules, possèdent un rôle prédominant dans le maintien de la fonction barrière de l'intestin. En effet, elles sont responsables de l'étanchéité de l'espace intercellulaire et régulent de manière sélective le transport paracellulaire des solutés ioniques. Ce sont des complexes multi protéiques connectés aux microfilaments d'actine composés de protéines transmembranaires, de protéines membranaires périphériques et des molécules régulatrices (protéine kinases). Ces jonctions serrées possèdent également un rôle important dans les voies de signalisation impliquées dans la régulation du cytosquelette, dans le contrôle de la prolifération et la mise en place de la polarité des cellules.
Les composants des protéines transmembranaires des jonctions serrées peuvent être classifiés en trois groupes : les protéines transmembranaires à domaine unique, à trois domaines et à quatre domaines (telles que la claudine ou l'occludine). Ces jonctions sont également sujettes à un remodelage constant (Schneeberger & Lynch, 1992).

b. Les jonctions adhérentes

Ces jonctions sont associées au développement et au maintien de la morphologie des cellules adjacentes. Elles possèdent un rôle majeur dans la polarisation et la conformation des cellules. Ce sont en effet les premières jonctions à se mettre en place après le contact entre deux cellules. Elles sont localisées en dessous des jonctions serrées et permettent d'avoir des liaisons adhésives fortes permettant le maintien de la proximité cellulaire et sont également le site de la communication intercellulaire. Elles sont assemblées par l'interaction de protéines transmembranaires, des protéines adaptatrices intracellulaires et le cytosquelette (Nagafuchi, 2001).

c. Les desmosomes

En association avec les jonctions serrées, les desmosomes sont connus pour assurer une résistance mécanique des tissus. Contrairement aux jonctions serrées et adhérentes localisées au pôle apical de la membrane latérale, les desmosomes sont trouvés tout le long de la membrane latérale. Les desmosomes forment des structures capables de s'attacher aux filaments intermédiaires du cytosquelette, permettant ainsi une forte adhésion des cellules les unes par rapport aux autres (Holthöfer *et al.,* 2007).

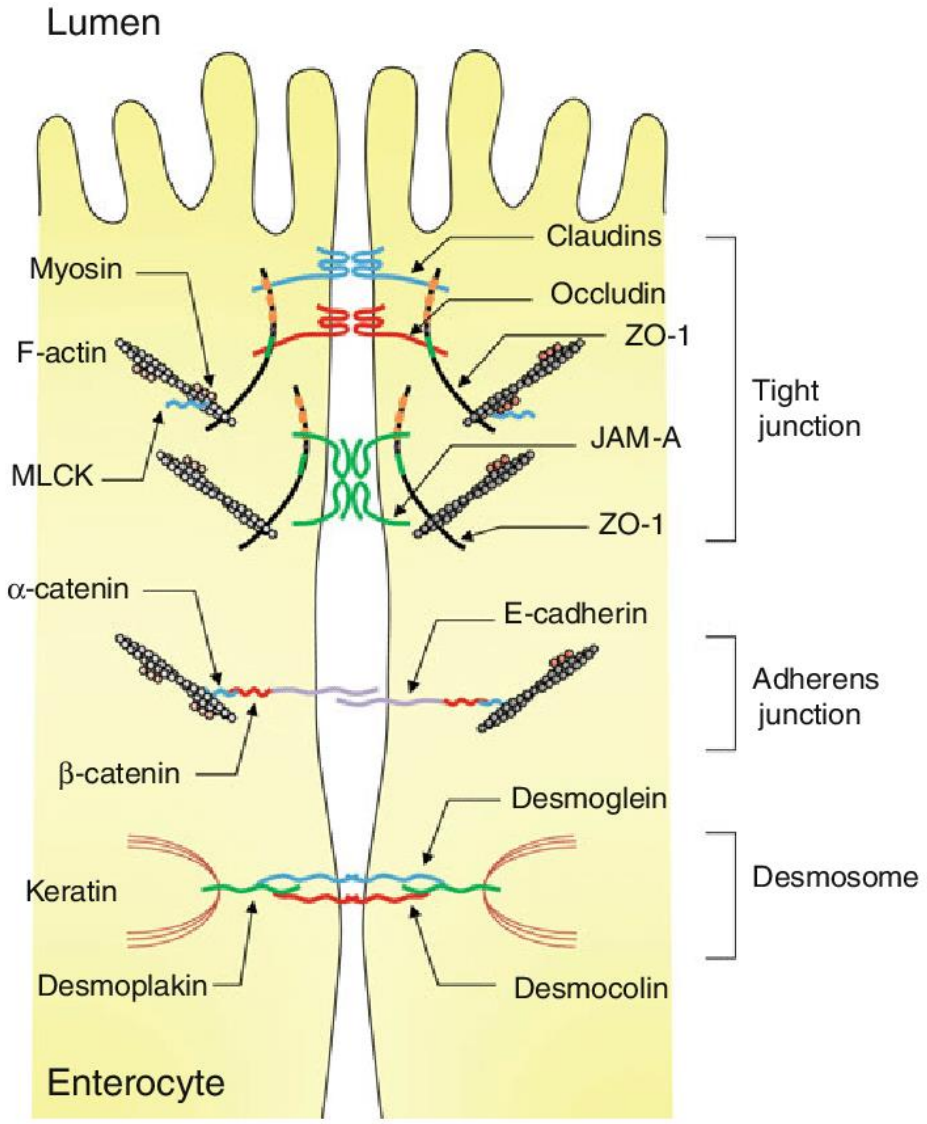


Figure 7. Structure moléculaire de la jonction intercellulaire des cellules épithéliales intestinales

Les jonctions intercellulaires des cellules épithéliales intestinales sont agencées par différents complexes protéiques, dont les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. Les jonctions serrées, complexes protéiques multiples, se situent aux extrémités apicales des membranes latérales des cellules épithéliales intestinales. Le complexe de jonctions serrées est constitué de protéines d'échafaudage transmembranaires et intracellulaires. Les boucles extracellulaires des protéines transmembranaires (occludine, claudines, JAMs et tricelluline) créent une barrière perméable et sélective concernant les voies paracellulaires grâce à des interactions hémophiles et hétérophiles avec les cellules adjacentes.

D'après Suzuki, 2013.

Abréviations : ZO-1 : Zonula occludens-1 ; JAM-A : Junctional adhesion molecule A ; MLCK : Myosin light-chain kinase.

2.1.2. Contrôle de la perméabilité intestinale et dérégulation

La dérégulation de la barrière intestinale est associée à des pathologies intestinales telles que le syndrome de l'intestin irritable ou des cancers digestifs (Si *et al.,* 2004 ; McGuckin *et al.,* 2009). L'altération de la barrière épithéliale intestinale est aussi impliquée dans le développement de maladies extra-intestinales telles que le diabète de type 1 (DT1) ou le DT2 par exemple (Visser *et al.,* 2009 ; Pasini *et al.,* 2019). De plus, la possible contribution de la barrière intestinale au développement de maladies métaboliques telles que l'obésité a également été démontré. Les effets des différents perturbateurs et les différentes voies moléculaires qui sont impliqués dans l'intégrité de la barrière intestinale sont encore controversées et font l'objet d'une recherche très active. De nombreux composés présents dans la nourriture peuvent affecter la régulation et l'organisation des protéines présentes au sein des jonctions serrées et *in fine* la perméabilité de la barrière intestinale. Plusieurs études ont déjà démontré l'impact des aliments sur la fonction barrière de l'intestin. En effet, différents facteurs tels que le manque ou l'excès de nourriture mais également le type de nourriture peut influencer différemment la barrière intestinale en augmentant ou diminuant la perméabilité. Certains acides aminés, vitamines ou peptides ont été décrits comme étant capable de diminuer la perméabilité cellulaire alors que d'autres substances telles que l'alcool ou certains acides gras et certains lipides sont capables d'augmenter cette perméabilité. De plus certaines molécules telles que les cytokines ou encore certains phénomènes tels que l'autophagie sont en mesure de modifier cette perméabilité. Nous allons donc voir, de façon non exhaustive, quels sont les principaux paramètres en mesure de modifier cette perméabilité intestinale (**Figure 8**).

a. Rôle des cytokines

Plusieurs études ont démontré que le statut inflammatoire, lié à l'absorption de lipides, joue un rôle sur la barrière intestinale. Ce statut inflammatoire se développe par l'intermédiaire de cytokines pro- et anti- inflammatoires, qui sont donc des molécules aptes à modifier la perméabilité de l'intestin.

Interféron-γ (IFN- γ)

L'IFN-γ appartient à la famille des interférons qui ont pour principale fonction de protéger l'intégrité de nos cellules grâce à leur capacité immuno-modulatrice et antivirale. Cette cytokine, pro-inflammatoire, est produite par les leucocytes (cellules tueuses naturelles ou lymphocytes T tueurs naturels) en réponse à une agression de certains pathogènes (Texeira *et al.,* 2005). L'IFN-γ active ainsi les macrophages et induit l'expression des

molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH de classe II). Il a été démontré que des souris déficientes en IFN-γ nourries avec un régime gras présentaient une diminution de leur perméabilité intestinale en comparaison avec des souris sauvages nourries avec le même régime. L'IFN-γ, lié à l'absorption des lipides, semble jouer un rôle dans l'altération de la perméabilité intestinale (Adams *et al.,* 1993).

Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α)

TNF-α est une cytokine pro-inflammatoire produite principalement par les lymphocytes T et les macrophages. Elle est connue pour induire l'apoptose et engendrer une réponse inflammatoire des cellules épithéliales intestinales et certaines études ont également démontré sa capacité à détériorer les jonctions serrées de la barrière intestinale *via* différents mécanismes et ainsi diminuer le contrôle de la perméabilité intestinale (Mankertz *et al,* 2009 ; Ma *et al,* 2004).

Interleukine-1β (IL-1β)

L'IL-1β est remarquablement élevée dans la muqueuse intestinale lorsqu'une inflammation (notamment à bas bruit) est installée. Des études récentes ont démontré que cette cytokine est en mesure d'augmenter la perméabilité intestinale. A titre d'exemple, avec le modèle cellulaire Caco-2, l'IL-1β diminue l'expression et la redistribution de l'occludine, protéine présente au niveau des jonctions serrées afin d'assurer leur rôle de cohésion (Al-Sadi *et al.,* 2012).

Interleukine-6 (IL-6)

Des études ont démontré l'implication de de l'IL-6 dans la régulation des jonctions serrées au niveau intestinal. L'IL-6 augmente sélectivement la perméabilité paracellulaire aux cations mais pas aux macromolécules, avec une augmentation des pores formant la claudine-2 dans les cellules épithéliales intestinales (Suzuki *et al.,* 2011).

Interleukine-10 (IL-10)

L'IL-10 est considérée comme étant une cytokine anti-inflammatoire. Les souris knock-out pour l'IL-10, utilisées comme modèle de colite, présentent une perméabilité intestinale accrue avec en parallèle, un expression plus importante des cytokines pro-inflammatoires TNF-α, IL-1β et d'IL-6 (Madsen *et al.,* 1999). Ces études ont ainsi suggéré que cette cytokine joue un rôle protecteur de la fonction barrière de l'intestin. De plus, d'autres études ont démontré que l'administration exogène d'IL-10 peut contrer l'augmentation de la perméabilité

intestinale (corrélée avec une diminution des niveaux de protéines impliquées dans la formation des jonctions serrées) observée chez des souris soumises à une nutrition parentérale (Sun *et al.,* 2008).

b. Rôle de l'autophagie

De nombreux polymorphismes touchant des gènes impliqués dans l'autophagie ont été identifiés comme des facteurs de risque précoce dans le développement de maladies inflammatoires de l'intestin. Certaines études ont montré que l'autophagie renforçait la fonction de barrière, entraînant une augmentation de la résistance électrique transépithéliale (RET) et une réduction de la perméabilité paracellulaire concernant le passage des petits solutés et de certains ions (Shengbiao *et al*., 2016). Ce mécanisme est médié en partie par la dégradation de la jonction serrée claudine-2 elle-même médiée par les lysosomes. Par ailleurs, ces travaux ont montré que la muqueuse intestinale des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin présente une expression accrue de la claudine-2 et une augmentation de la perméabilité des jonctions serrées dépendante de la claudine-2 (Hu *et al.,* 2015). Dans l'intestin, un fin équilibre entre tolérance et défense est nécessaire pour maintenir l'homéostasie. Le processus conservé d'autophagie semble jouer un rôle critique dans le maintien de cet équilibre en régulant l'invasion et la dissémination des agents pathogènes, en maintenant l'intégrité de la barrière et en préservant l'homéostasie intestinale (Hu *et al.,* 2015 ; Haq *et al.,* 2019).

c. Rôle de l'alimentation et des lipides

De nombreuses études ayant pour but de mimer et reproduire les caractéristiques de pathologies humaines telles que l'obésité ou le DT2 ont pour habitude d'utiliser des modèles animaux nourris avec des régimes gras, sur plus ou moins long-terme. Le lien entre la consommation des lipides, le changement de composition du microbiote, l'altération de la barrière et altérations métaboliques a été identifié pour la première fois par l'équipe de P. Cani. (Cani *et al,* 2007). En effet, une augmentation des taux de LPS dans le plasma chez des souris soumises à un régime obésogène a clairement été démontrée. Cette augmentation du niveau de LPS circulants est la conséquence d'un défaut de la fonction barrière de l'intestin (médiée par la diminution de l'expression de l'occludine et ZO-1 (Zonula Occludens-1, protéines présentes au sein des jonctions serrées). Des études antérieures avaient également démontré une altération de l'expression et de la localisation des protéines constituant les jonctions serrées chez des souris obèses (Madara, 1987 ; Mitic *et al.,* 2000). Ce phénomène contribue ainsi à la translocation des LPS de la lumière intestinale vers la circulation sanguine. Le

cholestérol, quant à lui, semble avoir un effet protecteur sur la perméabilité intestinale. En effet, le manque de cholestérol peut conduire à une augmentation de la perméabilité aux ions et macromolécules et une diminution des protéines présentes au sein des jonctions serrées (Robertson *et al.,* 2018). Les phospholipides, et plus particulièrement la phosphatidylcholine, participent au également maintien de l'intégrité de la membrane des cellules épithéliales. De plus, la phosphatidylcholine est connue pour jouer un rôle protecteur contre l'invasion de certains pathogènes (Chen *et al.,* 2019). A l'inverse, les acides biliaires sont capables de perturber l'intégrité de la barrière intestinale. Leur action sur la perméabilité intestinale et sur la sécrétion de peptides antimicrobiens dépend de leur nature, du temps d'exposition à ces derniers mais aussi du modèle cellulaire (Assimakopoulos *et al.,* 2007 ; Stenman *et al.,* 2012).

Une étude récente chez l'Homme a également démontré une forte augmentation de la perméabilité intestinale au niveau du duodénum chez des personnes en situation d'obésité comparées à des personnes « saines » après une ingestion de lipides (alors qu'il n'y a pas de différence significative observée entre les deux groupes de personnes en conditions basales). Cette augmentation de la perméabilité intestinale en réponse à une consommation de lipides est corrélée avec le développement d'une inflammation systémique et intestinale (Cvijanovic *et al*., 2017). La modification du microbiote intestinal joue un rôle critique dans le dysfonctionnement de la barrière intestinale. En effet, l'administration de traitements à base d'antibiotiques en réponse à un régime gras empêche l'augmentation de la perméabilité intestinale induite par le régime hyperlipidique. De plus, la modulation de la composition du microbiote par l'administration préventive de prébiotiques chez des souris obèses améliore la fonction barrière grâce à la diminution de la perméabilité intestinale et améliore le statut inflammatoire de ces souris traitées (Choque & Tamashiro, 2018). Pour résumer, les lipides alimentaires (et leur prise en charge) provoquent la perturbation de la fonction barrière et la translocation excessive des macromolécules pourrait contribuer à l'activation locale des cellules immunitaires contribuant ainsi au développement d'une inflammation (Genser *et al*., 2018).

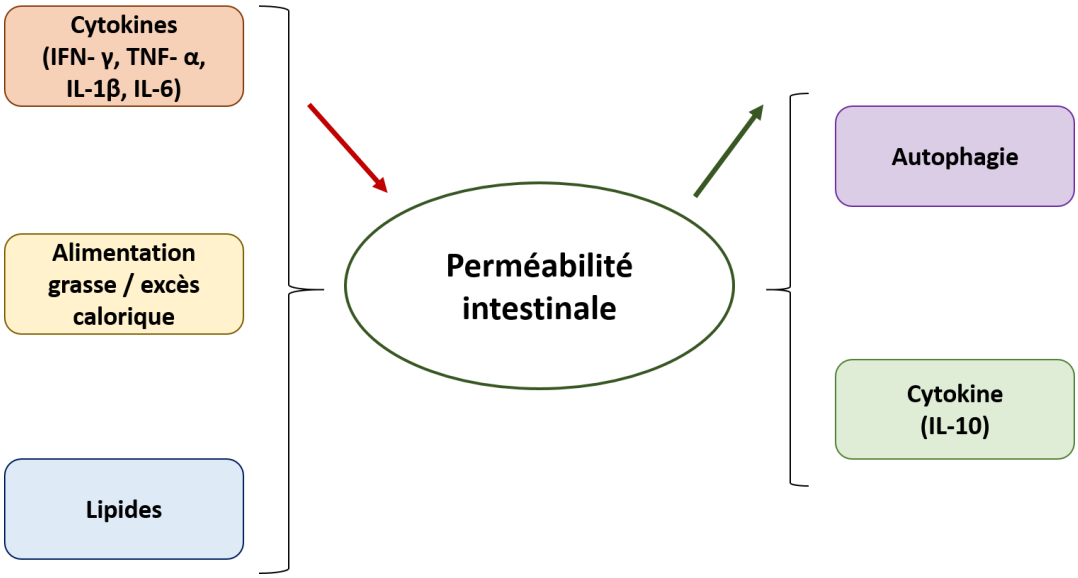


Figure 8. Paramètres affectant la perméabilité intestinale

Certaines cytokines, une alimentation riche en lipide vont avoir un effet délétère sur la perméabilité intestinale et permettre le passage de molécules indésirables telles que des endotoxines. Au contraire, des phénomènes physiologiques comme l'autophagie (qui permet l'élimination des cellules apoptotiques notamment) ou encore l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) vont avoir des effets bénéfiques sur cette perméabilité, à savoir son renforcement pour permettre l'intégrité de cette dernière
Abréviations : IFN-γ : Interferon-γ ; TNF-α : Tumor necrosis factor-α ; IL-1β : Interleukine-1β ; IL-6 : Interleukine-6 ; IL-10 : Interleukine-10.

3. Barrière immunologique

Des études récentes ont mis en évidence le rôle central de l'intestin en tant que site d'évènements immunologiques impliqués dans le développement de plusieurs maladies, incluant les maladies métaboliques telles que l'obésité et le diabète. La grande majorité des cellules immunitaires présentes au sein de l'épithélium intestinal sont les lymphocytes et notamment des lymphocytes T. Ils constituent l'interface entre l'environnement extérieur et le corps et fournissent une protection immunitaire instantanée contre l'entrée et la dispersion des pathogènes, contribuant ainsi à l'efficacité de la barrière intestinale. Le système immunitaire intestinal possède ainsi différents types de cellules et peut être divisé en deux grandes catégories : le système immunitaire inné composé de cellules épithéliales, de macrophages, de cellules dendritiques, de neutrophiles (Santaolalla *et al,* 2011) et le système immunitaire adaptatif composé principalement de lymphocytes (Cebra, 1999). Les systèmes immunitaires inné et adaptatif garantissent l'intégrité de l'interface lumière-environnement. Le déséquilibre de l'homéostasie du système immunitaire intestinal conduit généralement à l'inflammation de ce dernier. L'inflammation de l'intestin est caractérisée par l'infiltration des cellules immunitaires dans la muqueuse et par la production de cytokines pro- ou anti-inflammatoires

par les entérocytes. Parmi les phagocytes, les macrophages sont, en situation physiologique, les cellules les plus nombreuses dans le compartiment sous-épithélial (également appelé chorion). Renouvelés en permanence à partir des monocytes sanguins, ils se différencient dans l'intestin où ils acquièrent une activité très efficace de phagocytose tout en devenant producteurs d'IL-10 (interleukine 10). Cette cytokine anti-inflammatoire, clé dans le maintien de l'homéostasie intestinale, contribue à leur propre conditionnement et les rend tolérants aux signaux pro-inflammatoires induits par les motifs bactériens. Ces macrophages peuvent ainsi éliminer les bactéries qui franchissent l'épithélium sans provoquer de réponse inflammatoire délétère pour l'hôte (Grainger *et al.,* 2017). Néanmoins, en cas d'infection, des monocytes sanguins non conditionnés, capables de produire de grandes quantités de cytokines inflammatoires telles que TNF (*tumor necrosis factor alpha*) et IL-1β en réponse aux signaux microbiens, sont recrutés localement pour participer à l'élimination des bactéries potentiellement pathogènes (Velde *et al.,* 1990*).*

4. Barrière microbiologique : l'intestin, un lieu de cohabitation

4.1. Notion de microbiote

Plus précisément, le microbiote intestinal humain correspond à l'ensemble des micro-organismes qui évoluent le long de notre système digestif au cours de notre vie. Le tractus digestif est colonisé par différents types de microorganismes, principalement des bactéries mais également des virus, des levures, des champignons avec une abondance plus prononcée dans le duodénum et le colon. Cet écosystème microbien, en perpétuelle interaction avec l'épithélium intestinal, est composé d'approximativement 10^{12} à 10^{14} micro-organismes et est maintenant considéré comme étant un organe à part entière. En effet, cet écosystème complexe compte une multitude d'espèces (entre 500 et 1000) à la naissance avant de se stabiliser vers l'âge de 2 ou 3 ans. Le microbiote est essentiel au système immunitaire et est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière. Son altération pourrait être liée à de nombreuses maladies.

4.2. Notion de tolérance : cohabitation hôte- bactéries

Une notion de tolérance rentre en jeu pour que le microbiote ne soit pas reconnu et ciblé par le système immunitaire. Ainsi, le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) et le microbiote sont en perpétuelle communication afin de lutter efficacement contre les agressions extérieures tout en permettant au GALT de tolérer la présence du microbiote. Nous le verrons plus en détails dans la suite de ce manuscrit mais il a déjà été démontré que la reconnaissance

des LPS bactériens et les cascades de signalisation aboutissant à une réponse inflammatoire sont régulées à la baisse en présence prolongée de composés microbiens. De plus, un contact prolongé entre les cellules épithéliales intestinales et des composés bactériens entraine une réduction de l'expression des Toll-like receptors (TLRs) nécessaires à la reconnaissance des motifs microbiens (Otte *et al.,* 2004). C'est ainsi que cette mise en sourdine de notre système immunitaire permet à notre microbiote d'exercer l'ensemble de ces fonctions sans risques pour son hôte.

4.3. Origine, localisation et composition du microbiote

4.3.1. Origine

Si le fait que la colonisation de l'intestin humain par des microbes commence immédiatement à la naissance est clairement établi (**Figure 9**), certaines études récentes ont émis l'hypothèse que la colonisation de ce dernier débuterait même *in utero via* le placenta et le liquide amniotique (Aagaard *et al.,* 2014 ; Collado *et al.,* 2016). Cependant, les conclusions de ces études sont très variables en terme de populations bactériennes détectées. Cette hétérogénéité peut être expliquée par des différences dans les techniques de prélèvement (aspiration abdominale ou par voie vaginale) mais aussi par les différents types d'analyses utilisés (culture bactérienne ou techniques de biologie moléculaire). Ensuite et dès l'accouchement, les nourrissons sont immédiatement exposés à une population microbienne complexe (Redon Do-Lopez *et al.,* 1990). Le fait que le microbiote intestinal des nourrissons et le microbiote vaginal de leur mère présentent des similitudes prouve que le contact immédiat avec les microbes pendant la naissance peut affecter le développement du microbiote intestinal (Mändar & Mikelsaar, 1996). De plus, les nourrissons nés par césarienne ont une composition microbienne différente de celle des nourrissons nés par voie vaginale (Huurre *et al,* 2008). Cette différence peut être expliquée différents facteurs tels que l'environnement, le personnel hospitalier, etc... Après l'établissement initial du microbiote intestinal et pendant la première année de vie, la composition microbienne de l'intestin des mammifères est relativement simple et varie largement entre les différents individus et également avec le temps. Cependant, après l'âge d'un an, le microbiote intestinal des enfants commence à ressembler à celui d'un jeune adulte et se stabilise (Mackie *et al.,* 1999) (**Figure 9**).

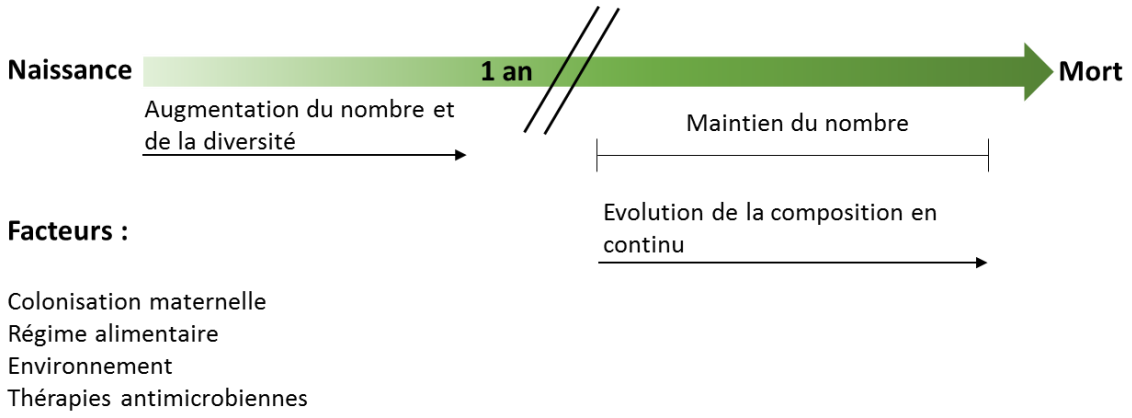


Figure 9. Développement et maintien du microbiote au cours du temps en fonction des facteurs environnementaux

Adapté de Sekirov et al., 2010.

4.3.2. Localisation et composition

À l'âge adulte, la majorité du microbiote intestinal est composée de bactéries dites anaérobies strictes. Ces dernières sont 3 fois plus nombreuses que les bactéries anaérobies facultatives et aérobies (Harris *et al.,* 1976). Les estimations du nombre d'espèces bactériennes présentes dans l'intestin humain varient considérablement entre les différentes études, mais il est généralement admis qu'il contient entre 500 et 1 000 espèces (Rajilić-Stojanović *et al.,* 2007).

Le microbiote intestinal n'est pas homogène. En effet, le nombre de cellules bactériennes présentes dans l'intestin chez les mammifères présente un continuum allant de 10^1 à 10^3 bactéries par gramme de contenu dans l'estomac et le duodénum, progressant à 10^4 à 10^7 bactéries par gramme dans le jéjunum et l'iléon et culminant à 10^{11} à 10^{12} cellules par gramme dans le côlon (O'Hara & Shanahan, 2006). De plus, la composition microbienne varie entre ces sites. Différentes catégories de bactéries sont réparties le long des sections de l'intestin grêle et du côlon. Les sections de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) sont peuplées par des bacilles de la classe des Firmicutes et des Actinobactéries. Il existe ainsi une hétérogénéité du microbiote intestinal selon l'axe gastro-colique (**Figure 10**).

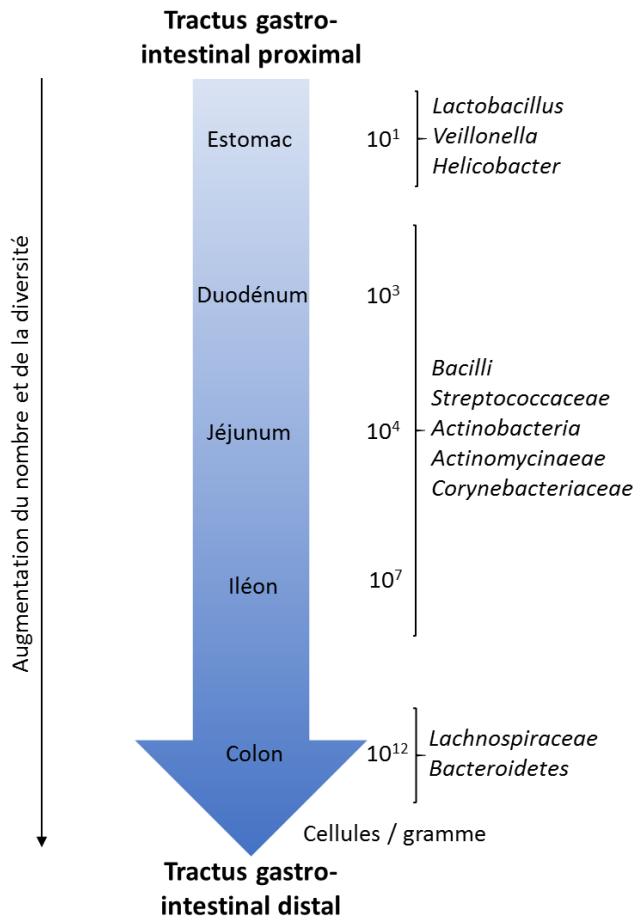


Figure 10. Variations du nombre et de la composition bactérienne le long du tractus gastro-intestinal

Adapté de Sekirov et al., 2010.

En plus de cette variabilité longitudinale, une grande variation dite « latitudinale » dans la composition du microbiote existe également comme nous pouvons le voir sur la **Figure 11**.

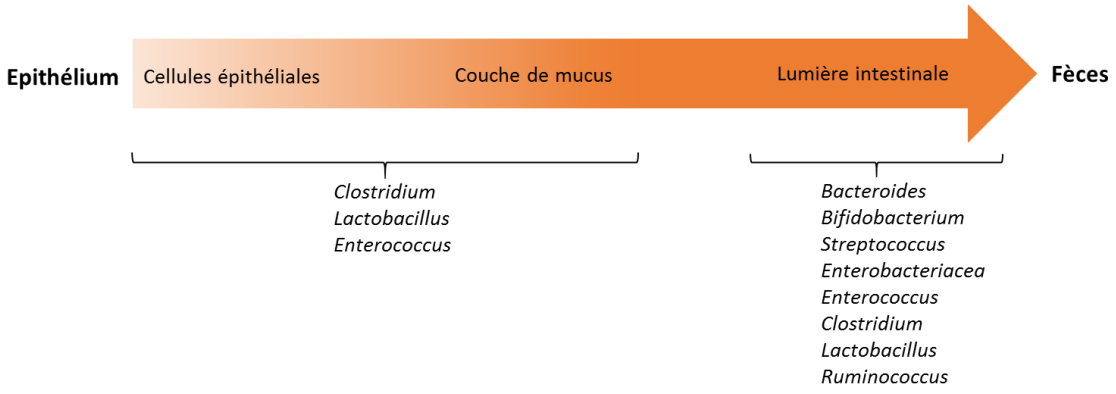


Figure 11. Variation latitudinale intestinale de la composition bactérienne

Adapté de Sekirov et al., 2010.

L'épithélium intestinal est séparé de la lumière par une couche de mucus épaisse et complexe sur le plan physico-chimique. Le microbiote présent dans la lumière intestinale diffère significativement du microbiote intégré dans cette couche de mucus ainsi que du microbiote présent à proximité immédiate de l'épithélium. Des études ont démontré que de nombreuses espèces bactériennes présentes dans la lumière intestinale ne pouvaient pas pénétrer la couche de mucus et avoir accès aux cryptes des cellules épithéliales (Swidsinski *et al.* 2005). Par exemple, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus,* les membres des *Enterobacteriacea*, *Enterococcus*, *Clostridium, Lactobacillus*, et *Ruminococcus* ont tous été trouvés dans les fèces, alors que seuls *Clostridium, Lactobacillus*, et *Enterococcus* ont été détectés dans la couche de mucus et les cryptes des cellules épithéliales de l'intestin grêle (Swidsinski *et al.* 2005).

4.4. Fonctions du microbiote

Le microbiote joue différents rôles essentiels, notamment dans les fonctions digestive, métabolique ou encore immunitaire que nous allons décrire brièvement dans cette partie.

4.4.1. Installation et développement du système immunitaire

Le microbiote intestinal possède un rôle primordial dans le développement de l'immunité. En effet, la muqueuse intestinale représente la plus grande surface en contact avec les antigènes de l'environnement externe. De plus, le microbiote intestinal recouvrant la muqueuse représente une grande proportion des antigènes présentés aux cellules immunitaires ainsi que des antigènes capables de stimuler les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires, tels que les TLRs et les récepteurs de type Nucleotide-binding Oligomerization Domain proteins (NOD) des cellules épithéliales intestinales (Rakoff-Nahoum *et al,* 2008). Concrètement, ce système immunitaire propre à l'intestin est composé du tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT). Il comporte, pour l'intestin grêle les plaques de Peyer et le tissu lymphoïde de l'intestin grêle, pour le gros intestin les agrégats lymphoïdes et, pour l'ensemble du tractus gastro-intestinal, des cellules immunitaires isolées dans la lamina propria. Ces cellules immunitaires sont en contact avec le reste du système immunitaire *via* les ganglions lymphatiques mésentériques locaux. Outre les cellules immunitaires, l'épithélium intestinal joue également un rôle dans la génération de réponses immunitaires grâce à la présentation de motifs de danger ou du non-soi grâce aux récepteurs TLRs et les NOD (Rakoff-Nahoum *et al,* 2008).

Le système immunitaire de la muqueuse doit remplir deux fonctions, pouvant sembler contradictoires et paradoxales : il doit à la fois être tolérant vis-à-vis du microbiote afin d'éviter

l'induction d'une réponse immunitaire systémique excessive et néfaste pour l'hôte et il doit également être en mesure de contrôler ce microbiote intestinal afin d'éviter sa prolifération et sa translocation vers des sites systémiques. Le microbiote intestinal est étroitement impliqué dans la réalisation de ces objectifs en collaboration avec le système immunitaire de la muqueuse intestinale.

4.4.2. Rempart contre les pathogènes

Le microbiote intestinal fournit à son hôte une barrière physique supplémentaire contre les pathogènes en plus de celle constituée par la muqueuse. Le rôle protecteur du microbiote intestinal contre la colonisation des pathogènes s'effectue *via* différentes actions. Les bactéries sont ainsi capables d'agir par exclusion compétitive, comme l'occupation de sites d'attachement ou par la consommation de sources de nutriments. Les bactéries présentes nativement dans l'intestin communiquent entre elles et avec les cellules grâce au *quorum sensing* (Bivar, 2018) qui est un mode de communication faisant intervenir des molécules chimiques sécrétées et réceptionnées par les bactéries afin de coordonner leur métabolisme et la formation d'un biofilm notamment. Le microbiote est aussi responsable de la production de substances antimicrobiennes de manière directe (le microbiote lui-même) ou indirecte (stimulation d'une production de substances par l'hôte). De plus, le microbiote favorise le renouvellement, la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales (Abrams *et al.,* 1963) ainsi que la production de mucines, permettant le maintien et l'intégrité de l'épithélium. La flore microbienne permet d'apporter une forme d'apprentissage au système immunitaire (Salzman, 2011).

4.4.3. Digestion des aliments

Le microbiote intestinal assure son propre métabolisme en puisant son énergie dans nos aliments (et notamment parmi les fibres alimentaires). C'est ainsi que ces micro-organismes jouent un rôle direct et primordial dans la digestion. En effet, ils sont capables d'assurer la fermentation des substrats et des résidus alimentaires non digestibles. Ils permettent également l'assimilation de nutriments nécessaires à notre santé grâce à un arsenal enzymatique dont nous ne sommes pas pourvus. Ils assurent également l'hydrolyse de l'amidon, de la cellulose et participent à la synthèse de certaines vitamines (B et K).

Ils sont également impliqués dans différentes voies métaboliques telles que l'absorption des acides gras (à courtes chaines préférentiellement) et du calcium (Flint *et al.,* 2012). Le microbiote intestinal assure ainsi des fonctions cruciales au métabolisme de l'hôte telles que l'acquisition de nutriments et la régulation énergétique. Il contribue ainsi à la

biotransformation des différents substrats provenant de la nourriture afin d'obtenir de l'énergie pour la survie et la croissance bactérienne permettant également la synthèse de métabolites absorbables, directement utilisables par les cellules épithéliales intestinales. Ils sont ainsi considérés comme étant des marqueurs associés à des pathologies métaboliques tels que des prédispositions à l'obésité, l'homéostasie immunitaire ou l'inflammation (Ottman *et al.,* 2012).

4.5. Dysbiose

Les maladies intestinales chroniques inflammatoires (MICI)**,** comme la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, sont liées à une activation inappropriée du système immunitaire dans l'intestin. Des facteurs génétiques et environnementaux peuvent être à l'origine de leur développement (tels que l'alimentation, l'âge...). Un déséquilibre du microbiote en espèces bactériennes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires**,** tout comme la prédominance de certaines familles de bactéries (*Entérobactéries, Fusobactéries*), ou l'absence d'autres espèces (*Clostridia, Faecalibacterium*) ont été décrits chez des personnes atteintes de MICI. Des études sont toujours en cours pour déterminer s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de ces maladies, mais également pour savoir si la dysbiose à l'origine de la maladie est innée ou relative à un autre facteur environnemental tel que l'alimentation ou encore l'administration d'un médicament. La dysbiose pourrait ainsi apparaître sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux et pourrait même jouer un rôle dans l'initiation, l'installation ou le degré de sévérité de l'inflammation, engendrant dans ce cas précis une sorte de cercle vicieux.

Le diabète et l'obésité ont de multiples origines, à la fois génétique, mais aussi nutritionnelle et environnementale. La part respective de chacun de ces facteurs est variable d'un individu à l'autre et les mécanismes moléculaires incriminant chacun d'entre eux restent à décrire précisément. Cependant, il est maintenant connu que ces maladies métaboliques sont caractérisées par une inflammation chronique dans laquelle le microbiote est impliqué de près ou de loin (**Figure 12**). Ainsi, une augmentation des graisses dans l'alimentation augmente la proportion des bactéries à Gram négatif. Par conséquent, elle augmente la présence de LPS inflammatoires au niveau local puis favorise le passage des LPS dans la circulation sanguine, dans le foie, les tissus adipeux et musculaires. L'inflammation à bas bruit qui s'installe dans ces tissus de façon chronique favoriserait l'insulinorésistance préalable au diabète et à l'obésité (Ferroni *et al.,* 2004). Cependant le lien de causalité entre le développement de ces deux phénomènes et notamment chez l'Homme, reste très controversé à l'heure actuelle (Cani *et al.,* 2007). De plus, chez la souris axénique, l'implantation de

microbiote provenant de souris obèses provoque rapidement une prise de poids importante (Bäckhed *et al.,* 2004 ; Le Roy *et al.,* 2019). D'autres mécanismes impliquant le microbiote sont aussi probablement impliqués : mis à part les LPS, l'augmentation de la perméabilité épithéliale pourrait même laisser passer des bactéries entières**.** Leur implantation durable au niveau des différents tissus (adipeux, musculaires et hépatiques) pourrait favoriser le maintien de l'inflammation. Parallèlement, certains métabolites bactériens circulants auraient un rôle déterminant dans le mécanisme de régulation de la pression artérielle par le rein ou dans le développement de la plaque d'athérome. Les enjeux d'aujourd'hui sont de développer des stratégies personnalisées grâce à un apport adapté aux spécificités individuelles de chaque patient par l'administration de prébiotiques, probiotiques ou encore symbiotiques. A plus long terme, des traitements préventifs pourraient ainsi être développés afin de prévenir la survenue de ces maladies.

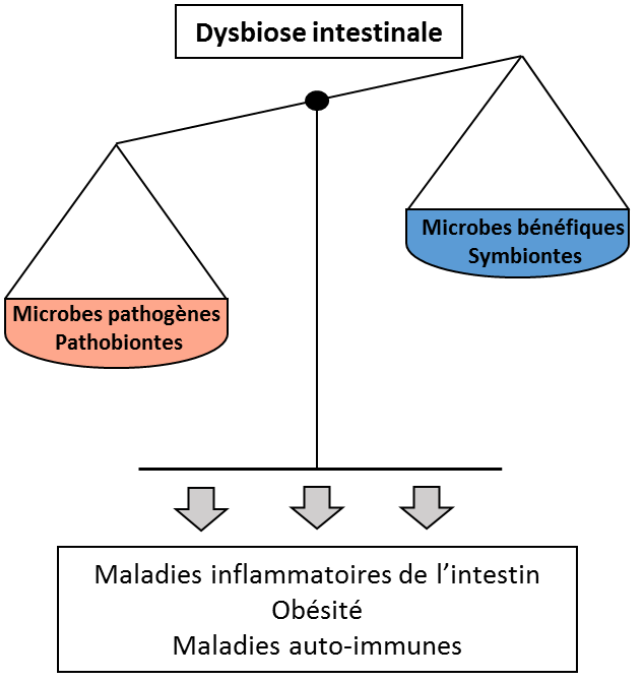


Figure 12. Association de la dysbiose avec le développement de maladies intestinales chroniques

Les dysbioses intestinales sont associées aux maladies humaines. Le microbiote du tractus gastro-intestinal des mammifères peut se diviser en bactéries pathogènes et bénéfiques appelées respectivement pathobiontes et symbiontes. Un microbiote sain contient une composition équilibrée de pathobiontes et de symbiontes. Une modification non naturelle de la composition du microbiote intestinal, la dysbiose intestinale, peut entraîner une inflammation intestinale, de nombreuses autres maladies et des maladies auto-immunes.

Adapté de Mazmanian et al., 2014.

4.6. Translocation intestinale

Comme nous l'avons vu et décrit, l'intestin présente de multiples barrières capables de nous protéger contre les pathogènes. Cependant, lors du développement de maladies métaboliques et/ou infectieuses, diverses molécules (nutriments, lipides, toxines…) sont en mesure d'être « transloquées » de la lumière intestinale vers la circulation générale et passer ainsi à travers les barrières existantes. Il existe plusieurs mécanismes physiopathologiques associés à une altération de la fonction barrière: la perte de l'intégrité entérocytaire, l'augmentation de la perméabilité paracellulaire, la rupture de la barrière muqueuse et la diminution de l'immunité intestinale (Wells *et al*., 1992 ; Ghosh *et al.,* 2020).

La translocation du contenu du tube digestif vers le milieu interne peut s'effectuer soit par un passage transcellulaire à travers les entérocytes, ou par un passage paracellulaire *via* les jonctions serrées (Yue *et al.,* 2012 ; Ghosh *et al.,* 2020). Le transport se fait ensuite par voie portale ou lymphatique. Les toxines bactériennes peuvent également passer dans la circulation générale par la voie transcellulaire en utilisant les lipides comme vecteurs tels que les lipoprotéines riches en triglycérides (TRL) comme les chylomicrons (CM) sécrétés par les entérocytes (Ghoshal *et al.,* 2009). La diminution de l'efficacité de la fonction barrière de l'intestin provoquée par une inflammation aiguë ou à bas bruit, pourrait favoriser la translocation des LPS. Dans le cas précis de ces molécules, trois voies de « translocation » sont actuellement décrites au niveau de l'intestin grêle : une voie transcellulaire faisant intervenir l'endocytose médiée par la clathrine et les rafts, une autre voie transcellulaire faisant intervenir les entérocytes *via* la sécrétion de CM et une voie paracellulaire mettant en jeu les cellules caliciformes et les jonctions serrées (**Figure 13**). Cependant, les modalités exactes et les facteurs influençant la translocation intestinale des LPS restent encore peu connues et investigations restent nécessaires afin de déterminer précisément les mécanismes impliqués dans cette translocation et les voies métaboliques qui en découlent. Une partie de mes travaux de thèse aborde cette problématique, comme exposé plus loin.

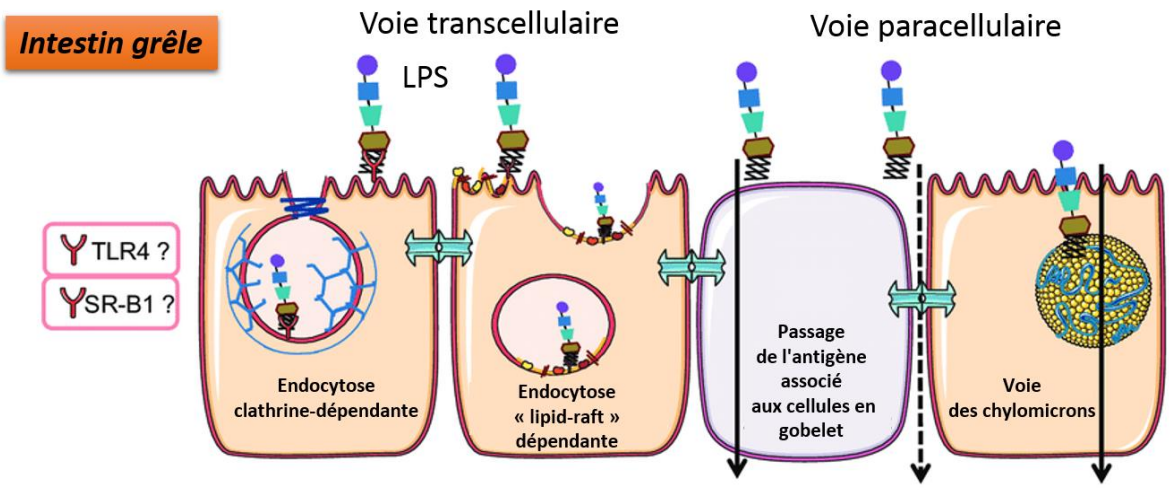


Figure 13. Voies de translocation intestinale : l'exemple des lipopolysaccharides

Dans l'intestin grêle, le LPS peuvent emprunter 3 voies différentes pour traverser la barrière épithéliale avec de gauche à droite sur le schéma : 1) la voie associée à la transcytose médiée par des récepteurs spécifiques dans les entérocytes, 2) la voie impliquant le passage par les cellules en gobelet 3) la voie des chylomicrons après l'ingestion d'un repas riche en lipides.

D'après Guerville & Boudry, 2016.

Abréviations : LPS: Lipopolysaccharides, TLR-4: Toll-like receptor 4, SR-B1: Scavenger receptor class B type 1.

CHAPITRE 3. LES LIPOPOLYSACCHARIDES (LPS).

A. Un petit rappel historique concernant les LPS…

Les endotoxines bactériennes, également appelées lipopolysaccharides sont au centre de mes travaux de thèse. Nous allons commencer par un rapide rappel historique de la caractérisation des LPS dans l'histoire de la Science.

- C'est aux 18 et 19ème siècles que le terme de « poison » lié aux LPS va émerger. En effet, Albrecht von Haller et François Magendie démontrent que l'injection intraveineuse de matières en décomposition provoque des symptômes maladifs : fièvre, diarrhée et décès. Malgré la mortalité induite par ce poison, personne n'était alors encore en mesure d'expliquer précisément ce phénomène. C'est au 19ème siècle que le pathologiste allemand Jakob Henle suggère que des organismes vivants capables de reproduction en seraient à l'origine : Louis Pasteur confirmera ces propos quelques années plus tard.
- En 1856, Peter Ludwig Panum, un physio-pathologiste danois, parle pour la première fois de « poison putride » conduisant aux mêmes symptômes que ceux observés lors du sepsis et présente ainsi des similarités avec le terme actuel d'« endotoxines ». Bien qu'il ait au départ rejeté l'hypothèse que ces toxines proviennent de bactéries, il a finalement émis l'hypothèse que ce poison pourrait provenir des bactéries dans ses derniers travaux.
- En 1889, le médecin bactériologiste Marc Armand Ruffer démontre que l'inoculation de sérum de culture de bactéries mortes ou vivantes (*Pseudomonas aeruginosa*) chez le lapin provoquait une importante fièvre.
- C'est seulement en 1892 que Richard Pfeiffer, médecin allemand, démontre que la bactérie responsable du choléra (*Vibrio cholerae*) conserve ses propriétés toxiques même après destruction thermique. Le terme d'endotoxine émerge : il déduit que ces toxines sont produites non pas à l'extérieur de la cellule bactérienne mais bien en son sein.
- C'est enfin en 1943 que le terme de lipopolysaccharides est employé par Murray J. Shear : il s'agit de la contraction de polysaccharides et lipides.

B. Localisation, caractérisation et composition des LPS

1. Localisation et caractérisation des LPS

Les LPS sont des éléments constitutifs non protéiques spécifiques de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Les bactéries à Gram positif quant à elles ne possèdent pas de LPS de par la composition de leur paroi, constituée de nombreuses couches de peptidoglycane et d'un assemblage d'acides teichoïques étroitement associé au peptidoglycane. Les acides lipoteichoïques (LTA), sont placés de façon transversale et s'enfoncent jusqu'à la membrane cytoplasmique.

La constitution de la paroi des bactéries Gram négatif est plus complexe. En effet, en allant de l'intérieur vers l'extérieur, celle-ci possède également une membrane plasmique recouverte cette fois-ci d'une faible couche de peptidoglycanes sans LTA, puis une deuxième membrane externe. Alors que la membrane interne est une membrane plasmique traditionnelle constituée d'un double feuillet phospholipidique permettant la délimitation du cytoplasme, la membrane externe est constituée d'un double feuillet lipidique asymétrique. Le feuillet interne est constitué de phospholipides tandis que le feuillet externe est composé principalement de LPS (Lüderitz *et al.,* 1982).

Les LPS ont pour principal rôle de contribuer à la régulation de la perméabilité membranaire et confèrent ainsi une forte capacité d'adaptation aux bactéries qui en en possèdent (Vaara, 2020).

2. Composition et structure des LPS

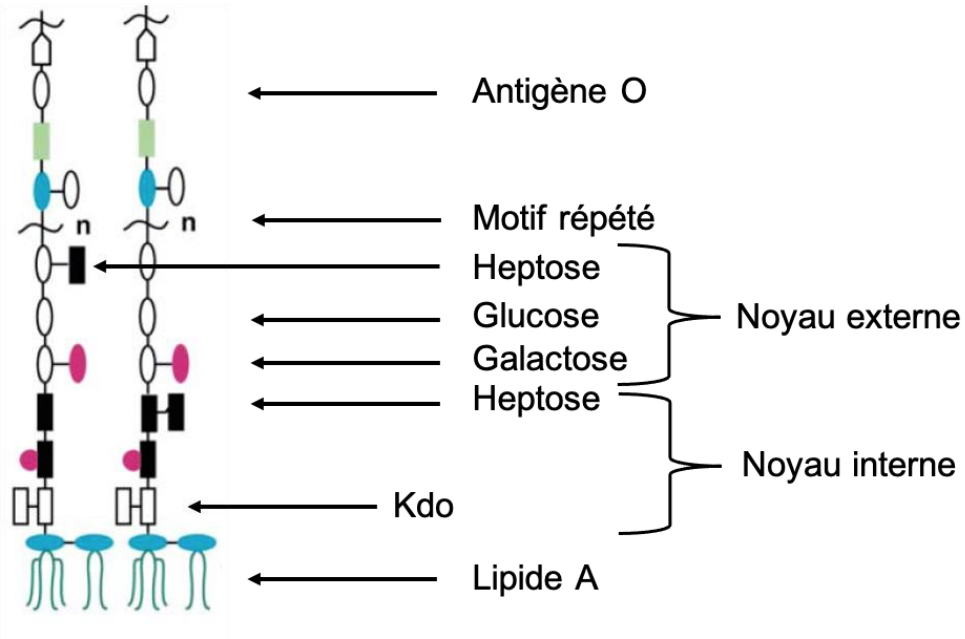


Figure 14. Représentation schématique de la structure des LPS

Les LPS sont composés d'une partie lipidique (lipide A, intracellulaire) et d'une partie polysaccharidique. La partie lipidique est constituée du lipide A inséré dans la membrane bactérienne. La partie polysaccharidique située en surface de la bactérie comprend le noyau et l'antigène O.
Adapté de la revue de Stephen Trent, 2004.
Abréviations : Kdo = acide 3 déoxy-D-manno-octulosonique ou kéto-déoxyoctanate.

Les LPS sont composés de trois parties distinctes (**Figure 14**) :

- La chaîne ou l'antigène O (pour « *Ohne Kapsel* » en allemand) de nature saccharidique, hydrophile et présent à la partie la plus distale des LPS en contact avec le milieu extérieur.
- Le noyau, central, avec une partie plutôt hydrophobe comprenant le noyau interne, et une partie plutôt hydrophile, le noyau externe.
- Le lipide A hydrophobe, ancré dans la membrane externe des bactéries constituant la partie proximale des LPS.

Cette structure biochimique générale est relativement commune aux différentes espèces, mais constitue néanmoins d'une véritable signature : les éléments constitutifs de ces différentes parties peuvent varier d'une espèce bactérienne à une autre et certaines espèces peuvent disposer d'un LPS dépourvu d'antigène O et de noyau externe (Caroff *et al.*, 2002).

2.1. L'antigène O

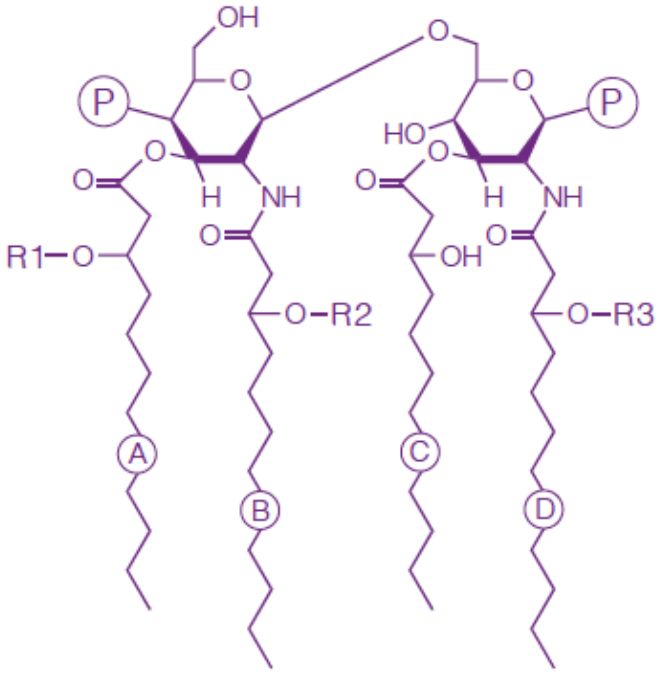
L'antigène O constitue la partie extérieure et non capsulaire de la molécule de LPS et est une véritable interface entre les bactéries et l'environnement extérieur. C'est la partie la plus variable du LPS, qui permet de caractériser « sérologiquement » les espèces bactériennes, d'où le nom « antigène ». Structurellement, l'antigène O est composé de plusieurs répétitions (jusqu'à une cinquantaine) de plusieurs polysaccharides appelés "chaînes O". Chacune de ces chaînes O est un produit d'assemblage de 1 à 8 monosaccharides, dont plus d'une centaine (homopolymères ou hétéropolymères) ont été identifiés à ce jour. Il est également possible de trouver des sous-unités non glucidiques à la place des monosaccharides, tels que l'O-acétyle, l'acide lactique ou l'acide glycérique. Ainsi, les antigènes O peuvent différer par leur composition en monosaccharides, leur nombre de chaînes O constitutives ainsi que par le mode de liaison de ces chaînes O les unes avec les autres. Cette composition semble être corrélée à l'environnement de la bactérie. Ainsi, l'espèce *E. coli* présente environ 170 sérotypes différents d'antigène O. Quand il est présent, l'antigène O agit tel un bouclier protecteur de la bactérie en tenant les potentielles molécules délétères à distance de la membrane (antibiotiques, agents antimicrobiens de l'hôte, etc…). Cette fonction protectrice de l'antigène O explique pourquoi les bactéries qui en sont dépourvues sont moins viables et de ce fait moins virulentes.

2.2. Le noyau

Le noyau des LPS est divisé en deux parties distinctes : le noyau interne et le noyau externe. La partie interne hautement conservée est liée de manière covalente au lipide A *via* l'acide 3-désoxy-D-mannose-octanoïque ou l'acide céto-désoxyoctanoïque (autrement appelé KDO). La présence de ce résidu « KDO » sur la molécule de LPS semble être nécessaire à la survie des bactéries porteuses, mais le nombre de ces résidus dans chaque molécule de LPS peut varier selon le type de bactérie. En plus de cette chaîne KDO, le noyau interne est également composé d'une autre chaîne glucidique, contenant généralement trois heptoses, dont la conformation peut être modifiée en ajoutant différents groupes : phosphate, pyrophosphate ou éthanolamine diphosphate. Le noyau externe peut varier davantage car il est connecté au noyau interne à l'extrémité proximale et à l'antigène O à l'extrémité distale, et est généralement composé de quantités variables d'hexoses ordinaires, tels que le D-glucose, le D-galactose ou la D-glucosamine.

2.3. Le lipide A

La structure du lipide A est hautement conservée chez toutes les bactéries à Gram négatif, voire presque identique chez les bactéries de la même famille. En s'insérant entre les phospholipides membranaires, il forme un point d'ancrage du LPS dans la paroi bactérienne. Le lipide A le plus couramment décrit est le lipide A d'*Escherichia coli* et *Salmonella* (**Figure 15**). Il est constitué de disaccharides de glucosamine liés en β-1,6 et est phosphorylé par deux groupements phosphate. Le disaccharide est acylé avec quatre acides gras (β-hydroxymyristoyle, groupement C14-OH), et deux autres chaînes d'acides gras (résidus laurate et myristate) sont greffées sur ces acides gras. Les seuls changements dans la structure du lipide A sont la nature des sucres et la nature et la quantité des acides gras secondaires branchés aux quatre premiers acides gras. Le lipide A est responsable de la plupart des activités biologiques du LPS. Il est notamment important de noter que la présence du lipide A seul est suffisante pour induire des réponses inflammatoires chez un individu.



Species	A	B	C	D	R1	R2	R3
E. coli	14	14	14	14	14:0	12:0	H
Salmonella spp.	14	14	14	14	14	12:0	14

Figure 15. Représentation schématique des structures du lipide A de *E. Coli* et *Salmonella spp.*

Les lipides A sont constitués d'un disaccharide de glucosamine reliée en β-1,6 substitué par deux phosphates chargés négativement et des acides gras saturés portant différents radicaux (R1, R2 et R3). Adapté de Netea et al., 2002.

C. Endotoxémie et l'inflammation provoquée par les LPS

Le lipide A est considéré par l'organisme comme un motif moléculaire associé à la présence de pathogènes (PAMPs, « *pathogen associated molecular patterns* »). Reconnu par les cellules immunitaires comme un signal générique de non-soi (différent d'un antigène), il est ainsi responsable des propriétés pro-inflammatoires de l'endotoxine. Chez l'Homme, l'administration d'une quantité très faible de LPS (de l'ordre de moins de 4 ng/kg) est capable en quelques heures de provoquer une réponse inflammatoire et des symptômes cliniques à type de frissons, céphalées, courbatures nausées ou encore photophobie. L'association entre LPS et mortalité a été constatée depuis longtemps chez l'Homme. Cependant, certaines études scientifiques suggèrent que cette association pourrait dépendre de l'espèce bactérienne à l'origine de l'infection.

1. Reconnaissance des LPS par la voie canonique

Il s'agit de la principale voie de prise en charge des LPS et qui est désormais très bien détaillée. Préalablement, cette voie implique généralement deux protéines qui vont avoir un rôle clé dans les étapes de prise en charges des toxines : le cluster de différenciation 14 (CD14) et la lipopolysaccharide binding protein (LBP) (Schumann *et al.*, 1990; Wright *et al.*, 1990). Ces protéines vont être en mesure de présenter le LPS aux récepteurs TLR4 à la surface des cellules.

- La LBP est une protéine plasmatique d'environ 60 kDa. Elle est synthétisée et sécrétée par le foie en réponse à des stimulations cytokiniques telles que les interleukines IL-6 ou encore l'IL-1β (Kirschning *et al.*, 1997). Elle peut aussi être produite par d'autres tissus non hépatiques comme l'intestin (Vreugdenhil *et al.*, 1999). En cas d'infection, ses taux sanguins passent d'environ 5-10 µg/mL à 200 µg/mL en moins de 24 heures (Tobias *et al.*, 1992). La LBP se fixe aux LPS avec une forte affinité (Tobias *et al.*, 1989) et la formation du complexe LBP/LPS permet ensuite aux molécules de LPS de s'associer au CD14 (Hailman *et al.*, 1994). L'albumine joue un rôle prépondérant lors de cet échange. Elle se charge de protéger le lipide A hydrophobe lors de son passage dans la circulation sanguine hydrophile depuis la LBP vers le CD14 (Gioannini *et al.*, 2002).

- Le CD14 est une glycoprotéine présentant une forme membranaire (mCD14) et une forme soluble (sCD14). La forme membranaire de 55 kDa est retrouvée à la surface des cellules de l'immunité telles que les polynucléaires, macrophages ou lymphocytes

B. Il existe deux types de formes solubles, une de 56 kDa directement sécrétée par les vésicules intracellulaires et une autre de 48 kDa produite après clivage de la forme membranaire (Labeta *et al.*, 1993). Le CD14 est caractérisé par une conformation en « U » constituant une poche hydrophobe favorisant l'accueil des LPS. Le mCD14 des cellules immunitaires permet une interaction avec les LPS circulants et une présentation de l'endotoxine bactérienne capturée au complexe TLR4/MD-2. En ce qui concerne les cellules non immunitaires qui ne possèdent pas de CD14 membranaire, la forme soluble sera en mesure d'intervenir dans le processus de prise en charge des LPS. La protéine CD14 est maintenant bien connue pour être impliquée dans les phénomènes d'inflammation à bas bruit (Won *et al.,* 2021).

Comme mentionné quelques lignes auparavant, ces deux protéines vont permettre la présentation des toxines bactériennes au complexe TLR4/MD-2. Cela est d'autant plus vrai que les LPS ne sont que très rarement retrouvés à l'état libre dans la circulation sanguine en raison de leur propension à former des agrégats.
Il existe néanmoins plusieurs voies de transfert des LPS à la membrane cellulaire. En effet, si la voie majoritaire de présentation fait intervenir le duo LBP/CD14, il existe deux autres possibilités de présentation qui ne requiert pas ou que partiellement la présence de ces protéines.

1.1. La voie LBP/CD14 dépendante

La voie majoritaire de présentation des LPS se déroule de la façon suivante : dissociation des agrégats de LPS par la LBP circulante, liaison de la molécule de LPS à la LBP puis fixation de ce néo-complexe à CD14 (Wright, 1990 ; Han, 1994 ; Thomas, 2002).

1.2. La voie LBP/CD14 non-dépendante

Une réponse inflammatoire induite par les LPS sans présence de LBP peut se produire (Wurfel, 1997). En effet, nous avons évoqué précédemment le rôle primordial de l'albumine dans la prise en charge des LPS. C'est d'autant plus vrai dans cette voie où cette protéine va être capable de se lier aux molécules de LPS après qu'il ait été déstabilisés par la présence d'ions ou de de facteurs protéiques immunitaires. Cette voie n'incluant pas la LBP, ni CD14 reste cependant minoritaire.

1.3. La voie LBP dépendante et CD14 indépendante

La LBP peut être sous forme circulante (sLBP) à forte concentration ou sous forme transmembranaire (mLBP) à faible concentration (Gutsmann, 2001). Selon la forme de la LBP, cette dernière peut avoir un rôle permettant l'activation de la réponse ou la neutralisation des LPS indépendamment de la protéine CD14 :

- À forte concentration, la sLBP va avoir un pouvoir neutralisant des LPS en les fixant.
- À faible concentration, la mLBP va avoir un rôle activateur de la réponse inflammatoire *via* la fixation au complexe TLR4/MD-2.

1.4. Formation du complexe TLR4/MD-2 et cascades de signalisation

Nous allons dans cette section détailler les mécanismes impliqués lors de la formation du complexe TLR4/MD-2 ainsi que la voie de signalisation qui s'ensuit.

1.4.1. Le complexe TLR4/MD-2

Le récepteur TLR4 fait partie de la famille des *toll-like receptors* (TLRs) (Medzhitov *et al.*, 1997). Les TLRs sont capables de reconnaître une variété de composants structuraux microbiens, les PAMPs. Ainsi, le TLR4 est décrit comme étant le récepteur de reconnaissance spécifique des LPS (Gioannini *et al.,* 2005 ; Lu *et al.,* 2008). Il est exprimé sur divers types cellulaires : à la surface des cellules myéloïdes et d'autres cellules non immunitaires comme les cellules de l'épithélium intestinal ou encore les cellules endothéliales. Il s'agit d'une protéine transmembranaire comprenant trois parties : un domaine extracellulaire en forme de fer à cheval (forme caractéristique des TLRs), une zone transmembranaire et un domaine intracellulaire appelé *toll/IL-1 receptor* (TIR) (Park *et al.*, 2009).

Si on s'intéresse davantage à la voie majoritaire de prise en charge des LPS circulants (la voie LBP/CD14), le CD14 s'associe en premier lieu avec la protéine adaptatrice membranaire MD-2 qui dispose aussi d'une poche hydrophobe facilitant l'accueil des molécules de LPS. Ce complexe MD-2/LPS se fixe ensuite sur le récepteur TLR4 membranaire (Park *et al.,* 2009). L'association de la molécule de LPS avec MD-2 d'un côté et TLR4 de l'autre provoque une dimérisation du récepteur TLR4 membranaire (Resman *et al*., 2009) ; cette dimérisation est à l'origine de son activation. La structure du lipide A peut moduler les interactions avec le complexe TLR4/MD-2 et peut ainsi influencer la réponse inflammatoire (Ohto *et al.,* 2012). L'activation de TLR4 par le complexe LBP/CD14/LPS peut également être facilité *via* l'action de microdomaines membranaires, les *« raft »* (ou radeaux lipidiques). Riches en cholestérol et sphingolipides, les rafts présentent une dynamique membranaire

favorisant la migration du récepteur TLR4 vers la protéine CD14 ainsi que l'endocytose du complexe TLR4/MD-2 (Triantafilou *et al.*, 2004 ; Lingwood & Simons, 2010 ; Zanoni *et al.*, 2011).

Le récepteur TLR4 constitue une véritable interface entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire. Cette position lui confère la capacité de changer de conformation après fixation à des endotoxines bactériennes constituant un signal d'alerte pour les composants du milieu intracellulaire. De là vont découler des cascades de signalisation intracellulaires qui aboutissent à la libération de molécules à la fois pro- et anti-inflammatoires. Le but de ces cascades est d'assurer la défense de l'hôte (Yesudhas *et al.,* 2014).

1.4.2. Les cascades de signalisation

La dimérisation du complexe facilite le recrutement de deux protéines sur les domaines TIR intracellulaires : le *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) et le *TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon β* (TRIF). Les protéines MyD88 et TRIF ont besoin de protéines adaptatrices spécifiques pour être en mesure de se fixer sur les domaines du TIR : MyD88 adaptor-like protein (MAL) et TRIF-related adaptor molecule (TRAM).

La fixation de MyD88 sur le complexe TLR4/MAL assure les recrutements successifs des protéines interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) (Motshwene *et al.,* 2009; Lin *et al.,* 2010). La cascade de signalisation du TNF receptor associated factor (TRAF) 6 est alors activée et aboutit rapidement à l'activation des facteurs de transcription nuclear factor κB (NFκB) et activator protein-1 (AP-1) *via* des cascades de phosphorylations dépendantes respectivement d'IκB kinases (IKK) et de mitogen-activated protein kinase (MAPK). NFκB et AP-1 induisent ensuite l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires comme le tumor necrosis factor α (TNF-α), l'IL-1β ou l'IL-6.

Le scénario diffère lorsque la protéine MAL se dissocie du domaine TIR. En effet, dans ce cas précis, un phénomène d'endocytose du complexe TLR4/MD-2/LPS se produit (Kagan *et al.,* 2008). Une fois internalisé, le complexe recrute les protéines TRAM et TRIF. De là, une cascade de signalisation dépendante de TRIF permet soit l'activation de TRAF6, soit le déclenchement de la voie dépendante de TRAF3. Cette dernière est associée à une translocation intranucléaire du facteur de transcription interferon regulatory factor 3 (IRF3) qui stimule à son tour la transcription de certains gènes et notamment ceux de l'IL-10 ou inductibles par l'interféron (IFN) de type 1. (**Figure 16***)*.

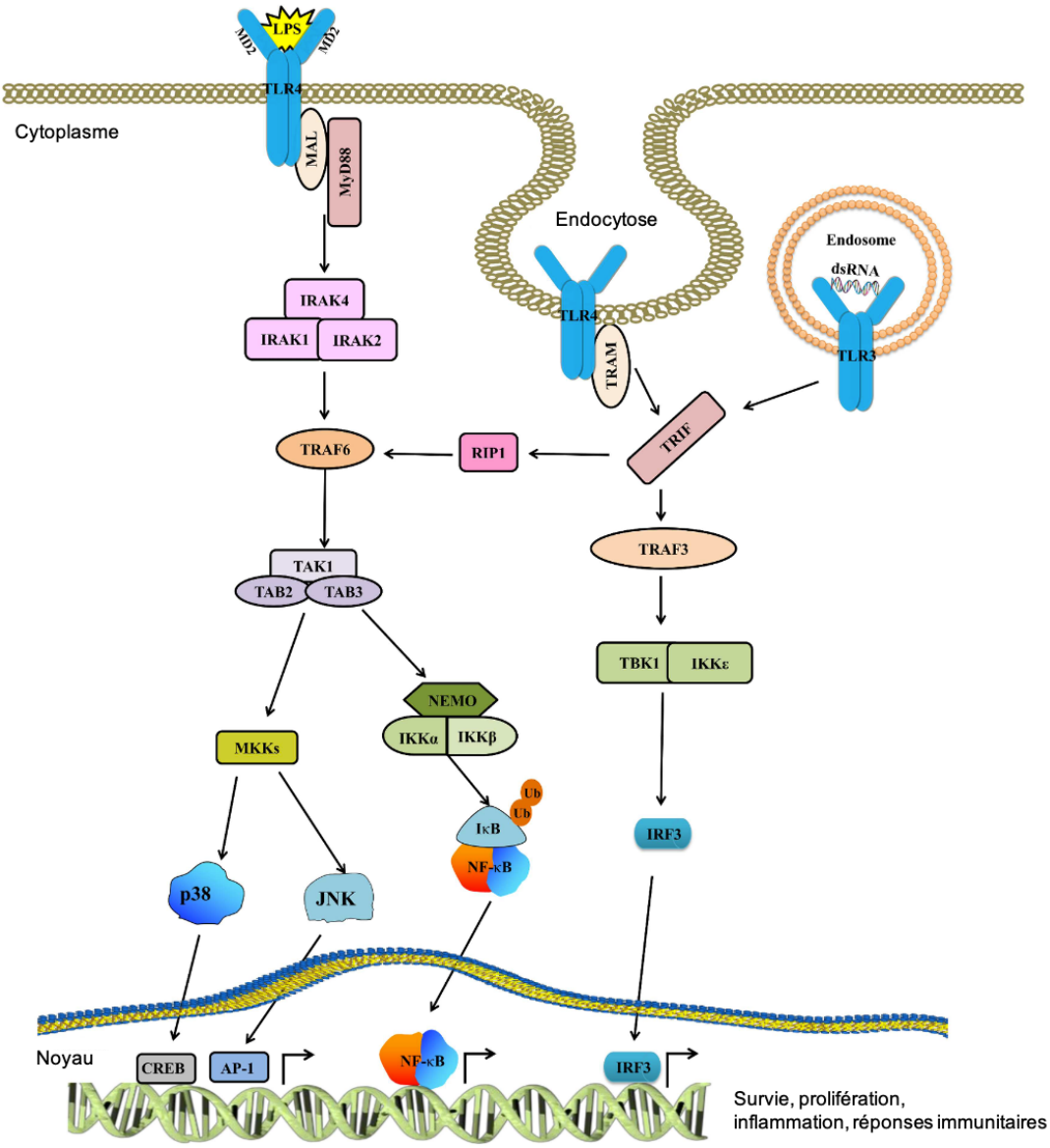


Figure 16. Activation du récepteur TLR4 par les LPS et cascade de signalisation

Le récepteur TLR4 est activé par les molécules de LPS, tandis que CD14 et MD2 forment un complexe permettant la fixation du LPS sur TLR4. Deux voies distinctes peuvent ensuite être mises en place : a) via la dimérisation du récepteur TLR4 permet le recrutement de MAL, MyD88 et IRAK au niveau des domaines TIR intracellulaires, il s'ensuit alors une cascade de signalisation via TRAF6 b) via l'endocytose du complexe TLR4/MD-2/LPS qui s'accompagne du recrutement de TRAM et TRIF au niveau des domaines TIR puis l'activation de TRAF3 ou TRAF.

Adapté de Yesudhas et al., 2014.

<u>Abréviations</u> : LPS : Lipopolysaccharides ; CD14 : Cluster de differentiation 14 ; MD-2 : Myeloid differentiation factor 2 ; TLR4 : Toll-like receptor 4 ; MyD88 : Myeloid differentiation factor 88 ; MAL : MyD88 adaptor-like protein ; IRAK :Interleukin-1 receptor-associated kinase ; TRIF : TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon β ; TRAM : TRIF-related adaptor molecule ; TRAF6 : TNF receptor associated factor 6 ; MKK : MAP kinase kinase ; MAPK : mitogen-activated protein kinase ; AP-1 : Activator protein-1 ; NFκB : Nuclear factor κB ; TRAF3 – TNF receptor associated factor 3 ; TBK : TANK-binding kinase 1 ; IKK – IκB kinase ; IRF3 : Interferon regulatory factor 3, JNK : c-Jun N-terminal kinase ; TAK1 : Transforming growth factor β-activated kinase 1 ; TAB2 : TAK1-binding protein 2 ; TAB3 : TAK1-binding protein 3 ; NEMO : NF-kB Essential Modulator ; RIP1 : Receptor-interacting protein 1.

2. Prise en charge des LPS par la voie des caspases

L'organisme est capable de détecter des molécules de LPS au niveau du cytosol par un mécanisme indépendant de TLR4 faisant intervenir différentes caspases selon l'espèce. Au total, cinq caspases inflammatoires co-existent : les caspases 1, 4, 5, 11 et 12.

La réponse inflammatoire déclenchée par l'activation de la caspase 1 est l'une des réactions les mieux décrites. Elle met en œuvre la formation d'un complexe protéique, l'inflammasome, qui permet l'activation de la caspase 1. Cette dernière assure ainsi la conversion des précurseurs cytokiniques, telle que la pro-IL-1β (produite suite à l'activation du récepteur TLR4), en leur homologue biologiquement actif. La caspase 12 serait quant à elle anti-inflammatoire notamment *via* ses capacités d'inactivation de la caspase 1 (Saleh *et al.,* 2006) et de la voie NFκB (Labbé *et al.,* 2010). La caspase 11 est exprimée chez la souris tandis que les caspases 4 et 5 seront davantage exprimées chez l'Homme (Hagar *et al.,* 2013 ; Matikainen *et al.,* 2020). L'interaction des LPS avec les caspases 4, 5 et 11 se fait au niveau de leur domaine CARD (caspase-associated recruitment domains) à leur extrémité N-terminale (Martinon & Tschopp, 2007). Les effets pro-inflammatoires de la caspase 11 ressemblent à ceux de la caspase 1 dans le sens où elle favorise indirectement la formation de l'inflammasome, et ainsi une activation des précurseurs cytokiniques tels que l'IL-1β (Wang *et al.,* 1998). Cependant, les caspases 4, 5 et 11 favorisent aussi l'induction de la pyroptose cellulaire (Shi *et al.,* 2014).

La particularité de cette reconnaissance des LPS dans le cytoplasme implique logiquement une entrée des endotoxines dans la cellule. Cependant, la plupart des bactéries à Gram négatif montrées comme étant capables d'activer la caspase 11 ne sont pas des bactéries cytosoliques (Kailasan Vanaja *et al.,* 2014). La voie de prise en charge par les caspases ainsi que la signalisation moléculaire qui en découle sont représentées sur la **Figure 17**. Il est intéressant de remarquer que de nouvelles études émettent l'hypothèse que certaines vésicules se situant à la surface des bactéries seraient un moyen de transport des LPS dans le milieu intracellulaire. Ces vésicules, les vésicules de la membrane externe (« outer membrane vesicles », OMVs) seraient produites volontairement par la bactérie lorsqu'elle se trouve en condition de stress (Ellis & Kuehn, 2010). Ces vésicules sont également un moyen de communication entre les cellules bactériennes infectieuses et les cellules de l'hôte infectées. Les OMVs sont en mesure de délivrer les molécules de LPS directement dans le cytosol (Kesty *et al.,* 2004). Une diminution de la quantité d'OMVs par modification génétique des bactéries s'accompagne d'une activation moindre de la caspase 11 (Vanaja *et al.,* 2014 ; Vanaja *et al.,* 2016).

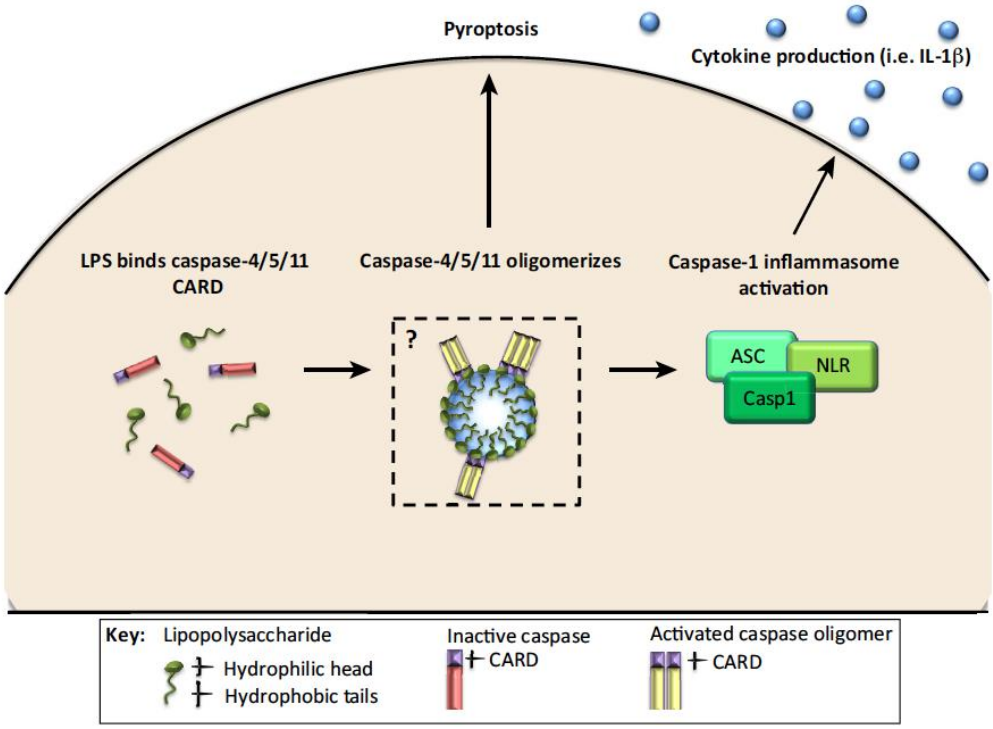


Figure 17. Activation de la voie des caspases par les LPS

Les LPS, une fois entrés dans le milieu intracellulaire (via la bactérie directement si elle est intracellulaire ou via les récepteurs TLR4 avec la LBP si la bactérie est extracellulaire), sont ensuite reconnus par les domaines CARD des caspases 4/5/11 entrainant leur activation par oligomérisation conduisant à la pyroptose (mort cellulaire). L'activation de l'inflammasome conduit à l'activation de la caspase 1 et à la production de cytokines pro-inflammatoires.

D'après Smith et al, 2015.

Abréviations : IL-1β : Interleukine- 1β ; ASC : C-terminal caspase recruitment domain ; NLR : Nod-like receptor ; Casp1 : Caspase 1 ; CARD : caspase-associated recruitment domains.

3. Médiateurs de l'inflammation

La présence de signaux de danger, « Damage Associated Molecular Pattern » (DAMPs) ou de motifs pathogéniques PAMPs est perçue par les cellules immunitaires grâce à leurs récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (ou PRR). Les cellules présentes dans le tissu infecté ou lésé, tels que les phagocytes mononuclées résidents (comme les macrophages et les cellules dendritiques) ou encore les mastocytes, sont les premières cellules activées par ces signaux. En réponse à cette activation et comme le montre la **figure 18** ci-dessous, elles libèrent notamment de l'histamine, des cytokines pro-inflammatoires (il existe également une voie impliquant la cyclo-oxygénase 2 (COX-2), également pro-inflammatoire) et d'autres composés actifs que nous pouvons catégoriser sous le terme général de médiateurs de l'inflammation (MacGlashan, 2003 ; Levi & Van Der Poll, 2005 ; Laskin, 2009). Les conséquences fonctionnelles de cette activation sont l'élimination du pathogène (*via* la phagocytose) et/ou la réparation de la lésion (remodelage de la matrice extracellulaire par exemple).

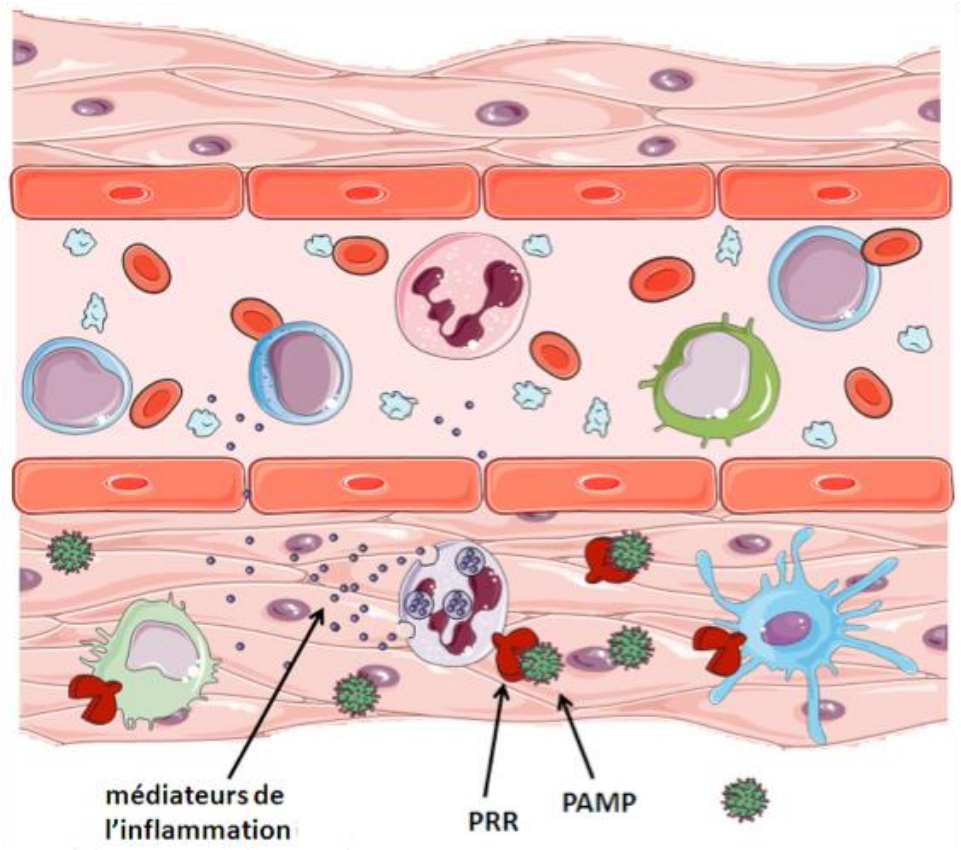


Figure 18. Libération des médiateurs de l'inflammation par les cellules immunitaires lors d'une infection

La présence de pathogènes est détectée par ces cellules via leurs PRR, récepteurs reconnaissants les PAMPs, qui sont des motifs particuliers aux agents infectieux provoquant la libération de médiateurs de l'inflammation par les cellules immunitaires.

D'après Katia Mayol, ENS Lyon, 2021.

3.1. Médiateurs lipidiques

Lorsque qu'une cellule immunitaire détecte un signal de danger, la phospholipase A2 est activée *via* la stimulation par le TNF-α (Fourcade e*t al.,* 1995). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des phospholipides membranaires en position sn2 et la libération d'acides gras polyinsaturés (principalement des acides gras oméga 6 et 3) servant de substrats pour la génération de leucotriènes (notamment le leucotriène B4, LTB4), prostaglandines et Platelet Activating Factor (PAF). Ces composés sont chimiotactiques pour les neutrophiles et les macrophages, et induisent aussi l'augmentation de la dilatation des vaisseaux et leur perméabilité, facilitant l'arrivée des leucocytes sur le site de l'inflammation afin de contenir le danger provoqué par le pathogène (Bennett & W. Gilroy, 2016).

Il existe également des médiateurs lipidiques dits « pro-résolvants », générés à partir à partir d'acides gras polyinsaturés localement au niveau du site de l'inflammation. Les lipoxines (LX) et notamment LXA_4 ont été les premières à être identifiées comme étant pro-résolvantes. Elles sont exprimées par différents types cellulaires tels que les macrophages, les monocytes ou encore les plaquettes et sont dérivées de l'acide arachidonique (C20:4). De plus, différentes voies de biosynthèses existent pour ces molécules : la voie majoritaire et classique avec l'implication de plusieurs lipoxygénases (LOX). Les acides eicosapentanéoïque (C20:5) et docosahéxaénoïque (C22 :6) sont également des acides gras pouvant être métabolisés en résolvines, protectines et marésines grâce aux LOX (Kwon, 2020) (**Figure 19**). Ces différents médiateurs lipidiques pro-résolvants assurent l'inhibition d'autres médiateurs pro-inflammatoires (cytokines) et l'ingestion de cellules apoptotiques par les cellules phagocytaires (Barning, 2016).

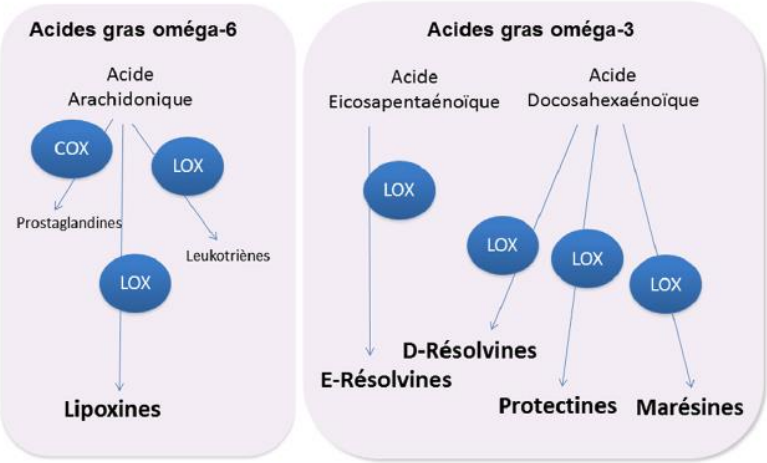


Figure 19. Synthèse des médiateurs lipidiques pro-résolvants

Les médiateurs lipidiques pro-résolvants sont biosynthétisés à partir d'acides gras polyinsaturés (acides gras oméga-6 et oméga-3) en impliquant plusieurs lipoxygénases (LOX) et cyclo-oxygénases (COX).
D'après C. Barning, Revue française d'allergologie, 2016.

3.2. Autres médiateurs

En plus des nombreux médiateurs lipidiques impliqués dans la résolution ou dans le maintien de l'inflammation, il existe d'autres catégories de médiateurs, que nous allons détailler dans cette partie. Il s'agit notamment de l'histamine, des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines et des protéines de phase aigüe.

3.2.1. L'histamine

L'histamine est une amine dite vasoactive et est localisée dans les granules des mastocytes et des basophiles. Les mastocytes, une fois activés par la reconnaissance de PAMPs ou DAMPs libèrent l'histamine stockée dans leurs granules dans le milieu extracellulaire augmentant ainsi la perméabilité vasculaire et permet la contraction des muscles lisses localement. Elle agit également au niveau de système nerveux et provoque la sensation de douleur (MacGlashan, 2003).

3.2.2. Les cytokines

Le TNF-α, l'IL-1 et l'IL-6 sont les principales cytokines impliquées dans le processus inflammatoire. Ces cytokines produites par les macrophages, les cellules dendritiques ou encore les mastocytes renferment dans leurs granules des « stocks » de TNF-α qui a pour rôle de stimuler l'expression de molécules d'adhérence et la production de chimiokines par les cellules endothéliales assurant ainsi le recrutement des leucocytes sanguins (neutrophiles, éosinophiles, monocytes ou les cellules *Natural Killer*, NK) vers le lieu de l'inflammation. Il active également les systèmes de défense contre les microbes au niveau des phagocytes et favorise la mitose des lymphocytes T et B (nécessaire pour la mise en place de la réponse adaptative si la réponse innée n'est pas suffisante à la résolution de l'inflammation). Enfin et fort heureusement, le TNF-α active fortement la production de facteurs de croissance, qui seront indispensables à la réparation du tissu endommagé (Boussiotis *et al.,* 1994).

L'IL-1 est sécrétée par de nombreuses cellules après la reconnaissance de PAMPs : les leucocytes ou encore les cellules endothéliales et les fibroblastes. L'IL-1, ayant pour rôle de protéger l'organisme en combattant la maladie, provoque des effets locaux mais aussi systémiques. Comme le TNF-α, cette cytokine stimule l'expression de molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium vasculaire favorisant ainsi la migration des leucocytes circulants vers le site enflammé. De plus, il est impliqué dans l'induction de la fièvre (Chai *et al.,* 1996). L'IL-1 agit directement sur les centres de l'hypothalamus qui contrôlent la température corporelle permettant ainsi une augmentation de cette température. Cette élévation permet

aux lymphocytes d'entrer en phase mitotique plus rapidement et avoir une division cellulaire plus efficace.

Comme déjà mentionné précédemment, l'IL-6 est produite par les phagocytes (macrophages et cellules dendritiques) et les cellules endothéliales en cas de foyer inflammatoire. Elle induit localement l'activation des phagocytes et la modification de l'endothélium et favorise le recrutement de monocytes sanguins vers les tissus et la production de protéines de la phase aiguë par les hépatocytes (Birkedal-Hansen, 1993).

3.2.3. Les chimiokines

Les chimiokines sont des cytokines impliquées dans la migration cellulaire après stimulation par des signaux de dangers. Elles forment alors une sorte de « gradient » et sont capables de diriger la migration des leucocytes nécessaires vers le tissu inflammé.
On répartit les chimiokines en deux classes, en fonction de la distance séparant deux résidus cystéines conservés : les chimiokines α qui ont une séquence cystéine-résidu aléatoire-cystéine (CXC) et les chimiokines β qui ont une séquence cystéine-cystéine (CC).
La plupart des chimiokines interagissent avec plusieurs récepteurs, et chacun d'entre eux peut reconnaitre plusieurs chimiokines. Chaque population leucocytaire exprime un groupe défini de récepteurs, ce qui permet aux différents types de cellules immunitaires de répondre spécifiquement à certaines chimiokines seulement (Baggiolini & Loetscher, 2000).

3.2.4. Les protéines de phase aigüe

Elles sont produites au niveau du foie et notamment par les hépatocytes au moment de la phase aigüe de l'inflammation. Les plus décrites sont la « *C-Reactive Protein* » (CRP)**,** la « *Serum Amyloid-A* » (SAA) et la « *Serum Amyloid-P* » (SAP). Toutes favorisent la phagocytose des pathogènes par les macrophages. De plus, la CRP est produite rapidement en réponse à l'IL-6, et son dosage dans le sérum est utilisé en clinique pour diagnostiquer une inflammation (Ceciliani *et al.,* 2005).

3.2.5. Le cas particulier du Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) : médiateur ou biomarqueur ?

Des travaux effectués dans notre laboratoire ont démontré le rôle prometteur du GLP-1 comme marqueur de l'inflammation. Le GLP-1 est un peptide sécrété par les cellules entéroendocrines de l'intestin juste après une prise alimentaire (Kazafeos, 2011). Son rôle dans la régulation du métabolisme glucidique est aujourd'hui largement décrit (Everard & Cani, 2014 ; Holst *et al.,* 2007). Il a également été démontré que le taux de GLP-1 augmente lorsque certains composants bactériens, les LPS, parviennent à franchir la barrière intestinale (Nguyen

et al., 2014 ; Lebrun *et al.,* 2017). Il existe donc un lien direct entre l'augmentation de l'exposition aux LPS et celle du taux de GLP-1, en cas de lésions intestinales et donc d'inflammation. La muqueuse intestinale enflammée serait alors incapable d'assurer sa fonction barrière, et serait facilement franchie par les LPS produits par la flore bactérienne locale, déclenchant une augmentation de la sécrétion de GLP-1 (Lebrun *et al.,* 2017). De par ses propriétés anti-inflammatoires très bien décrites dans la littérature, cette incrétine peut ainsi être considérée comme étant un véritable biomarqueur de l'inflammation lors d'une infection provoquée par les LPS.

En ce qui concerne les maladies métaboliques, le rôle du GLP-1 reste encore à être démontré. En effet, diverses études ont démontré que la production et les taux de GLP-1 circulants étaient diminués chez des animaux et des patients en situation d'obésité ou atteints de DT2 (Ahrén, 2011 ; Nauck *et al.,* 2011 ; Zietek & Rath, 2016) tandis que d'autres travaux ne démontrent aucune différence de sécrétion (Vollmer *et al.,* 2008 ; Knop *et al.,* 2012). Une diminution de la fonction du GLP-1 pourrait être expliquée par une réduction des taux circulants de l'incrétine ou bien d'une réduction de sa fonction insulinotropique. L'activité réduite du GLP-1 entrainerait ainsi une prise de masse corporelle (*via* des modifications de la vidange gastrique) et la prise de masse corporelle entrainerait quant à elle une perte de l'activité du GLP-1. De plus, nous avons démontré récemment au sein du laboratoire que les animaux déficients en protéine de transfert des phospholipides (PLTP) ne sécrétaient pas de GLP-1 après administration de LPS par voie orale contrairement aux souris sauvages qui atteignent un pic de concentration une heure après gavage (**Annexe 1**). De nombreuses études ont également prouvé le bienfait de traitements basés sur le GLP-1 contre l'obésité et le DT2 : il s'agit notamment des analogues du GLP-1, agonistes du récepteur au GLP-1 (GLP1-R) ou des inhibiteurs de l'enzyme dipeptydil-peptidase-4 (DPP-4) Le lien de causalité entre la production de GLP-1, la translocation intestinale des LPS ou encore le développement de maladies métaboliques à bas bruit reste encore à être investigué davantage afin de déterminer si cette molécule est un médiateur de l'inflammation à proprement parler ou s'il s'agit plus simplement d'un marqueur secondaire de l'inflammation.

4. Le développement du sepsis

Nous avons évoqué dans les chapitres précédents les mécanismes de mise en place et les conséquences d'une endotoxémie à bas bruit en relation avec les altérations de la perméabilité intestinale. Cependant, certaines situations pathologiques sont associées à la présence d'une présence de fortes quantités d'endotoxines déclenchant une réaction inflammatoire aiguë. Le sepsis, ou « état septique », désigne une « réponse inflammatoire

généralisée associée à une infection grave » (Ceccioni *et al.,* 2018). En effet, des études récentes ont démontré le lien qu'il existait entre obésité, diabète et l'évolution défavorable du sepsis au vu de la fragilité du terrain et le risque de décompensation métabolique (Belhaj Salah *et al.,* 2020). Le sepsis est décrit comme étant « un dysfonctionnement organique potentiellement mortel causé par une réponse déréglée de l'hôte vis-à-vis de l'infection ». Si l'infection n'est pas détectée à temps et prise en charge rapidement, elle peut entraîner un choc septique, une défaillance de plusieurs organes et la mort. Il s'agit le plus souvent d'une complication grave de l'infection, notamment dans les pays à revenu faible ou intermédiaire où il représente une cause majeure de morbidité et de mortalité maternelles et néonatales (OMS, 2020).

4.1. Épidémiologies mondiale et nationale...

Une personne meurt de sepsis dans le monde toutes les 5 secondes. Dans les pays industrialisés et développés, le sepsis représente autant de décès que l'infarctus du myocarde : on dénombre une centaine de cas de sepsis pour 100 000 habitants pour les moins de 65 ans, et plus de 1000 cas pour les plus de 65 ans. Dans les pays en voie de développement, la principale forme de sepsis reste le sepsis puerpéral qui demeure une cause de mortalité importante chez les femmes après leur accouchement (environ 18 000 décès par an). Quant au sepsis néonatal, on estime qu'il est à l'origine de plus de 350,000 décès parmi les nouveau-nés dans le monde (Institut pasteur, 2018).

4.2. Physiopathologie

Le sepsis va engendrer une réponse accrue du système immunitaire et cette réponse disproportionnée va elle-même induire de multiples dysfonctions d'organes mettant ainsi en jeu le pronostic vital de l'individu atteint de ce syndrome. Cette dysfonction d'organes peut être caractérisée par le score SOFA, le « Sequential Organ Failure Assessment score » (**Figure 20**).

	SOFA score 0	SOFA score 1	SOFA score 2	SOFA score 3	SOFA score 4
Respiratory system: PaO_2/FiO_2 (kPa)	≥53·3	<53·3	<40	<26·7	<13·3
Coagulation system: platelets (×10^3/μL)	≥150	<150	<100	<50	<20
Hepatic system: bilirubin (μmol/L)	<20	20–32	33–101	102–204	>204
Cardiovascular system	MAP >70 mm Hg	MAP <70 mm Hg	Dopamine <5 μg/kg per min, or dobutamine (any dose) administered	Dopamine 5·1–15 μg/kg per min, or epinephrine ≤0·1 μg/kg per min, or norepinephrine ≤0·1 μg/kg per min administered	Dopamine >15 μg/kg per min, or epinephrine >0·1 μg/kg per min, or norepinephrine >0·1 μg/kg per min administered
Central nervous system: Glasgow Coma Scale	15	13–14	10–12	6–9	<6
Renal system					
Creatinine (μmol/L)	<110	111–170	171–299	300–440	>440
Urine output (mL/day)	..	..	..	<500	<200

Scores from 0 to 4 are assigned for each of the six organ systems, with a higher score indicative of worse organ dysfunction in each system. MAP=mean arterial pressure.

Table: **Description of sequential organ failure assessment (SOFA) scoring system**[5]

Figure 20. Description du score SOFA

D'après Cecconi et al., 2018.

Abréviations : FiO_2 : Fraction inspirée en oxygène, PaO_2 : pression partielle en oxygène, MAP : Pression artérielle moyenne.

L'évolution la plus délétère du sepsis est le choc septique. Le choc septique est défini comme étant « une défaillance circulatoire aiguë, entraînant des désordres hémodynamiques, métaboliques et viscéraux, déclenchée par un agent infectieux » (**Figure 21**). Il est défini par l'apparition ou la persistance d'une hypotension artérielle (PAS < 90 mmHg ou PAD < 40 mmHg) ou encore de signes d'hypoperfusion périphérique (lactatémie ≥ 4 mmol/L, oligurie) malgré un remplissage vasculaire adéquat (au cours d'un sepsis grave, ou d'emblée chez un malade ayant des signes d'infection).

Le choc septique est une urgence médicale qui requiert des soins visant à hausser rapidement la pression artérielle systémique (en augmentant le volume sanguin et en administrant des vasopresseurs tels que les catécholamines) ainsi que des antibiotiques par voie intraveineuse. Le choc septique reste un état grave associé à un fort taux de mortalité. En France, la mortalité des patients atteints d'un sepsis atteint quasiment 30% mais la mortalité du choc peut atteindre jusqu'à 50%. On estime à 30 000 le nombre de décès consécutifs au sepsis en France. Malheureusement, le vieillissement de la population permet d'ores et déjà de prédire une forte augmentation de la mortalité associée au sepsis dans les années à venir (Institut Pasteur, 2018). L'OMS a d'ailleurs inscrit le sepsis en 2017 comme étant une « priorité de santé publique » et a adopté des mesures afin de mieux prendre en charge la prévention, le diagnostic et le traitement du sepsis (Cecconi *et al.,* 2018).

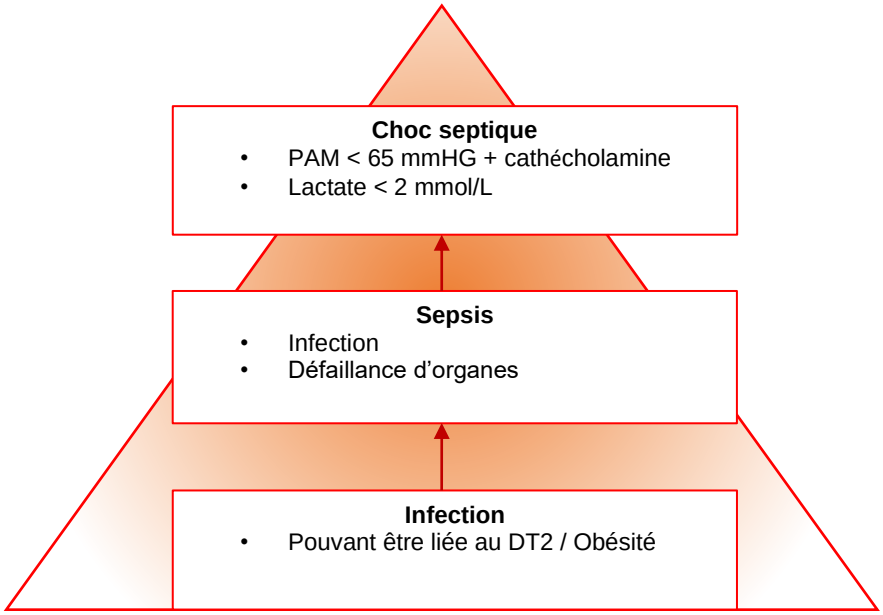


Figure 21. Lien entre inflammation à bas bruit, sepsis et choc septique : comparaison des niveaux de gravité croissant de la pathologie infectieuse

Abréviations : DT2 : Diabète de type 2, PAM : Pression artérielle moyenne.

CHAPITRE 4. NEUTRALISATION ET ÉLIMINATION DES LPS : IMPLICATIONS DES PROTÉINES DE LA FAMILLE LT/LBP ET DES LIPOPROTÉINES

Comme nous l'avons vu précédemment, les maladies métaboliques provoquent une fragilisation durable et persistante de l'intestin. Cette vulnérabilité conduit au passage des LPS dans la circulation sanguine puis à des complications locales et systémiques (maladies cardiovasculaires notamment). Dans les cas extrêmes de lésion majeure de l'intestin, les niveaux de LPS circulants sont tels qu'ils peuvent provoquer des états inflammatoires sévères pouvant même aller jusqu'au décès de l'hôte. Fort heureusement, des mécanismes de prise en charge, neutralisation et inactivation de ces endotoxines bactériennes existent. Ce chapitre vise ainsi à les décrire.

Le transfert et la fixation des LPS sur les lipoprotéines plasmatiques circulantes est la principale voie de neutralisation de ces derniers. Il existe ainsi des transporteurs qui sont capables de prendre en charge ces toxines, molécules amphiphiles, afin de les fixer à la surface des lipoprotéines. Il s'agit des protéines de la famille « lipid transfer » (LT) ou la LBP (Wong *et al.,* 2017). Une fois inactivée et inoffensive pour l'hôte, elles sont transportées pour être éliminées *via* la voie hépatobiliaire.

A. Les lipoprotéines

Ce début de chapitre vise à décrire la structure, la diversité et l'implication des lipoprotéines au niveau i) de la prise en charge des triglycérides et du cholestérol et ii) de la prise en charge et de l'inactivation des LPS.

1. Que ce sont les lipoprotéines ?

Comme son nom l'indique, une lipoprotéine est une association moléculaire formée par des lipides et des protéines (**Figure 22**). Ces structures permettent aux lipides, qui sont très peu solubles dans l'eau, de circuler dans le compartiment sanguin. Différents types de lipoprotéines existent, classifiées initialement selon leur densité. De la densité la plus faible à la densité la plus haute, nous pouvons énumérer : les chylomicrons (CM), les lipoprotéines de très faible densité (« very low-density lipoproteins », VLDL), de densité intermédiaire (« intermediate-density lipoproteins », IDL), de faible densité (« low-density lipoproteins », LDL) et enfin les lipoprotéines de haute densité (« high-density liporoteins », HDL). Toutes ces lipoprotéines possèdent plusieurs rôles que nous détaillerons dans cette partie.

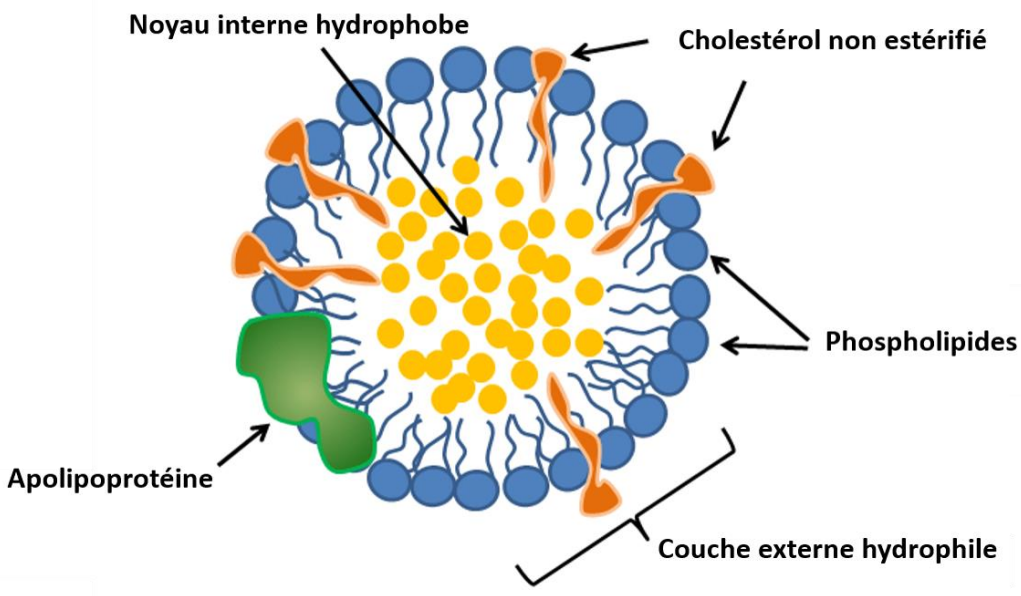


Figure 22. Représentation schématique d'une lipoprotéine

Structure commune des lipoprotéines. Elles sont toutes composées d'un noyau de lipides hydrophobes (triglycérides et esters de cholestérol) entouré d'une coque de protéines (les apolipoprotéines) et de lipides (phospholipides et cholestérol libre).
D'après Champe et al., 2005.

La surface des lipoprotéines est constituée d'une couche amphiphile comprenant des phospholipides, du cholestérol libre et d'une (ou plusieurs) apolipoprotéine(s), telles que les apolipoprotéines A ou B (apoA et apoB). La partie centrale contient des molécules complètement hydrophobes telles que des triglycérides (TG), des esters de cholestérol et de faibles quantités d'autres substances hydrophobes (des vitamines liposolubles par exemple).

Comme le montre le **Tableau 2** ci-dessous, les lipoprotéines au-delà de leur densité, les lipoprotéines peuvent être classifiées en fonction des paramètres suivants (liste non exhaustive) : taille (poids moléculaire moyen ou diamètre), composition en apolipoprotéines, ou composition en lipides. Ces différentes propriétés déterminent la fonction des différentes classes de lipoprotéines.

Lipoprotéines	Densité	Poids moléculaire moyen	Diamètre (nm)	Apolipoprotéines principales	Lipides principaux	Fonction principale
Chylomicrons	<0,99	5.10^9	100-1000	B48, C-II, C-III, A-I, A-IV	Triglycérides	Transport des lipides alimentaires
VLDL	0,99-1,006	$7,5.10^6$	30-70	B100, C-II, E	Triglycérides	Transport des lipides depuis le foie
IDL	1,006-1,019	$2,5.\ 10^6$	15-25	B100, E	Triglycérides	Transport des lipides depuis le foie
LDL	1,019-1,063	$2,5.\ 10^6$	15-25	B100, Lp(a)	Cholestérol	Distribution des lipides dans les tissus
HDL	1,063-1,21	$3.\ 10^5$	6-14	A-I, A-II	Phospholipides	Récupération du cholestérol dans les tissus

Tableau 2. Caractéristiques et compositions des lipoprotéines.

Abréviations : VLDL : Very-low density lipoproteins ; IDL : Intermediate-density lipoprotein ; LDL : Low-density lipoprotein ; HDL : High-density lipoprotein.

2. Métabolisme des lipoprotéines

Une vue d'ensemble du métabolisme des différentes lipoprotéines précédemment décrite est illustrée dans la **Figure 23**. Les CM sont produits par l'intestin à partir de lipides alimentaires. En effet, les lipides provenant du chyme sont hydrolysés par les enzymes pancréatiques (lipase, phospholipase). Cette hydrolyse est accompagnée d'une émulsification en gouttelettes grâce à l'action des sels biliaires. Les produits de digestion de ces lipides sont les suivants : les monoglycérides (MG), les acides gras (AG), le cholestérol et des lysophospholipides. Au sein des entérocytes, les lipides sont synthétisés *de novo* à partir du glycérophosphate pour les phospholipides et de MG pour les TG. Les CM sont ainsi synthétisés par les entérocytes avec une partie centrale constituée principalement de TG et une couche externe constituée d'apolipoprotéines, phospholipides et cholestérol libre (Kindel et *al.,* 2010). Ces CM nouvellement synthétisés sont ensuite relâchés dans la circulation lymphatique puis sanguine et leur couche superficielle s'enrichit en apolipoprotéines d'origine hépatique.

Ils sont en mesure de transporter les TG provenant des aliments de l'intestin jusqu'aux différents tissus périphériques (les organes utilisateurs). La lipoprotéine lipase (LPL) est une enzyme nécessaire à l'hydrolyse de ces TG présents sur les lipoprotéines (Beisiegel *et al.,* 1991 ; Heeren e*t al.,* 2002) afin de permettre leur passage au niveau intracellulaire. Les CM dépourvus en partie de ces TG, appelés remnants, sont éliminés de la circulation par la voie hépatique.

Les VLDL sont sécrétées par les hépatocytes et synthétisées à partir des acides gras libres (AGL) présents dans la circulation et des lipides issus de la lipogenèse. À l'image des CM, les VLDL ont pour rôle d'assurer la distribution des TG aux tissus périphériques grâce à l'action

de la LPL. Les VLDL sont transformées en IDL puis LDL, lipoprotéines qui assurent également la distribution du cholestérol aux tissus périphériques et qui peuvent être captées par le foie afin d'être dégradées. Les HDL, quant à elles, sont principalement formées au niveau du foie et de l'intestin (qui sont les sources principales d'apolipoprotéines A1, protéine « squelette » des HDL) et deviennent matures dès lors que des composés lipidiques, notamment les molécules de cholestérol, se fixent à elles avant d'être captées par le foie : il s'agit du transport reverse du cholestérol. Le cholestérol est ensuite éliminé ou distribué de nouveau aux lipoprotéines (telles que les LDL) afin d'être distribué aux tissus périphériques (**Figure 23**).

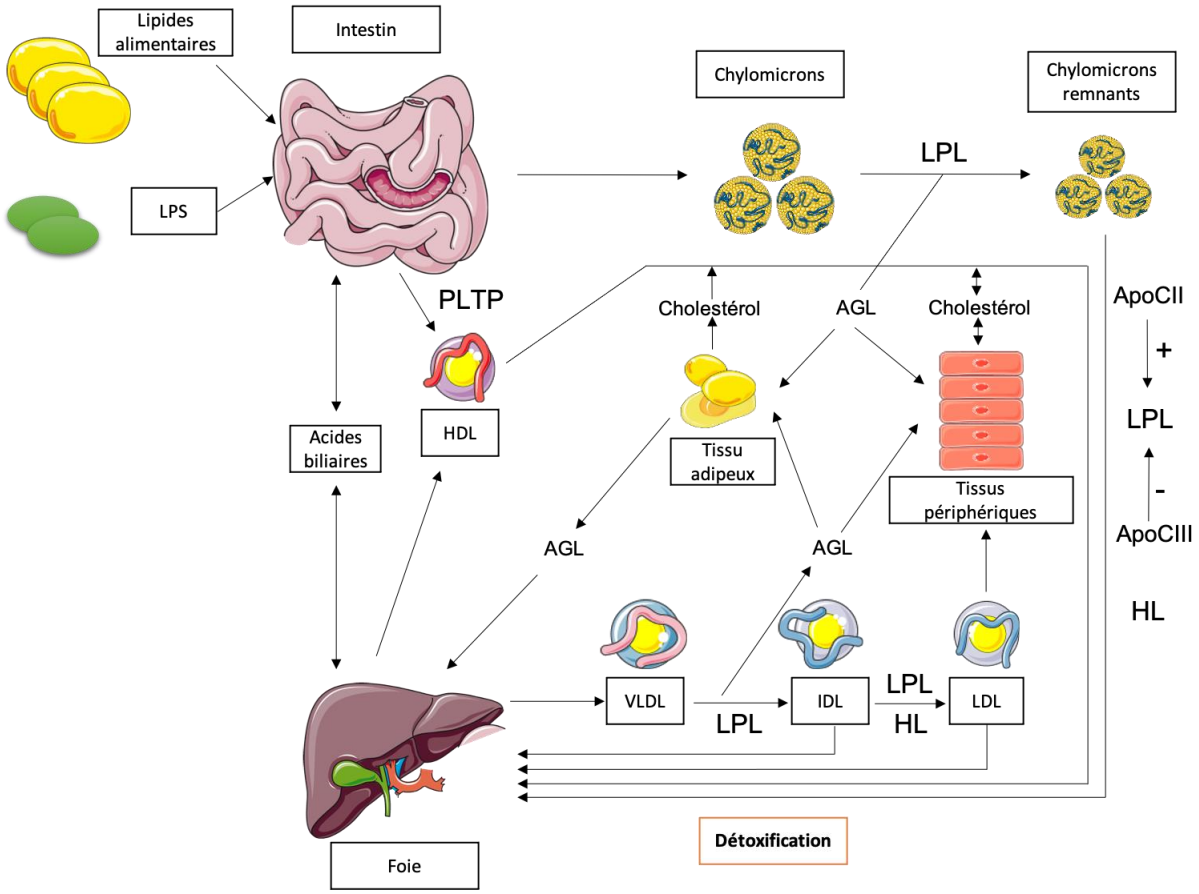


Figure 23. Représentation schématique du métabolisme des lipoprotéines, de leur rôle dans le transport des lipides

Adapté de la thèse de Lorène Lebrun, 2016.
Abréviations : AGL : Acides gras libres ; VLDL : Very low-density lipoproteins ; LDL : Low-density lipoproteins ; IDL : Intermediate density lipoproteins ; HDL : High-density lipoproteins, LPL : Lipoprotein lipase, HL : Lipase hépatique ;, ApoCII : Apolipoprotéine CII ; ApoCIII : Apolipoprotéine CIII ; PLTP : Phospholipid transfer protein, ; LPS : Lipopolysaccharides.

3. Implication des lipoprotéines dans le développement de pathologies cardiovasculaires

Nous avons vu précédemment l'implication du métabolisme des lipoprotéines dans la prise en charge des lipides alimentaires et la distribution aux différents tissus. Cependant, lors du développement de certaines maladies métaboliques ou encore l'excès d'alimentation riche

en lipides, une modification du métabolisme lipoprotéique va se produire, suivi d'une augmentation du taux de cholestérol et des TG entrainant des conséquences délétères sur la santé de l'hôte. En effet, il est possible de mesurer ces taux de cholestérol en dosant le cholestérol, comprenant le cholestérol LDL (LDLc), considéré comme étant le « mauvais » cholestérol (associé à un risque cardiovasculaire élevé) et le cholestérol HDL, considéré comme étant le bon cholestérol (HDLc, inversement corrélé au risque cardiovasculaire). On parle ainsi d'hypercholestérolémie lorsque les taux de cholestérol dépassent la normale (1,6 g/L en moyenne chez l'Homme). En parallèle, une hypertriglycéridémie (>1,25 g/L en moyenne chez l'Homme) est fréquemment observée chez les individus atteints de surpoids, d'obésité ou encore de diabète.

Conséquences d'une dyslipidémie (notamment de l'augmentation de TG et de LDLc et d'un taux trop faible de HDLc) : l'accumulation de lipoprotéines à apoB (principalement les LDL) dans la paroi vasculaire. Ce phénomène est à l'origine de la formation de plaques d'athérome au niveau des artères de grand et moyen calibres. Il est également important d'ajouter que les remnants de lipoprotéines et notamment les remnants de CM peuvent être un marqueur du développement de maladies métaboliques comme l'obésité et le diabète. Certaines études récentes évoquent la corrélation entre le développement de cette maladie et l'augmentation de la quantité de remnants de CM dans le sang (Chait *et al.,* 2020). Les plaques d'athérome s'épaississent progressivement, provoquant des anomalies hémodynamiques, et peuvent se rompre, provoquant une thrombose en obstruant la totalité du vaisseau sanguin. Une fois l'athérosclérose développée, cette maladie peut être responsable de graves complications telles que : l'infarctus du myocarde, l'AVC, l'artériopathie des membres inférieurs ou encore un anévrysme artériel.

4. Inactivation des LPS

Au-delà de l'implication des lipoprotéines dans la pathologie de l'athérosclérose, plusieurs études ont montré que chacune des classes de lipoprotéines est capable de se lier aux LPS et de les neutraliser (Harris *et al.,* 1990; Emancipator *et al.,* 1992). Toutefois, les LPS ne se lient pas à toutes les lipoprotéines avec la même affinité et ont une légère préférence pour les HDL. En effet, l'incubation de LPS avec du sang humain aboutit à une fixation d'environ 60% sur les HDL contre 25% pour les LDL et seulement 12% pour les VLDL (Levels *et al.,* 2001). Cette capacité d'inactivation des molécules de LPS par les lipoprotéines est aussi fonction du type de LPS en présence et notamment de la conformation du lipide A (Sprong *et al.,* 2004). En effet, la capacité d'inactivation des lipoprotéines se fait *via* des modifications structurales de la portion endotoxique des LPS (Brandenburg *et al.,* 2004).

Les LPS associés aux lipoprotéines sont des LPS neutralisés dont le pouvoir pro-inflammatoire est fortement diminué. En effet, comparés aux LPS libres, les LPS ainsi fixés se lient moins facilement à la surface des cellules de l'immunité (Cavaillon *et al.,* 1990) et leur clairance est ainsi augmentée grâce à une prise en charge optimisée de ces derniers par la voie hépatobiliaire (Sewnath *et al.,* 2000).

B. Protéines de la famille LT/LBP : une prise en charge efficace

1. Les membres de la famille LT/LBP

Les LPS sont des molécules amphiphiles ayant besoin de navettes pour pouvoir se fixer sur les lipoprotéines. Dans la circulation sanguine, ce sont principalement les protéines membres de la famille LT/LBP qui sont en charge d'un tel transfert. Cette famille est constituée de la protéine bactéricide augmentant la perméabilité (« *bactericidal permeability increasing protein* », BPI), de la LBP, de la protéine de transfert du cholestérol estérifié (« *cholesteryl ester transfer protein* », CETP) et de la protéine de transfert des lipides (« *Phospholipid transfer protein* », PLTP). Les principaux points communs dans cette famille : i) une homologie de structure avec une représentation tridimensionnelle de la protéine en forme de boomerang créant une sorte de poche pour la fixation des lipides (Beamer *et al.,* 1997 ; Lagrost *et al.,* 1998 ; Huuskonen *et al.,* 2000), ii) une capacité de fixation et de transfert de composés lipidiques ou lipophiles et iii) une implication dans le métabolisme des LPS. Parmi ces protéines, seules deux ont une capacité de transfert avérée des LPS sur les lipoprotéines, la LBP et la PLTP (Hailman *et al.,* 1996, Gutsmann *et al.,* 2001 ; Dusuel *et al.,* 2021). En revanche, seules la PLTP et la BPI sont capables de neutraliser les LPS et enfin, toutes les protéines sauf la CETP sont capables de se lier aux toxines bactériennes. Un récapitulatif des principales fonctions de ces protéines dans le métabolisme des LPS est proposé dans le **tableau 3** ci-après.

Protéines de la famille LT/LBP	Liaison aux LPS	Neutralisation des LPS	Transfert des LPS aux lipoprotéines
PLTP	☺	☺	☺
CETP	☹	☹	☹
LBP	☺	☹	☺
BPI	☺	☺	☹

Tableau 3. Récapitulatifs des fonctions des protéines de la famille LT/LBP dans le métabolisme des LPS

Abréviations : LPS : lipopolysaccharides ; PLTP : Phospholipid transfer protein ; CETP : Cholesteryl ester transfer protein ; LBP : Lipopolysaccharide binding protein ; BPI : Bactericidal permeability increasing protein.

2. Implication de la protéine de transfert des phospholipides (PLTP)

Dans cette section, nous allons nous intéresser et décrire plus précisément la PLTP, principale protéine de transfert étudiée durant mon projet de thèse.

2.1. Structure et fonctions principales de la PLTP

La PLTP est une protéine ubiquitaire de 81 kDa (**Figure 24**) initialement décrite pour sa capacité à transférer les phospholipides depuis les lipoprotéines riches en TG (CM, VLDL, IDL) vers les LDL et HDL. Elle modifie ainsi la composition, la structure et de ce fait les propriétés biologiques des HDL (Lagrost *et al.,* 1998). Elle a été largement étudiée dans un contexte d'athérosclérose et de maladies cardio-vasculaires. Toutefois, en plus de transférer des phospholipides, la PLTP sert également de navette à toute une panoplie de composés amphipathiques tels que les diacylglycérol (DAG) (Rao *et al.,* 1997), la vitamine E (Desrumaux *et al.,* 1999) ou encore les LPS (Hailman *et al.,* 1996 ; Gautier *et al,* 2008).

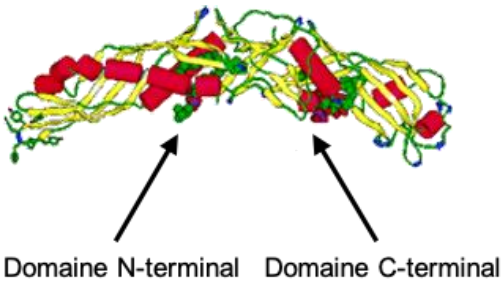


Figure 24. Structure de la PLTP

Les hélices α sont représentées par des « cylindres » et les feuillets ß par des « filaments ». D'après Huuskonen et al., 2000.

In vitro, la PLTP et la LBP sont toutes deux capables de transférer les LPS vers les lipoprotéines. Cependant la PLTP n'est pas capable de présenter à elle seule les LPS au CD14 et ne peut donc pas être considérée pro-inflammatoire (Hailman *et al.,* 1996 ; Vesy *et al.,* 2000). De plus, des souris déficientes en PLTP (*Pltp* knockout ou *Pltp*-KO) sont davantage sensibles à une injection de LPS *via* une moindre association des LPS aux HDL, une clairance ralentie des LPS, une production accrue de cytokines pro-inflammatoires et une augmentation significative de la mortalité (Gautier *et al.*, 2008). Les souris déficientes en PLTP présentent donc une neutralisation moindre des endotoxines bactériennes au niveau circulant.

2.2 Mécanismes de prise en charge des LPS par la PLTP

Il a déjà été démontré que la PLTP était capable de se lier au LPS et de le transférer vers les HDL (Hailman *et al.,* 1996) mais aussi de transférer les LPS entre les lipoprotéines (Levels *et al.,* 2001). La PLTP est à l'origine de l'initiation de la voie de transport inverse des lipopolysaccharides que nous décrirons dans la prochaine partie. Notre équipe a démontré que la PLTP jouait un rôle clé dans la protection contre le sepsis. Dans un premier temps, en utilisant un modèle de souris déficiente pour la PLTP, il a été démontré que la PLTP réduisait la susceptibilité de l'hôte à l'endotoxine (Gautier *et al.,* 2008). Dans un second temps, l'administration de PLTP recombinante était également protectrice contre l'endotoxémie chez les souris exprimant la PLTP et chez les souris déficientes pour la PLTP (Deckert *et al.,* 2017). La déficience en PLTP chez les souris est également associée à une diminution du taux de HDL (Jiang *et al.,* 1999). Les LPS, une fois pris en charge par les lipoprotéines, sont ensuite détoxifiés grâce au foie. Au niveau des hépatocytes, les récepteurs aux lipoprotéines et notamment les LDL récepteurs (LDLR) et récepteurs « Scavenger Receptor Class B type 1 » (SR-B1) ont été proposés comme favorisant cette clairance (Havel, 1986 ; Topchiy *et al.,* 2016 ; Zannis *et al.,* 2006) (**Figure 25**). Comme déjà mentionné précédemment, à l'heure à

laquelle ces lignes sont écrites, les mécanismes permettant le retour des complexes lipoprotéines-LPS ainsi que le devenir exact des LPS dans les cellules hépatiques sont encore mal connus et il reste beaucoup de questions en suspens.

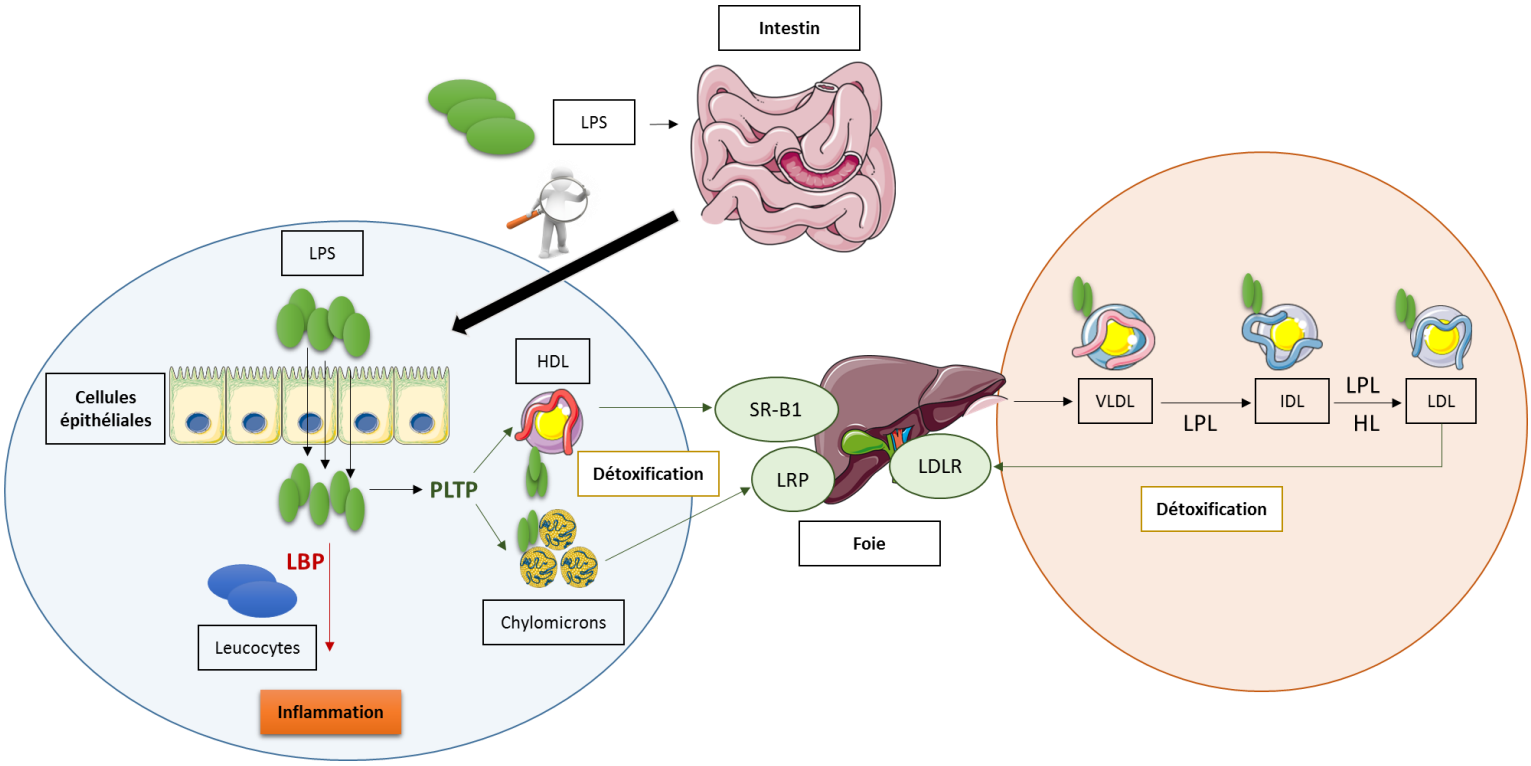


Figure 25. Représentation schématique de l'implication des lipoprotéines et de la PLTP dans l'inactivation des LPS

Abréviations : VLDL : Very low-density lipoproteins ; LDL : Low-density lipoproteins ; IDL : Intermediate density lipoproteins ; HDL : High-density lipoproteins ; LPL : Lipoprotein lipase ; HL : Hepatic lipase : PLTP : Phospholipid transfer protein ; LBP : Lipopolysaccharide binding protein ; LPS : lipopolysaccharides ; LRP : LDL receptor-related protein ; SR-B1 : Scavenger Receptor Class B type 1 ; LDLR : LDL receptor.

C. Élimination des LPS

1. Transport inverse des LPS

Des études assez anciennes montrent que l'inactivation plasmatique des LPS est réversible (Rudbach *et al.,* 1966; Rudbach & Johnson, 1966). Il parait donc indispensable d'éliminer de la circulation sanguine les LPS même inactivés. La clairance des LPS de l'organisme présente de nombreuses similitudes avec celle du cholestérol : implication de la PLTP et de la CETP, prise en charge par les HDL circulants, élimination par le foie. Ainsi, par analogie avec le transport inverse du cholestérol, les voies d'élimination des LPS peuvent être nommées « transport inverse des LPS » (Gautier & Lagrost, 2011). Les lipoprotéines se chargent en LPS et les transportent ensuite vers le foie (Mathison & Ulevitch, 1979) où ils subissent des modifications de structure avant d'être éliminés par voie biliaire. Chez les rats, des LPS injectés par voie intraveineuse atteignent rapidement le foie : d'abord les cellules de Kupffer (les macrophages résidents du foie), puis les hépatocytes et enfin la bile (Buttenschoen *et al.,* 2010; Mimura *et al.,* 1995) (**Figure 26**).

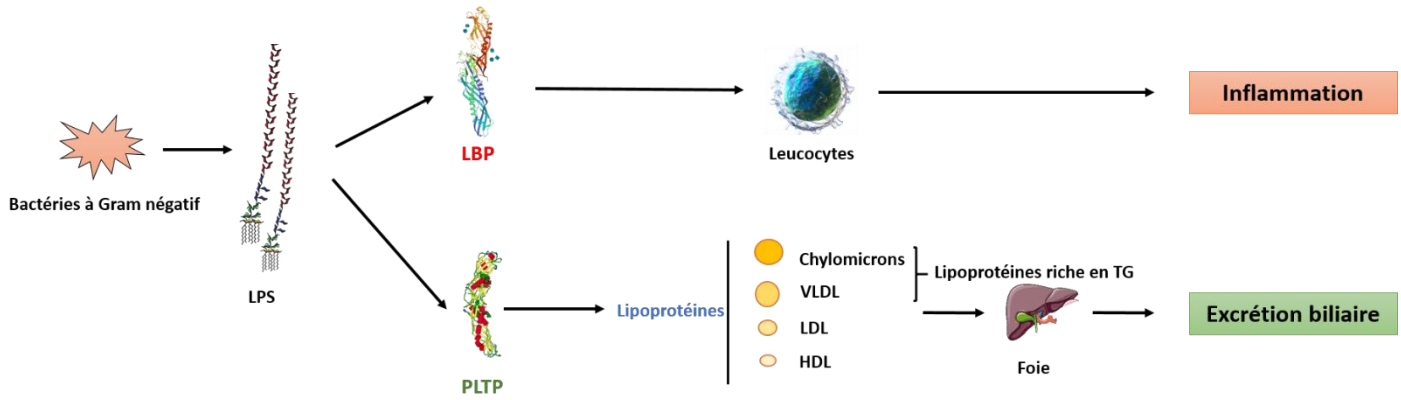


Figure 26. Voie de transport inverse des LPS

Adapté de Gautier et al., 2008
Abréviations : VLDL : Very low-density lipoproteins, HDL : high-density lipoproteins, PLTP : Phospholipid transfer protein, LBP : LPS binding-protein, TG : Triglycérides.

2. Effet du premier passage hépatique

L'effet de « premier passage hépatique » correspond à la transformation d'une substance (médicament, endotoxines…) lors de son premier passage par le foie, avant d'avoir atteint la circulation systémique, notamment lors d'une administration par voie orale (Van de Waterbeemd & Gifford, 2003 ; Gibaldi *et al.,* 2021). Cet effet de premier passage contribue ainsi à la réduction de la biodisponibilité de cette substance dans l'organisme. Les LPS d'origine intestinale auraient donc la possibilité de subir une première élimination avant d'être

re-largués dans la circulation dite principale (**Figure 27**). Néanmoins, jusqu'à présent ce phénomène n'a pas été clairement mis en évidence et a fait l'objet d'un travail du laboratoire auquel j'ai contribué (cf. partie 2 des résultats).

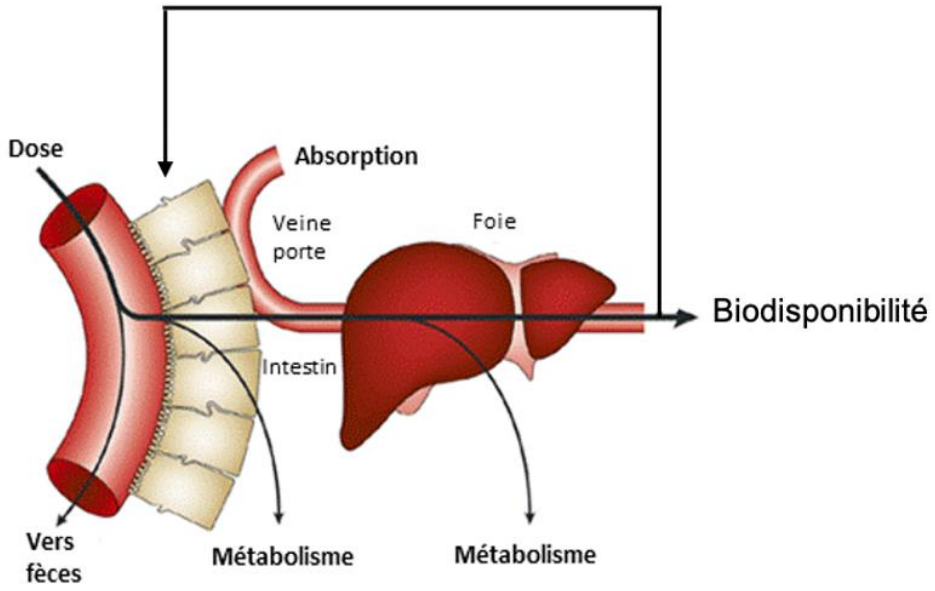


Figure 27. Effets du premier passage hépatique

Adapté de Thibaut Bricks (ANR, 2014), d'après Van de Waterbeemd & Gifford, 2003.

3. Voie annexe de détoxification : différentes enzymes impliquées

Comme déjà mentionné précédemment, la voie majoritaire de détoxification du LPS circulant est appelée « transport inverse du LPS » mais il existe d'autres voies minoritaires. L'enzyme acyloxyacyl hydrolase (AOAH) est exprimée principalement dans les cellules de Kupffer du foie mais est également présente dans le plasma au niveau des cellules immunitaires. Elle catalyse l'hydrolyse d'une partie des acides gras présents dans le lipide A (déacylation), provoquant une diminution du pouvoir pro-inflammatoire des LPS. Elle peut donc réduire la capacité d'endotoxique du LPS présent dans la circulation (Lu & Munford, 2011). Ce processus de désacylation ne semble pas dépendre du récepteur TLR4 *in vitro* (Munford & Hall, 1985) mais il est plus controversé *in vivo* car la désacylation du LPS circulant est plus lente chez les souris déficientes en TLR4 (Lu & Munford, 2011). Une autre enzyme, la phosphatase alcaline intestinale (PAI), a été décrite comme ayant un rôle majeur dans la neutralisation du LPS (Bates *et al.,* 2007). Mécaniquement, elle inactive le LPS en déphosphorylant le lipide A (Poelstra *et al.,* 1997). Comme vu précédemment, d'autres protéines telles que la serum amyloid A (SAA), les collectines (protéines notamment une partie

lectine capable de fixer les polysaccharides) ou la BPI sont aussi des protéines capables de se fixer aux LPS et d'assurer leur neutralisation (Chaby, 2004 ; Shao *et al.,* 2007).

CHAPITRE 5. LIEN ENTRE PLTP ET MALADIES METABOLIQUES ET INFLAMMATION

Dans cet ultime, chapitre, nous allons aborder les différentes implications de la PLTP dans un contexte de maladies cardiométaboliques et notamment dans l'obésité, le diabète, les maladies cardiovasculaires et d'une manière générale dans un contexte d'inflammation. L'ensemble de ces observations est résumé dans le **tableau 4**.

A. PLTP : obésité et diabète

Plusieurs données de la littérature ont montré un lien entre activité PLTP et désordres métaboliques mais celui-ci est controversé et reste encore à être décrit en détail. En effet, certaines études chez les animaux démontrent que l'augmentation de l'activité PLTP est associée à une diminution des effets négatifs d'administration d'un régime gras, à savoir le développement de l'obésité et de l'insulino-résistance (Song *et al.,* 2019 ; Sponton *et al.,* 2020). D'autres études, cette fois cliniques, démontrent quant à elles une augmentation des niveaux plasmatiques de PLTP chez les sujets obèses ainsi qu'une association positive avec des paramètres de l'insulino-résistance (Dullaart *et al.,* 1994; Murdoch *et al.,* 2000; Kaser *et al.,* 2001). Chez des patients atteints de DT2, une augmentation de l'activité de la PLTP plasmatique a été retrouvée (Dullaart *et al.,* 2007). Une autre étude met en évidence que l'augmentation de l'activité PLTP plasmatique pourrait être associée à un risque accru de développer une pathologie métabolique de type DT2 (Abbasi *et al.,* 2015).

Ces données suggèrent que l'activité PLTP agit comme un facteur contribuant à l'apparition des désordres métaboliques et non l'inverse. Cependant, des travaux datant des années 2000 montrent qu'au contraire, la perte de fonction de la PLTP pourrait favoriser le développement des maladies métaboliques et pourrait notamment favoriser la survenue et le développement de l'obésité et d'autres comorbidités comme le DT2. En effet, chez l'Homme, des polymorphismes du gène codant pour la PLTP humaines sont associés à un tour de taille augmenté et un risque accru de devenir obèse (Bossé *et al.,* 2005). Il est néanmoins important de préciser qu'aucune association entre ces polymorphismes et des variants fonctionnels de la PLTP n'a été établie. Nous pouvons ainsi nous demander si les effets précédemment décrits sur le développement de l'obésité et du DT2 sont dus à une variation de l'activité PLTP ou s'il s'agit d'une conséquence d'un déséquilibre de liaison avec un polymorphisme touchant un gène voisin du même locus. D'autres études suggèrent également qu'une augmentation de la PLTP circulante pourrait améliorer la tolérance au glucose, la sensibilité à l'insuline mais également augmenter la dépense énergétique et diminuer les niveaux de cholestérol et phospholipides circulants (Sponton *et al.,* 2020). De plus, certaines limites peuvent être soulignées : selon les études, la quantité de PLTP ou son activité ont été dosées ce qui peut

être à l'origine de résultats discordants sachant que la PLTP possède plusieurs formes, active et inactive.

B. PLTP : maladies cardiovasculaires

De nombreuses études effectuées chez l'Homme ont démontré que l'augmentation de l'activité PLTP était corrélée avec le risque de de développer des maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose (De Vries *et al.,* 2006 ; Schlitt *et al.,* 2009 ; Dullaart *et al.,* 2013). Des études sur des modèles murins ont démontré une relation directe entre l'activité PLTP et le développement de l'athérosclérose. En effet, la déficience en PLTP semble être associée à une atténuation de l'athérogénèse chez des souris atteintes d'hyperlipidémie (Jiang *et al.,* 2001). Plus précisément, la déficience en PLTP est associée à une réponse thrombotique réduite suite à un stress oxydatif aigu (Desrumaux *et al.,* 2010), une altération de l'agrégation plaquettaire (Zhao *et al.,* 2018) et à une réduction de l'incidence des anévrismes de l'aorte abdominale (Deckert *et al.,* 2013). La déficience en PLTP chez des souris atténue donc le développement de l'athérosclérose tandis que la surexpression de cette dernière tend à aggraver le phénomène (Jiang *et al*., 2001 ; Van Haperen *et al.,* 2002 ; Yang *et al.,* 2003). Il en va de même chez le lapin où la surexpression de la PLTP conduit à l'apparition de l'athérosclérose (Masson *et al.,* 2011).

Néanmoins, il est important de noter que le modèle murin ne reproduit pas fidèlement ce qu'il se passe chez l'Homme. En effet, la souris ne possède pas de CETP active et présente de faibles niveaux de lipoprotéines avec de l'apolipoprotéine B (apoB) rendant ainsi le métabolisme des lipoprotéines différents de celui de chez l'Homme. De façon plus générale, une hypothèse a été émise selon laquelle le potentiel athérogène de la PLTP pourrait reposer sur sa capacité à favoriser la production de lipoprotéines riches en apoB dans le foie. Chez l'Homme, il a été démontré qu'une activité élevée de la PLTP était associée au risque de développer une coronaropathie (Schlitt *et al.,* 2009). Cependant, les mécanismes impliqués semblent être complexes. En effet, l'activité PLTP a été corrélée positivement aux taux de LDLc (Murdoch *et al.,* 2000), certaines études ont démontré que les variations génétiques au niveau du locus du gène codant pour la PLTP sont principalement associées aux taux de HDLc et de TG mais pas aux taux de LDLc. Des taux de transcription de PLTP plus élevés entrainent ainsi une augmentation des HDLc et une diminution des TG (Kathiresan *et al.,* 2009). Outre la modulation des concentrations en HDLc, le remodelage des HDL peut également expliquer la relation qu'il existe entre la PLTP et le risque de développer une maladie coronarienne chez l'Homme. En effet, un polymorphisme nucléotidique au niveau du gène de la PLTP a été associé positivement aux HDL de petites et moyennes tailles et négativement aux HDL de grandes tailles indépendamment des concentrations de LDLc ou d'apoB (Zhao *et al.,* 2021).

D'autres études ont également démontré qu'une activité plasmatique PLTP plus élevée était associée à un risque plus élevé de faire un AVC ou encore de développer une dysfonction systolique (Chen *et al.,* 2013 ; Robins *et al.,* 2013). De manière plus générale, il a été démontré que des niveaux plasmatiques de PLTP plus élevés se révèlent être un facteur de prédiction de la mortalité associée aux maladies cardiovasculaires.

C. PLTP : endotoxémie et inflammation

Le lien de causalité entre la PLTP et l'inflammation reste très controversé à l'heure actuelle. En effet, les travaux que nous avons menés ainsi que diverses études démontrent une augmentation de la présence de cytokines pro-inflammatoires dans la circulation chez les souris déficientes en PLTP après injection de LPS (Gautier *et al.,* 2008). De plus, l'activité PLTP semble être diminuée en présence de LPS ou de composés toxiques comme la fumée de cigarette (Brehm *et al.,* 2014 ; Jiang & Yu, 2021). En revanche, en absence de traitement aux LPS, la déficience en PLTP semble être associée à une diminution de l'IL-6 pro-inflammatoires dans la circulation (Schlitt *et al.,* 2005). La PLTP est impliquée dans la détoxification des LPS par voie biliaire en favorisant la fixation de ces LPS sur les lipoprotéines circulantes telles que les HDL ou encore les TRL (VLDL et CM). Plusieurs études ont démontré que l'absence de PLTP semblerait favoriser grandement l'endotoxémie chez des animaux après administration de LPS (Gautier *et al.,* 2008). De plus, la capacité des LPS à induire la production de GLP-1 et le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) est également exacerbée chez ces animaux (Nguyen *et al.,* 2014).

	Surpoids et obésité	Diabète de type 2	Athérosclérose	Pathologies cardiaques	Endotoxémie et infection
Activité PLTP	↗	↗	↗	↗	↗ ou ↘ selon le traitement aux LPS

Tableau 4. Corrélation entre l'activité PLTP et le développement de maladies cardiométaboliques.

↗ augmentation de l'activité PLTP ou ↘ diminution de l'activité PLTP selon le type de maladies et le traitement.

Comme nous l'avons vu dans cette section, la corrélation entre l'activité PLTP et l'atténuation ou l'aggravation d'une maladie métabolique reste encore très discutée. C'est pourquoi mon projet de thèse visait ainsi à étudier de manière plus précise les relations entre PLTP et désordres métaboliques ainsi que la détermination de la capacité de cette protéine à

neutraliser les LPS en cas d'endotoxémie métabolique c'est-à-dire dans un contexte de maladies inflammatoires.

OBJECTIFS

Le but de ce projet de thèse était d'étudier l'implication de la protéine de transfert des lipides (PLTP) et l'implication des lipoprotéines et leurs métabolismes dans la prise en charge d'endotoxines bactériennes, transloquées du compartiment intestinal au compartiment sanguin afin de les inactiver pour ensuite les détoxifier. Nous avons étudié l'implication de la PLTP et des lipoprotéines à la fois dans un contexte de maladie inflammatoire à bas bruit mais également dans un contexte d'inflammation aigüe.

- En premier lieu, nous avons voulu étudier la translocation intestinale depuis la lumière intestinale jusqu'à la circulation chez des souris sauvages (WT) et déficientes en PLTP (*Pltp* -KO) après administration orale de LPS fluorescents. En plus d'avoir pu quantifier l'endotoxémie de ces souris, nous avons également étudié l'impact qu'avaient les lipoprotéines sur la prise en charge des LPS une fois ces derniers arrivés dans la circulation en fonction du génotype.

- Dans un second temps, nous avons voulu déterminer quels étaient les profils lipidique et glucidique mais également l'endotoxémie chez des souris WT et *Pltp*-KO soumises à un régime obésogène (high-fat diet) dans le but d'observer ce qu'il se passait dans un contexte plus « physiologique », telles que des maladies inflammatoires à bas bruit (obésité / DT2).

- Pour terminer, nous avons également caractérisé l'impact et le rôle de la PLTP et des lipoprotéines dans un modèle animal de péritonite, inflammation aiguë (sepsis).

Le but de ces trois études était de pouvoir investiguer quelles étaient les conséquences physiologiques et métaboliques que pouvaient avoir la présence (ou l'absence de la PLTP) dans des modèles animaux mimant le développement de maladies inflammatoires chroniques (obésité, diabète) ou de choc septique (sepsis).

RÉSULTATS

ARTICLE 1 (soumis à Diabetes)

A. Introduction et objectifs

Des travaux précédemment publiés par notre laboratoire avaient déjà démontré la capacité de la PLTP à prendre en charge les LPS afin de favoriser leur détoxification au niveau hépatique notamment en passant par le transport inverse du cholestérol (Gautier *et al.,* 2008). Cette voie implique le transfert de ces endotoxines aux lipoprotéines circulantes, principalement les HDL, afin de les inactiver puis les détoxifier *via* les hépatocytes et les cellules de Kupffer. Ces travaux ont également démontré que la sensibilité des souris déficientes en PLTP était fortement augmentée suite à l'injection de LPS exogènes (Gautier *et al.,* 2008). Nous avons ainsi voulu étudier l'impact de l'absence de PLTP dans un contexte de maladies métaboliques et d'endotoxémie d'origine intestinale.

Nous avions également démontré que l'induction expérimentale d'une endotoxémie métabolique par l'infusion en continu de LPS est capable de mimer les conséquences métaboliques d'un régime obésogène (HF) (Lebrun *et al.,* 2017).

Dans ce contexte et pour compléter ces travaux, nous avons émis l'hypothèse que la PLTP favorisait la prise en charge de faibles quantités de LPS (soit par administration orale soit par fragilisation de la barrière intestinale *via* l'administration d'un régime gras) et que son absence allait avoir un caractère délétère notamment en accentuant l'endotoxémie des souris déficientes pour cette protéine.

Pour répondre à cette hypothèse, nous avons donc voulu déterminer quel allait être l'impact d'une administration de petites doses *per os* de LPS marqués (0.5 $mg.kg^{-1}$) sur l'absorption intestinale, sur l'endotoxémie de nos souris et sur leur état inflammatoire. Pour cela nous avons utilisé des souris sauvages (WT) et déficientes en PLTP (*Pltp*-KO) ainsi que du LPS marqués fluorescents de façon à pouvoir suivre le devenir de ce LPS en fonction du temps après l'administration orale. Nous avons également voulu comparer les effets provenant de cette administration *per os* de LPS avec les effets que peuvent un régime obésogène sur des souris WT et *Pltp*-KO. En plus de quantifier les LPS présents au niveau de la muqueuse intestinale et au niveau du compartiment sanguin, nous les avons également quantifiés au niveau des différentes fractions lipoprotéiques afin de voir si une différence intergénotype existait en terme de liaison aux lipoprotéines et donc d'inactivation, neutralisation et élimination de ces derniers.

B. Publication scientifique

Increased weight gain and insulin resistance in HF-fed PLTP deficient mice is related to altered inflammatory response and plasma transport of gut-derived LPS

(Effect of PLTP on gut-derived LPS)

1. Authors and affiliations

Lorène J Lebrun[1,2,3*], Gaëtan Pallot[1,2*], Maxime Nguyen[1,2,4], Annabelle Tavernier[1,2,3], Alois Dusuel[1,2], Thomas Pilot[1,2], Valérie Deckert[1,2], Isabelle Dugail[7], Naig Le Guern[1,2], Jean-Paul Pais De Barros[1,2,6], Hélène Choubley[1,2,6], Laurent Lagrost[1,2], David Masson[1,2,5], Thomas Gautier[1,2#], Jacques Grober[1,2,3#].

1. Univ. Bourgogne Franche-Comté, LNC UMR1231, F-21000 Dijon, France ; INSERM, LNC UMR1231, F-21000 Dijon, France
2. FCS Bourgogne-Franche Comté, LipSTIC LabEx, F-21000 Dijon, France
3. Agrosup Dijon, 1 esplanade Erasme, F-21000 Dijon, France
4. Department of Anesthesiology and Intensive Care, Dijon University Hospital, F-21000 Dijon, France
5. Laboratory of Clinical Chemistry, François Mitterrand University Hospital, Dijon, France
6. Lipidomic analytic plate-forme, UBFC, Bâtiment B3, Bvd Maréchal de Lattre de Tassigny, 21000, Dijon, France.
7. Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, UMR1269, F-75000 Paris France

* *These authors contributed equally to this work and share the same first author position*

[#] *These authors contributed equally to this work and share the same last author position*

Keywords

PLTP (phospholipid transfer protein), LPS (lipopolysaccharides), lipid metabolism, obesity, inflammation, dietary fat.

2. Summary

Bacterial lipopolysaccharides (LPS, endotoxins) are found in high amounts in the gut lumen. LPS can cross the gut barrier and pass into the blood (endotoxemia), leading to low-grade inflammation, a common scheme in metabolic diseases. Phospholipid Transfer Protein (PLTP) can transfer circulating LPS to plasma lipoproteins, thereby promoting its detoxification. However, the impact of PLTP on the metabolic fate and biological effects of gut-derived LPS is unknown. This study aimed to investigate the influence of PLTP on low-grade inflammation, obesity and insulin resistance in relationship with LPS intestinal translocation and metabolic endotoxemia. Wild-type (WT) mice were compared with *Pltp*-KO mice after a 4-month high-fat (HF) diet or oral administration of labelled LPS. On a HF diet, *Pltp*-KO mice mice showed increased weight gain, adiposity, insulin resistance, lipid abnormalities and inflammation together with higher exposure to endotoxemia compared to WT mice. After oral administration of LPS, PLTP deficiency led to increased intestinal translocation and decreased association of LPS to lipoproteins together with an altered catabolism of triglyceride-rich lipoproteins (TRL). Our results show that PLTP, by modulating intestinal translocation of LPS and plasma processing of TRL-bound LPS, has a major impact on low-grade inflammation and the onset of diet-induced metabolic disorders.

3. Abbreviations

ApoB, apolipoprotein B; apoCII, apolipoprotein CII; apoCIII, apolipoprotein CIII; AUC, area under curve; BAT, brown adipose tissue; BW, body weight; Cer, ceramides; CM, chylomicron; EE, energy expenditure; FF, free fraction; FFA, free fatty acids; 3-HM, 3-hydroxymyristate (3-OH-C14:0); HDL, high-density lipoprotein; HF, high-fat; IL-1β, interleukin 1β; IL-6, interleukin 6; IL-10, interleukin 10; IFNγ, gamma interferon; ITT, insulin tolerance test; LBP, LPS binding protein; LF, low-fat; LDL, low-density lipoprotein; LDLR, low-density lipoprotein receptor; LPC, lysophosphatidylcholine; LPE, lysophosphatidylethanolamine; LPL, lipoprotein lipase; LPLi, lipoprotein lipase inhibitor; LPS, lipopolysaccharides; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MIP-2, macrophage inflammatory protein-2; OGTT, oral glucose tolerance test; PA,

phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PS, phosphatidylserine; PLTP, phospholipid transfer protein; SM, sphingomyelin; SR-B1, scavenger receptor class B type I; TG, triglyceride; TLR-4, Toll-like receptor-4; TNF-α, tumor necrosis factor alpha; TRL, triglyceride-rich lipoproteins; WT, wild type.

4. Introduction

Obesity is a pathology whose incidence is constantly increasing worldwide. It is one of the largest world's health problems (1) and is a major risk for serious non-communicable disorders including insulin resistance, type 2 diabetes, atherosclerosis and some cancers. It is now well established that high-fat (HF) diets contribute to the development of obesity (2). Moreover, excess of dietary fats not only induces weight gain but it also promotes the associated inflammatory background. Firstly, high amounts of dietary fat increase systemic exposure to potentially proinflammatory free fatty acids (FFA) and their derivatives (3). Secondly, their intestinal absorption was recently found, in both mice and humans, to facilitate the passage of bacteria-derived proinflammatory compounds such as lipopolysaccharides (LPS, endotoxins) from gut lumen to plasma (3, 4). Finally, HF diets are also known to disturb gut barrier organization and permeability and therefore to allow the entrance of luminal compounds such as the above-mentioned endotoxins. Increased endotoxemia, which results from this trans- and paracellular intestinal translocation, triggers a slight increase in plasmatic levels of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-6 (Il-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) (5) and therefore participates to the onset of a low-grade metabolic inflammation. When chronic, this low-grade inflammation alters the function of several organs such as adipose tissue, muscle, liver and intestine (6). Previous studies demonstrated that experimental induction of metabolic endotoxemia by continuous infusion of low doses of LPS is able to mimic the metabolic consequences of a HF diet. For instance, it promotes the proliferation of adipocyte precursors, the accumulation of fat mass and the subsequent development of insulin resistance (7). In addition, the deleterious effects of HF diets on intestinal permeability and on the development

of metabolic endotoxemia have also been investigated. Indeed, it has been suggested that changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia, inflammation, and associated disorders by a mechanism that could increase intestinal permeability (8, 9, and 10). Furthermore, antibiotic treatment in mice can deeply reduce these negative effects and leads to a decreased fat mass, a lower macrophage infiltration in adipose tissue, an improved glucose tolerance but also a reduction in LPS plasma levels (11).

In the vascular compartment, plasma lipoproteins play a major protective role during inflammation and sepsis by inactivating and eliminating LPS (12). In the circulation, low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL)-bound LPS can be taken up by the liver through the interaction of these lipoproteins (13) with their hepatic receptors, i.e., LDL-receptor (LDLR) and scavenger receptor B type I (SR-B1), respectively (14, 15) In addition to LDL and HDL, LPS can also be transported by chylomicrons (CM) (16). Indeed, CM have a high affinity for LPS and thus not only transport postprandial fat, but also significant amounts of concomitantly absorbed LPS. Interestingly, sequestration of absorbed LPS on CM reduces LPS toxicity and enhances its hepatic clearance (17).

In addition to lipoproteins, plasma proteins such as phospholipid transfer protein (PLTP), contribute to the control of endotoxemia (18, 19, and 20). PLTP was first described for its role in phospholipid transfer between lipoprotein classes (18). In previous works, we demonstrated that PLTP plays also an important role in reverse lipopolysaccharide transport pathway (RLT pathway) by promoting the association of LPS molecules to circulating HDL in vivo (21). Indeed, PLTP is able to transfer and exchange LPS between circulating lipoproteins (22) thereby influencing LPS detoxification by the liver. Despite its potential beneficial impact on LPS clearance, the role of PLTP in the onset of obesity and inflammation remains controversial. Indeed, in Pltp deficient mice, decreased binding of LPS to HDL, and thus detoxification from the body was associated with an increase in insulin secretion and a better oral glucose tolerance response (23). Moreover, some studies have demonstrated an increased PLTP activity associated with obesity and metabolic syndrome in humans whereas

others have suggested that PLTP deficiency could lead to an improvement in tissue and whole-body insulin sensitivity in mice (24, 25). In addition, a recent study has shown a beneficial effect of PLTP production by brown adipose tissue (BAT) on glucidic and lipid homeostasis (26).

Most of the protective roles of lipoproteins and PLTP on inflammation were observed in models of acute increase in endotoxemia induced by intravenous or intraperitoneal injections of LPS. However, the impact of PLTP on inflammation induced by gut-derived LPS in a context of HF diet and obesity is still unclear. The aim of the present study was to investigate this relationship in mice expressing or not PLTP and submitted to low-fat (LF) or HF diets. We show here that PLTP deficiency worsens HF-diet induced obesity and insulin resistance in mice through mechanisms involving alterations of plasma triglyceride (TG) clearance, inflammatory response and lipoprotein-mediated transport of gut-derived LPS.

5. Methods

Experimental animals, diets and samplings

All animal procedures were conducted in accordance with institutional guidelines and approved by the University of Burgundy's Ethics Committee on the Use of Laboratory Animals (protocol number 5459). Wild-type (WT) C57BL/6J mice and mice knocked-out for PLTP (*Pltp*-KO) on C57BL/6J background were used. Mice were matched by age (2-5 months old mice) and were housed in a controlled environment (light from 7am to 7pm, constant humidity and temperature) and were given a standard chow (LF) diet (D1250B, Research Diets Inc) or 60% high-fat diet (D12492, Research Diets Inc). Every sampling procedure (except caudal sampling) was performed under inhaled anesthesia (isoflurane) titrated to maintain spontaneous breathing. Blood was collected simultaneously in the portal vein and by intracardiac puncture in EDTA-coated tubes. Plasmas were separated by centrifugation at 8,000 x g for 10 min at 4°C and were stored at -20°C until use.

Measurements of weight gain and food intake, lean and fat masses, energy expenditure (EE) and fecal lipids content

Body mass and food intake were measured every week in mice fed with HF and LF diets. EchoMRI® was used to determine body composition through nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (fat mass and lean masses). EE measurement was performed by indirect calorimetry and adjusted according to Even and Nadkarmi (27). Total lipids in feces were extracted by Folch's method (28). Details are provided in the Supplemental Experimental Procedures.

Oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT)

Mice were fasted 6 hours before starting experiments. Glucose solution (150 or 200 g/L in drinking water; G8270, Sigma) or insulin solution (0.03 or 0.05 u/mL in NaCl; Humalog 100IU/mL, Lispro, Lilly) were administered at a rate of 1.5 or 2 g/kg (OGTT) and 0.3 or 0.5 u/kg (ITT), respectively. Details are provided in the Supplemental Experimental Procedures.

Conjugation of DOTA-Bodipy-NCS to LPS

DOTA-Bodipy-NCS was prepared using the method previously described (Bernhard *et al.,* 2010) (29). Briefly, LPS from *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich) were incubated in the presence of one equivalent of DOTA-Bodipy-NCS solubilized in DMSO for 1 h at 37°C in a hot water bath. Labeled LPS were purified on a Superdex 75 column (GE Healthcare), concentrated with Nanosep MWCO 3 kDa (Pall).

LPS quantification

Concentrations of fluorescently labelled LPS in plasma and intestinal fractions were determined by the measurement of the fluorescence using a Perkin Elmer Wallac 1420 Victor^2 microplate reader (absorption: 485 nm / emission: 535 nm). Total LPS concentrations were also measured by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LCMS^2) (30, 31).

Drugs administration in mice

For LPS translocation studies, mice were gavaged with Dotaga-Bodipy-LPS concentrated at 0.5 mg/kg. For TG production kinetics, mice were treated with 0.5 g/kg Poloxamer 407 (Lutrol®, LPL inhibitor) via intraperitoneal injection to inhibit triglyceride hydrolysis. Mice were gavaged with corn oil at 10 mg/kg (Sigma-Aldrich).

Real-Time Quantitative PCR

Details are provided in the Supplemental Experimental Procedures.

Separation of plasma lipoproteins

Triglyceride-rich lipoproteins (TRL;i.e. CM and very low-density lipoprotein (VLDL), d<1.006), LDL (1.006 < d < 1.063) , HDL (1.063 < d < 1.21)) and the free fraction (FF) were separated using a 3-step sequential ultracentrifugation procedure in a TLA 100.1 rotor in a Optima™ MAX-XP Ultracentrifuge (Beckman, Palo Alto, CA). Lipoproteins were also separated by fast protein liquid chromatography (FPLC) performed on pooled plasma injected in an agarose Superose 6 column and eluted in Tris/Saline/EDTA buffer.

Plasma biochemical analyses

Cytokines, insulin, apolipoprotein CII (apoCII), and apolipoprotein CIII (apoCIII) concentrations were determined by commercially available ELISA Kits (M-CYTOMAG-70K, Millipore; 80-INSMR-CH10, Alpco; MBS923729-96, Mybiosource; MBS944394-96, Mybiosource).

Protein concentration was determined to perform normalization on samples such as gut segments. It was measured by a commercial colorimetric assay kit (Thermo Scientific™ Pierce™ BCA assay kit).

Post-heparin plasma (50 U/kg) LPL activity was measured by a commercial fluorometric kit (STA-610, Cell Biolabs, inc).

Triglyceridemia and cholesterolemia were measured by commercial photometric assay kits (Triglycerides FS, DiaSys Diagnostic Systems GmbH and Cholesterol FS, DiaSys Diagnostic Systems GmbH, respectively). Phospholipid and sphingolipid profiles were determined using the method described in Anjani *et al.* (32).

Tissue analysis

Details are provided in the Supplemental Experimental Procedures.

Statistics

Data were collected using Microsoft Excel for Office 365. Data are presented as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using Prism 6.0 (GraphPad). To decide whether to use parametric or non-parametric statistics, the normality of distributions was assessed with the Shapiro-Wilk test (under n=7, distributions were considered to be non-normal). Statistical significance of differences between two groups was evaluated with the Mann-Whitney U test or the Student's t test (a statistical correction was applied when variances were different between groups). For more than two groups (e.g. kinetics), two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons was performed, if applicable. A value of $p<0.05$ was considered statistically significant (NS, not significant; *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$ and ****$p<0.0001$).

6. Results

Increased fat mass in *Pltp*-KO mice under HF diet

Weight gain, food intake, EE and fat mass were assessed in mice expressing active PLTP (WT) or not (*Pltp*-KO) which were fed for 4 months with LF or HF diet (**Figure 1** and **Supplemental, Table 1**). No significant difference in body weight was observed between WT and *Pltp*-KO mice fed with LF. Under HF conditions, both WT and *Pltp*-KO mice displayed a higher weight gain than their LF counterparts. Weight gain in *Pltp*-KO mice was significantly higher than in WT mice as early as two weeks after the onset of the diet, leading to 21.7% increase in weight gain in *Pltp*-KO mice (+60.13±3.14 vs +49.44±3.90% in WT mice; $p<0.05$) after 4 months (**Figure 1A, left)**. AUC confirmed a higher weight gain in *Pltp*-KO mice fed with HF diet (112.5±5.9 vs 119.3±7.5 arbitrary unit (au) in WT and *Pltp*-KO mice, respectively; $p<0.05$) (**Figure 1A, right**). A higher proportion of fat mass (40.7±1.7 vs 32.7±3.2% of BW in WT mice; $p<0.05$) and a lower lean mass (50.8±1.68 vs 58.9±2.86% of BW in WT mice; $p<0.05$) were observed in *Pltp*-KO mice compared with WT mice (**Figure 1B**). Additional analyses on tissue biopsies showed increased hepatic neutral lipid content and increased adipocyte size in visceral fat tissue of *Pltp*-KO mice (**Supplemental, Figure S1**). Moreover, analysis of food intake over the duration of the diet showed no significant difference between *Pltp*-KO mice and WT mice **(Figure 1C**). Similar fecal lipids content and EE were observed in both genotypes (**Supplemental, Table S1**). As a consequence, a better feed efficiency in *Pltp*-KO mice (0.05±0.02 g of body weight/kcal) compared to WT mice (0.04±0.02 g of body weight/kcal) under HF diet ($p<0.05$) was observed (**Figure 1D**).

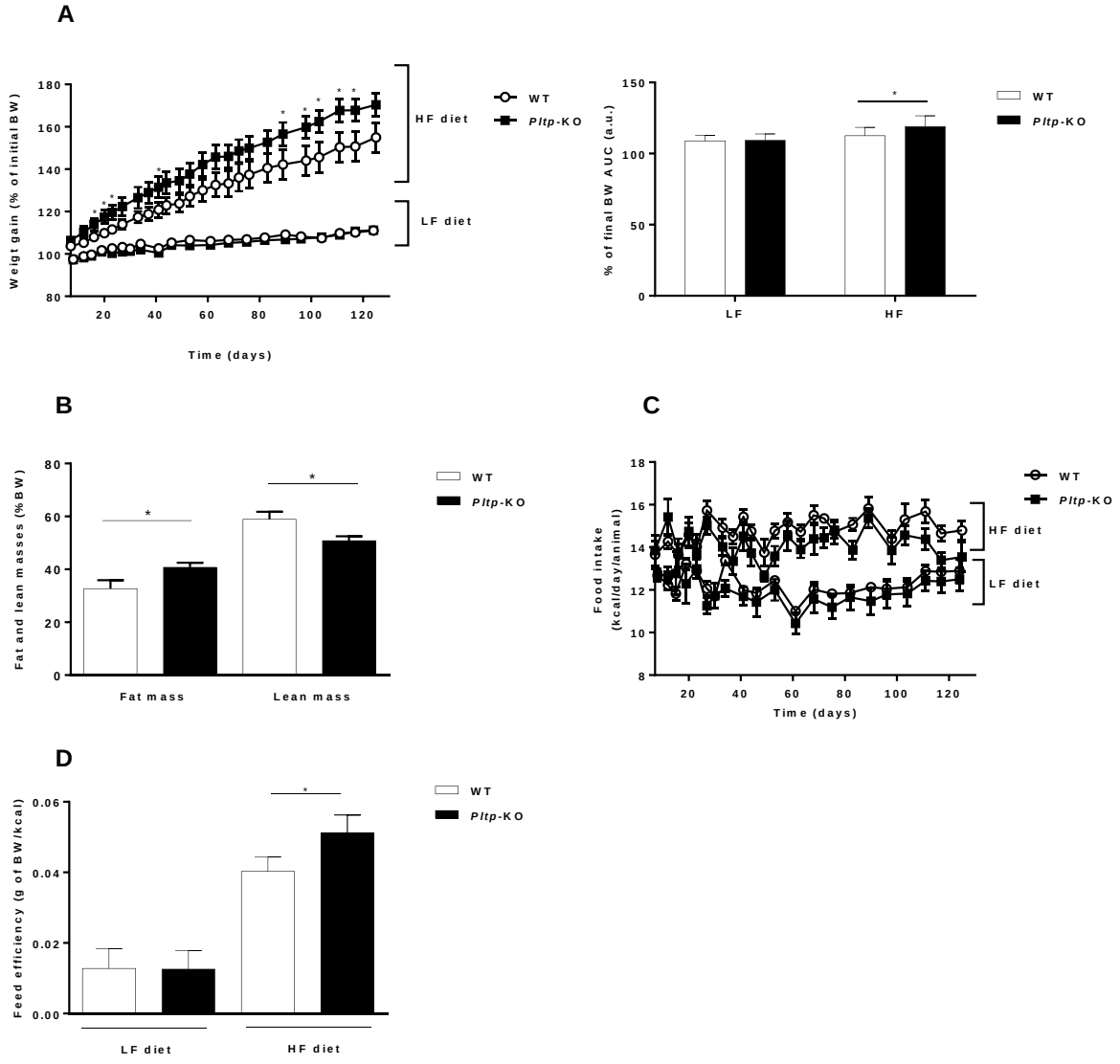


Figure 1. *Pltp*-KO mice have a higher fat mass under HF diet

Evaluation of body mass and energy balance during the 4 months of LF or HF in WT and *Pltp*-KO mice. **A.** Initial body weights in WT and *Pltp*-KO mice (left) and AUC of final body weight (right) (n=12-15). **B.** Weight gain and AUC in WT and *Pltp*-KO mice under LF and HF (n=10-12). **C.** Body composition in mice fed with a HF (n= 10-12). **D.** Food intake in WT and *Pltp*-KO mice under LF and HF diets (n=10-12). **E.** Feed efficiency in WT and *Pltp*-KO mice under LF and HF diet (n= 10-12). Statistical analyses were performed using the Student's t test, *p<0.05. All results are expressed as mean ± SEM.

Altered carbohydrate homeostasis in *Pltp*-KO mice under HF diet

Carbohydrate metabolism was investigated in WT and *Pltp*-KO mice (**Figure 2**). Under LF diet, oral glucose tolerance test (OGTT) led to identical response in both genotypes. HF diet led to higher glucose levels compared to LF diet in both genotypes. Glucose intolerance was more pronounced in *Pltp*-KO than in WT mice (729.8±45.13 vs 635±26.15 a.u., respectively; p=0.03) (**Figure 2A**). In similar manner, insulin tolerance test (ITT) displayed no difference under LF, an altered insulin sensitivity for both genotypes under HF and a slightly more pronounced effect in *Pltp*-KO mice (248.2±21.46 vs 197.8±14.65 a.u. in WT mice; p=0.06) (**Figure 2B**).

Plasma insulin levels under basal conditions and after glucose gavage were measured. When comparing LF fed mice, no differences were observed under basal and glucose-stimulated conditions. Under HF diet, *Pltp*-KO mice displayed a slightly higher insulinemia under basal condition which turned significant after glucose gavage (9.84±1.98 vs 4.03±1.07 ng/mL in WT mice; p=0.03) (**Figure 2C**). Thus, PLTP deficiency exacerbates HF diet-mediated glucose intolerance.

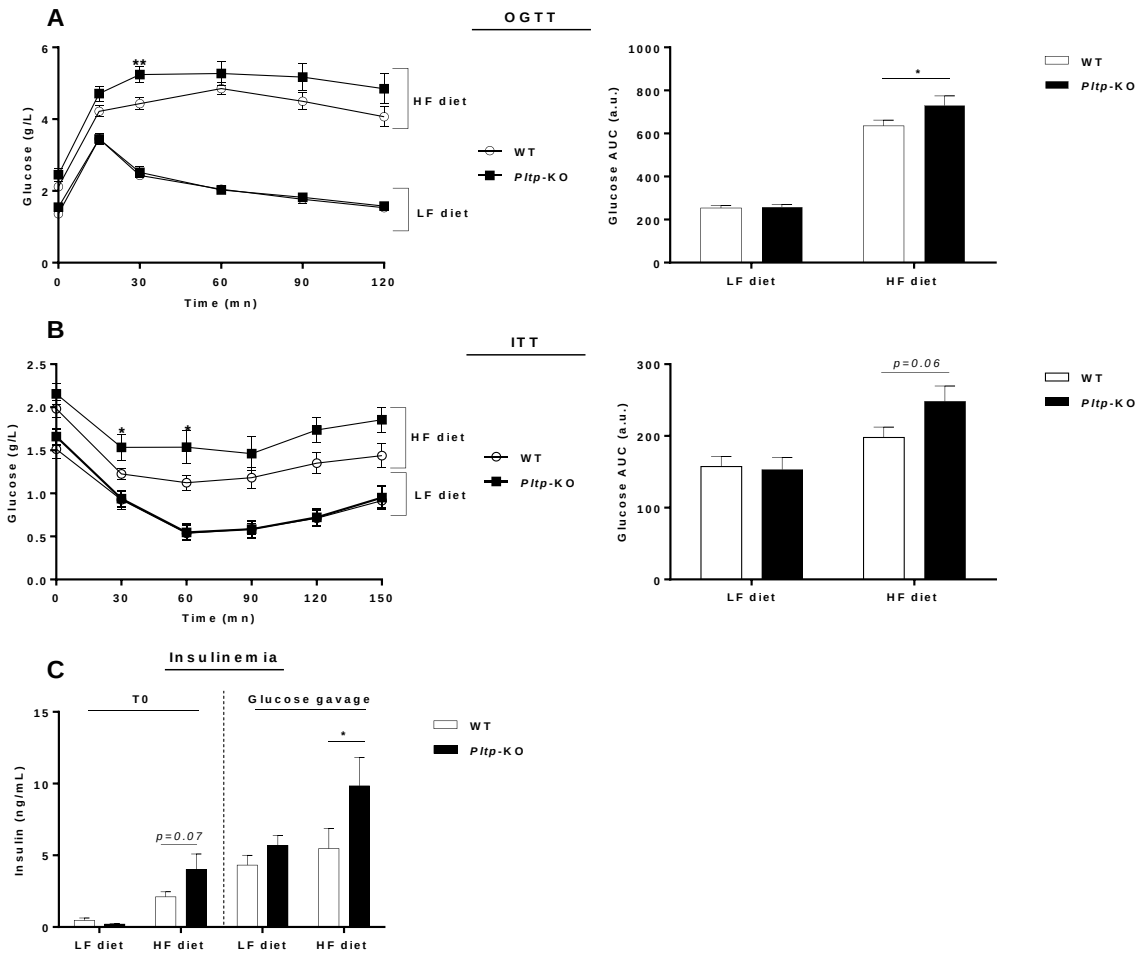


Figure 2. PLTP deficiency is associated with altered carbohydrate homeostasis

Evaluation of carbohydrate metabolism in WT and *Pltp*-KO mice after 4 months of LF or HF diet. **A.** Oral glucose tolerance test (OGTT, 1.5g/kg) and blood glucose monitoring (g/L; 120min) and areas under the curves of OGTT (a.u.: arbitrary units). **B.** Insulin tolerance test (ITT, 0.5u/kg) and blood glucose monitoring (g/L; 150min) and areas under the curves of ITT (a.u.: arbitrary units). **C.** Insulin levels (ng/mL): basal (T0) and 15 minutes after glucose gavage at 1.5g/kg. Statistical analyses were performed using the Student's t test, *p<0.05, **p<0.001 and ***p<0.0001 (n=12-16). All results are expressed as mean ± SEM.

Altered plasma lipid levels in *Pltp*-KO mice under HF diet

Triglyceride (TG) levels were significantly higher in *Pltp*-KO compared to WT mice (0.88±0.04 vs 0.71±0.05 g/L, respectively; $p<0.05$) (**Figure 3A**) whereas plasma cholesterol was lower (1.16±0.11 vs 1.55±0.11 g/L, respectively; $p<0.05$) (**Figure 3B**). Decrease in plasma cholesterol was a consequence of lower amount in LDL and HDL fractions (**Figure 3C**). Plasma phospholipid profiling revealed a significant reduction in total Phospholipid (PL) in *Pltp*-KO mice (1.98 ± 0.14 vs 2.52±0.13 g/L in WT mice; $p<0.05$) (**Figure 3D**) especially with a marked decrease in phosphatidylglycerol (PG) (-59.8%; $p<0.05$) (**Figure 3E**). Within sphingolipids species, ceramide levels were almost doubled in *Pltp*-KO mice (5.73±1.20 vs 2.79±0.32 nmol/mL in WT mice; $p<0.05$) (**Figure 3F**). These data confirm the prominent role of PLTP in plasma lipid homeostasis, which extends beyond phospholipids to ceramides.

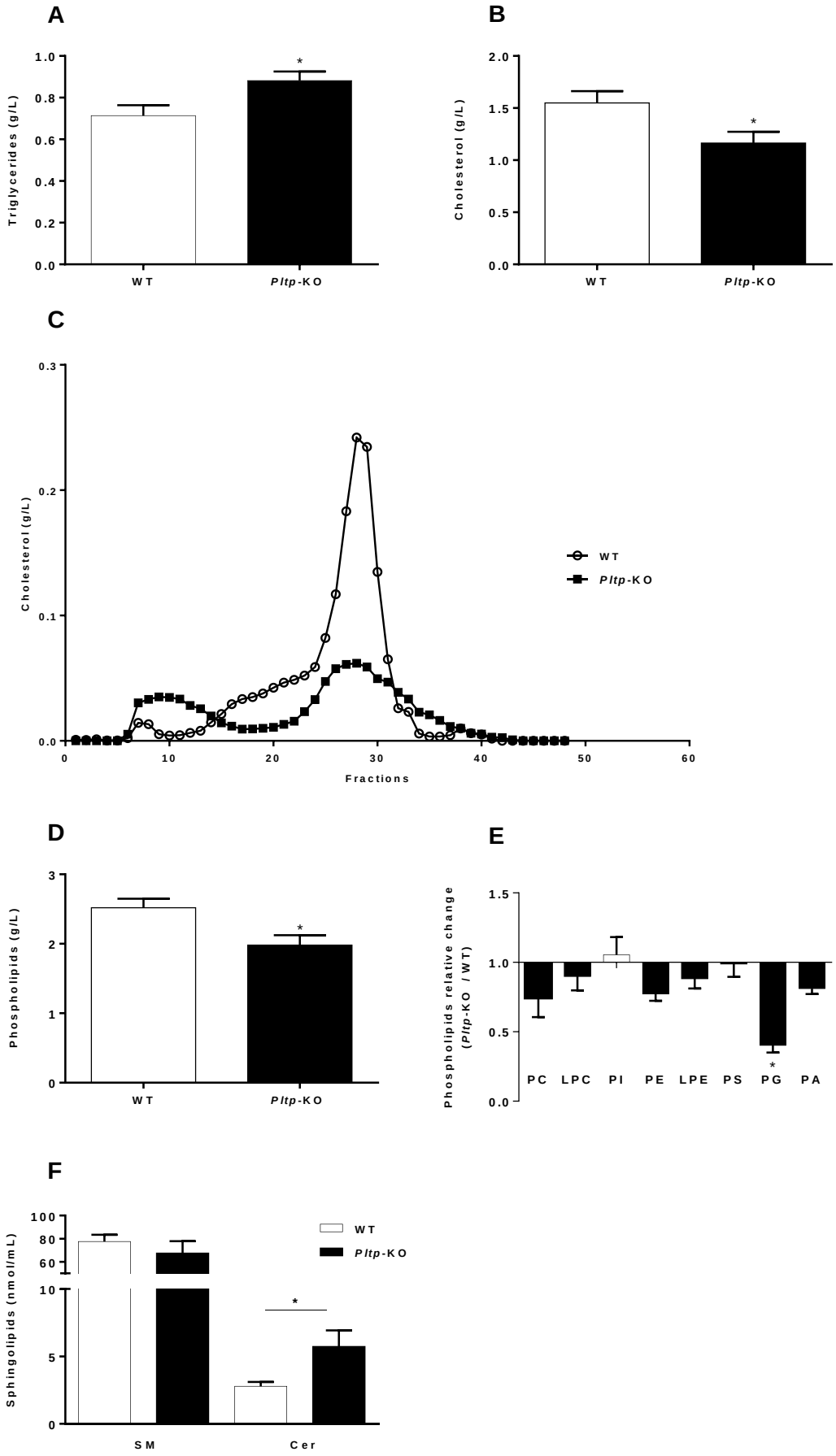

A
Triglycerides (g/L)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
WT
Pltp-KO
B
Cholesterol (g/L)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
WT
Pltp-KO
C
Cholesterol (g/L)
0.3
0.2
0.1
0.0
0
10
20
30
40
50
60
Fractions
WT
Pltp-KO
D
Phospholipids (g/L)
3
2
1
0
*
WT
Pltp-KO
E
Phospholipids relative change (Pltp-KO / WT)
1.5
1.0
0.5
0.0
PC
LPC
PI
PE
LPE
PS
PG
PA
*
F
Sphingolipids (nmol/mL)
100
80
60
10
5
0
WT
Pltp-KO
*
SM
Cer

Figure 3. PLTP deficiency is associated with altered lipid levels under HF diet

Quantification of total plasma triglycerides (**A**) and cholesterol (**B**) in WT and *Pltp*-KO mice fed with HF for 4 months. Characterization of cholesterol in lipoproteins in plasma (from pooled samples) in WT and *Pltp*-KO mice by Fast protein liquid chromatography (**C**) Quantification of total plasma phospholipid levels (**D**) and ratios of the concentrations observed in *Pltp*-KO mice to the average of calculated concentrations in WT mice under HF for 4 months (**E**); phospholipids: phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE), lysophosphatidylethanolamine (LPE), phosphatidylserine (PS), phosphatidylglycerol (PG) and phosphatidic acid (PA). Quantification of total plasma sphingolipids in WT and *Pltp*-KO mice under HF for 4 months (**F**); sphingomyelin (SM) and ceramides (Cer). Statistical analyses were performed using the matched Student's t test *$p<0.05$ ($n=10-12$). All results are expressed as mean ± SEM.

Oral lipid loading test led to a higher and extended TG peak in *Pltp*-KO mice compared with WT mice, with a higher TG AUC (6.23± 0.48 vs 4.55±0.38 a.u., respectively; p<0.05) (**Figure 4A**). Importantly, when TG clearance was blocked with a LPL inhibitor (LPLi), no differences in triglyceridemia was observed between the two genotypes (**Figure 4B**), indicating a key role of PLTP in TG removal from plasma.

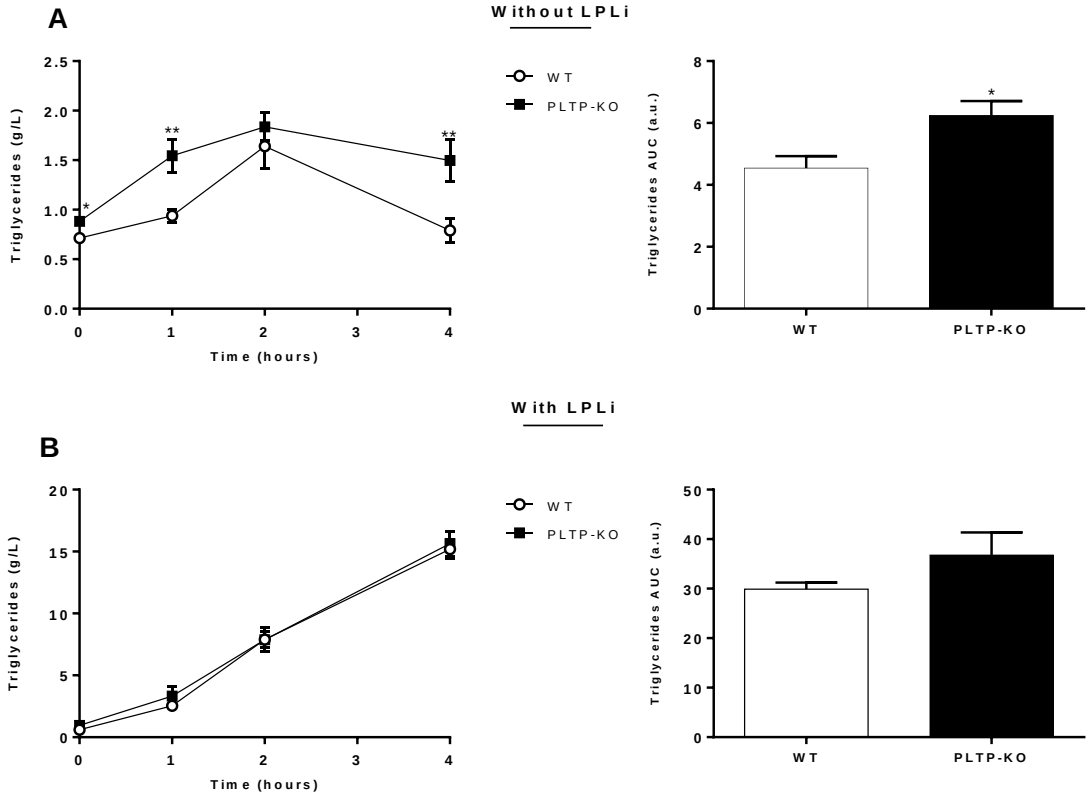


Figure 4. *Pltp*-KO mice have an altered triglyceride clearance under HF diet

Quantification of plasma triglycerides (g/L) in WT and *Pltp*-KO mice fed with HF diet for 4 months, treated or not with an LPL inhibitor (LPLi; poloxamer i.p. injection 407 at 1 mg/kg). **A.** Kinetic of triglyceridemia (g/L) and AUC of triglyceridemia without LPLi in mice fed with HF for 4 months (n=11-12). **B.** Kinetic of triglyceridemia and AUC of triglyceridemia (g/L) with LPLi in mice fed with HF or 4 months (n=11-12). Statistical analyses were performed using the paired Student's t test, *p<0.05, **p<0.01 and. All results are expressed as mean ± SEM.

.

Increased inflammation and circulating LPS and altered plasma transport of LPS in *Pltp*-KO mice

Inflammatory profiles were investigated in WT and *Pltp*-KO mice under HF diet. Plasma IL-10 and TNF-α were significantly increased in *Pltp*-KO mice when compared with WT mice (54.9±2.8 vs 37.9±3.3 pg/mL for IL-10, 23.7±2.34 vs 18.1±1.05 pg/mL for TNF-α; p<0.001 and p<0.05, respectively) (**Figure 5A**). Measurements of plasma levels of 3-hydroxymyristate (3-HM), i.e. a specific marker of LPS, showed an increased LPS concentration in *Pltp*-KO mice (**Figure 5B**). This was confirmed by calculation of AUC (6429±429 vs 7996±503 a.u. in WT and *Pltp*-KO mice, respectively; p=0.023) (**Figure 5C**).

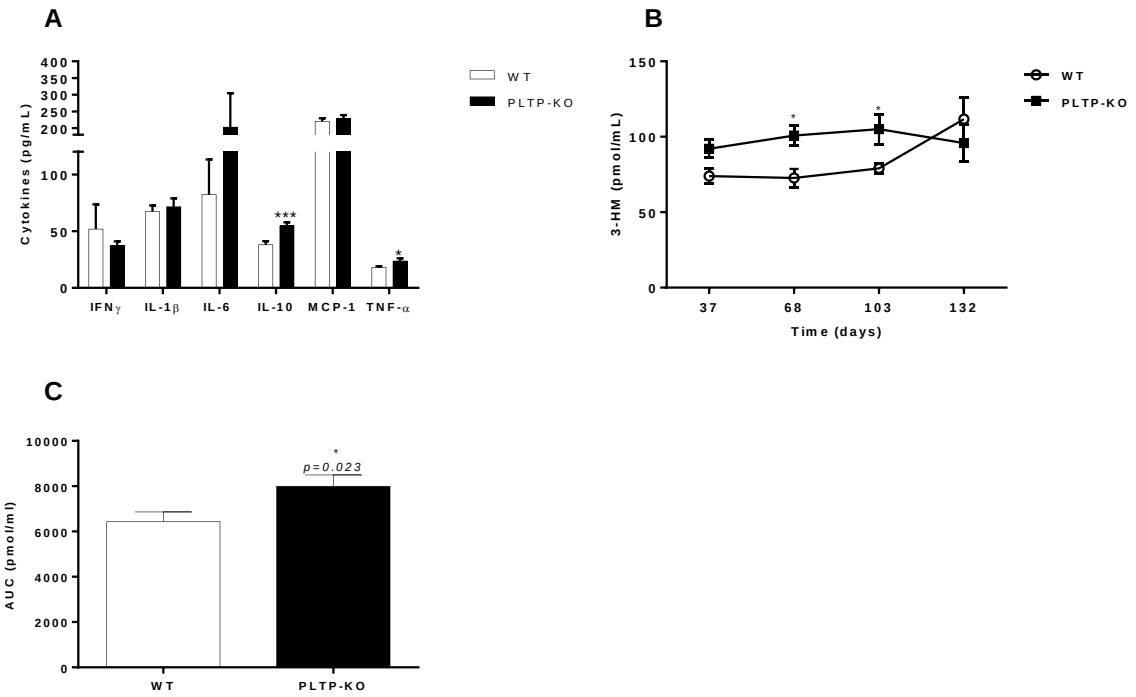


Figure 5. *Pltp*-KO mice have a higher inflammatory response under HF diet

Evaluation of the inflammatory status of WT and PLTP-KO mice fed with HF diet for 4 months **A.** Levels of cytokines (pg/mL) in mice (n=12). **B.** Quantification of circulating LPS *via* the measurement of 3-HM (ng/mL) by HPLC/MS/MS in mice fed with HF diet every month (n=19-22). **C.** AUC of circulating LPS in mice fed with HF diet every month (n=19-22). Statistical analyses were performed using the matched Student test, NS: not significant, *p<0.05 and ***p<0.001. All results are expressed as mean ± SEM.

Inflammatory profiles were also investigated in WT and *Pltp*-KO mice after an oral gavage of LPS under LF diet. IL-6 was significantly increased in *Pltp*-KO mice (392.05±80.30 pg/mL) compared to WT mice (10.01±3.23 pg/mL; $p<0.05$) (**Figure 6A**). Higher plasma LPS levels were observed in *Pltp*-KO versus WT mice (1.06±0.05 vs 0.80±0.04 µg/mL, respectively; $p=0.0017$) (**Figure 6B**). One hour after LPS gavage, free LPS (i.e. found in the lipoprotein-free fraction, FF) was significantly higher in *Pltp*-KO mice compared to WT mice (0.85±0.02 vs 0.25 ± 0.02 µg/mL, respectively; $p<0.05$) (**Figure 6C**). In addition, LPS concentration in the duodenum mucosa was 47.7% higher in *Pltp*-KO mice than in WT mice (13.37±0.63 vs 9.05±0.48 µg/mL, respectively; $p<0.001$) (**Figure 6D).** Microscopic observations confirmed the results obtained after fluorometric assays, with a higher fluorescent signal in the proximal sections of small intestine in *Pltp*-KO mice (**Figure 6E**). Next, LPS plasma distribution was determined in portal and systemic blood at an early time-point after LPS gavage (15 minutes). In WT mice (**Figure 6F, left**), the level of TRL-bound LPS was significantly decreased in systemic blood compared to portal blood (0.24±0.08 vs 0.51±0.09 µg/mL in systemic and portal blood respectively; $p<0.0001$). The same phenomenon could be observed when considering HDL-bound LPS (0.30±0.11 vs 0.56±0.11 µg/mL, in systemic and portal blood respectively; $p=0.0005$). In *Pltp*-KO mice (**Figure 6F, right**), a similar decrease in HDL-bound LPS was observed from portal to systemic blood (0.67±0.23 vs 0.34±0.19 µg/mL in portal and systemic blood respectively; $p=0.0008$). However, regarding TRL-bound LPS, no decrease was observed in *Pltp*-KO mice while a significant drop occurred when considering free LPS (1.07±0.42 vs 0.71±0.35 µg/mL in portal and systemic blood respectively; $p=0.0082$). Overall, these results indicate that PLTP deficiency exacerbates the inflammatory status through an altered plasma transport of LPS.

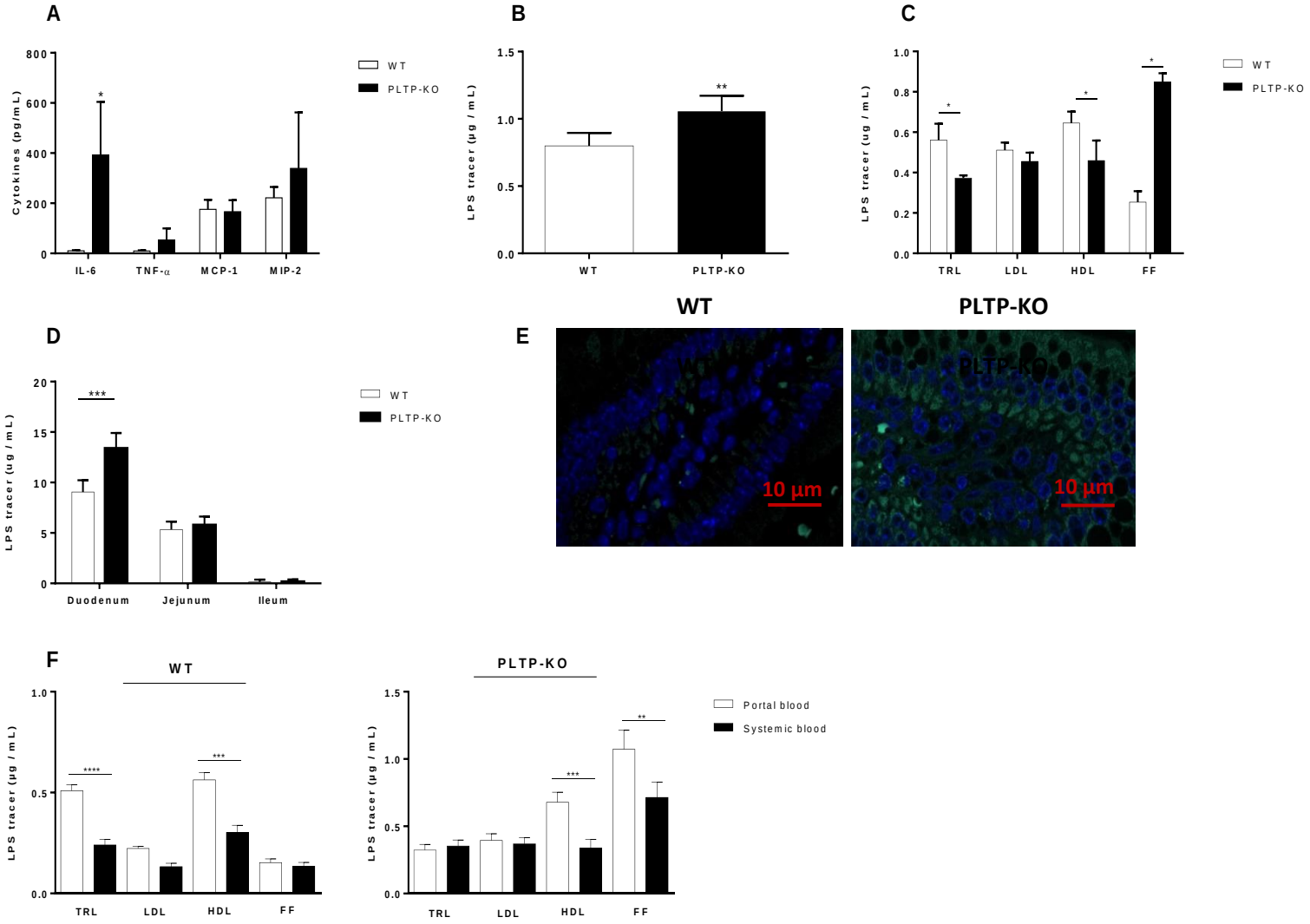

A
Cytokines (pg/mL)
800
600
400
200
0
*
IL-6
TNF-α
MCP-1
MIP-2
WT
PLTP-KO
B
LPS tracer (µg / mL)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
WT
PLTP-KO
C
LPS tracer (ug / mL)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
*
*
TRL
LDL
HDL
FF
WT
PLTP-KO
D
LPS tracer (ug / mL)
20
15
10
5
0
***
Duodenum
Jejunum
Ileum
WT
PLTP-KO
E
WT
PLTP-KO
10 µm
10 µm
F
WT
LPS tracer (µg / mL)
1.0
0.5
0.0
****
***
TRL
LDL
HDL
FF
PLTP-KO
LPS tracer (µg / mL)
1.5
1.0
0.5
0.0
***
**
TRL
LDL
HDL
FF
Portal blood
Systemic blood

Figure 6. *Pltp*-KO mice have a higher inflammatory response after LPS gavage

Quantification of cytokines levels, LPS plasma concentration, LPS association with lipoproteins and concentration of LPS in plasma and proximal gut segments one hour after oral LPS administration (0.5 mg/kg) and in WT and *Pltp*-KO mice. **A.** Levels of cytokines (pg/mL) one hour after LPS gavage (n=7). **B**. Plasma LPS quantification (µg/mL) after LPS gavage in mice (n=6). **C.** Mucosa LPS quantification (µg/mL) after LPS gavage in mice (n=6). **D.** Distribution of LPS (µg/mL) in lipoproteins fractions in plasma after LPS gavage (n=6). **E.** Immunofluorescence microscopy of WT (left) and *Pltp*-KO (right) mice small intestine (duodenum) cross section (immersion objective x63). **F**. Distribution of LPS (µg/mL) in portal blood and systemic blood in WT mice (left) *Pltp*-KO mice (right) 15 mn after LPS gavage (n=9)**.** Statistical analyses were performed using the matched Student's t Test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 or a two-way ANOVA analysis **p<0.01, ***p<0.001 and **** p<0.0001. All results are expressed as mean ± SEM.

Decreased LPL activity in *Pltp*-KO mice

Plasma LPL activity was quantified after oral lipid or LPS loading (**Figure 7**). A 13% decrease in *Pltp*-KO mice compared to WT mice was observed after lipid gavage (p=0.044) (**Figures 7A)** and a 18% decrease in *Pltp*-KO mice compared to WT mice was observed after LPS oral load (p=0.020) (**Figure 7B**). Gene expression of *Lpl* and plasma level of apoCII and apoCIII (LPL modulators) were determined in different conditions (**Figure 7C**). A decreased expression of *Lpl* mRNA was observed in liver (0.60±0.11 vs 1.14±0.23; p<0.05), ileum (0.50±0.10 vs 1.20±0.27; p<0.05) and muscle (0.53±0.15 vs 1.26±0.47; p=0.07) from *Pltp*-KO vs WT mice (**Figure 7C**). The apoCII/apoCIII ratio was significantly decreased after oral lipid loading in *Pltp*-KO mice (0.61±0.08 vs 1.04±0.12 in WT mice; p=0.0122) and similar trend was observed after oral LPS challenge (0.60±0.12 vs 0.97±0.14 in WT mice; p=0.0619) (**Figure 7D and 7E**).

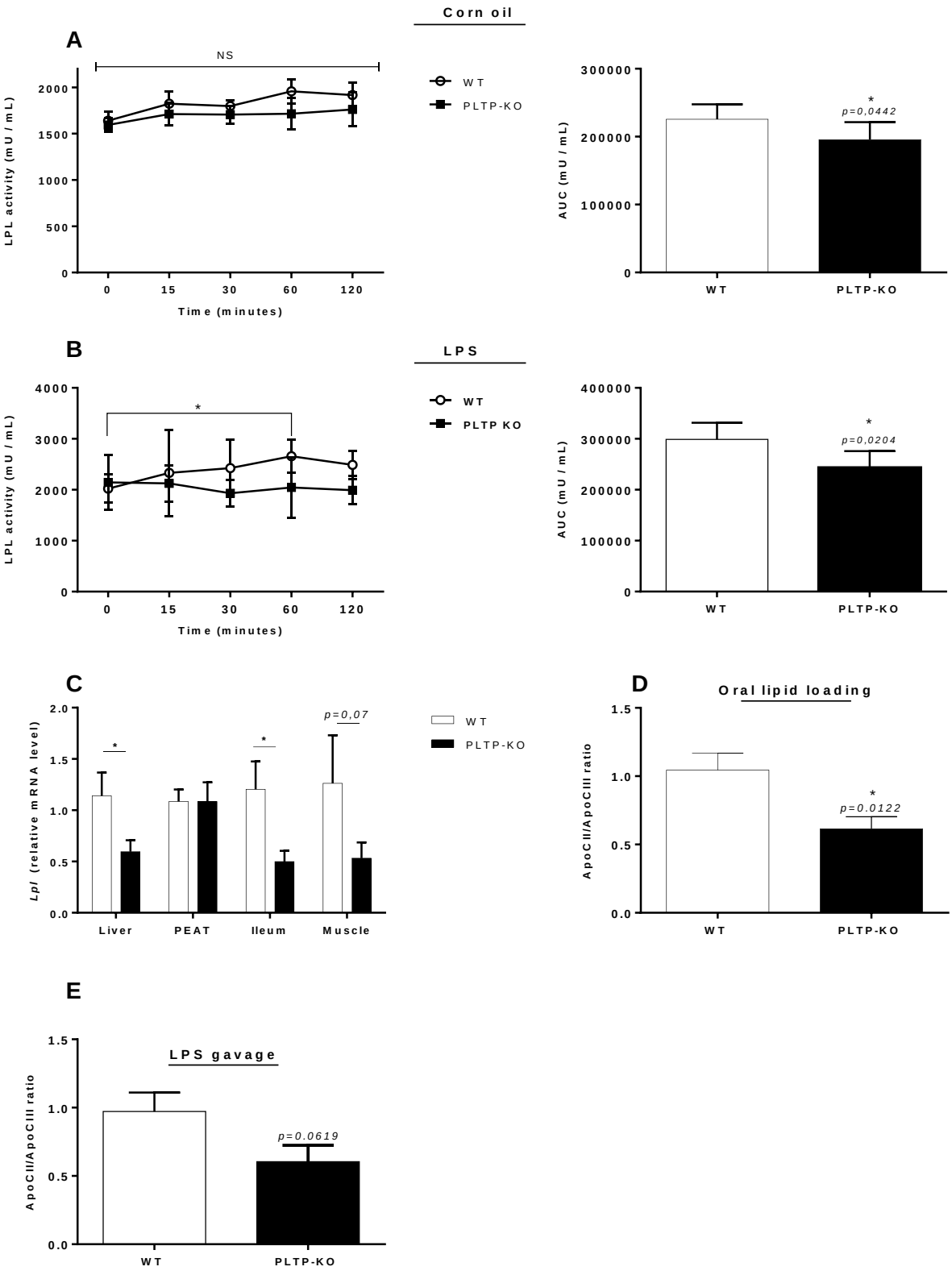

Corn oil
A
NS
LPL activity (mU / mL)
Time (minutes)
WT
PLTP-KO
AUC (mU / mL)
p=0,0442
B
LPS
*
p=0,0204
C
Lpl (relative mRNA level)
Liver
PEAT
Ileum
Muscle
p=0,07
D
Oral lipid loading
ApoCII/ApoCIII ratio
p=0.0122
E
LPS gavage
p=0.0619

Figure 7. PLTP deficiency is associated with a lower LPL activity in mice

Kinetics of LPL activity and determination of apoCII/apoCIII ratio after oral lipid loading (10 ml/kg) or LPS gavage (0.5 mg/kg) in mice. **A.** Kinetic and AUC of LPL activity (U/mL) after corn oil gavage in mice (n=8). **B.** Kinetic and AUC of LPL activity (U/mL) after LPS gavage (n=8). **C.** Relative expression of *Lpl* mRNA / *36b4* mRNA in (n=13). **D.** ApoCII/apoCIII ratio in mice after oral lipid loading (n=10-11). **E.** ApoCII/apoCIII in mice after LPS oral administration (n=10-11). Statistical analyses were performed using the matched Student's t test, NS: not significant, *p<0.05. All results are expressed as mean ± SEM.

Finally, while gut-derived LPS accumulated to a larger extent in *Pltp*-KO mice after oral gavage (+22.5% and +32.9% at 30 and 60 mn, respectively; **Figure 8A**), administration of LPLi abrogated the increased endotoxin levels in *Pltp*-KO mice (**Figure 8B**) indicating that the altered-LPS clearance associated with PLTP-deficiency is mediated by a decrease in LPL activity.

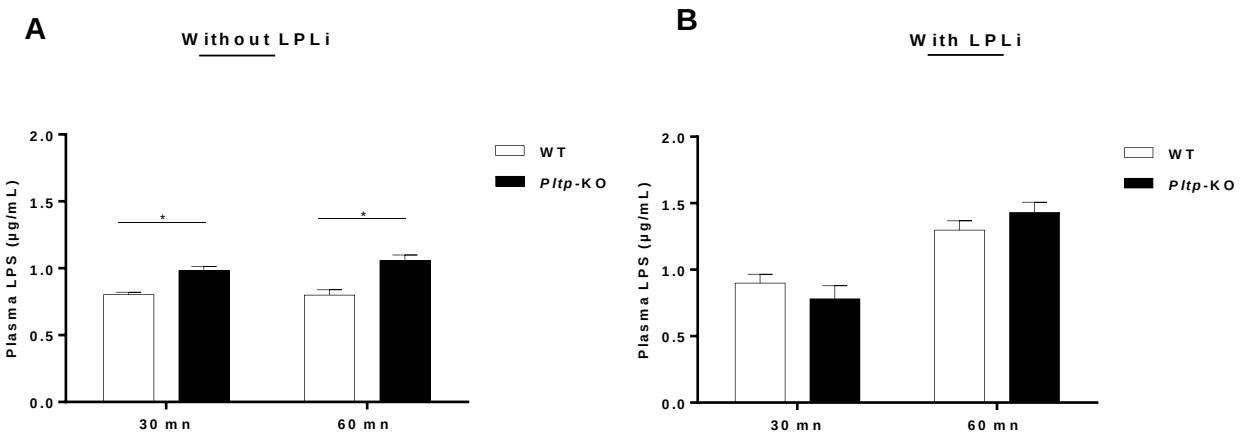


Figure 8. LPLi abrogates the modulatory effect of PLTP on plasma LPS in treated mice

Kinetic of plasma LPS levels (µg/mL) in mice 30 and 60 mn after LPS oral administration. **A.** Plasma LPS levels after LPS gavage (n=8). **B.** Plasma LPS levels after LPLi (P407) i.p. injection and LPS gavage (n=8). Statistical analyses were performed using the matched Student's t test. All results are expressed as mean ± SEM.

7. Discussion

Here, we report that PLTP deficiency is related to a higher adiposity and administration of a HF diet has more severe metabolic consequences: PLTP-KO mice gain more weight, become more glucose intolerant and insulin resistant compared to their WT littermates. This was associated with marked alterations of plasma lipid levels and decreased postprandial triglyceride clearance. Similarly, to our results, a recent study (33) demonstrated that, in a context of SRB1 deficiency, PLTP-knockout mice also develop a metabolic syndrome characterized by altered TG and glucose metabolism. However, while the authors attributed the increased TG levels to alteration in TRL remnant uptake in the postprandial phase (33), we demonstrate here in a direct manner that *Pltp*-KO mice display a defect in TG hydrolysis due to decreased LPL activity caused by altered plasma levels of its cofactors and a decreased gene expression in several tissues. In addition, we could show that *Pltp*-KO mice display a more pronounced inflammatory status under HF conditions together with increased exposure to gut-derived LPS. Importantly, we show that decreased LPL activity is a leading cause of impaired LPS detoxification in our model of *Pltp*-KO mice.

In the present study, increased weight gain in HF-fed *Pltp*-KO mice is not due to higher food intake. Feed efficiency calculation indeed demonstrates that *Pltp*-KO mice are more efficient to transform ingested kilocalories into grams of body weight. Since fecal lipid contents appear to be identical between the two genotypes, this better efficiency is not due to a better energy absorption capacity. Although a lower EE in the absence of PLTP could have been expected, no differences were observed for this parameter. The fact that EE measurements were performed in specific cages in which mice were individualized can explain this result. In addition, data acquisition was done over a 24-hour period which does not fully reflect the long-term effect of a four-month diet. Moreover, possible differences in gut microbiota-produced energy (34, 35), which could be modified in the absence of PLTP, have been overlooked in our EE measurements. Lastly, compared to WT, *Pltp*-KO mice display a higher adipose (low metabolic activity) to lean (high metabolic activity) mass ratio. Although this suggests that EE

measurements need to be adjusted to this morphological disparity, there are still controversies about the most relevant calculation method (36). *Pltp*-KO mice have a higher amount of total fat tissues, adipocytes hypertrophy in visceral fat and higher hepatic lipid accumulation under HF conditions. Expansion of adipose tissue and liver steatosis are related to lipotoxicity which in turn is detrimental for insulin sensitivity (37, 38, 36) resulting in worsened glucose metabolism. Thus given that *Pltp*-KO mice become fatter on HF diet, it is not surprising that they exhibit more pronounced alterations in glucose control.

The lipid profile of HF-fed *Pltp*-KO compared to WT mice is in line with their insulin-resistant status. Previous studies in *Pltp*-KO mice described a reduced production of TRL (40). Since it is known that HF diet increases TG levels in response to a decreased insulin sensitivity in mice (4,41), our observations suggests that increased plasma TG levels in our *Pltp*-KO model might be well the consequence of altered insulin sensitivity after a HF diet. In addition, the absence of PLTP is also associated to an increase in ceramide levels, which are known to be closely related to the pathogenesis of insulin resistance (42). Moreover, *Pltp*-KO mice display decreased HDL cholesterol levels which is also a factor associated with a loss of insulin sensitivity (43). Interpretation of changes in phospholipid profiles in *Pltp*-KO mice is more difficult. Although all phospholipid classes tend to decrease, we noticed a marked effect of PLTP deficiency on phosphatidylglycerols (PG) which are among the lowest abundant phospholipids in the plasma. Positive association of PG levels with fat mass was reported in obese patients (44), which is not seen here in fatter *Pltp*-KO mice. Decreased PG levels in *Pltp*-KO mice is also surprising with regard to their fatty liver phenotype, as PG elevation was observed in obese patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) (32). Thus, we suggest that PLTP might have a specific preference for plasma PG remodeling independent on obesity-related metabolic status. Interestingly recent findings suggest that PG could have an anti-inflammatory effect by inhibiting toll-like receptor-4 involved in the development of low-grade metabolic diseases (45). The reduced PG levels in *Pltp*-KO mice might thus contribute to their increased inflammatory status. Ceramides are also known to be closely linked to inflammation.

Therefore, the high ceramides plasma levels observed in *Pltp*-KO mice is likely a determinant of their higher inflammatory state (46).

Beyond global pro-inflammatory lipid profiles, we document a PLTP-dependent effect of pro-inflammatory LPS. HF-fed *Pltp*-KO mice have an overall increased exposure to LPS over the duration of the diet, although the difference in endotoxemia was not significant when measured in post-absorptive state at a single time point at the end of the study. This observation highlights the importance of a regular monitoring of plasma LPS levels to clearly assess the extent of metabolic, low-grade endotoxemia (47). Although *Pltp*-KO mice were reported to display a lower inflammatory status on basal conditions (48), PLTP deficiency is known to be associated to an increased inflammation in response to LPS challenge (20). Beside previously performed IP or IV injection of LPS, we show here that either oral gavage or HF diet increase LPS in *Pltp*-KO mice. Increased LPS levels could result from higher translocation from the gut which is known to be modulated by HF diet (3, 4) or altered detoxification of circulating LPS (20). To get more insights, we developed a strategy based on the oral administration of fluorescent LPS allowing accurate monitoring in the different body compartments (30). Our observation of higher LPS concentrations and fluorescent signal in proximal gut segments of *Pltp*-KO mice suggests accelerated translocation of endotoxins. Whether a transcellular or a paracellular way for LPS crossing of the intestinal barrier (49) is affected remains to be determined. Analysis of plasma LPS distribution revealed a lack of association with TRL despite increased TG levels in *Pltp*-KO mice. This might suggest that the modalities of LPS translocation (either through packaging together with the CM in the transcellular pathway) is altered in *Pltp*-KO mice. Further studies need to be performed to precisely determinate mechanisms involved in LPS translocation in HF-fed mice.

In our model, circulating LPS was bound to HDL and TRL in WT mice whereas they were mainly found in free fraction (FF) in *Pltp*-KO mice. This is in agreement with the well-known ability of PLTP to transfer LPS onto lipoproteins, especially to HDL (50). However, we highlight here that this phenomenon occurs very rapidly upon LPS administration and most

interestingly that this PLTP-facilitated mechanism also applies for gut-derived LPS binding to TRL and HDL. Previous studies have already demonstrated the protective role of TRL preventing from negative consequences of endotoxemia (51, 52). Since lipoprotein-bound LPS are considered as an inactive form (53), defective association of gut-derived LPS to lipoproteins is likely a proinflammatory contributor in *Pltp*-KO mice. Beside inactivating circulating LPS, lipoproteins also play a key role in promoting hepatic-mediated clearance of LPS (14). Our observations reporting significant portal to central decreases in TRL- and HDL-bound LPS in WT mice are in line with the concept. Importantly, *Pltp*-KO mice displayed altered hepatic clearance of TRL-bound LPS. This might relate to an impaired LPS binding to TRL despite increased TG levels or to an impaired TRL clearance.

We demonstrate that LPL activity is decreased in *Pltp*-KO mice either after an oral lipid load or after an oral LPS administration. Moreover, exacerbated response to oral lipid load in *Pltp*-KO mice was blunted when a LPL inhibitor was administrated. These results suggest that TRL catabolism is indeed impaired in HF diet in *Pltp*-KO mice. In order to get more insight into the underlying causes of altered LPL activity in *Pltp*-KO mice, we studied the role of apoCII and apoCIII, LPL co-factors (54, 55) and we show that the apoCII/apoCIII balance is altered in *Pltp*-KO mice. Furthermore, *Lpl* gene expression itself was lower in the liver and ileum of *Pltp*-KO mice. Since HDL can be generated by LPL-mediated CM hydrolysis, it can be hypothesized that a decreased LPL activity could indirectly affect the association of bacterial toxins with HDL in *Pltp*-KO mice. Finally, the use of LPLi in our animals abrogated the difference in LPS clearance between *Pltp*-KO mice and WT mice reinforcing the hypothesis that altered LPL activity is a leading cause of decreased LPS detoxification in our model.

Overall, our study demonstrates that PLTP deficiency leads to less efficient detoxification of LPS but also to an exacerbated inflammatory response in the context of obesity and insulin resistance. These observations are in accordance with the concept of metabolic endotoxemia playing a key role in the aggravation of metabolic abnormalities (8). This work highlights the relationship between PLTP, TRL metabolism and low-grade

inflammation as observed in metabolic diseases. Beyond the well-established implication of LPL activity in obesity and type 2 diabetes (56), our results suggest that LPL also plays an important role in the detoxification of bacterial toxins and the attenuation of inflammation. The underlying causes of altered LPL modulation in *Pltp*-KO mice will need to be addressed in future studies.

8. Author contributions

GP, LJL, TG, JG, LL and DM conceived and guided the project.

GP, LJL, MN, AT, NLG, AD, VD, JPPDB, HC, TP, JG and TG carried out the experiments.

GP, LJL, JG and TG analyzed the data.

GP, LJL, JG and TG wrote the manuscript.

GP, LJL, JG, ID, DM, and TG reviewed and edited the manuscript.

All the authors have read and approved the manuscript.

9. Acknowledgments

This research was funded by grants from the Univ. Bourgogne Franche-Comté, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), by a French Government grant managed by the French National Research Agency under the program “Investissements d’Avenir” (Lipstic Labex). The authors gratefully acknowledge JP Pais de Barros, H. Choubley, and V. Bergas from the Lipidomic platform and V. Saint-Giorgio from the Centre de Zootechnie of the Université de Bourgogne for animal care.

10. Conflict of interest statement

The authors declare no existing conflict of interest.

11. Funding

This research was funded by grants from the Univ. Bourgogne Franche-Comté, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), by a French Government grant

managed by the French National Research Agency under the program “Investissements d’Avenir” (Lipstic Labex) and SFD-BD (Société Francophone du Diabète- Becton Dickinson).

12. References

1. Bouchard C. Current understanding of the etiology of obesity: genetic and nongenetic factors. Am Soc Clin Nutr. 1991;53(March):1561S-1565S.
2. Raymond SU, Leeder S, Greenberg HM. Obesity and cardiovascular disease in developing countries: A growing problem and an economic threat. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2006;9(2):111–6.
3. Laugerette F, Vors C, Peretti N, Michalski MC. Complex links between dietary lipids, endogenous endotoxins and metabolic inflammation. Biochimie. 2011;93(1):39–45.
4. Petit V, Arnould L, Martin P, Monnot MC, Pineau T, Besnard P, et al. Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. J Lipid Res. 2007;48(2):278–87.
5. Gnauck A, Lentle RG, Kruger MC. The Characteristics and Function of Bacterial Lipopolysaccharides and Their Endotoxic Potential in Humans. Int Rev Immunol. 2016;35(3):189–218.
6. Michalski MC, Vors C, Lecomte M, Laugerette F. Dietary lipid emulsions and endotoxemia. OCL - Oilseeds fats, Crop Lipids. 2016;23(3).
7. Luche E, Cousin B, Garidou L, Serino M, Waget A, Barreau C, et al. Metabolic endotoxemia directly increases the proliferation of adipocyte precursors at the onset of metabolic diseases through a CD14-dependent mechanism. Mol Metab. 2013;2(3):281–91.
8. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. 2007;56(July):1761–72.
9. Winer DA, Luck H, Tsai S, Winer S. The intestinal immune system in obesity and insulin resistance. Cell Metab. 2016;23(3):413–26.
10. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Neyrinck AM, Delzenne NM. Changes in gut microbiota control metabolic diet–induced obesity and diabetes in mice. Diabetes. 2008;57(6):1470–81.

11. Fujisaka S, Ussar S, Clish C, Devkota S, Dreyfuss JM, Sakaguchi M, et al. Antibiotic effects on gut microbiota and metabolism are host dependent. J Clin Invest [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2021 Oct 20];126(12):4430–43.

12. Levels JHM, Marquart JA, Abraham PR, Van Den Ende AE, Molhuizen HOF, Van Deventer SJH, et al. Lipopolysaccharide is transferred from high-density to low-density lipoproteins by lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein. Infect Immun. 2005;73(4):2321–

13. Levels JHM, Abraham PR, Van den Ende A, Van Deventer SJH. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin. Infect Immun. 2001;69(5):2821–8.

14. Topchiy E, Cirstea M, Kong HJJ, Boyd JH, Wang Y, Russell JA, et al. Correction: Lipopolysaccharide is cleared from the circulation by hepatocytes via the low density lipoprotein receptor. PLoS One. 2016;11(7):1–15.

15. Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-B1 in the biogenesis of HDL. J Mol Med. 2006;84(4):276–94.

16. Vors C, Pineau G, Drai J, Meugnier E, Pesenti S, Laville M, et al. Postprandial endotoxemia linked with chylomicrons and lipopolysaccharides handling in obese versus lean men: A lipid dose-effect trial. J Clin Endocrinol Metab. 2015;100(9):3427–35.

17. Xiao C, Hsieh J, Adeli K, Lewis GF. Gut-liver interaction in triglyceride-rich lipoprotein metabolism. Am J Physiol - Endocrinol Metab. 2011;301(3).

18. Zhang M, Zhai X, Li J, Albers JJ, Vuletic S, Ren G. Structural basis of the lipid transfer mechanism of phospholipid transfer protein (PLTP). Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids. 2018;1863(9):1082–94.

19. Deckert V, Lemaire S, Ripoll PJ, De Barros JPP, Labbé J, Borgne CC Le, et al. Recombinant human plasma phospholipid transfer protein (PLTP) to prevent bacterial growth and to treat sepsis. Sci Rep. 2017;7(1):1–16.

20. Gautier T, Klein A, Deckert V, Desrumaux C, Ogier N, Sberna AL, et al. Effect of plasma phospholipid transfer protein deficiency on lethal endotoxemia in mice. J Biol Chem. 2008;283(27):18702–10.

21. Gautier T, Lagrost L. Plasma PLTP (phospholipid-transfer protein): an emerging role in 'reverse lipopolysaccharide transport' and innate immunity. Biochem Soc Trans. 2011;39(4):984–8.

22. Hailman E, Albers JJ, Wolfbauer G, Tu AY, Wright SD. Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein. J Biol Chem. 1996;271(21):12172–8.

23. Nguyen AT, Mandard S, Dray C, Deckert V, Valet P, Besnard P, et al. Lipopolysaccharides-mediated increase in glucose-stimulated insulin secretion: Involvement of the GLP-1 pathway. Diabetes. 2014;63(2):471–82.

24. Song G, Zong C, Shao M, Yu Y, Liu Q, Wang H, et al. Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency attenuates high fat diet induced obesity and insulin resistance. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids. 2019;1864(10):1305–13.

25. Murdoch SJ, Kahn SE, Albers JJ, Brunzell JD, Purnell JQ. PLTP activity decreases with weight loss: Changes in PLTP are associated with changes in subcutaneous fat and FFA but not IAF or insulin sensitivity. J Lipid Res. 2003;44(9):1705–12.

26. Sponton CH, Hosono T, Taura J, Jedrychowski MP, Yoneshiro T, Wang Q, et al. The regulation of glucose and lipid homeostasis via PLTP as a mediator of BAT – liver communication. 2020;1–17.

27. Even PC, Nadkarni NA. Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: Principles, practical considerations, interpretation and perspectives. Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol. 2012;303(5):459–76.

28. Folch J, Lees M, Sloane Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. 1987;55(5):999–1033.

29. Bernhard C, Goze C, Rousselin Y, Denat F. First bodipy-DOTA derivatives as probes for bimodal imaging. Chem Commun. 2010;46(43):8267–9.

30. Duheron V, Moreau M, Collin B, Sali W, Bernhard C, Goze C, et al. Dual labeling of lipopolysaccharides for SPECT-CT imaging and fluorescence microscopy. ACS Chem Biol. 2014;9(3):656–62.

31. Pais de Barros J-P, Gautier T, Sali W, Adrie C, Choubley H, Charron E, et al. Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amebocyte lysate assay. J Lipid Res. 2015;56(7):1363–9.

32. Anjani K, Lhomme M, Sokolovska N, Poitou C, Aron-Wisnewsky J, Bouillot JL, et al. Circulating phospholipid profiling identifies portal contribution to NASH signature in obesity. J Hepatol. 2015;62(4):905–12.

33. Hoekstra M, Van Der Sluis RJ, Hildebrand RB, Lammers B, Zhao Y, Praticò D, et al. Disruption of phospholipid transfer protein-mediated high-density lipoprotein maturation reduces scavenger receptor BI deficiency-driven atherosclerosis susceptibility despite unexpected metabolic complications. Arterioscler Thromb Vasc Biol [Internet]. 2020 [cited 2021 Nov 8];40(3):611–23.

34. Blaut M. Gut microbiota and energy balance: Role in obesity. Proc Nutr Soc [Internet]. 2015 Aug 21 [cited 2021 Oct 17];74(3):227–34.

35. Duca FA, Lam TKT. Gut microbiota, nutrient sensing and energy balance. Diabetes, Obes Metab. 2014;16:68–76.

36. Speakman JR, Yamada Y, Sagayama H, Berman ESF, Ainslie PN, Andersen LF, et al. A standard calculation methodology for human doubly labeled water studies. Cell Reports Medicine. 2021 Feb 16;2(2):100203.

37. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. Cell. 2012 Mar 2;148(5):852–71.

38. Morigny P, Houssier M, Mouisel E, Langin D. Adipocyte lipolysis and insulin resistance. Biochimie [Internet]. 2016 [cited 2021 Oct 19];125:259–66.

39. Chavez JA, Summers SA. Lipid oversupply, selective insulin resistance, and lipotoxicity: Molecular mechanisms. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids. 2010 Mar;1801(3):252–65.

40. Yazdanyar A, Jiang XC. Liver phospholipid transfer protein (PLTP) expression with a PLTP-null background promotes very low-density lipoprotein production in mice. Hepatology. 2012;56(2):576–84.

41. Axelsen M, Smith U, Eriksson JW, Taskinen MR, Jansson PA. Postprandial hypertriglyceridemia and insulin resistance in normoglycemic first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. Ann Intern Med. 1999 Jul 6;131(1):27–3.

42. Chavez JA, Summers SA. A ceramide-centric view of insulin resistance. Cell Metab 2012;15(5):585–94.

43. Murdoch SJ, Carr MC, Hokanson JE, Brunzell JD, Albers JJ. PLTP activity in premenopausal women: Relationship with lipoprotein lipase, HDL, LDL, body fat, and insulin resistance. J Lipid Res. 2000;41(2):237–44.

44. Kayser BD, Lhomme M, Prifti E, Da Cunha C, Marquet F, Chain F, et al. Phosphatidylglycerols are induced by gut dysbiosis and inflammation, and favorably modulate adipose tissue remodeling in obesity. FASEB J. 2019;33(4):4741–54.

45. Choudhary V, Griffith S, Chen X, Bollag WB. Erratum: Pathogen-associated molecular pattern-induced TLR2 and TLR4 activation increases keratinocyte production of inflammatory mediators and is inhibited by phosphatidylglycerol (Mol Pharmacol (2020) 97 (324-335) DOI: 10.1124/mol.119.118166). Mol Pharmacol. 2020;97(5):354.

46. De Mello VDF, Lankinen M, Schwab U, Kolehmainen M, Lehto S, Seppänen-Laakso T, et al. Link between plasma ceramides, inflammation and insulin resistance: Association with serum IL-6 concentration in patients with coronary heart disease. Diabetologia [Internet]. 2009 Aug 11 [cited 2021 Oct 20];52(12):2612–5.

47. Boutagy NE, McMillan RP, Frisard MI, Hulver MW. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? Biochimie. 2016 May 1;124:11–20.

48. Schlitt A, Liu J, Yan D, Mondragon-Escorpizo M, Norin AJ, Jiang XC. Anti-inflammatory effects of phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency in mice. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids. 2005 Apr 15;1733(2–3):187–91.

49. Akiba Y, Maruta K, Takajo T, Narimatsu K, Said H, Kato I, et al. Lipopolysaccharides transport during fat absorption in rodent small intestine. Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol. 2020;318(6):G1070–87.

50. Zhang M, Zhai X, Li J, Albers JJ, Vuletic S, Ren G, et al. The binding capability of plasma phospholipid transfer protein, but not HDL pool size, is critical to repress LPS induced inflammation. Sci Rep. 2016;6(June 2015):1–12.

51. Read TE, Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Kane JP, Rapp JH. The protective effect of serum lipoproteins against bacterial lipopolysaccharide. Eur Heart J [Internet]. 1993 Dec 1 [cited 2021 Oct 17];14(SUPPL. K):125–9.

52. CJ, Kitchens RL, Wolfbauer G, Albers JJ, Munford RS. Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes. Infection and Immunity [Internet]. 2000 May [cited 2021 Oct 24];68(5):2410–7.

53. Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Read TE, Kane JP, Jones AL, et al. Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death. J Clin Invest. 1993 Mar 1;91(3):1028–34.

54. Wang CS, McConathy W, Kloer HU, Alaupovic P. Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. J Clin Invest. 1985;75(2):384–90.

55. Wolska A, Lo L, Sviridov DO, Pourmousa M, Pryor M, Ghosh SS, et al. A dual apolipoprotein C-II mimetic-apolipoprotein C-III antagonist peptide lowers plasma triglycerides. Sci Transl Med. 2020;12(528).

56. Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: Structure, function, regulation, and role in disease. J Mol Med [Internet]. 2002 [cited 2021 Oct 20];80(12):753–69.

13. Supplemental data

Measurements of weight gain and food intake, lean and fat masses, energy expenditure (EE) and fecal lipids content

First, animals are weighed and then placed in a specific containment tube (EchoMRI 500T; EchoMRI, Houston, USA). Then, the tube is inserted into the device. The measurement sequence is initiated and lasts three minutes. Measurements were performed on a computer-controlled open-circuit CLAMS system (Oxymax Comprehensive Lab Animal Monitoring System; Columbus Instruments). In order to limit the effects of stress due to the modification of their environment, the mice were acclimatized to the test protocol (calorimetry cage, ventilation...) for 48 hours prior to the experiment. The measurement of the EE was carried out during 24 hours respecting the day/night cycle and with an air flow rate of 0.6 L/min. Gases evacuated from the chambers were sampled for 45 seconds every 20 minutes after a 90 seconds purging period. The volumes of oxygen (VO_2) consumed and carbon dioxide (VCO_2) produced were quantified by analyzing the sampled gases through the oxygen and carbon dioxide detector. Before starting the experiment, a calibration of the detectors was performed using a specific calibration mixture containing both oxygen, carbon dioxide and nitrogen (Air Liquide). A reference measurement with ambient air was performed every 8 measurements. The ratio of carbon dioxide production and oxygen consumption was calculated (RQ: respiratory quotient or RER: respiratory exchange ratio). At the end of the experiment the body composition data previously measured by EchoMRI® allowed the adjustment of the EE [heat production: $(3.815 + 1.232 \times RQ) \times VO_2$] to the metabolically active mass of animals (Lean mass + 0.2 Fat mass) according to the procedure described by Even and Nadkarmi. During the experiment, moves of the animals inside the cage were measured as well as the consumption of water and food in real time. Briefly, this is a simple a reliable method for extraction of fecal lipids, more particularly phospholipids and neutral lipids such as tripalmitin, lecithin, calcium stearate, cholesterol, cholesteryl palmitate, and a mixture of all of these. Fecal samples are homogenized with a mixture of chloroform, methanol, acetic acid and water. The

extract is washed with water to remove non-lipidic impurities extracted by the solvents. The washing procedure also removes the methanol and acetic acid, leaving the lipids in the chloroform layer. Recoveries of known lipids mentioned above added to fecal samples before extraction averaged 99 percent.

Oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT)

Glucose was administered orally through a cannula of gavage and insulin was injected via IP. Blood glucose was measured over time through the tail vein and with a blood glucose monitor (OneTouchUltra, Lifescan). Measurements was taken before gavage and 15, 30, 60, 90, 120 and 210 minutes after gavage for OGTT. Measurements was taken before injection and 30, 60, 90, 120 and 150 minutes after injection.

Real-Time Quantitative PCR

Duodenum, jejunum, ileum, colon, liver, muscle and peri-epididymal adipose tissue were immediately snap frozen (immersion in liquid nitrogen) after harvest and stored at -80°C until RNA extraction. Total RNA was isolated using TRIzol reagent. RNA extraction included a DNAse treatment step. RNA was quantified using the NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific), and 500 ng of RNA from each sample was reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Multiscribe® reverse transcriptase, 4368813, Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCRs were performed using StepOnePlus (Real-Time PCR System, Applied Biosystems), TaqMan® (4324018, Applied Biosystems) or SYBRGreen® (4367659, Applied Biosystems) technologies. The mRNA level was normalized to levels of *Gapdh* or *Rplp0* mRNA and the results were expressed as relative expression levels using the 2-ΔΔCt method.

LPS quantification

This method relies on the quantification of 3HM. Samples (30 µL) were mixed with 4 µL of 3-OH-tridecanoic acid used as internal standard (1 µg/µL in ethanol) and 300 µL of

hydrochloric acid 8M. After a 3 hours hydrolysis step at 90 °C, free fatty acids were extracted with 600 µL of distilled water and 5 ml of hexane/ethyl acetate (3/2 v/v). After evaporation of the organic phase, dried extract was solubilized in ethanol (50 µL) and 3 µL were injected on a SBC18 2,1x50 mm, 1,8 µm column and connected to an Infinity 1290 HPLC system (Agilent Technologies). Separation of 3OH-free fatty acids was achieved at 45 °C using ammonium formate 5 mM / formic acid 0,1% as eluent A and acetonitrile 95% as eluent B. The elution gradient was set-up at a flow rate of 0,4 ml/min as follows: 55% A for 0,5 min, up to 100 % B in 2,5 min and maintained at 100 % B for 5 min.MS/MS detection was performed in negative mode using a QqQ 6490 triple quadruple mass spectrometer equipped with a JetStream ESI source (Gas Temperature 290°C, Gas Flow 19 l/min, Nebulizer 20 psi, Sheath Gas Heater 175 °C, Sheath Gas Flow 12 l/min, Capillary Voltage 2000 V, Charging 200 V). The mass spectrometer was set up in the selected reaction monitoring mode for the quantification of selected ions as follows: for 3-hydroxytetradecanoic acid (3HM), precursor ion 243.2 Da, product ion 59 Da, for 3-hydroxytridecanoic acid (IS), precursor ion 229.2 Da, product ion 59 Da, Collision energy and Cell Acceleration was set at 12 V and 2 respectively.

Tissue analysis

Intestinal sections (duodenum, jejunum and ileum) from mice were put in paraformaldehyde solution 4% (Cell Store Pot, 10% neutral buffer formalin, 60 ml). Intestinal sections were then cut, fixed in acetone at −20 °C for 10 min, and mounted in Vectashield fluorescent mounting medium with DAPI (Vector). Slides were observed with an Axio Imager M2 epifluorescence microscope (Zeiss) with excitation at 485 nm and emission at 535 nm for Bodipy.

Supplemental table and figure

Table

	WT	*Pltp*-KO	n (per group)	*p* values
Energy expenditure (EE)	14.93±0.60	16.62±0.87	12	0.12
Fecal lipids content	0.02±0.01	0.02±0.01	4	0.60

Table S1. Energy balance of *Pltp*-KO mice is not altered under HF diet

Assessment of energy balance in WT and *Pltp*-KO mice after 4 months of HF diet: energy expenditure (EE) (kcal/day/animal) and fecal lipids content (mg/g). Statistical analyses were performed using the Student's t test. All results are expressed as mean ± SEM.

Figure

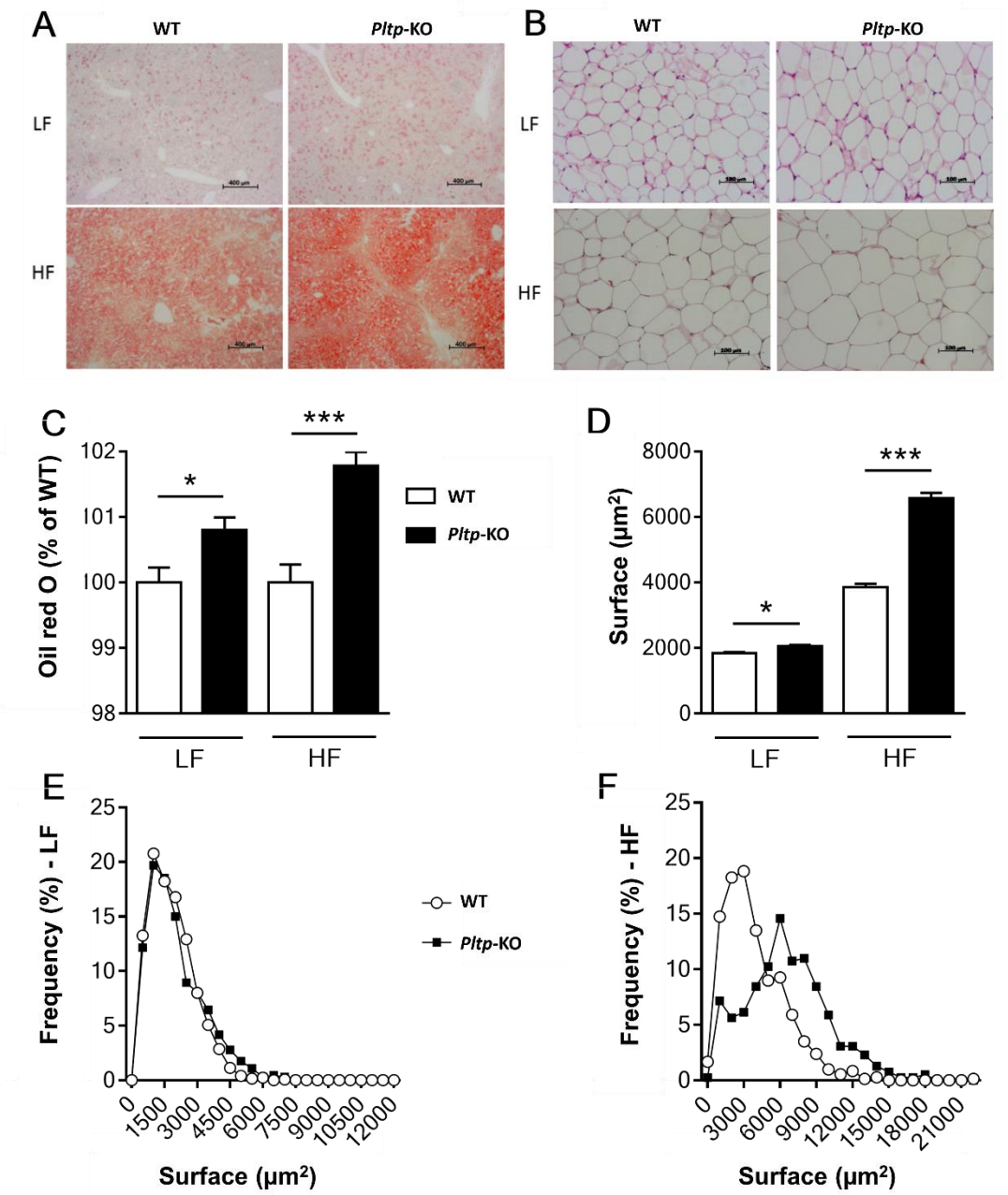


Figure S1. Tissue analyses (liver and adipose tissue) in WT and *Pltp*-KO mice under LF or HF. **A** Microscopy of mice liver. **B.** Microscopy of mice adipose tissue. **C.** Oil red O (% of WT) analyses in mice. **D.** Adipocyte surface in mice (µm^2). **E.** Distribution of adipocyte according to their surfaces in mice under LF. **F.** Distribution of adipocytes according to their surfaces in mice under HF. Statistical analyses were performed using the Student Test, *p<0.05 an *p<0.001. All results are expressed as mean ± SEM.

Article 1

C. Principaux résultats et éléments de discussion

Nous avons démontré et confirmé dans ce premier travail de thèse que la déficience en PLTP est liée à une adiposité plus élevée et que l'administration d'un régime gras obésogène (HF) est à l'origine de conséquences métaboliques sévères : les souris *Pltp*-KO prennent plus de poids, deviennent plus intolérantes au glucose et résistantes à l'insuline par rapport aux souris WT. Ce phénomène a été associé à une altération des taux de lipides plasmatiques et de la clairance postprandiale des TG. En outre, les souris *Pltp*-KO présentent un état inflammatoire accru dans des conditions d'HF ainsi qu'une exposition accrue aux LPS provenant de l'intestin.

Suite à l'administration d'un régime (HF) pendant une durée de 4 mois, plusieurs modifications vont avoir lieu chez les souris déficientes en PLTP. Nous avons en effet constaté une prise de masse corporelle plus importante. Fait plus surprenant, même si la prise de masse corporelle chez les souris *Pltp*-KO est plus importante, leur prise alimentaire reste identique à celle des souris sauvages. De plus, le calcul de l'efficacité alimentaire montre que les souris *Pltp*-KO sont plus efficaces pour stocker l'énergie. La masse grasse stockée et plus présente chez ces souris favorise le développement du phénomène d'insulino-résistance (Samuel & Shulman, 2012). Ainsi, nous rapportons également une dérégulation de l'homéostasie glucidique (se traduisant par une forte augmentation de la glycémie) associée à l'insulinorésistance plus marquée chez les souris *Pltp*-KO. La résistance à l'insuline serait initiée par une hypersécrétion de cette hormone (Corkey, 2012). Le régime gras que nous avons administré stimule davantage la sécrétion d'insuline quotidienne qu'un régime classique de par sa charge calorique plus importante (Zhang *et al.,* 2020). Cette altération du métabolisme glucidique est également accompagnée d'une altération du métabolisme lipidique. En effet nous avons observé chez des souris *Pltp*-KO, des taux de TG plus importants ainsi qu'une diminution du cholestérol associé aux HDL témoignant d'une plus faible capacité de ces dernières à assurer leur rôle de transport. Nous avons également vu que la déficience en PLTP est également associée à une augmentation des céramides dans le plasma des souris sous régime gras. Les céramides, connus pour être associées au développement de l'insulino-résistance (Chavez & Summers, 2012), pourraient contribuer aux altérations glucidiques que nous avons observées.

L'altération du profil lipidique des souris *Pltp*-KO pourrait en partie être à l'origine du statut inflammatoire plus développé chez ces souris. En effet, il a déjà été démontré qu'en plus

d'être impliqués dans l'altération de l'homéostasie glucidique chez les souris déficientes en PLTP, les céramides sont également connus pour être pro-inflammatoires (De Mello *et al.,* 2009). De plus la diminution des phosphatidylglycérol (PG) chez les *Pltp*-KO pourrait également être un facteur augmentant l'inflammation. En effet, les PG possèdent une activité anti-inflammatoire en inhibant le récepteur TLR-4 impliqué dans la cascade de signalisation des LPS (Choudhary *et al.,* 2020).

A côté de ces lipides endogènes, il était important de prendre en compte un possible effet direct des LPS sur la réponse inflammatoire plus importante des souris *Pltp*-KO. En accord avec des études précédentes (Gautier *et al.,* 2008) nous retrouvons en effet des taux de LPS circulants plus importants chez ces souris à la fois avec la méthode de détection de la fluorescence (associée aux LPS) mais également avec la méthode de dosage du 3-hydroxymyristate (3-HM) après administration d'un régime HF ou d'une faible quantité de LPS exogènes par voie orale. Nous avons aussi mis en évidence une absorption plus importante des LPS au niveau intestinal chez les souris déficientes en PLTP. En effet, les mesures de fluorescence obtenues suite à une administration exogène de LPS préalablement marqués démontrent une plus forte concentration de ces derniers à des temps précoces au niveau des sections proximales de l'intestin grêle (duodénum et jéjunum) chez ces souris. Cela a été confirmé par des coupes histologiques d'intestin : la fluorescence émise par les LPS dans les sections proximales de l'intestin grêle est plus importante chez les souris qui n'expriment pas la PLTP.

De façon intéressante, l'installation plus prononcée de l'inflammation décrite précédemment pourrait également expliquer la prise de poids plus importante chez les souris déficientes en PLTP (Kim *et al*., 2012 ; Pereira & Alvarez-Leite, 2014). De plus, il a largement été déjà démontré que les régimes gras et l'administration de LPS étaient en mesure de modifier la perméabilité intestinale en modifiant plusieurs paramètres clés dans cette régulation : le microbiote et l'intégrité de la barrière physique (Cani *et al.,* 2007 ; Kim *et al.,* 2012 ; Cao *et al.,* 2018). Ce dysfonctionnement de la fonction barrière de l'intestin pourrait expliquer pourquoi nous retrouvons davantage de LPS chez nos souris déficiences en PLTP. La déficience en PLTP conduit ainsi à une forte accumulation des LPS dans la « fraction libre », autrement dit des LPS non associés aux lipoprotéines, qui se traduit par un défaut de clairance de ces derniers et ainsi à l'augmentation de l'endotoxémie, et notamment de la quantité de LPS non-inactivés chez nos souris. La PLTP permet de prendre en charge rapidement les LPS de façon à pouvoir les transférer préférentiellement aux lipoprotéines telles que les HDL et les CM, favorisant ensuite leur captation au niveau hépatique et leur élimination au niveau de la vésicule biliaire (Hailman *et al.,* 1996 ; Gautier *et al.,* 2008). Les CM sont générés à partir des lipides alimentaires directement au niveau des entérocytes (Tso

& Balint, 1986 ; Demignot *et al.,* 2014). La précocité de neutralisation des LPS chez les souris WT pourrait être expliquée par l'association de ces derniers aux CM directement au niveau des entérocytes en utilisant la voie transcellulaire. Nous pouvons alors nous questionner sur le rôle de la PLTP dans la perméabilité intestinale et l'assemblage des CM et émettre l'hypothèse suivante : la déficience en PLTP cumulée à la fragilisation de la barrière intestinale par l'administration de toxines bactériennes pourrait favoriser cette perméabilité facilitant le passage des LPS de manière paracellulaire. En effet, la PLTP est également connue pour favoriser la lipidation de l'apoB des CM au sein des entérocytes (Sirwi *et al.,* 2018). Ainsi, les LPS administrés au souris *Pltp*-KO ne pourraient pas être associés précocement aux CM entérocytaires et passeraient directement de la lumière intestinale à la circulation sanguine en utilisant la voie paracellulaire. Ceci expliquerait pourquoi nous retrouverons davantage de LPS libres chez les souris n'exprimant pas la PLTP.

De précédentes études ont démontré que l'administration d'un régime gras pouvait être à l'origine d'une réduction de l'intestin à moduler la sécrétion des CM (Kalopissis *et al.,* 1980 ; Petit *et al.,* 2007). L'hypertriglycéridémie forcée montre également une diminution de l'absorption et de la sécrétion intestinale des CM chez les animaux nourris avec un régime HF, ce qui est en accord avec la littérature (Petit *et al.,* 2007). Dans notre étude, l'hypertriglycéridémie liée au régime ou à un gavage est davantage prononcée chez les souris déficientes en PLTP. Etant donné qu'elle n'est pas provoquée par une élévation de la sécrétion intestinale des CM, nous en avons déduit qu'elle pouvait être la conséquence d'un défaut de catabolisme des TG. Afin de déterminer les possibles altérations de clairance des TG chez nos souris *Pltp*-KO, nous sommes logiquement intéressés à l'activité LPL, enzyme responsable du catabolisme des TRL en hydrolysant les TG. Nous avons mis en évidence que sous régime standard, la déficience en PLTP est associée à une réduction de l'expression du gène codant pour la *Lpl* dans différents tissus tels que l'intestin, le muscle et le foie. Lors de l'administration d'un régime gras, nous retrouvons également une forte réduction de l'expression de ce gène et notamment au niveau musculaire. Les résultats obtenus suite au dosage de l'activité LPL ont confirmé une diminution de l'activité chez les souris déficientes en PLTP : une réduction de l'activité est observée après administration de graisses (de l'huile de maïs) et de LPS. Ce défaut de clairance impliqué dans la moins bonne prise en charge des LPS en absence de PLTP est associé à la réduction du rapport apoCII (activateur de la LPL ; Wolska *et al.,* 2017) sur apoCIII (inhibiteur de la LPL).

Ces observations pourraient aussi partiellement expliquer pourquoi moins de LPS sont associés aux HDL chez nos souris *Pltp*-KO. Les HDL étant en partie générées au cours de l'hydrolyse des CM grâce à l'action de la LPL (Gotto, 1990 ; Wang & Eckel, 2009), nous pouvons émettre l'hypothèse suivante : la diminution de l'activité LPL pourrait directement

impacter l'association des toxines bactériennes avec les HDL générées en moindres quantités et expliquerait pourquoi nous retrouvons une quantité de LPS libres plus importante chez les souris *Pltp*-KO. Nous pouvons donc supposer que la hausse des LPS plasmatiques durant les mois de régime gras chez nos souris PLTP-KO semble participer, sur le long-terme, à l'initiation de désordres métaboliques. Comme nous l'avons vu, il en est de même lorsque nous administrons des quantités faibles de LPS aux souris PLTP-KO. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse suivante : les souris ne possédant pas de PLTP n'auraient-elles pas une « dérégulation basale » de leur homéostasie intestinale qui permettrait le passage accru de LPS dans la circulation ? D'autant plus que nous avons également dosé le LPS présent dans la muqueuse et que nous nous sommes rendu compte que le taux de LPS était bien plus élevé dans les segments proximaux de l'intestin grêle des animaux déficients en PLTP.

Nous pouvons cependant souligner quelques limites expérimentales concernant les résultats obtenus. En effet, comme toute manipulation effectuée sur des animaux, l'environnement joue un rôle crucial et influe énormément sur le métabolisme des souris. Une partie des manipulations s'est faîte en cages isolées, pouvant ainsi induire du stress chez les animaux. Néanmoins, des périodes d'acclimatation ont été respectées afin de limiter au maximum ce biais. Il est également important de noter que l'évaluation de la balance énergétique ne prend pas en compte les effets produits par le microbiote. Comme détaillé dans l'introduction, les bactéries présentes dans notre intestin peuvent capter ou produire de l'énergie. Pour terminer et comme nous l'avons vu, les souris *Pltp*-KO ont une masse corporelle plus élevée et une adiposité plus élevée et il est bien connu que le tissu adipeux est métaboliquement très peu actif. Des techniques d'ajustement (Even & Nadkarni, 2012) à cette disparité sont donc nécessaires et appliquées mais reste actuellement controversées.

Pour résumer, nous avons mis en évidence qu'en absence de PLTP et après administration d'une régime HF avec ou sans LPS, en plus d'une endotoxémie plus élevée, des altérations glucidiques et lipidiques étaient également présentes expliquant la prise de poids, le développement de désordres métaboliques pouvant être à l'origine de l'obésité et du DT2. Cependant, d'autres études démontrent que la PLTP et son activité sont augmentées chez les patients atteints d'obésité et de DT2 (Dullaart *et al.,* 1994, 2007 ; Murdoch *et al.,* 2000 ; Kaser *et al.,* 2001). De plus, le lien de causalité entre l'endotoxémie métabolique et l'initiation du développement de l'obésité ou du DT2 reste encore très controversé (Cani *et al.,* 2007 ; Moreira *et al.,* 2012). Ainsi, de futures recherches restent donc à être effectuées afin d'étudier notamment les mécanismes précis de translocation des LPS (voie paracellulaire / voie transcellulaire) grâce à l'utilisation de Chambres de Ussing, dispositif expérimental permettant l'étude *ex vivo* du transfert de molécules d'intérêt entre deux compartiments. Le maintien d'un

catabolisme optimal grâce à l'activité LPL est nécessaire à un transport efficace des LPS par les TRL (et notamment les CM) afin de les neutraliser et *in fine*, les détoxifier *via* la voie hépatobiliaire (**Figure 28**). C'est pourquoi, à plus long terme, la LPL ainsi que ses cofacteurs pourraient être des marqueurs précoces afin de détecter le développement de maladies métaboliques voire de potentielles cibles thérapeutiques.

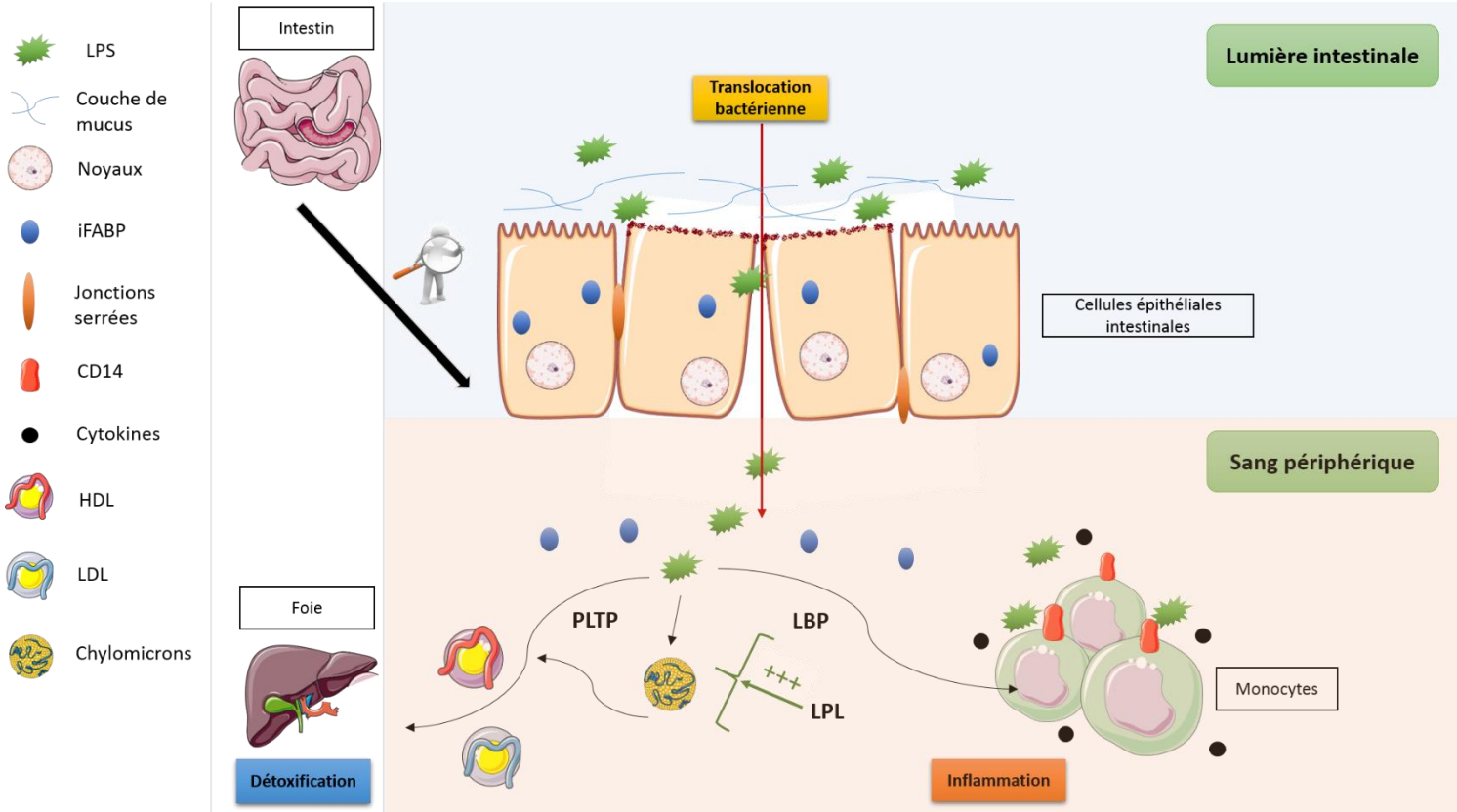


Figure 28. Vue d'ensemble des résultats obtenus pour l'article 1 : implication de la PLTP, des lipoprotéines et de la LPL dans la neutralisation des LPS d'origine intestinale.

Abréviations : LDL : Low-density lipoproteins ; HDL : High-density lipoproteins ; PLTP : Phospholipid transfer protein ; LPS : lipopolysaccharides ; LBP : LPS-binding protein ; LPL : Lipoprotein lipase ; CD14 : Cluster of differentiation 14 ; iFABP : Intestinal fatty-acid binding protein.

ARTICLE 2 (publié dans Frontiers in immunology)

A. Introduction et objectifs

Dans ce deuxième travail, pouvant être considéré comme le prolongement des études menées dans l'article précédemment décrit, nous avons à nouveau investigué quel allait être l'impact de l'absence de PLTP sur le devenir de LPS présents dans l'aire abdominale. Cette fois-ci néanmoins, nous nous sommes placés dans un contexte inflammatoire aigu. Pour cela nous avons mimé un modèle de péritonite chez l'animal en administrant par voie intrapéritonéale (IP) de fortes doses de LPS (allant de 1 à 25 mg/kg) à des souris. Nous avons été en mesure de suivre et d'étudier les interactions LPS-lipoprotéines dans plusieurs compartiments biologiques : le liquide péritonéal, le sang portal et le sang périphérique.

Nous avons émis l'hypothèse que l'absence de PLTP allait impacter la prise en charge des LPS et donc leur transfert aux lipoprotéines et *in fine* leur détoxification grâce à la voie hépatobiliaire. Les résultats obtenus précédemment au laboratoire suggéraient que la PLTP était impliquée dans la lutte contre le développement de l'endotoxémie aiguë. En effet, les souris déficientes en PLTP développaient une réponse inflammatoire à long terme et une mortalité plus importantes suite à une stimulation systémique par ces toxines bactériennes (Gautier *et al.,* 2008). En administrant de la PLTP recombinante, la mortalité de ces souris était diminuée (Deckert *et al.,* 2017). Contrairement aux travaux précédents qui étudiaient les effets à long terme des LPS circulants, nous nous sommes intéressés au rôle de la PLTP aux temps les plus précoces dans la prise en charge et le transfert aux lipoprotéines des LPS délivrés de manière spécifique dans la cavité péritonéale. Nous avons également porté une attention particulière à l'existence possible et aux modalités du phénomène de premier passage hépatique de ces LPS venant juste de passer la barrière péritonéale.

frontiers in Immunology

ORIGINAL RESEARCH
published: 12 May 2021
doi: 10.3389/fimmu.2021.622935

Intra-Abdominal Lipopolysaccharide Clearance and Inactivation in Peritonitis: Key Roles for Lipoproteins and the Phospholipid Transfer Protein

Maxime Nguyen[1,2,3,4], Gaëtan Pallot[3,4], Antoine Jalil[3,4], Annabelle Tavernier[3,4], Aloïs Dusuel[3,4], Naig Le Guern[3,4], Laurent Lagrost[2,3,4], Jean-Paul Pais de Barros[3,5], Hélène Choubley[3,5], Victoria Bergas[3,5], Pierre-Grégoire Guinot[1,2,3,4], David Masson[2,3,4,6], Belaid Bouhemad[1,2,3,4] and Thomas Gautier[2,3,4]*

[1] Department of Anesthesiology and Intensive Care, Dijon University Hospital, Dijon, France, [2] Université Bourgogne Franche-Comté / Agrosup, Lipids Nutrition Cancer (LNC) UMR1231, Dijon, France, [3] INSERM, LNC UMR1231, Dijon, France, [4] FCS Bourgogne-Franche Comté, LipSTIC LabEx, Dijon, France, [5] Lipidomic Analytical Platform, Université Bourgogne Franche-Comté (UBFC), Dijon, France, [6] Laboratory of Clinical Chemistry, François Mitterrand University Hospital, Dijon, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Cornelis Van 'T Veer,
Amsterdam University Medical Center,
Netherlands

Reviewed by:
Jean-Pierre Routy,
McGill University, Canada
Juerg Hamacher,
Lindenhofspital, Switzerland

***Correspondence:**
Maxime Nguyen
maxime.nguyensoenen@gmail.com

Specialty section:
This article was submitted to
Inflammation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 29 October 2020
Accepted: 21 April 2021
Published: 12 May 2021

Citation:
Nguyen M, Pallot G, Jalil A, Tavernier A, Dusuel A, Le Guern N, Lagrost L, Pais de Barros J-P, Choubley H, Bergas V, Guinot P-G, Masson D, Bouhemad B and Gautier T (2021) Intra-Abdominal Lipopolysaccharide Clearance and Inactivation in Peritonitis: Key Roles for Lipoproteins and the Phospholipid Transfer Protein.
Front. Immunol. 12:622935.
doi: 10.3389/fimmu.2021.622935

Introduction: During peritonitis, lipopolysaccharides (LPS) cross the peritoneum and pass through the liver before reaching the central compartment. The aim of the present study was to investigate the role of lipoproteins and phospholipid transfer protein (PLTP) in the early stages of LPS detoxification.

Material and Methods: Peritonitis was induced by intra-peritoneal injection of LPS in mice. We analyzed peritoneal fluid, portal and central blood. Lipoprotein fractions were obtained by ultracentrifugation and fast protein liquid chromatography. LPS concentration and activity were measured by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and limulus amoebocyte lysate. Wild-type mice were compared to mice knocked out for PLTP.

Results: In mice expressing PLTP, LPS was able to bind to HDL in the peritoneal compartment, and this was maintained in plasma from portal and central blood. A hepatic first-pass effect of HDL-bound LPS was observed in wild-type mice. LPS binding to HDL resulted in an early arrival of inactive LPS in the central blood of wild-type mice.

Conclusion: PLTP promotes LPS peritoneal clearance and neutralization in a model of peritonitis. This mechanism involves the early binding of LPS to lipoproteins inside the peritoneal cavity, which promotes LPS translocation through the peritoneum and its uptake by the liver.

Keywords: endotoxemia, peritonitis, sepsis, phospholipid transfer protein, lipoproteins, inflammation, lipopolysaccharides 4

INTRODUCTION

Intra-abdominal infection, which is known as peritonitis, is the second most common infection site leading to septic shock (1). Secondary peritonitis is caused by the perforation of a hollow organ (2), resulting in the release of the digestive content into the abdominal cavity. Lipopolysaccharides (LPS), also known as endotoxins, are components of the outer membrane of gram-negative bacteria. LPS, which are composed of a polysaccharide chain and a lipid A moiety, are responsible for the interaction with the innate immune system and the triggering of inflammation (3). The noxious properties of LPS are due to its interaction with the host's immune system and its over-activation (4). Once in the blood, LPS can bind to the LPS binding protein (LBP). This complex binds to CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4). LPS subsequently forms a complex with myeloid differentiation factor 2 (MD-2) which activates innate immunity through intra-cellular pathways (5). In parallel with the classical TLR4 pathway, intra-cellular receptors for LPS have been described (caspase-11 in mice and caspase 4/5 in humans) (6).

There are several mechanisms for LPS detoxification. First, LPS might be cleared by immune cells after monomerization of LPS aggregate by LBP. CD14 could also transfer LPS to lipoproteins. However, both of those clearance process might also enhance TLR4 related inflammation (7). One of the main pathways for LPS clearance and inactivation is the "reverse lipopolysaccharide transport" (RLT) (8). In this pathway, once in blood, LPS is rapidly transferred to lipoproteins, mainly high density lipoproteins (HDL) (9). This first step is facilitated by the phospholipid transfer protein (PLTP) which has the ability to transfer LPS to lipoproteins, especially HDL. Once bound to HDL, and resulting from masking of the lipid A moiety, LPS no longer activates TLR4. Instead, LPS is transported by lipoproteins to the liver which is the main organ involved in LPS detoxification. Indeed, both Kupffer cells and hepatocytes might inactivate LPS by enzymatic degradation catalyzed by acyloxyacyl hydrolase and alkaline phosphatase, respectively (7). Receptors involved in this process include LDL receptor and scavenger receptor class B type 1 (10–12). Thus, RLT pathway modulates inflammation and might decrease the consequences of the host response to infection by contributing to LPS neutralization and elimination. Interspecies specificities have been described between mice and human regarding response to LPS and their analogues (13). In particular, the LPS doses needed to trigger a cytokine storm are much higher in mice than in humans (14) and gene expression pattern and time course of pathways related to inflammatory response to endotoxemia significantly differ between mice and humans (15). The differences in lipoprotein profiles with LDL and HDL as main lipid carriers in humans and mice, respectively might partly explain these differences since LDL and HDL differ in their efficiency to bind LPS and in their metabolic fate (9).

PLTP is a lipid transfer protein that belongs to the lipid transfer lipopolysaccharide binding protein (LT/LBP) family. PLTP was first described for its role in phospholipid transfer between lipoprotein classes, HDL remodeling, including generation of pre-beta HDL (16) and its impact on onset and progression of atherosclerosis (17). As member of the same LT/LBP family, PLTP has structure similarities with LBP and both are able to bind LPS. In previous works, we demonstrated that PLTP played a pivotal role in the RLT pathway and overall protection against endotoxemia and sepsis ex-vivo and in animals models. Indeed, after studying a model of PLTP-deficient mice, we previously reported that PLTP reduced host susceptibility to endotoxemia (18). Furthermore, administration of recombinant human PLTP improved survival in mice following injections of LPS or bacterial infection (19). Interestingly, it has also been shown that the time to maximal blood concentration (Tmax) after intraperitoneal injection of LPS seemed longer in PLTP-deficient mice, suggesting delayed peritoneal clearance (18).

During intra-abdominal sepsis, LPS are located in the peritoneal compartment. LPS cross the peritoneum to reach the portal blood flow through the liver prior reaching the central compartment. However, little is known about the factors affecting the passage of LPS from the peritoneal cavity to portal blood through the peritoneum or about the accumulation of LPS in central blood after they pass through the liver. Furthermore, although lipoproteins are known to play a key role in LPS detoxification, data on the lipoprotein profile in peritoneal fluid are scarce, and the ability of peritoneal lipoproteins to bind LPS at the initial site of infection during peritonitis is unknown. The aim of the present study was to investigate the role of PLTP and lipoproteins in the detoxification of LPS from the peritoneal cavity, considering the 2 biological barriers (peritoneum and the liver) and the 3 compartments (peritoneal, portal and central). Our working hypothesis was that, in abdominal endotoxemia, PLTP and lipoprotein might enhance LPS clearance and neutralization by promoting the binding of LPS to lipoproteins, therefore preventing the triggering of inflammation. Our experiments were conducted at early time points in order to identify neutralizing mechanisms that occur in the very first steps in the inflammation process and that could explain the higher inflammation and mortality reported in absence of PLTP.

MATERIALS AND METHODS

Design

The protocol was prepared before the study. Abdominal endotoxemia was modeled by intraperitoneal LPS injection in mice. LPS from *E. coli* (O55:B5 strain) was injected to mature mice (more than 6 weeks old). Mice were matched by age and sex prior to experiments. Two genotypes were used: wild-type mice (C57BL/6) (WT) and mice knocked-out for PLTP (*Pltp*$^{-/-}$). Every

Abbreviations: 3HM, 3-hydroxymyristate; FPLC, Fast protein liquid chromatography; HDL, High density lipoprotein; LAL, Limulus amoebocyte lysate; LBP, Lipopolysaccharide binding protein; LCMS2, Liquid chromatography coupled with mass spectrometry; LPS, Lipopolysaccharide; PBS, Phosphate buffered saline; PLTP, Phospholipid transfer protein; PLTP -/-, Knock out for PLTP; RLT, Reverse lipopolysaccharide transport; TLR4, Toll-like receptor 4; TSE, Tris/Saline/EDTA; WT, Wild type.

set of experiments included a control of each genotype which received intra-peritoneal (IP) injection of LPS-free phosphate buffered saline (PBS, vehicle). Every sampling procedure (except caudal sampling) was performed under inhaled anesthesia (isoflurane) titrated to maintain spontaneous breathing. The study did not have human endpoints. The manuscript is drafted in agreement with the ARRIVE 2.0 guidelines.

Animal Procedures

LPS injection: Purified LPS of Escherichia coli serotype 055-B5 (Sigma Aldrich) was suspended in endotoxin-free PBS and vigorously mixed before use. The mice received a single injection (1mg/kg or 25mg/kg of body weight) of LPS intraperitoneally (20). For peritoneal lavage: 5ml of sodium chloride 0.9% was injected inside the peritoneal cavity. The abdomen was shaken, and the intra-abdominal fluid was collected by a second puncture. Portal sampling was performed after laparotomy on visual control under anesthesia. The time between portal and cardiac (central) sampling was less than 1 minute. After procedures, mice were sacrificed by cervical dislocation (21). Plasma was obtained by blood centrifugation (10 min, 6000*g* at 4°C). Time points for sampling were selected based on previous kinetics data (22).

Study Approval

All animal procedures were approved by the University of Burgundy's Ethics Committee on the Use of Laboratory Animals (registered under the number 5459). All animal procedures were performed in agreement with ethical principles.

Lipoprotein Profile Analyses

The different fractions of plasma and of peritoneal liquid were separated according to their density by sequential ultracentrifugation in a TLA100.1 rotor (Beckman, Palo Alto, CA). Two or three ultracentrifugation steps were conducted at the appropriate densities in order to separate the plasma into 3 or 4 fractions: either 1) the triglyceride rich fraction ($d < 1.006$), the cholesterol-rich lipoprotein fraction ($1.006 < d < 1.21$) and the lipoprotein-free fraction ($d > 1.21$) or 2) the triglyceride rich fraction ($d < 1.006$), the LDL fraction ($1.006 < d < 1.063$), the HDL fraction ($1.063 < d < 1.21$) and the lipoprotein-free fraction ($d > 1.21$) were separated.

The different fractions of plasma and of peritoneal liquid were also separated by fast protein liquid chromatography (FPLC). Plasma and peritoneal liquid were pooled and 200 µl of the mix were injected in an agarose superpose 6 column and eluted in Tris/Saline/EDTA (TSE) buffer. 300µl fractions were collected.

Lipoprotein electrophoresis was performed on agarose gel (Biotec-Fisher GmbH, Reiskirchen, Germany), and manufacturer instructions were followed.

LPS Quantitation and Activity Measurements

LPS was quantified by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LCMS2) (23). This method relies on the quantification of 3-hydroxymyristate (3HM) (a fatty acid from lipid A specific of LPS). Samples (*ca* 30µl) were mixed with 4µL of 3-OH-tridecanoic acid used as internal standard (1µg/µL in ethanol) and 300µL of hydrochloric acid 8M. After 3 hours of hydrolysis at 90°C, free fatty acids were extracted with 600µl of distilled water and 5ml of hexane/ethyl acetate (3/2 v/v). After evaporation of the organic phase, dried extracts were solubilized in ethanol (50µL) and 3µL were injected on a SBC18 2.1x50 mm, 1.8 µm column and connected to an Infinity 1290 HPLC system (Agilent Technologies). Separation of 3OH-free fatty acids was achieved at 45°C using ammonium formate 5mM/formic acid 0.1% as eluent A and acetonitrile 95% as eluent B. The elution gradient was set up at a flow rate of 0.4 ml/min as follows: 55% A for 0.5 min, up to 100% B in 2.5 min and maintained at 100% B for 5 min. MS/MS detection was performed in negative mode using a QqQ 6490 triple quadruple mass spectrometer equipped with a JetStream ESI source (Gas Temperature 290°C, Gas Flow 19 l/min, Nebulizer 20 psi, Sheath Gas Heater 175°C, Sheath Gas Flow 12 l/min, Capillary Voltage 2000 V, Charging 200 V). The mass spectrometer was set up in the selected reaction monitoring mode for the quantification of selected ions as follows: for 3-hydroxytetradecanoic acid (3HM), precursor ion 243.2 Da, product ion 59 Da; for 3-hydroxytridecanoic acid (IS), precursor ion 229.2 Da, product ion 59 Da, Collision energy and Cell Acceleration was set at 12 V and 2 V, respectively.

LPS activity was measured by limulus amoebocyte lysate (LAL) using a commercially available colorimetric activity assay (HycultBiotech Inc., Wayne, PA).

Lipid Measurements

Triglycerides, cholesterol and phospholipids were measured enzymatically by colorimetry with commercially available kits (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holtzheim, Germany), according to manufacturer's instructions. Cholesterol concentrations in FPLC fractions from peritoneal fluid (**Figure 2B**) were measured by mass spectrometry, as previously described (24).

Definitions

Portal to central plasma gradient was calculated as follows: *portal concentration – central concentration*. The hepatic first pass effect was calculated as portal to central gradient divided by portal concentration.

Cholesterol-rich lipoprotein fractions refer to HDL plus LDL fractions. Because mice are known to have only small amounts of LDL, those two density fractions were not separated in every experiment.

Statistics

Data were collected using Microsoft Excel for Office 365. Qualitative data are presented as frequencies and percentage. Quantitative data are presented as median and interquartile range. Only non-parametric tests were carried out due to the small sample sizes. Paired data were processed using a Wilcoxon signed-rank test. The threshold for statistical significance was set to $p<0.05$. Statistical analysis was performed with R Studio Version 1.2.5001© 2009-2019 RStudio, Inc. Graphical representations were made using the "ggplot2" package. The experimental unit was one animal. Sample sizes were chosen as a compromise between power and the three Rs principle. All

collected data were analyzed. Only 4 mice without LPS in the peritoneal fluids and blood after intraperitoneal LPS injection were excluded from the analysis (considered as injection error).

RESULTS

Lipoprotein Profile in Peritoneal Fluid, Portal Blood and Peripheral Blood at Basal State

Peritoneal fluid, portal plasma and central plasma were sampled from 8 wild-type (WT) and 8 PLTP knock-out (*Pltp*$^{-/-}$) mice in the absence of LPS injection. Fast protein liquid chromatography (FPLC) analysis was conducted on pooled samples for each compartment (central plasma, portal plasma and peritoneal fluid) and lipoprotein subpopulations were analyzed by electrophoresis. Results are shown in **Figure 1**. In the peritoneal fluid, small amounts of lipoproteins (in the pre-beta and beta migration range) were detected by agarose gel electrophoresis (**Figure 1A**). However, because the peritoneal lavage resulted in dilution, lipid characterization could not be conducted on FPLC fractions. Comparing the central and portal compartments, HDL concentration appeared clearly higher in the former compartment, with consistent observations using either FPLC or electrophoresis and with similar profiles whether PLTP was expressed or not (**Figure 1**).

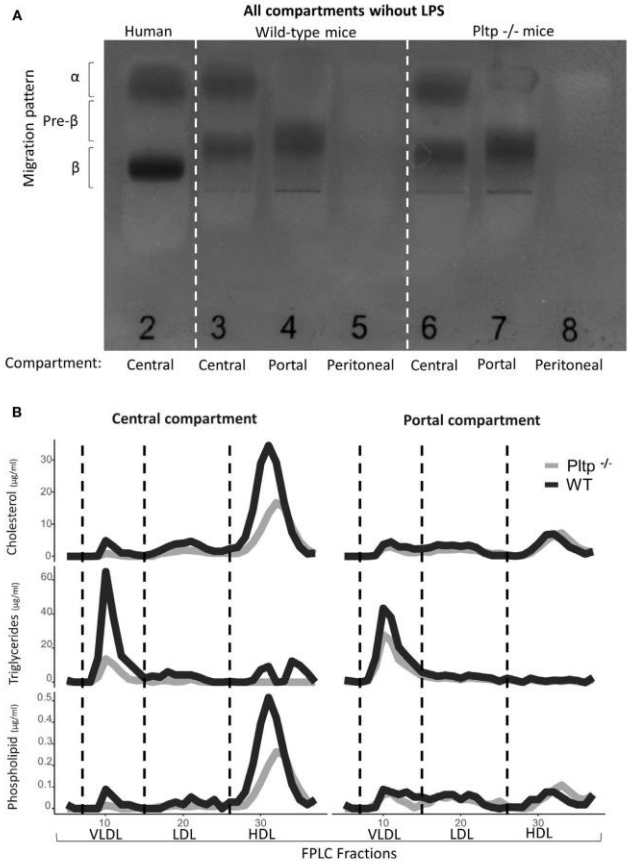


FIGURE 1 | Characterization of lipoproteins in central, portal, and peritoneal compartments (from pooled samples) in wild-type (black lines) and *Pltp*$^{-/-}$ (grey lines) mice in absence of LPS injections by **(A)** Electrophoresis and **(B)** Fast protein liquid chromatography. Both electrophoresis and FPLC showed clear differences in lipoprotein composition between portal and central blood. For FPLC, fractions 5 to 37 are shown. FPLC, Fast protein liquid chromatography; Pltp -/-, Knock out for the phospholipid transfer protein; VLDL, very low density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; HDL, High density lipoprotein.

PLTP Promotes Peritoneal LPS Clearance and Inactivation

After intraperitoneal injection of LPS (1mg/kg) in WT and *Pltp*$^{-/-}$ mice (n=9 in each group), the total concentration and biological activity of LPS were measured in central blood using the liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LCMS2) test and limulus amoebocyte lysate (LAL) test, respectively (**Figure 2A**). In the presence of PLTP, LPS molecules appeared more quickly in the central blood, and higher concentrations were detected at 30 minutes, 1 hour, and 4 hours. However, LPS biological activity as assessed by the LAL test tended to be lower as compared to *Pltp*$^{-/-}$ mice, and specific LPS activity was significantly reduced in WT mice ($p<0.05$) (**Figure 2A**). **Figure 2B** shows LPS kinetics following intravenous injection of a single, 1mg/kg LPS dose. At the early time points studied, plasma decay of LPS occurred at similar rates in *Pltp*$^{-/-}$ (n=7) and WT mice (n=8).

PLTP Facilitates LPS Peritoneal Translocation

Peritonitis was modeled by intra-peritoneal LPS injection (1mg/kg). Nine *Pltp*$^{-/-}$ mice were compared to eight WT mice. Thirty minutes after the LPS injection, peritoneal fluid and portal blood were drawn and components in peritoneal lavage were fractionated by FPLC gel permeation chromatography and ultra-centrifugation. The results are presented in **Figure 3**. In peritoneal fluid, LPS was located in lipoprotein-containing fractions, mainly HDL, in higher proportion in WT mice than in *Pltp*$^{-/-}$ mice (59% [49;67] vs. 9% [7;13], $p<0.01$) (**Figure 3A**). FPLC analysis revealed that LPS co-eluted mostly with

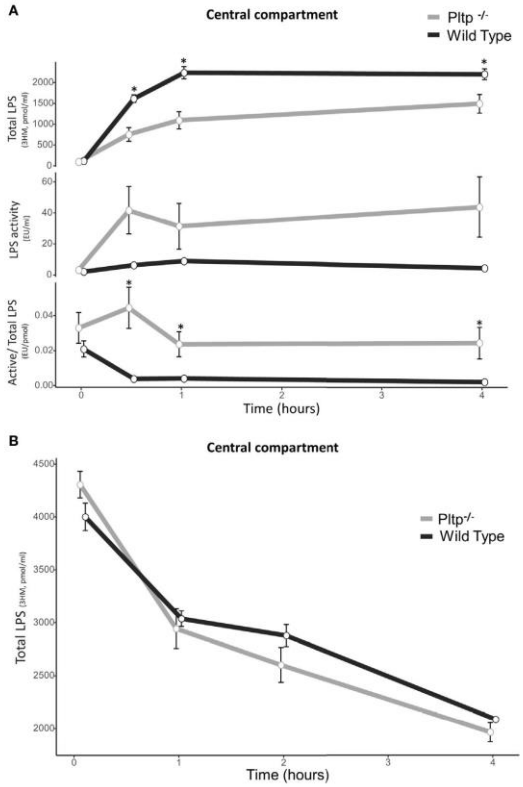


FIGURE 2 | Kinetics of central LPS concentration and activity in wild-type (black lines) and *Pltp*$^{-/-}$ (grey lines) mice. **(A)** After intra-peritoneal injection (n = 8 vs. n = 7) and **(B)** after caudal (intravenous) injection (n = 8 vs. n = 8). **(A)** After intraperitoneal injection, wild type mice had higher LPS absorption, but absorbed LPS was less active. **(B)** After intravenous injection, there was no differences in LPS concentrations. LPS, lipopolysaccharide; 3HM, 3-hydroxymyristate; WT, wild-type; Pltp -/-, Knock out for the phospholipid transfer protein. Results are presented as means +/- SEM; *, statistically significant difference ($p<0.05$).

cholesterol in WT mice but not in *Pltp*$^{-/-}$ mice, suggesting an association of LPS with lipoproteins when PLTP is expressed. Under inflammatory conditions, it appeared that HDL cholesterol levels were higher in peritoneal fluid and portal blood in WT mice than in *Pltp*$^{-/-}$ mice (**Figure 3B**). In portal blood, LPS appeared in higher concentrations in WT mice (**Figures 3B** and **4A**). LPS was mainly located within the HDL fraction when separated by FPLC (**Figure 3B**).

PLTP Promotes a Hepatic First Pass Effect on LPS

Fifteen minutes after the intraperitoneal LPS injection (1 mg/kg), portal and central (cardiac) blood were drawn from WT and *Pltp*$^{-/-}$ mice (n=10 in each group). Overall, LPS concentration was higher in WT mice than in *Pltp*$^{-/-}$ mice, both in the portal (288 [262-355] vs. 97 [90-149] pmol/ml, $p < 0.01$) and the central compartments (139 [111-170] vs. 78 [72-102] pmol/ml, $p<0.01$),

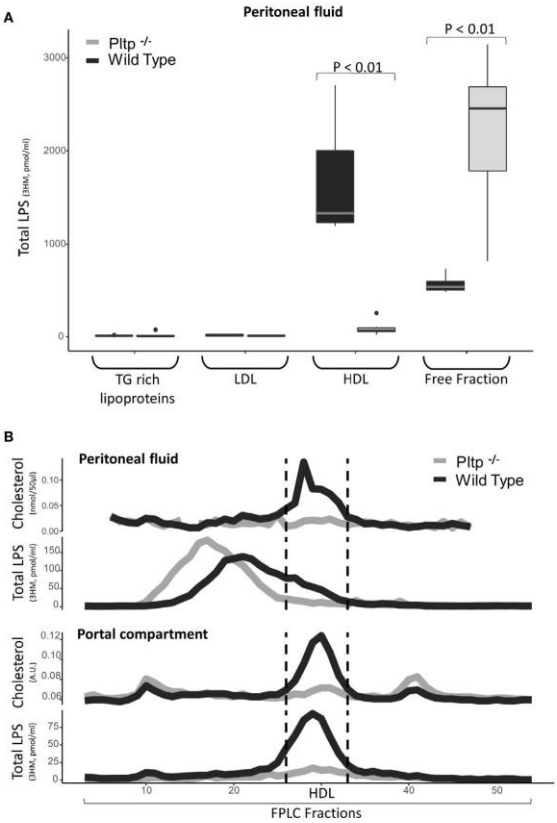


FIGURE 3 | Characterization of LPS distribution in lipoprotein fractions in portal and peritoneal compartments 30 minutes after LPS injection in wild-type (black) and *Pltp*$^{-/-}$ (grey) mice. **(A)** LPS was quantified in lipoprotein fractions individualized by ultracentrifugation (n=7 in both groups) in peritoneal fluids. **(B)** LPS and cholesterol were quantified in lipoprotein fractions individualized by FPLC (from pooled samples) in both peritoneal fluid and portal blood. Both methods support an association between lipoproteins and LPS in the peritoneal cavity and in portal blood, but only in wild-type mice. *Pltp*$^{-/-}$ mice appeared to have lower HDL levels. LPS, lipopolysaccharide; FPLC, Fast protein liquid chromatography; 3HM, 3-hydroxymyristate; WT, Wild type; Pltp -/-, Knock out for the phospholipid transfer protein; TG, Triglycerides; LDL, Low density lipoproteins; HDL, High density lipoproteins. Total LPS was measured by mass spectrometry. Total LPS and cholesterol are expressed as arbitrary (A.U.). Box represents median and interquartile range, bar represents minimal and maximal range, points are outliers. P-values are given only if $p < 0.05$.

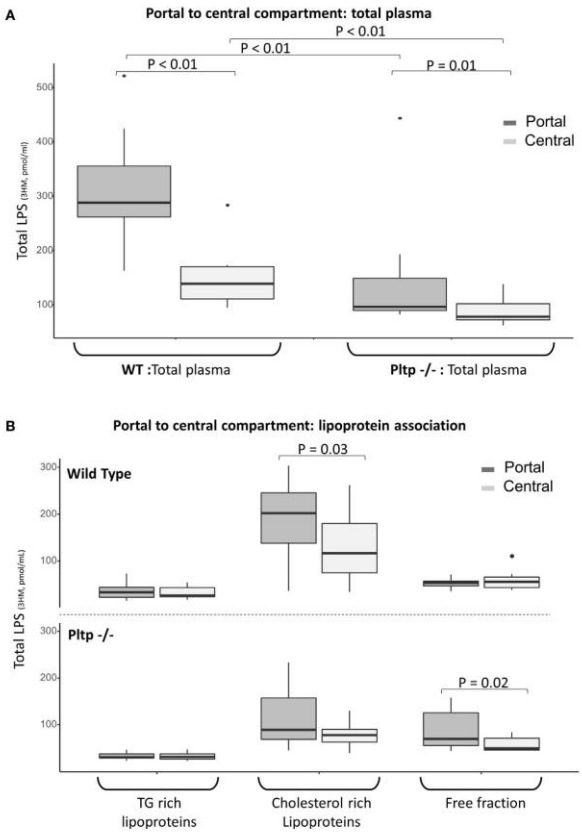


FIGURE 4 | Hepatic first pass effect 15 minutes after 1mg/kg LPS injection in wild-type and *Pltp*$^{-/-}$ mice. **(A)** LPS was quantified in the portal (dark grey) and central (light grey) compartments in total plasma of WT and *Pltp*$^{-/-}$ mice (n=10 vs. n= 10). **(B)** LPS was quantified in lipoprotein fractions individualized by ultracentrifugation in blood from portal (dark grey) and central (light grey) compartment in WT and *Pltp* -/- mice (n=12 vs. n= 10). Both genotypes exhibited a significant hepatic first pass effect. This effect was greater in wild-type mice, in which the difference in LPS concentration was located within the lipoprotein fraction, whereas it was located within the free fraction in *Pltp*$^{-/-}$ mice. LPS, lipopolysaccharide; 3HM, 3-hydroxymyristate; WT, wild-type; Pltp -/-, Knock out for the phospholipid transfer protein; TG, triglycerides. Boxes represent median and interquartile range, bars represent minimal and maximal range, dots are outliers. P-values are given only if $p < 0.05$.

respectively (**Figure 4A**). Significant portal to central gradients were observed in both genotypes, but the hepatic first pass effect on LPS was higher in WT mice than in *Pltp*$^{-/-}$ mice (51% [40-61] vs. 17% [11-24], p=0.03).

In order to gain more insight into the differences in LPS lipoprotein distribution upstream and downstream of the liver, 12 WT mice were compared to 10 *Pltp*$^{-/-}$ mice. Portal and central plasma fractions were separated by ultracentrifugation. LPS was mostly located in the lipoprotein fractions of WT mice in both the portal (66% [62;72] for WT vs. 50% [41;54] for *Pltp*$^{-/-}$, p=0.01) and central compartments (61% [46;67] vs. 48% [44;51], p=0.10). The portal to central gradients of LPS for the different fractions are presented in **Figure 4B**. WT mice exhibited a significant portal to central LPS gradient in the lipoprotein fraction whereas the portal to central gradient was significant only in the lipoprotein-free fraction of *Pltp*$^{-/-}$ mice.

In a third set of experiments, after injection of a single high dose of LPS (25 mg/kg) to 9 WT mice, the bulk of LPS was still found to be bound to the lipoprotein fraction at 15 minutes: 80% [80-90] in portal blood and 77% [74;79] in the central compartment. However, the first pass effect was no longer observed (**Figure 5**).

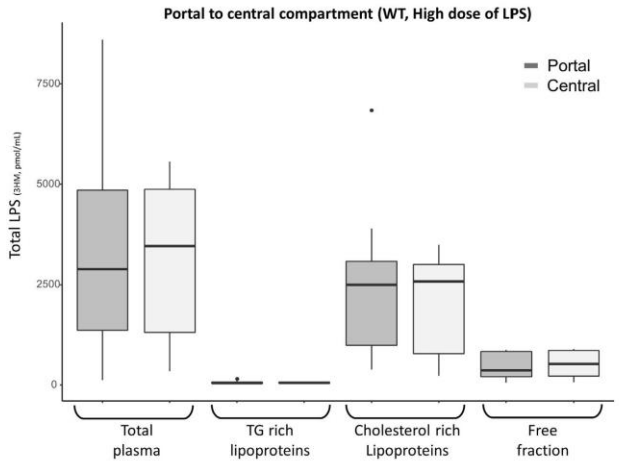


FIGURE 5 | Portal (dark grey) and central (light grey) LPS concentrations 15 minutes after high dose (25 mg/kg) LPS injection in 9 WT mice. There was no portal to central LPS gradient for high LPS load, suggesting saturation of the hepatic first pass effect. After the high dose of LPS, most portal and central LPS remained located within the lipoprotein fraction in WT mice. LPS, lipopolysaccharide; 3HM, 3-hydroxymyristate; WT, wild-type; TG, Triglycerides Boxes represent median and interquartile range, bars represent minimal and maximal range, dots are outliers. All p-values are > 0.05.

LPS Associates With Human Lipoproteins Within the Peritoneal Cavity of Pltp$^{-/-}$ Mice

Human plasma (7.5 µl/g) or vehicle was injected immediately after LPS in the peritoneum of *Pltp*$^{-/-}$ mice (n=9 per group). When the group that received the plasma injection was compared to the control group injected with the vehicle, the peritoneal fluids of the plasma injection group contained more lipoproteins, as assessed by cholesterol-containing FPLC fractions. LPS was found to associate readily with human HDL in the peritoneal fluid in the *Pltp*$^{-/-}$ mice treated with intraperitoneal plasma injection (**Figures 6A, B**).

DISCUSSION

Our main finding is that, in a model of peritonitis, PLTP promotes the peritoneal clearance and neutralization of LPS, concurrently with binding of LPS to lipoproteins. This clearance process is initiated very early, when the binding of LPS to lipoproteins can still occur inside the peritoneal cavity. In the presence of PLTP, LPS were able to bind to lipoproteins in all three compartments (peritoneal, portal and central). PLTP-dependent binding was found to facilitate the passage of LPS through the peritoneal membrane and subsequent uptake by the liver.

In the present study, a PLTP-mediated association between LPS and lipoproteins within the peritoneal cavity is reported for the first time. This finding is in line with the ability of PLTP to transfer LPS to lipoproteins in blood (25), indicating that PLTP can act in the same way in blood plasma and peritoneal fluid. Because LPS is neutralized once it is associated with lipoproteins (8), our study suggests that LPS might be inactivated very quickly in the peritoneal cavity. Differences exists between mice and human regarding lipoprotein involved in this pathway. Mostly, mice have low level of circulating low density lipoproteins (LDL) and very low density lipoproteins (26).

After intraperitoneal administration, drugs are mostly absorbed *via* the visceral peritoneum (27). Blood from the visceral peritoneum then flows into the portal vein and through the liver before reaching the central circulation. In mice expressing PLTP, we observed a continuum in the association of LPS with lipoproteins between peritoneal fluid and portal blood. This continuum suggests that lipoproteins might facilitate the peritoneal translocation of LPS, thus explaining the higher LPS clearance observed in the presence of PLTP. Previous reports have suggested that lipoproteins and PLTP might cross the peritoneum (19, 28). Peritoneal inflammation is known to increase peritoneal permeability (29), and the increase in permeability might facilitate lipoprotein exchange between the portal and peritoneal compartment in the context of peritonitis. On the contrary, sepsis is known to lower HDL concentration (30). According to our results, one might hypothesize that low HDL concentration might impair intraperitoneal LPS clearance.

Experimental data has demonstrated lower LPS central concentration when injected into a portal vein compared to a peripheral vein, supporting the hypothesis of a hepatic first pass effect (31). The portal to central plasma LPS gradient had already been observed in the setting of digestive LPS translocation in rats (32). The gradient of LPS between portal and central blood as observed in the present study brings direct support in favor of a first pass of LPS a short time after LPS infusion.

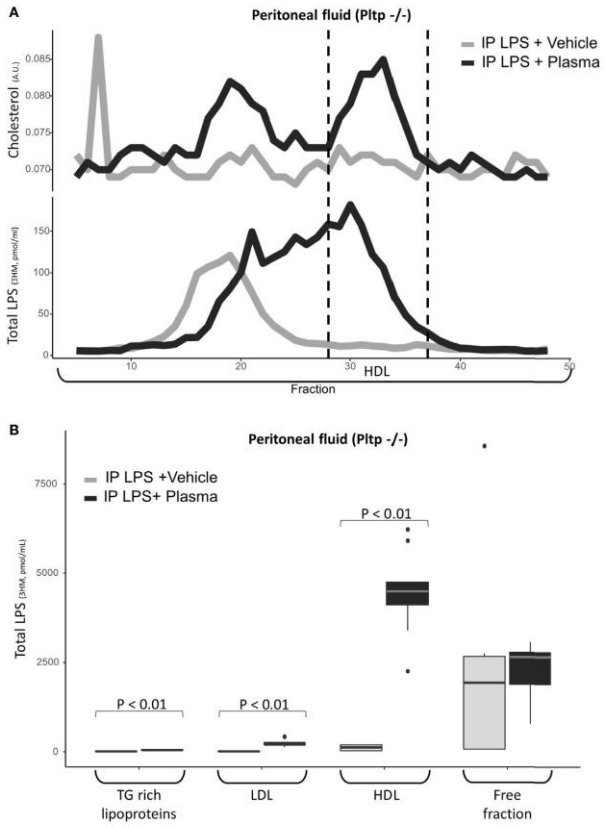


FIGURE 6 | Characterization of LPS distribution in lipoprotein fractions in the peritoneal compartment 30 minutes after intraperitoneal LPS injection with co-injection of human plasma (black line) or vehicle (grey line) (n=9 vs. n=9) in *Pltp*$^{-/-}$ mice. **(A)** LPS and cholesterol were quantified in lipoprotein fractions individualized by FPLC (in pooled samples). **(B)** LPS was quantified in lipoprotein fractions individualized by ultracentrifugation. Both methods supported an association between LPS and lipoprotein in the peritoneum after plasma injection. LPS, lipopolysaccharide; FPLC, Fast protein liquid chromatography; 3HM, 3-hydroxymyristate; IP, intra-peritoneal; Pltp -/-, Knock out for the phospholipid transfer protein; TG, triglycerides; LDL, low density lipoproteins; HDL, high density lipoproteins. Boxes represent median and interquartile range, bars represents minimal and maximal range, dots are outliers. P-values are given only if $p < 0.05$.

In line with previous studies, these observations indicate that LPS readily associates with lipoproteins in a neutralizing process mediated by PLTP. Indeed, we observed higher LPS neutralization in WT mice, which can be paralleled with higher LPS binding to lipoproteins in the peritoneal and portal compartments. Indeed, the increased capacity of PLTP to neutralize LPS might explain the protective effect previously reported in sepsis (18, 19). Our results add significant knowledge regarding the key roles of lipoproteins and PLTP in LPS clearance and inactivation in abdominal sepsis. Enhancing this pathway by increasing lipoprotein levels and functionality, *in situ*, might help to increase LPS inactivation and clearance very early at the source of the insult, and protect against the harmful consequences of sepsis in patients with endotoxemia of abdominal origin.

Some limitations should be underlined. First, intraperitoneal LPS injection does not reflect the clinical setting (*i.e.* polymicrobial human peritonitis). However, the present study aimed to specifically describe mechanisms involved in lipopolysaccharide clearance and inactivation at early time points. Intraperitoneal injection allows to standardize both doses and timing, thus to increase reproducibility. In addition, this model of peritonitis enabled us to specifically study the LPS pathway by avoiding exposure to multiple pathogens associated molecular patterns, thus to precisely monitor LPS across the different compartments. Because bacteremia is a much more

complex condition during which endotoxemia is only one among several burdens, infection data might have given different results. We did not study the lymphatic route. Lymphatics are also involved in the clearance of the peritoneal cavity (33). Substances absorbed by lymphatics circulate through the thoracic duct to the subclavian vein, thus bypassing the liver and the hepatic first pass. However, it is very unlikely that LPS might have reached central circulation through lymphatic route 15 or 30 minutes after intraperitoneal injection due to its slow flow (34). Intraperitoneal lipid quantification was limited because of the dilution that inevitably occurred during peritoneal lavage. However, cholesterol could be quantified by mass spectrometry on one FPLC series. We chose to study short endpoint in order to identify pathological mechanisms that occurs early in the inflammation process. Longer endpoints in particular reporting higher inflammation and mortality in *Pltp* -/- mice have not been re-explored here but have previously been described (18, 19). While it has been reported that PLTP, rather than HDL pool size was critical to reduce LPS induced inflammation (35), our model did not allow us to address this question because both PLTP and HDL metabolism are altered in *Pltp*$^{-/-}$ mice. We did not study the cellular compartment after peritoneal lavage. Exploring the profile of cell populations over time might have given further information about peritoneal inflammation upon LPS stimulation. For instance, it has been reported that natural killer cells that might contribute to a hyper response in sepsis by acquiring memory-like properties (36). However, *ex-vivo* data already exist and showed that peritoneal macrophage activation by LPS depended on both PLTP secretion by the cells and the presence of lipoproteins in the medium (37).

In conclusion, using a model of peritonitis we demonstrated that PLTP promotes the binding of LPS to lipoproteins, making it a key factor of peritoneal clearance and neutralization. First, this phenomenon involves the rapid and efficient PLTP-dependent binding of LPS to lipoproteins, promoting its transfer from the peritoneal cavity to the portal blood. Secondly, a hepatic first pass effect occurs, thus lowering the central LPS concentration in WT mice. This results in higher LPS clearance and inactivation when originating from the peritoneal cavity. Finally, LPS binds readily to human lipoproteins when human plasma is infused inside the peritoneal cavity of *Pltp*$^{-/-}$ mice. Overall, this work highlights the key role of PLTP and lipoproteins during the early steps of the absorption and clearance of LPS originating from the peritoneal cavity.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by University of Burgundy's Ethics Committee on the Use of Laboratory Animals (registered under the number 5459). Written informed consent for participation was not obtained from the owners because this was not applicable.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MN, TG, LL, BB, and DM conceived and guided the project. MN, GP, AT, NL-G, AJ, AD, J-PP, VB, HC, and TG carried out the experiments. MN, TG, and BB analyzed the data. MN, TG, and BB wrote the manuscript. TG, LL, P-GG, BB, and DM reviewed and edited the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by a French Government grant managed by the French National Research Agency (Agence nationale de la recherche) as part of the "Investissements d'Avenir" program, reference: ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC Labex.

It is also part of two integrated projects funded by the European Union (FEDER) and the French government (Regional Council of Bourgogne-Franche-Comté).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Suzanne Rankin for proofreading and editing the manuscript. This work has been presented partially in the e-ISICEM 2020 congress.

REFERENCES

1. Quenot J-P, Binquet C, Kara F, Martinet O, Ganster F, Navellou J-C, et al. The Epidemiology of Septic Shock in French Intensive Care Units: The Prospective Multicenter Cohort EPISS Study. *Crit Care* (2013) 17:R65. doi: 10.1186/cc12598
2. Ross JT, Matthay MA, Harris HW. Secondary Peritonitis: Principles of Diagnosis and Intervention. *BMJ* (2018) 361:k1407. doi: 10.1136/bmj.k1407
3. Beutler B, Rietschel ET. Innate Immune Sensing and its Roots: The Story of Endotoxin. *Nat Rev Immunol* (2003) 3:169–76. doi: 10.1038/nri1004
4. Munford RS. Endotoxemia-Menace, Marker, or Mistake? *J Leukoc Biol* (2016) 100:687–98. doi: 10.1189/jlb.3RU0316-151R
5. Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 Signal Transduction Pathway. *Cytokine* (2008) 42:145–51. doi: 10.1016/J.CYTO.2008.01.006
6. Skirecki T, Cavaillon JM. Inner Sensors of Endotoxin - Implications for Sepsis Research and Therapy. *FEMS Microbiol Rev* (2019) 43:239–56. doi: 10.1093/femsre/fuz004
7. Guerville M, Boudry G. Gastrointestinal and Hepatic Mechanisms Limiting Entry and Dissemination of Lipopolysaccharide Into the Systemic Circulation. *Am J Physiol Liver Physiol* (2016) 311:G1–15. doi: 10.1152/ajpgi.00098.2016
8. Gautier T, Lagrost L. Plasma PLTP (Phospholipid-Transfer Protein): An Emerging Role in "Reverse Lipopolysaccharide Transport" and Innate Immunity. *Biochem Soc Trans* (2011) 39:984–8. doi: 10.1042/BST0390984

9. Levels JH, Abraham PR, van den Ende A, van Deventer SJ. Distribution and Kinetics of Lipoprotein-Bound Endotoxin. *Infect Immun* (2001) 69:2821–8. doi: 10.1128/IAI.69.5.2821-2828.2001
10. Topchiy E, Cirstea M, Kong HJ, Boyd JH, Wang Y, Russell JA, et al. Lipopolysaccharide Is Cleared From the Circulation by Hepatocytes Via the Low Density Lipoprotein Receptor. *PloS One* (2016) 11:e0155030. doi: 10.1371/journal.pone.0155030
11. Guo L, Zheng Z, Ai J, Huang B, Li XA. Hepatic Scavenger Receptor Bi Protects Against Polymicrobial-Induced Sepsis Through Promoting LPS Clearance in Mice. *J Biol Chem* (2014) 289:14666–73. doi: 10.1074/jbc.M113.537258
12. Guo L, Song Z, Li M, Wu Q, Wang D, Feng H, et al. Scavenger Receptor Bi Protects Against Septic Death Through Its Role in Modulating Inflammatory Response. *J Biol Chem* (2009) 284:19826–34. doi: 10.1074/jbc.M109.020933
13. Chentouh R, Fitting C, Cavaillon JM. Specific Features of Human Monocytes Activation by Monophosphoryl Lipid a. *Sci Rep* (2018) 8:7096. doi: 10.1038/s41598-018-25367-y
14. Suffredini AF, Reda D, Banks SM, Tropea M, Agosti JM, Miller R. Effects of Recombinant Dimeric TNF Receptor on Human Inflammatory Responses Following Intravenous Endotoxin Administration. *J Immunol* (1995) 155:5038–45.
15. Junhee Seok H, Shaw W, GC A, NM M, VB H, Xu W, et al. Genomic Responses in Mouse Models Poorly Mimic Human Inflammatory Diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110:3507–12. doi: 10.1073/pnas.1222878110
16. Van Tol A. Phospholipid Transfer Protein. *Curr Opin Lipidol* (2002) 13:135–9. doi: 10.1097/00041433-200204000-00004
17. Masson D, Jiang XC, Lagrost L, Tall AR. The Role of Plasma Lipid Transfer Proteins in Lipoprotein Metabolism and Atherogenesis. *J Lipid Res* (2009) 50: S201–6. doi: 10.1194/jlr.R800061-JLR200
18. Gautier T, Klein A, Deckert V, Desrumaux C, Ogier N, Sberna AL, et al. Effect of Plasma Phospholipid Transfer Protein Deficiency on Lethal Endotoxemia in Mice. *J Biol Chem* (2008) 283:18702–10. doi: 10.1074/jbc.M802802200
19. Deckert V, Lemaire S, Ripoll P-J, Pais de Barros J-P, Labbé J, Borgne CC-L, et al. Recombinant Human Plasma Phospholipid Transfer Protein (PLTP) to Prevent Bacterial Growth and to Treat Sepsis. *Sci Rep* (2017) 7:3053. doi: 10.1038/s41598-017-03285-9
20. Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA. Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci* (2011) 50:600–13.
21. The University of Texas at Austin Institutional Animal Care and Use Committee. *Guidelines for the Use of Cervical Dislocation for Rodent Euthanasia*. Available at: http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf [Accessed April 29, 2019].
22. Dusuel A, Deckert V, Pais De Barros J-P, Van Dongen K, Choubley H, Charron E, et al. Human CETP Lacks Lipopolysaccharide Transfer Activity, But Worsens Inflammation and Sepsis Outcomes in Mice. *J Lipid Res*. doi: 10.1194/jlr.ra120000704
23. Pais de Barros J-P, Gautier T, Sali W, Adrie C, Choubley H, Charron E, et al. Quantitative Lipopolysaccharide Analysis Using HPLC/MS/MS and its Combination With the Limulus Amebocyte Lysate Assay. *J Lipid Res* (2015) 56:1363–9. doi: 10.1194/jlr.D059725
24. Blondelle J, de Barros JPP, Pilot-Storck F, Tiret L. Targeted Lipidomic Analysis of Myoblasts by GC-MS and LC-MS/MS. *Methods Mol Biol* (2017) 1668:39–60.
25. Hailman E, Albers JJ, Wolfbauer G, Tu A-Y, Wright SD. Neutralization and Transfer of Lipopolysaccharide by Phospholipid Transfer Protein. *J Biol Chem* (1996) 271:12172–8.
26. Steenbergen RHG, Joyce MA, Lund G, Lewis J, Chen R, Barsby N, et al. Lipoprotein Profiles in SCID/uPA Mice Transplanted With Human Hepatocytes Become Human-Like and Correlate With HCV Infection Success. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* (2010) 299:G844–54. doi: 10.1152/ajpgi.00200.2010
27. Lukas G, Brindle SD, Greengard P. The Route of Absorption of Intraperitoneally Administered Compounds - Pubmed. *J Pharmacol Exp Ther* (1971) 178:562–4.
28. Kagan A, Bar-Khayim Y, Schafer Z, Fainaru M. Kinetics of Peritoneal Protein Loss During CAPD: Ii. Lipoprotein Leakage and its Impact on Plasma Lipid Levels. *Kidney Int* (1990) 37:980–90. doi: 10.1038/KI.1990.74
29. Wang T, Cheng H-H, Heimbürger O, Waniewski J, Bergström J, Lindholm B. Effect of Peritonitis on Peritoneal Transport Characteristics: Glucose Solution Versus Polyglucose Solution. *Kidney Int* (2000) 57:1704–12. doi: 10.1046/J.1523-1755.2000.00015.X
30. Van HJ, Heezius ECJM, Dallinga GM, Van JAG, Verhoef J, Van KPM. Lipoprotein Metabolism in Patients With Severe Sepsis. *Crit Care Med* (2003) 31:1359–66. doi: 10.1097/01.CCM.0000059724.08290.51
31. Mimura Y, Sakisaka S, Harada M, Sata M. Role of Hepatocytes in Direct Clearance of Lipopolysaccharide in Rats. *Gastroenterology* (1995) 109:1969–76. doi: 10.1016/0016-5085(95)90765-3
32. Zheng Y, Tam Y, Coutts R. Endotoxin and Cytokine Released During Parenteral Nutrition. *J Parenter Enter Nutr* (2004) 28:163–8. doi: 10.1177/014860710402800316 3
33. Al Shoyaib A, Archie SR, Karamyan VT. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? *Pharm Res* (2020) 37:1–17. doi: 10.1007/s11095-019-2745-x
34. Olofsson P, Nylander G, Olsson P. Endotoxin: Routes of Transport in Experimental Peritonitis. *Am J Surg* (1986) 151:443–6. doi: 10.1016/0002-9610(86)90098-X
35. Yu Y, Cui Y, Zhao Y, Liu S, Song G, Jiao P, et al. The Binding Capability of Plasma Phospholipid Transfer Protein, But Not HDL Pool Size, is Critical to Repress LPS Induced Inflammation. *Sci Rep* (2016) 6:20845. doi: 10.1038/srep20845
36. Rasid O, Chevalier C, Camarasa TMN, Fitting C, Cavaillon JM, Hamon MA. H3k4me1 Supports Memory-Like NK Cells Induced by Systemic Inflammation. *Cell Rep* (2019) 29:3933–45. doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.043
37. Gautier T, Paul C, Deckert V, Desrumaux C, Klein A, Labbé J, et al. Innate Immune Response Triggered by Triacyl Lipid A is Dependent on Phospholipid Transfer Protein (PLTP) Gene Expression. *FASEB J* (2010) 24:3544–54. doi: 10.1096/fj.09-152876

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Nguyen, Pallot, Jalil, Tavernier, Dusuel, Le Guern, Lagrost, Pais de Barros, Choubley, Bergas, Guinot, Masson, Bouhemad and Gautier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article 2 (publié dans *Frontiers in immunology*)

B. Principaux résultats et discussion

Nous avons démontré dans ce deuxième travail une captation précoce des LPS par les HDL sous l'action de la PLTP dans la cavité péritonéale après administration qui permettrait de transférer ces toxines bactériennes plus rapidement dans le compartiment portal et de favoriser ainsi leur détoxification (**Figure 29**).

La PLTP étant une protéine ubiquitaire, il était prévisible de la retrouver dans la cavité péritonéale, sans que cela ait pu être formellement démontré jusqu'à présent. De même, le profil lipoprotéique du liquide péritonéal est encore fort peu connu, même si la présence de HDL a déjà été rapportée (Li *et al.,* 2001 ; Yu *et al.,* 2021). Nous mettons ainsi en évidence non seulement la présence de la PLTP dans le compartiment péritonéal mais également le rôle primordial et la fonctionnalité des HDL dans la prise en charge précoce des LPS sous l'action de la PLTP. En effet, nous avons démontré que la PLTP en collaboration avec les lipoprotéines et notamment les HDL, permettait de capter les LPS afin de les transférer dans le compartiment portal. De là, un effet de premier passage hépatique a clairement été observé chez les souris chez les souris sauvages, phénomène fortement altéré chez les souris déficientes en PLTP.

Nous avons donc démontré une certaine pluralité des rôles de la PLTP dans cette étude :

- Elle favorise l'inactivation et la clairance des LPS au niveau du compartiment péritonéal.
- Elle favorise la translocation des LPS du compartiment péritonéal au compartiment portal.
- Elle favorise l'effet de premier passage hépatique des LPS.
- Elle favorise *in fine* la détoxification des LPS au niveau hépatique.

Nous avons ainsi démontré que les lipoprotéines sont capables de passer dans le compartiment péritonéal en situation d'inflammation aigüe, ce qui tend à être en accord avec certains travaux publiés (Wang *et al.,* 2000). En effet, l'inflammation au niveau péritonéal, tout comme l'inflammation au niveau intestinal, tend à augmenter la perméabilité de ces tissus et donc favorise le passage et l'échange de composés tels que les lipoprotéines (Wang et al., 2000 ; Murch *et al.,* 2007, Kallus & Brandt, 2012) dans un contexte de péritonite et donc d'inflammation. Le fait que la PLTP joue un rôle protecteur dans le sepsis avait déjà été démontré par notre équipe (Gautier *et al.,* 2008 ; Deckert *et al.,* 2017) mais la précocité du

phénomène de prise en charge des LPS n'avait pas encore démontrée. Malgré certaines limites que cette étude peut comporter (éloignement des conditions cliniques réelle par exemple), elle permet de comprendre les mécanismes précoces d'inactivation des LPS et pourrait permettre le développement de nouvelles approches thérapeutiques afin de lutter contre le sepsis, notamment en ciblant la voie du premier passage hépatique afin de favoriser son action détoxifiante ou encore en ciblant les acteurs majeurs qui permettent la neutralisation des LPS : les lipoprotéines (notamment les HDL), les récepteurs hépatiques impliqués dans la captation des lipoprotéines, SR-B1 pour les HDL, LDLR pour les LDL et les LRP pour les CM (Havel, 1986) et bien évidemment la PLTP.

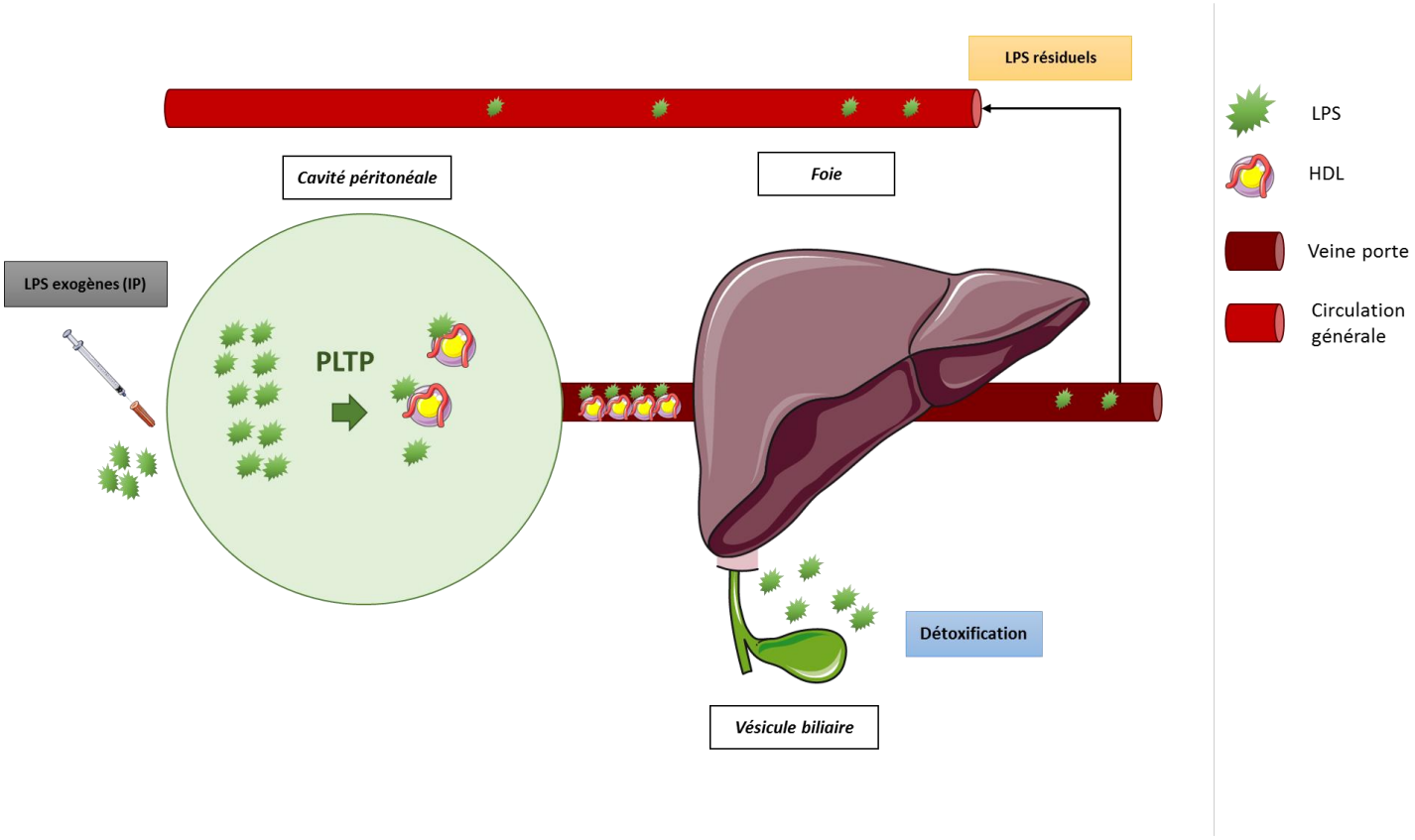


Figure 29. Vue d'ensemble des résultats obtenus pour l'article 2 : implication de la PLTP et des lipoprotéines dans la neutralisation des LPS originaires de la cavité péritonéale.

Abréviations : HDL : High-density lipoproteins ; PLTP : Phospholipid transfer protein ; LPS : lipopolysaccharides.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Ces deux études s'inscrivent dans la continuité de l'un des axes majeurs de recherche de notre équipe : l'investigation du rôle des lipoprotéines et de la protéine plasmatique de transfert des lipides au cours de l'inflammation. Ou plutôt des « inflammations ». En effet, le premier article est un prolongement des travaux menés par Lorène Lebrun durant sa thèse et consistait à étudier le rôle de la PLTP et du métabolisme des lipoprotéines suite à l'administration d'un régime obésogène. Nous avons complété ses travaux avec l'administration orale de lipopolysaccharides afin de voir comment variait l'endotoxémie, les métabolismes lipidique et glucidique chez nos souris sauvages exprimant le gène codant pour la PLTP et chez nos souris déficientes en PLTP. Le second travail, réalisé en collaboration avec le Dr. Maxime Nguyen, a permis d'approfondir les mécanismes déjà étudiés dans notre laboratoire portant sur la sensibilité accrue de nos souris *Pltp*-KO vis-à-vis des endotoxines bactériennes grâce au suivi de ces derniers dans différents compartiments clés. L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit de thèse a ainsi démontré le rôle primordial de la PLTP dans un contexte de maladies métaboliques provoquant une inflammation à bas bruit (obésité, DT2) et dans un contexte de maladie infectieuse aiguë (péritonite, sepsis). Nous avons mis en évidence le rôle protecteur de la PLTP en relation avec le métabolisme des lipoprotéines lors du développement de ces maladies. En effet, qu'il s'agisse d'une infection aiguë ou d'une inflammation à bas bruit, nous avons pour la première fois mis en évidence la précocité de l'intervention de la PLTP dans la participation à l'inactivation des endotoxines bactériennes en administrant de deux façons différentes les LPS dans la cavité abdominale.

Dans l'objectif de poursuivre les travaux déjà menés par notre équipe et grâce un modèle animal déficient en PLTP, nous avons démontré que l'absence de cette protéine était en mesure de favoriser le passage du LPS de la lumière intestinale vers la circulation, où il est retrouvé davantage sous forme libre au détriment de son association aux CM dans le cas d'une administration de LPS par voie orale et de l'administration d'un régime HF. Parallèlement à ce phénomène, un défaut de clairance des TRL a pu être démontré. L'absence de PLTP induit ainsi une forte incapacité à inactiver efficacement les LPS d'origine intestinale, conduisant à une augmentation de la réponse inflammatoire chez les souris déficientes pour cette protéine. En revanche l'absence de PLTP altère principalement l'association aux HDL dans la cavité péritonéale, et non aux TRL, après une administration de LPS par voie IP.

Si dans un contexte de sepsis, le rôle protecteur de la PLTP en association avec les lipoprotéines n'est plus à démontrer, la relation de causalité entre la PLTP et les maladies métaboliques restent encore à être élucidée. En effet, comme nous l'avons vu dans le dernier chapitre de l'introduction de cette thèse, son activité est décrite comme étant augmentée chez les chez les personnes atteintes de surpoids, en situation d'obésité ou encore les personnes

atteintes de DT2 (Dullaart *et al.,* 1994, 2007 ; Murdoch *et al.,* 2000 ; Kaser *et al.,* 2001). Des travaux de 2014 menés par Abbasi et ses collaborateurs ont même mis en évidence son implication dans le risque d'apparition du DT2. De façon surprenante, dans ce travail de thèse, nous démontrons que la PLTP assure un rôle protecteur en étant capable de prévenir à la fois les effets néfastes d'un régime obésogène et l'injection de LPS dans la cavité abdominale en faisant intervenir différents mécanismes selon la voie d'administration (et notamment l'association précoce aux lipoprotéines). Cependant, il est important de préciser que la plupart des études citées précédemment ont été effectuées chez l'Homme et notamment des patients atteints d'obésité et/ou de DT2, qui possèdent donc un gène fonctionnel codant pour la PLTP. La principale différence de notre étude réside dans le fait qu'elle met en jeu un modèle murin qui ne possède pas de PLTP fonctionnelle que l'on compare avec des souris sauvages exprimant cette protéine, dans une logique de « tout ou rien ». Ainsi, cela suggère que la PLTP pourrait effectivement être un biomarqueur du développement de ces maladies métaboliques mais également qu'elle pourrait être indispensable à la régulation et à la protection des individus, en dose suffisante pour prévenir l'apparition de ces pathologies.

Les questions qui peuvent maintenant se poser concernent les liens de causalité entre la présence de la PLTP et le développement de maladies métaboliques : la PLTP serait-elle un marqueur précoce de l'inflammation provoquée par des régimes gras et donc la translocation accrue de LPS au niveau intestinale ou la PLTP est-elle une protéine protectrice excrétée davantage lorsque ces maladies sont installées ? De plus, il reste à étudier de manière précise les mécanismes précis de translocation des LPS de la lumière intestinale vers le compartiment sanguin en absence ou en présence de PLTP et après administration ou non de régime gras. Pour répondre à ces questionnements, plusieurs solutions expérimentales peuvent être proposées et envisagées : l'utilisation de Chambre de Ussing permettrait de déterminer plus précisément le mode de translocation des LPS de la lumière intestinale vers le compartiment sanguin et donc de caractériser la voie de passage de ces derniers en absence ou en présence de PLTP et après administration orale de LPS et / ou d'un régime HF. L'utilisation de LPS marqués, comme nous l'avons fait dans notre étude, pourrait également servir à déterminer le mode de translocation au niveau intestinal en réalisant des coupes histologiques des sections proximales d'intérêt afin de les observer à l'aide d'un microscope confocal dans le but de déterminer plus précisément où se trouvent spatialement les LPS dans les cellules intestinales et à différents temps après gavage. Nous avons vu que certaines protéines étaient exprimées et nécessaires dans le rôle de barrière physique de l'intestin, comme ZO-1 ou JAM par exemple. Ainsi, la caractérisation de l'expression de protéines présentes au sein des jonctions intracellulaires serait également une méthode

efficace afin de déterminer si le passage des LPS dans un contexte de maladies métaboliques se fait par la voie para- ou transcellulaire.

Nous avons vu et confirmé que la détoxification des LPS passait tout d'abord par la captation de ces derniers par les lipoprotéines circulantes qui sont ainsi capables de les neutraliser. Or, il est maintenant bien établi que la taille des lipoprotéines peut être un facteur important à prendre en compte dans le développement de maladies cardiovasculaires (Vakkilainen *et al.,* 2003). De plus, il a été déjà été démontré que la taille et le nombre de CM influait fortement leur clairance et donc leur efficacité en tant que vecteurs circulants (Martins *et al.,* 1996). Ainsi, il serait intéressant de mesurer la taille des lipoprotéines d'intérêt (CM mais également HDL) dans un contexte de sepsis, d'obésité et de DT2 d'abord chez nos animaux déficients en PLTP comparés aux sauvages et ensuite chez des patients atteints de pathologies métaboliques. Une augmentation ou une diminution de taille pourrait être ainsi être un marqueur intéressant du développement ces maladies.

De plus, suite à nos travaux et celle d'autres équipes, l'étude du mode de détoxification des LPS au niveau hépatique avant qu'ils rejoignent la bile pour être excrétés reste encore à être plus clairement élucidé. En effet, même si des études existent déjà concernant l'élimination des LPS *via* la voie hépatobiliaire notamment grâce à l'action de l'AOAH et de l'association de ces LPS aux HDL (Fox *et al.,* 1990 ; Shao *et al.,* 2012), de futures investigations restent néanmoins à être effectuées pour déterminer quels sont les mécanismes précis impliqués.

Pour conclure, ces études, malgré leurs limites, notamment en termes de projection clinique, tendent à être compléter par de futurs travaux réalisables sur des patients atteints d'obésité, DT2 ou de sepsis et enrichissent les connaissances sur des maladies en pleine expansion dans le monde notamment en ciblant les molécules d'intérêt que nous avons étudiées : en augmentant l'expression des récepteurs hépatiques aux lipoprotéines (LRP, SR-B1) ou encore en ciblant directement l'activité de la LPL ou l'expression de ses cofacteurs (notamment apoCII et apoCIII).

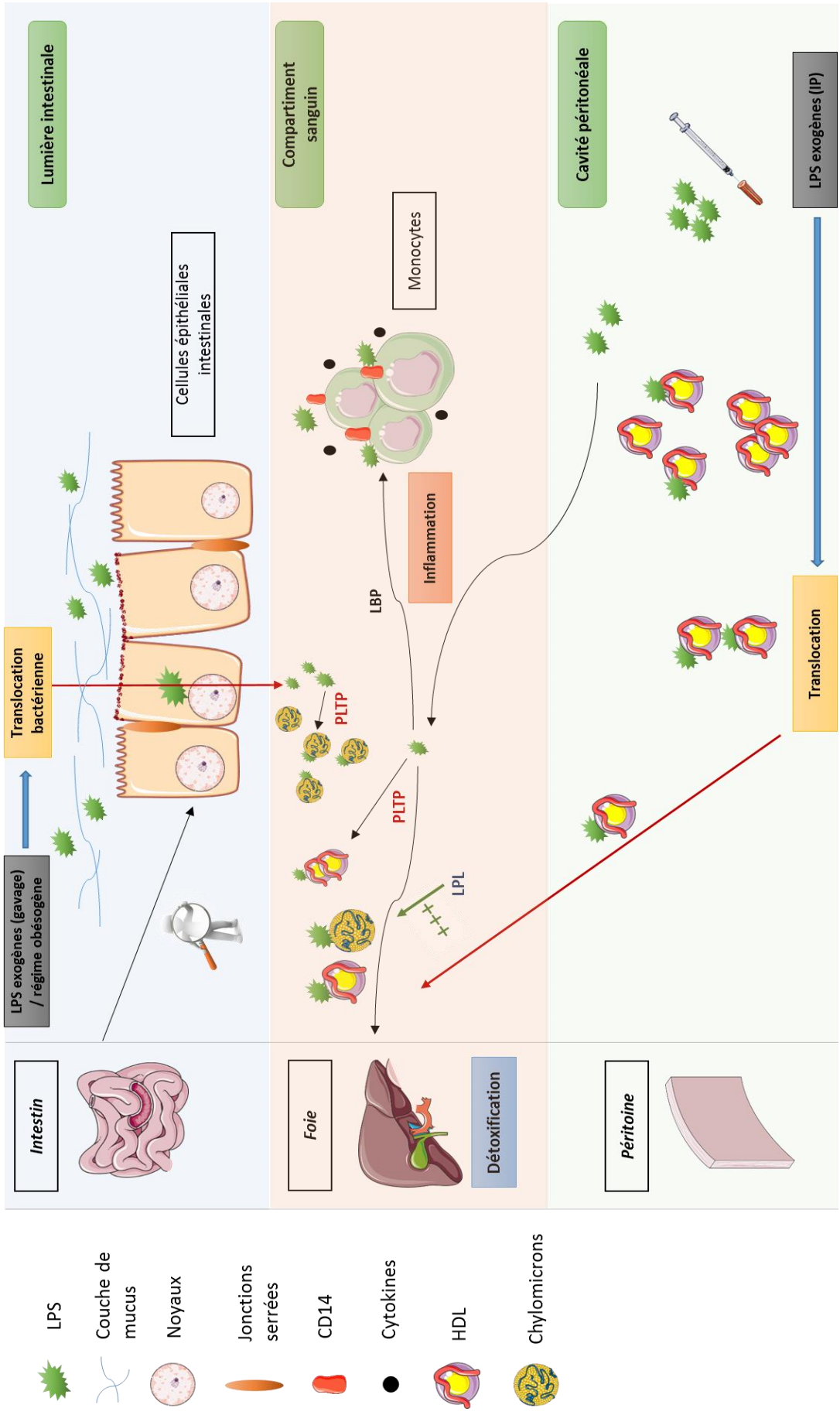


Figure 30. Vue d'ensemble des travaux de thèse (modèle obésité et modèle péritonite).

LPL : Lipoprotéine lipase ; PLTP : protéine de transfert des phospholipides ; LBP :Lipopolysacharide-binding protein ; LPS : Lipopolysaccharides ; HDL : High-density lipoprotein ; CD14 : Cluster of differentiation 14.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aagaard, K., J. Ma, K. M. Antony, R. Ganu, J. Petrosino, and J. Versalovic. 2014. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci. Transl. Med.* **6**.

Abbasi, A., G. M. Dallinga-Thie, and R. P. F. Dullaart. 2014. Phospholipid transfer protein activity and incident type 2 diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta*. **439**: 38–41.

Abrams GD, Bauer H & Sprinz H. 1963. Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* **12:** 355–364.

Acosta, A., and M. Camilleri. 2014. Gastrointestinal morbidity in obesity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1311**: 42–56.

Adams, R. B., S. M. Planchon, and J. K. Roche. 1993. IFN-gamma modulation of epithelial barrier function. Time course, reversibility, and site of cytokine binding. *J. Immunol.* **150**: 2356–63.

Ahrén, B. 2011. GLP-1 for type 2 diabetes. *Exp. Cell Res.* **317**: 1239–1245.

Al-Sadi, R., S. Guo, K. Dokladny, M. A. Smith, D. Ye, A. Kaza, D. M. Watterson, and T. Y. Ma. 2012. Mechanism of Interleukin-1β induced-increase in mouse intestinal permeability in vivo. *J. Interf. Cytokine Res.* **32**: 474–484.

Assimakopoulos, S. F., C. D. Scopa, and C. E. Vagianos. 2007. Pathophysiology of increased intestinal permeability in obstructive jaundice. *World J. Gastroenterol.* **13**: 6458.

B

Bäckhed, F., H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, Y. K. Gou, A. Nagy, C. F. Semenkovich, and J. I. Gordon. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 15718–15723.

Baggiolini, M., and P. Loetscher. 2000. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol. Today*. **21**: 418–420.

Baumgart, D.C. y Dignass, A. U. 2002. Intestinal barrier function. Current Opinion in Clinical. *Nutr. Metab. Care*. **5**: 685–694.

Barnig, C. 2016. Pro-resolving lipid mediators in allergic inflammation. *Rev. Fr. Allergol.* **56**: 38–42.

Bates, J. M., J. Akerlund, E. Mittge, and K. Guillemin. 2007. Intestinal Alkaline Phosphatase Detoxifies Lipopolysaccharide and Prevents Inflammation in Zebrafish in Response to the Gut Microbiota. *Cell Host Microbe*. **2**: 371–382.

Beamer, L. J. 1997. Crystal Structure of Human BPI and Two Bound Phospholipids at 2.4 Angstrom Resolution. *Science.* **276**: 1861–1864.

Beisiegel, U., W. Weber, and G. Bengtsson-Olivecrona. 1991. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 8342–8346.

Belhaj Salah, N., W. Marrakchi, I. Kooli, A. Toumi, A. Aouam, and M. Chakroun. 2020. Spécificités des bactériémies chez les diabétiques. *Ann. Endocrinol. (Paris).* **81**: 431.

Bennett, M., and D. W. Gilroy. 2016. Lipid Mediators in Inflammation. *Microbiol. Spectr.* **4**.

Birkedal-Hansen, H. 1993. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J. Periodontal Res.* **28**: 500–510. .

Bivar Xavier, K. 2018. Bacterial interspecies quorum sensing in the mammalian gut microbiota. *Comptes Rendus - Biol.* **341**: 297–299.

Bossé, Y., L. Bouchard, J. P. Després, C. Bouchard, L. Pérusse, and M. C. Vohl. 2005. Haplotypes in the phospholipid transfer protein gene are associated with obesity-related phenotypes: The Québec Family Study. *Int. J. Obes.* **29**: 1338–1345.

Bouchard, C. 1991. Current understanding of the etiology of obesity : genetic and nongenetic factors. *Am. Soc. Clin. Nutr.* **53**: 1561S-1565S.

Boussiotis, V. A., L. M. Nadler, J. L. Strominger, and A. E. Goldfeld. 1994. Tumor necrosis factor α is an autocrine growth factor for normal human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 7007–7011.

Brandenburg, K., A. B. Schromm, and T. Gutsmann. 2010. Endotoxins: Relationship between structure, function, and activity. *Subcell. Biochem.* **53**: 53–67.

Brehm, A., P. Geraghty, M. Campos, I. Garcia-Arcos, A. J. Dabo, A. Gaffney, E. Eden, X. C. Jiang, J. D'Armiento, and R. Foronjy. 2014. Cathepsin G degradation of phospholipid transfer protein (PLTP) augments pulmonary inflammation. *FASEB J.* **28**: 2318–2331.

Brown, C. D., M. Higgins, K. A. Donato, F. C. Rohde, R. Garrison, E. Obarzanek, N. D. Ernst, and M. Horan. 2000. Body mass index and the prevalence of hypertension and dyslipidemia. *Obesity Research*. **8**: 605–619.

Buts, J. -P, V. Vijverman, C. Barudi, N. De Keyser, P. Maldague, and C. Dive. 1990. Refeeding after starvation in the rat: comparative effects of lipids, proteins and carbohydrates on jejunal and ileal mucosal adaptation. *Eur. J. Clin. Invest.* **20**: 441–452.

Buttenschoen, K., P. Radermacher, and H. Bracht. 2010. Endotoxin elimination in sepsis: Physiology and therapeutic application. *Langenbeck's Arch. Surg.* **395**: 597–605.

C

Calle, M. C., and M. L. Fernandez. 2012. Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes and Metabolism*. **38**: 183–191.

Cani, P. D., J. Amar, M. A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A. M. Neyrinck, F. Fava, K. M. Tuohy, C. Chabo, T. Sulpice, B. Chamontin, G. R. Gibson, L. Casteilla, N. M. Delzenne, and M. C. Alessi. 2007. *Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance*. **56**: 1761–1772.

Cani, P. D., N. M. Delzenne, J. Amar, and R. Burcelin. 2008. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathol. Biol.* **56**: 305–309.

Cao, S., Q. Zhang, C. C. Wang, H. Wu, L. Jiao, Q. Hong, and C. Hu. 2018. LPS challenge increased intestinal permeability, disrupted mitochondrial function and triggered mitophagy of piglets. *Innate Immun.* **24**: 221–230.

Caroff, M., D. Karibian, J. M. Cavaillon, and N. Haeffner-Cavaillon. 2002. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* **4**: 915–926.

Cavaillon, J. M., C. Fitting, N. Haeffner-Cavaillon, S. J. Kirsch, and H. S. Warren. 1990. Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **58**: 2375–2382.

Cebra, J. J. 1999. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**: 1046s-1051s.

Ceciliani, F., A. Giordano, and V. Spagnolo. 2005. The Systemic Reaction During Inflammation: The Acute-Phase Proteins. *Protein Pept. Lett.* **9**: 211–223.

Cecconi, M., L. Evans, M. Levy, and A. Rhodes. 2018. Sepsis and septic shock. *Lancet*. **392**: 75–87.

Chaby, R. 2004. Lipopolysaccharide-binding molecules: Transporters, blockers and sensors. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**: 1697–1713.

Chai, Z., S. Gatti, C. Toniatti, V. Poli, and T. Bartfai. 1996. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1β: A study on IL-6-deficient mice. *J. Exp. Med.* **183**: 311–316.

Chait, A., and L. J. den Hartigh. 2020. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* **7**: 22.

Champe, C, Richard A. Harvey, Denise R. Ferrier. Book, Biochemistry, 2005.

Chavez, J. A., and S. A. Summers. 2012. A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab.* **15**: 585–594.

Chen, X., A. Sun, Y. Zou, J. Ge, H. Kamran, X. C. Jiang, and J. M. Lazar. 2013. High PLTP activity is associated with depressed left ventricular systolic function. *Atherosclerosis*. **228**: 438–442.

Chen, M., H. Huang, P. Zhou, J. Zhang, Y. Dai, D. Yang, X. Fan, and H. Pan. 2019. Oral phosphatidylcholine improves intestinal barrier function in drug-induced liver injury in rats. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2019**.

Choque Delgado, G. T., and W. M. da S. C. Tamashiro. 2018. Role of prebiotics in regulation of microbiota and prevention of obesity. *Food Res. Int.* **113**: 183–188.

Choudhary, V., S. Griffith, X. Chen, and W. B. Bollag. 2020. Erratum: Pathogen-associated molecular pattern-induced TLR2 and TLR4 activation increases keratinocyte production of inflammatory mediators and is inhibited by phosphatidylglycerol (Mol Pharmacol (2020) 97 (324-335) DOI: 10.1124/mol.119.118166). *Mol. Pharmacol.* **97**: 354.

Collado, M. C., S. Rautava, J. Aakko, E. Isolauri, and S. Salminen. 2016. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci. Rep.* **6**: 1–13.

Cornick, S., A. Tawiah, and K. Chadee. 2015. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers*. **3**.

Corkey, B. E. 2012. Diabetes: Have we got it all wrong? Insulin hypersecretion and food additives: Cause of obesity and diabetes? *Diabetes Care*. **35**: 2432–2437.

Corr, S. C., C. C. G. M. Gahan, and C. Hill. 2008. M-cells: Origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52**: 2–12.

Crusio, W. E., and H. H. Radeke. 2020. Lipid Transfer in Lipoprotein Metabolism and Cardiovascular Disease. 6082-8.

Cvijanovic, N., N. J. Isaacs, C. K. Rayner, C. Feinle-Bisset, R. L. Young, and T. J. Little. 2017. Lipid stimulation of fatty acid sensors in the human duodenum: Relationship with gastrointestinal hormones, BMI and diet. *Int. J. Obes.* **41**: 233–239.

D

Dalmas E, Rouault C, Abdennour M, Rovere C, Rizkalla S, Bar-Hen A, Nahon JL, Bouillot JL, Guerre-Millo M, Clément K, P. C. 2011. Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am. J. Clin. Nutr.* **94**: 450–458.

Deckert, V., B. Kretz, A. Habbout, K. Raghay, J. Labbé, N. Abello, C. Desrumaux, T. Gautier, S. Lemaire-Ewing, G. Maquart, N. Le Guern, D. Masson, E. Steinmetz, and L. Lagrost. 2013. Development of abdominal aortic aneurysm is decreased in mice with plasma phospholipid transfer protein deficiency. *Am. J. Pathol.* **183**: 975–986.

Deckert, V., S. Lemaire, P. J. Ripoll, J. P. P. De Barros, J. Labbé, C. C. Le Borgne, V. Turquois, G. Maquart, D. Larose, N. Desroche, F. Ménétrier, N. Le Guern, L. J. Lebrun, C. Desrumaux, T. Gautier, J. Grober, C. Thomas, D. Masson, L. M. Houdebine, and L. Lagrost. 2017. Recombinant human plasma phospholipid transfer protein (PLTP) to prevent bacterial growth and to treat sepsis. *Sci. Rep.* **7**: 1–16.

Demignot, S., F. Beilstein, and E. Morel. 2014. Triglyceride-rich lipoproteins and cytosolic lipid droplets in enterocytes: Key players in intestinal physiology and metabolic disorders. *Biochimie*. **96**: 48–55.

De Mello, V. D. F., M. Lankinen, U. Schwab, M. Kolehmainen, S. Lehto, T. Seppänen-Laakso, M. Orešič, L. Pulkkinen, M. Uusitupa, and A. T. Erkkilä. 2009. Link between plasma ceramides, inflammation and insulin resistance: Association with serum IL-6 concentration in patients with coronary heart disease. *Diabetologia*. **52**: 2612–2615.

De Vries, R., G. M. Dallinga-Thie, A. J. Smit, B. H. R. Wolffenbuttel, A. Van Tol, and R. P. F. Dullaart. 2006. Elevated plasma phospholipid transfer protein activity is a determinant of carotid intima-media thickness in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. **49**: 398–404.

Desrumaux, C., V. Deckert, A. Athias, D. Masson, G. Lizard, V. Palleau, P. Gambert, and L. Lagrost. 1999. Plasma phospholipid transfer protein prevents vascular endothelium dysfunction by delivering α-tocopherol to endothelial cells. *FASEB J.* **13**: 883–892.

Desrumaux, C., V. Deckert, S. Lemaire-Ewing, C. Mossiat, A. Athias, D. Vandroux, L. Dumont, S. Monier, J. P. Pais De Barros, A. Klein, E. De Maistre, D. Blache, A. Beley, C. Marie, P. Garnier, and L. Lagrost. 2010. Plasma phospholipid transfer protein deficiency in mice is associated with a reduced thrombotic response to acute intravascular oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**: 2452–2457.

Dey, I., and N. A. Bradbury. 2018. Physiology of the Gut: Experimental Models for Investigating Intestinal Fluid and Electrolyte Transport. *Curr. Top. Membr.* **81**: 337–381.

Ding, S., and P. K. Lund. Role of intestinal inflammation as an early event in obesity and insulin resistance. 2011*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **14** :328–333.

Dullaart, R. P. F., W. J. Sluiter, L. D. Dikkeschel, K. Hoogenberg, and A. Van Tol. 1994. Effect of adiposity on plasma lipid transfer protein activities: a possible link between insulin resistance and high density lipoprotein metabolism. *Eur. J. Clin. Invest.* **24**: 188–194.

Dullaart, R. P. F., R. de Vries, G. M. Dallinga-Thie, A. van Tol, and W. J. Sluiter. 2007. Plasma cholesteryl ester transfer protein mass and phospholipid transfer protein activity are associated with leptin in type 2 diabetes mellitus. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. **1771**: 113–118.

Dullaart, R. P. F., A. van Tol, and G. M. Dallinga-Thie. 2013. Phospholipid transfer protein, an emerging cardiometabolic risk marker: Is it time to intervene? *Atherosclerosis*. **228**: 38–41.

Dusuel, A., V. Deckert, J. P. P. De Barros, K. Van Dongen, H. Choubley, É. Charron, N. Le Guern, J. Labbé, S. Mandard, J. Grober, L. Lagrost, and T. Gautier. 2021. Human cholesteryl ester transfer protein lacks lipopolysaccharide transfer activity, but worsens inflammation and sepsis outcomes in mice. *J. Lipid Res.* **62**: 100011.

E

Ellis, T. N., and M. J. Kuehn. 2010. Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**: 81–94.

Ellulu, M. S., I. Patimah, H. Khaza'ai, A. Rahmat, and Y. Abed. 2017. Obesity & inflammation: The linking mechanism & the complications. *Arch. Med. Sci.* **13**: 851–863.

Eschwege, E., A. Basdevant, A. Crine, C. Moisan, and M. A. Charles. 2015. Type 2 diabetes mellitus in France in 2012: Results from the ObEpi survey. *Diabetes Metab.* **41**: 55–61.

Even, P. C., and N. A. Nadkarni. 2012. Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: Principles, practical considerations, interpretation and perspectives. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **303**: 459–476.

Everard, A., and P. D. Cani. 2014. Gut microbiota and GLP-1. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **15**: 189–196.

Emancipator, K., G. Csako, and R. J. Elin. 1991. In vitro inactivation of bacterial endotoxin by human lipoproteins and apolipoproteins. *Infect. Immun.* **60**: 596–601.

F

Fasano, A., and T. Shea-Donohue. 2005. Mechanisms of disease: The role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **2**: 416–422.

Ferroni, P., S. Basili, A. Falco, and G. Davì. 2004. Inflammation, insulin resistance, and obesity. *Curr. Atheroscler. Rep.* **6**: 424–431.

Flint, H. J., K. P. Scott, P. Louis, and S. H. Duncan. 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **9**: 577–589.

Fourcade, O., M. F. Simon, C. Viodé, N. Rugani, F. Leballe, A. Ragab, B. Fournié, L. Sarda, and H. Chap. 1995. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell*. **80**: 919–927.

Fox, E. S., P. Thomas, and S. A. Broitman. 1990. Hepatic mechanisms for clearance and detoxification of bacterial endotoxins. *J. Nutr. Biochem.* **1**: 620–628.

Franks, P. W., R. L. Hanson, W. C. Knowler, M. L. Sievers, P. H. Bennett, and H. C. Looker. 2010. Childhood Obesity, Other Cardiovascular.

G

Gautier, T., A. Klein, V. Deckert, C. Desrumaux, N. Ogier, A. L. Sberna, C. Paul, N. Le Guern, A. Athias, T. Montange, S. Monier, F. Piard, X. C. Jiang, D. Masson, and L. Lagrost. 2008.

Gautier, T., and L. Lagrost. 2011. Plasma PLTP (phospholipid-transfer protein): An emerging role in “reverse lipopolysaccharide transport” and innate immunity. *Biochem. Soc. Trans.* **39**: 984–988.

Genser, L., D. Aguanno, H. A. Soula, L. Dong, L. Trystram, K. Assmann, J. E. Salem, J. C. Vaillant, J. M. Oppert, F. Laugerette, M. C. Michalski, P. Wind, M. Rousset, E. Brot-Laroche, A. Leturque, K. Clément, S. Thenet, and C. Poitou. 2018. Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes. *J. Pathol.* **246**: 217–230.

Gerbe, F., C. Legraverend, and P. Jay. 2012. The intestinal epithelium tuft cells: Specification and function. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**: 2907–2917.

Ghosh, S. S., J. Wang, P. J. Yannie, and S. Ghosh. 2020. Intestinal barrier dysfunction, LPS translocation, and disease development. *J. Endocr. Soc.* **4**.

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

Gibaldi, M., R. N. Boyes, and S. Feldman. 1971. Influence of first-pass effect on availability of drugs on oral administration. *J. Pharm. Sci.* **60**: 1338–1340.

Gioannini, T. L., D. S. Zhang, A. Teghanemt, and J. P. Weiss. 2002. An essential role for albumin in the interaction of endotoxin with lipopolysaccharide-binding protein and sCD14 and resultant cell activation. *J. Biol. Chem.* **277**: 47818–47825.

Gioannini, T. L., A. Teghanemt, D. Zhang, E. N. Levis, and J. P. Weiss. 2005. Monomeric endotoxin:protein complexes are essential for TLR4-dependent cell activation. *Journal of Endotoxin Research*. **11**: 117–123.

Gotto, A. M. 1990. Interrelationship of triglycerides with lipoproteins and high-density lipoproteins. *Am. J. Cardiol.* **66**: A20–A23.

Guerville, M., and G. Boudry. 2016. Gastrointestinal and hepatic mechanisms limiting entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physio. 2016*. **311**: G1–G15.

Grainger, J. R., J. E. Konkel, T. Zangerle-Murray, and T. N. Shaw. 2017. Macrophages in gastrointestinal homeostasis and inflammation. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **469**: 527–539.

Gribble, F. M., and F. Reimann. 2016. Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* **78**: 277–299.

Gutsmann, T., M. Müller, S. F. Carroll, R. C. MacKenzie, A. Wiese, and U. Seydel. 2001. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infection and Immunity*. **69**: 6942–6950.

Gutsmann, T., N. Haberer, S. F. Carroll, U. Seydel, and A. Wiese. 2001. Interaction between lipopolysaccharide (LPS), LPS-binding protein (LBP), and planar membranes. *Biol. Chem.* **382**: 425–434.

H

Haq, S., J. Grondin, S. Banskota, and W. I. Khan. 2019. Autophagy: Roles in intestinal mucosal homeostasis and inflammation. *J. Biomed. Sci.* **26**: 1–14.

Hagar, J. A., D. A. Powell, Y. Aachoui, R. K. Ernst, and E. A. Miao. 2013. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: Implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science*. **341**: 1250–1253.

Hailman, E., H. S. Lichenstein, M. M. Wurfel, D. S. Miller, D. A. Johnson, M. Kelley, L. A. Busse, M. M. Zukowski, and S. D. Wright. 1994. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J. Exp. Med.* **179**: 269–277.

Hailman, E., J. J. Albers, G. Wolfbauer, A. Y. Tu, and S. D. Wright. 1996. Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein. *J. Biol. Chem.* **271**: 12172–12178.

Hall, K. D., A. Ayuketah, R. Brychta, H. Cai, T. Cassimatis, K. Y. Chen, S. T. Chung, E. Costa, A. Courville, V. Darcey, L. A. Fletcher, C. G. Forde, A. M. Gharib, J. Guo, R. Howard, P. V. Joseph, S. McGehee, R. Ouwerkerk, K. Raisinger, I. Rozga, M. Stagliano, M. Walter, P. J. Walter, S. Yang, and M. Zhou. 2019. Ultra-Processed Diets Cause Excess Calorie Intake and Weight Gain: An Inpatient Randomized Controlled Trial of Ad Libitum Food Intake. *Cell Metab.* **30**: 67-77.e3.

Han, J., J. C. Mathison, R. J. Ulevitch, and P. S. Tobias. 1994. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein, truncated at Ile-197, binds LPS but does not transfer LPS to CD14. *J. Biol. Chem.* **269**: 8172–8175.

Harris, M. A., C. A. Reddy, and G. R. Carter. 1976. Anaerobic bacteria from the large intestine of mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 907–912.

Harris, H. W., C. Grunfeld, K. R. Feingold, and J. H. Rapp. 1990. Human very low density lipoproteins and chylomicrons can protect against endotoxin-induced death in mice. *J. Clin. Invest.* **86**: 696–702.

Havel, R. J. 1986. Functional Activities of Hepatic Lipoprotein Receptors. *Annu. Rev. Physiol.* **48**: 119–134.

Heeren, J., A. Niemeier, M. Merkel, and U. Beisiegel. 2002. Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *J. Mol. Med.* **80**: 576–584.

Holst, J. J. 2007. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol. Rev.* **87**: 1409–1439.

Hu, C. A. A., Y. Hou, D. Yi, Y. Qiu, G. Wu, X. Kong, and Y. Yin. 2015. Autophagy and tight junction proteins in the intestine and intestinal diseases. *Anim. Nutr.* **1**: 123–127.

Holthöfer, B., R. Windoffer, S. Troyanovsky, and R. E. Leube. 2007. Structure and Function of Desmosomes. *Int. Rev. Cytol.* **264**: 65–163.

Huurre, A., M. Kalliomäki, S. Rautava, M. Rinne, S. Salminen, and E. Isolauri. 2008. Mode of delivery - Effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology*. **93**: 236–240.

Huuskonen, J., and C. Ehnholm. 2000. Phospholipid transfer protein in lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* **11**: 285–289.

J

Jiang, X. C., C. Bruce, J. Mar, M. Lin, Y. Ji, O. L. Francone, and A. R. Tall. 1999. Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J. Clin. Invest.* **103**: 907–914.

Jiang, X. C., S. Qin, C. Qiao, K. Kawano, M. Lin, A. Skold, X. Xiao, and A. R. Tall. 2001. Apolipoprotein B secretion and atherosclerosis are decreased in mice with phospholipid-transfer protein deficiency. *Nat. Med.* **7**: 847–852.

Jiang, X. C., and Y. Yu. 2021. The Role of Phospholipid Transfer Protein in the Development of Atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **23**: 1–9.

K

Kagan, J. C., T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira, and R. Medzhitov. 2008. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-β. *Nature Immunology*. **9**: 361–368.

Kahles, F., C. Meyer, J. Möllmann, S. Diebold, H. M. Findeisen, C. Lebherz, C. Trautwein, A. Koch, F. Tacke, N. Marx, and M. Lehrke. 2014. GLP-1 Secretion Is Increased by Inflammatory Stimuli

in an IL-6-Dependent Manner, Leading to Hyperinsulinemia and Blood Glucose Lowering. *Diabetes*. **63**: 3221–3229.

Kallus, S. J., and L. J. Brandt. 2012. The intestinal microbiota and obesity. *J. Clin. Gastroenterol.* **46**: 16–24.

Kalopissis, A. D., S. Griglio, M. I. Malewiak, and R. Rozen. 1980. Effect of a high-fat diet on rat very low density lipo-protein secretion. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **620**: 111–119.

Karasov, W. H. 2017. Integrative physiology of transcellular and paracellular intestinal absorption. *J. Exp. Biol.* **220**: 2495–2501.

Kathiresan, S., C. J. Willer, G. M. Peloso, S. Demissie, K. Musunuru, E. E. Schadt, L. Kaplan, D. Bennett, Y. Li, T. Tanaka, B. F. Voight, L. L. Bonnycastle, A. U. Jackson, G. Crawford, A. Surti, C. Guiducci, N. P. Burtt, S. Parish, R. Clarke, D. Zelenika, K. A. Kubalanza, M. A. Morken, L. J. Scott, H. M. Stringham, P. Galan, A. J. Swift, J. Kuusisto, R. N. Bergman, J. Sundvall, M. Laakso, L. Ferrucci, P. Scheet, S. Sanna, M. Uda, Q. Yang, K. L. Lunetta, J. Dupuis, P. I. W. De Bakker, C. J. O'Donnell, J. C. Chambers, J. S. Kooner, S. Hercberg, P. Meneton, E. G. Lakatta, A. Scuteri, D. Schlessinger, J. Tuomilehto, F. S. Collins, L. Groop, D. Altshuler, et al. 2009. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat. Genet.* **41**: 56–65.

Katz, S. L., J. E. MacLean, L. Hoey, L. Horwood, N. Barrowman, B. Foster, S. Hadjiyannakis, L. Legault, G. N. Bendiak, V. G. Kirk, and E. Constantin. 2017. Insulin resistance and hypertension in obese youth with sleep-disordered breathing treated with positive airway pressure: A prospective multicenter study. *Journal of Clinical Sleep Medicine*. **13**: 1039–1047.

Kazafeos, K. 2011. Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **93**: S32–S36.

Kesty, N. C., and M. J. Kuehn. 2004. Incorporation of Heterologous Outer Membrane and Periplasmic Proteins into Escherichia coli Outer Membrane Vesicles. *Journal of Biological Chemistry*. **279**: 2069–2076.

Kim, Y. S., and S. B. Ho. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **12**: 319–330.

Kim, K. A., W. Gu, I. A. Lee, E. H. Joh, and D. H. Kim. 2012. High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway. *PLoS One*. **7**.

Kindel, T., D. M. Lee, and P. Tso. 2010. The mechanism of the formation and secretion of chylomicrons. *Atheroscler. Suppl.* **11**: 11–16.

Kirschning, C. J., J. Au-Young, N. Lamping, D. Reuter, D. Pfeil, J. J. Seilhamer, and R. R. Schumann. 1997. Similar organization of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and phospholipid transfer protein (PLTP) genes suggests a common gene family of lipid-binding proteins. *Genomics*. **46**: 416–425.

Knop, F. K., K. Aaboe, T. Vilsbøll, A. Vølund, J. J. Holst, T. Krarup, and S. Madsbad. 2012. Impaired incretin effect and fasting hyperglucagonaemia characterizing type 2 diabetic subjects are early signs of dysmetabolism in obesity. *Diabetes, Obes. Metab.* **14**: 500–510.

Komarova, Y., and A. B. Malik. 2009. Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annu. Rev. Physiol.* **72**: 463–493.

Kwon, Y. 2020. Immuno-Resolving Ability of Resolvins, Protectins, and Maresins Derived from Omega-3 Fatty Acids in Metabolic Syndrome. *Mol. Nutr. Food Res.* **64**: 1900824.

ℒ

Labbé, K., J. Miu, G. Yeretssian, L. Serghides, M. Tam, C. A. Finney, L. K. Erdman, M.-L. Goulet, K. C. Kain, M. M. Stevenson, and M. Saleh. 2010. Caspase-12 Dampens the Immune Response to Malaria Independently of the Inflammasome by Targeting NF-κB Signaling. *The Journal of Immunology*. **185**: 5495–5502.

Labeta, M. O., J. -J Durieux, N. Fernandez, R. Herrmann, and P. Ferrara. 1993. Release from a human monocyte-like cell line of two different soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14. *Eur. J. Immunol.* **23**: 2144–2151.

Lagrost, L., C. Desrumaux, D. Masson, V. Deckert, and P. Gambert. 1998. Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. *Curr. Opin. Lipidol.* **9**: 203–209.

Laugerette, F., C. Vors, N. Peretti, and M. C. Michalski. 2011. Complex links between dietary lipids, endogenous endotoxins and metabolic inflammation. *Biochimie*. **93**: 39–45.

Larsen, C. M., M. Faulenbach, A. Vaag, A. Vølund, J. A. Ehses, B. Seifert, T. Mandrup-Poulsen, and M. Y. Donath. 2007. Interleukin-1–Receptor Antagonist in Type 2 Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.* **356**: 1517–1526.

Laskin, D. L. 2009. Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: A battle of forces. *Chem. Res. Toxicol.* **22**: 1376–1385.

Le Roy, T., J. Debédat, F. Marquet, C. Da-Cunha, F. Ichou, M. Guerre-Millo, N. Kapel, J. Aron-Wisnewsky, and K. Clément. 2019. Comparative evaluation of microbiota engraftment following fecal microbiota transfer in mice models: Age, kinetic and microbial status matter. *Front. Microbiol.* **10**: 3289.

Lebrun, L. J., K. Lenaerts, D. Kiers, J. P. Pais de Barros, N. Le Guern, J. Plesnik, C. Thomas, T. Bourgeois, C. H. C. Dejong, M. Kox, I. H. R. Hundscheid, N. A. Khan, S. Mandard, V. Deckert, P. Pickkers, D. J. Drucker, L. Lagrost, and J. Grober. 2017. Enteroendocrine L Cells Sense LPS after Gut Barrier Injury to Enhance GLP-1 Secretion. *Cell Rep.* **21**: 1160–1168.

Lebrun L. LPS et GLP-1: des mécanismes moléculaires à la physiopathologie. Published online 2016.

Levels, J. H. M., P. R. Abraham, A. Van den Ende, and S. J. H. Van Deventer. 2001. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin. *Infect. Immun.* **69**: 2821–2828.

Levi, M., and T. Van Der Poll. 2005. Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc. Med.* **15**: 254–259.

Li, Q., M. Yuan, X. Jiao, M. Ji, Y. Huang, J. Li, D. Li, and G. Wang. 2021. Metabolite profiles in the peritoneal cavity of endometriosis patients and mouse models. *Reprod. Biomed. Online*.

Lin, K. M., W. Hu, T. D. Troutman, M. Jennings, T. Brewer, X. Li, S. Nanda, P. Cohen, J. A. Thomas, and C. Pasare. 2014. IRAK-1 bypasses priming and directly links TLRs torapid NLRP3 inflammasome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 775–780.

Lingwood, D., and K. Simons. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*. **327**: 46–50.

Lu, Y. C., W. C. Yeh, and P. S. Ohashi. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. **42**: 145–151.

Lu, M., and R. S. Munford. 2011. The Transport and Inactivation Kinetics of Bacterial Lipopolysaccharide Influence Its Immunological Potency In Vivo. *J. Immunol.* **187**: 3314–3320.

Lüderitz, O., M. A. Freudenberg, C. Galanos, V. Lehmann, E. T. Rietschel, and D. H. Shaw. 1982. Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria. *Curr. Top. Membr. Transp.* **17**: 79–151.

M

Ma, T. Y., G. K. Iwamoto, N. T. Hoa, V. Akotia, A. Pedram, M. A. Boivin, and H. M. Said. 2004. TNF-α-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-κB activation. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **286**.

MacGlashan, D. 2003. Histamine: A mediator of inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **112**: S53–S59.

Mackie, R. I., A. Sghir, and H. R. Gaskins. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**: 1035s-1045s.

Madara, J. L., and J. R. Pappenheimer. 1987. Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. *J. Membr. Biol.* **100**: 149–164.

Madsbad, S. 2014. The role of glucagon-like peptide-1 impairment in obesity and potential therapeutic implications. *Diabetes, Obes. Metab.* **16**: 9–21.

Madsen, K. L., D. Malfair, D. Gray, J. S. Doyle, L. D. Jewell, and R. N. Fedorak. 1999. Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm. Bowel Dis.* **5**: 262–270.

Magalhaes, I., K. Pingris, C. Poitou, S. Bessoles, N. Venteclef, B. Kiaf, L. Beaudoin, J. Da Silva, O. Allatif, J. Rossjohn, L. Kjer-Nielsen, J. McCluskey, S. Ledoux, L. Genser, A. Torcivia, C. Soudais, O. Lantz, C. Boitard, J. Aron-Wisnewsky, E. Larger, K. Clément, and A. Lehuen. 2015. Mucosal-associated invariant T cell alterations in obese and type 2 diabetic patients. *J. Clin. Invest.* **125**: 1752–1762.

Matikainen, S., T. A. Nyman, and W. Cypryk. 2020. Function and Regulation of Noncanonical Caspase-4/5/11 Inflammasome. *J. Immunol.* **204**: 3063–3069.

Mändar, R., and M. Mikelsaar. 1996. Transmission of mother's microflora to the newborn at birth. *Neonatology*. **69**: 30–35.

Mankertz, J., M. Amasheh, S. M. Krug, A. Fromm, S. Amasheh, B. Hillenbrand, S. Tavalali, M. Fromm, and J. D. Schulzke. 2009. TNFα up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell Tissue Res.* **336**: 67–77.

Martinon, F., and J. Tschopp. 2007. Inflammatory caspases and inflammasomes: Master switches of inflammation. *Cell Death and Differentiation*. **14**: 10–22.

Martins, I. J., B. C. Mortimer, J. Miller, and T. G. Redgrave. 1996. Effects of particle size and number on the plasma clearance of chylomicrons and remnants. *J. Lipid Res.* **37**: 2696–2705.

Masson, D., V. Deckert, T. Gautier, A. Klein, C. Desrumaux, C. Viglietta, J. P. Pais De Barros, N. Le Guern, J. Grober, J. Labbé, F. Ménétrier, P. J. Ripoll, M. Leroux-Coyau, G. Jolivet, L. M. Houdebine, and L. Lagrost. 2011. Worsening of diet-induced atherosclerosis in a new model of transgenic rabbit expressing the human plasma phospholipid transfer protein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**: 766–774.

Mathison, J. C., and R. J. Ulevitch. 1979. The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J. Immunol.* **123**: 2133–21343.

Mayer, E. A., K. Tillisch, and A. Gupta. 2015. Gut/brain axis and the microbiota. *J. Clin. Invest.* **125**: 926–938.

Mazmanian, S. K., and Y. K. Lee. 2014. Interplay between intestinal microbiota and host immune system. *J. Bacteriol. Virol.* **44**: 1–9.

McGuckin, M. A., R. Eri, L. A. Simms, T. H. J. Florin, and G. Radford-Smith. 2009. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**: 100–113.

Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway. 1997. A human homologue of the Drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. **388**: 394–397.

Meyer, T. A., J. Wang, G. M. Tiao, C. K. Ogle, J. E. Fischer, and P. O. Hasselgren. 1995. Sepsis and endotoxemia stimulate intestinal interleukin-6 production. *Surgery*. **118**: 336–342.

Mimura, Y., S. Sakisaka, M. Harada, M. Sata, and K. Tanikawa. 1995. Role of hepatocytes in direct clearance of lipopolysaccharide in rats. *Gastroenterology*. **109**: 1969–1976.

Mitic, L. L., C. M. Van Itallie, and J. M. Anderson. 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: Lessons from mutant animals and proteins. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **279**: 250–254.

Moreira, A. P. B., T. F. S. Texeira, A. B. Ferreira, M. Do Carmo Gouveia Peluzio, and R. De Cássia Gonçalves Alfenas. 2012. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br. J. Nutr.* **108**: 801–809.

Motshwene, P. G., M. C. Moncrieffe, J. G. Grossmann, C. Kao, M. Ayaluru, A. M. Sandercock, C. V. Robinson, E. Latz, and N. J. Gay. 2009. An Oligomeric Signaling Platform formed by the toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. *J. Biol. Chem.* **284**: 25404–25411.

Munford, R. S., and C. L. Hall. 1985. Uptake and deacylation of bacterial lipopolysaccharides by macrophages from normal and endotoxin-hyporesponsive mice. *Infect. Immun.* **48**: 464–473.

Murch, O., M. Collin, C. J. Hinds, and C. Thiemermann. 2007. Lipoproteins in inflammation and sepsis. I. Basic science. *Intensive Care Med.* **33**: 13–24.

Murdoch, S. J., M. C. Carr, J. E. Hokanson, J. D. Brunzell, and J. J. Albers. 2000. PLTP activity in premenopausal women: Relationship with lipoprotein lipase, HDL, LDL, body fat, and insulin resistance. *J. Lipid Res.* **41**: 237–244.

N

Nauck, M. A., I. Vardarli, C. F. Deacon, J. J. Holst, and J. J. Meier. 2011. Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: What is up, what is down? *Diabetologia*. **54**: 10–18.

Nagafuchi, A. 2001. Molecular architecture of adherens junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 600–603.

Netea, M. G., M. Van Deuren, B. J. Kullberg, J. M. Cavaillon, and J. W. M. Van Der Meer. 2002. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol.* **23**: 135–139.

Nguyen, A. T., S. Mandard, C. Dray, V. Deckert, P. Valet, P. Besnard, D. J. Drucker, L. Lagrost, and J. Grober. 2014. Lipopolysaccharides-mediated increase in glucose-stimulated insulin secretion: Involvement of the GLP-1 pathway. *Diabetes*. **63**: 471–482.

O

O'Hara, A. M., and F. Shanahan. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* **7**: 688–693.

Ohto, U., K. Fukase, K. Miyake, and T. Shimizu. 2012. Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **109**: 7421–7426.

Otte, J. M., E. Cario, and D. K. Podolsky. 2004. Mechanisms of Cross Hyporesponsiveness to Toll-Like Receptor Bacterial Ligands in Intestinal Epithelial Cells. *Gastroenterology*. **126**: 1054–1070.

Ottman, N., H. Smidt, W. M. de Vos, and C. Belzer. 2012. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**: 104.

P

Park, J.-E., Y.-I. Kim, and A.-K. Yi. 2009. Protein Kinase D1 Is Essential for MyD88Dependent TLR Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*. **182**: 6316–6327.

Pasini, E., G. Corsetti, D. Assanelli, C. Testa, C. Romano, F. S. Dioguardi, and R. Aquilani. 2019. Effects of chronic exercise on gut microbiota and intestinal barrier in human with type 2 diabetes. *Minerva Med.* **110**: 3–11.

Pereira, S. S., and J. I. Alvarez-Leite. 2014. Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes. *Curr. Obes. Rep.* **3**: 422–431.

Pellegrini, M., V. Ponzo, R. Rosato, E. Scumaci, I. Goitre, A. Benso, S. Belcastro, C. Crespi, F. De Michieli, E. Ghigo, F. Broglio, and S. Bo. 2020. Changes in weight and nutritional habits in

adults with obesity during the “lockdown” period caused by the COVID-19 virus emergency. *Nutrients*. **12**: 1–11.

Petit, V., L. Arnould, P. Martin, M. C. Monnot, T. Pineau, P. Besnard, and I. Niot. 2007. Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. *J. Lipid Res.* **48**: 278–287.

Poelstra, K., W. W. Bakker, P. A. Klok, J. A. A. M. Kamps, M. J. Hardonk, and D. K. F. Meijer. 1997. Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo. *Am. J. Pathol.* **151**: 1163–1169.

Puder, J. J., and S. Munsch. 2010. Psychological correlates of childhood obesity. *International Journal of Obesity*. **34**: S37–S43.

R

Rajilić-Stojanović, M., H. Smidt, and W. M. De Vos. 2007. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ. Microbiol.* **9**: 2125–2136.

Rakoff-Nahoum, S., and R. Medzhitov. 2008. Innate immune recognition of the indigenous microbial flora. *Mucosal Immunol.* **1**: 10–14.

Rao, R., J. J. Albers, G. Wolfbauer, and H. J. Pownall. 1997. Molecular and macromolecular specificity of human plasma phospholipid transfer protein. *Biochemistry*. **36**: 3645–3653.

Raven, PH, GB Johnson, KA Mason, JB Losos, and RS Singer. 2014. *Biologie | De Boeck Supérieur*.

Redon Do-Lopez, V., C. Meriwether, C. Schmitt, M. Opitz, R. Cook, and J. D. Sobel. 1990. Vulvovaginal candidiasis complicating recurrent bacterial vaginosis. *Sex. Transm. Dis.* **17**: 51–53.

Resman, N., J. Vašl, A. Oblak, P. Pristovšek, T. L. Gioannini, J. P. Weiss, and R. Jerala. 2009. Essential roles of hydrophobic residues in both MD-2 and toll-like receptor 4 in activation by endotoxin. *Journal of Biological Chemistry*. **284**: 15052–15060.

Rho, S. S., K. Ando, and S. Fukuhara. 2017. Dynamic regulation of vascular permeability by vascular endothelial cadherin-mediated endothelial cell-cell junctions. *J. Nippon Med. Sch.* **84**: 148–159.

Ridker, P. M., C. P. Howard, V. Walter, B. Everett, P. Libby, J. Hensen, and T. Thuren. 2012. Effects of interleukin-1β inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen a phase IIb randomized, placebo-controlled trial. *Circulation*. **126**: 2739–2748.

Robins, S. J., A. Lyass, R. W. Brocia, J. M. Massaro, and R. S. Vasan. 2013. Plasma lipid transfer proteins and cardiovascular disease. The Framingham Heart Study. *Atherosclerosis*. **228**: 230–236.

Robertson, M. D., C. Pedersen, P. J. Hinton, A. S. J. R. Mendis, P. D. Cani, and B. A. Griffin. 2018. Elevated high density lipoprotein cholesterol and low grade systemic inflammation is associated with increased gut permeability in normoglycemic men. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **28**: 1296–1303.

Rudbach, J. A., R. L. Anacker, W. T. Haskins, A. G. Johnson, K. C. Milner, and E. Ribi. 1966. Physical Aspects of Reversible Inactivation of Endotoxin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **133**: 629–643.

Rudbach, J. A., and A. G. Johnson. 1966. Alteration and restoration of endotoxin activity after complexing with plasma proteins. *J. Bacteriol.* **92**: 892–898.

S

Saleh, M., J. C. Mathison, M. K. Wolinski, S. J. Bensinger, P. Fitzgerald, N. Droin, R. J. Ulevitch, D. R. Green, and D. W. Nicholson. 2006. Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature*. **440**: 1064–1068.

Salzman, N. H. 2011. Microbiota-immune system interaction: An uneasy alliance. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**: 99–105.

Samuel, V. T., and G. I. Shulman. 2012. Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. *Cell*. **148**: 852–871.

Santaolalla, R., M. Fukata, and M. T. Abreu. 2011. Innate immunity in the small intestine. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **27**: 125–131.

Sarwar, N., P. Gao, S. R. Kondapally Seshasai, R. Gobin, S. Kaptoge, E. Di Angelantonio, E. Ingelsson, D. A. Lawlor, E. Selvin, M. Stampfer, C. D. A. Stehouwer, S. Lewington, L. Pennells,

A. Thompson, N. Sattar, I. R. White, K. K. Ray, J. Danesh, R. W. Tipping, C. E. Ford, S. L. Pressel, A. R. Folsom, L. E. Chambless, L. E. Wagenknecht, D. B. Panagiotakos, C. Pitsavos, C. Chrysohoou, C. Stefanadis, M. Knuiman, P. H. Whincup, S. G. Wannamethee, R. W. Morris, S. Kiechl, J. Willeit, F. Oberhollenzer, A. Mayr, N. Wald, S. Ebrahim, J. W. Yarnell, J. Gallacher, E. Casiglia, V. Tikhonoff, P. J. Nietert, S. E. Sutherland, D. L. Bachman, J. E. Keil, I. H. de Boer, J. R. Kizer, K. J. Mukamal, A. Tybjærg-Hansen, et al. 2010. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: A collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. **375**: 2215–2222.

Scarpellini, E., M. Campanale, D. Leone, F. Purchiaroni, G. Vitale, E. C. Lauritano, and A. Gasbarrini. 2010. Gut microbiota and obesity. *Internal and Emergency Medicine*. **5**: 53–56.

Schlitt, A., J. Liu, D. Yan, M. Mondragon-Escorpizo, A. J. Norin, and X. C. Jiang. 2005. Anti-inflammatory effects of phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency in mice. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. **1733**: 187–191.

Schlitt, A., S. Blankenberg, C. Bickel, K. J. Lackner, G. H. Heine, M. Buerke, K. Werdan, L. Maegdefessel, U. Raaz, H. J. Rupprecht, T. Munzel, and X. C. Jiang. 2009. PLTP activity is a risk factor for subsequent cardiovascular events in CAD patients under statin therapy: The AtheroGene Study. *J. Lipid Res.* **50**: 723–729.

Schneeberger, E. E., and R. D. Lynch. 1992. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **262**.

Schumann, R. R., S. R. Leong, G. W. Flaggs, P. W. Gray, S. D. Wright, J. C. Mathison, P. S. Tobias, and R. J. Ulevitch. 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science (80-.).* **249**: 1429–1431.

Sekirov, I., S. L. Russell, L. Caetano M Antunes, and B. B. Finlay. 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* **90**: 859–904.

Sewnath, M. E., H. H. M. Levels, R. O. Elferink, C. J. F. Van Noorden, F. J. W. Ten Kate, S. J. H. Van Deventer, and D. J. Gouma. 2000. Endotoxin-induced mortality in bile duct-ligated rats after administration of reconstituted high-density lipoprotein. *Hepatology*. **32**: 1289–1299.

Shao, B., M. Lu, S. C. Katz, A. W. Varley, J. Hardwick, T. E. Rogers, N. Ojogun, D. C. Rockey, R. P. DeMatteo, and R. S. Munford. 2007. A host lipase detoxifies bacterial lipopolysaccharides in the liver and spleen. *J. Biol. Chem.* **282**: 13726–13735.

Shengbiao, W., Y. Shuang, L. Yunfeng, L. Cuiling, L. Tao, and L. Youtan. 2016. Effects of autophagy on lipopolysaccharide-induced vascular hyper-permeability. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. **28**: 673–677.

Shi, J., Y. Zhao, Y. Wang, W. Gao, J. Ding, P. Li, L. Hu, and F. Shao. 2014. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*. **514**: 187–192.

Si, J. M., Y. C. Yu, Y. J. Fan, and S. J. Chen. 2004. Intestinal microecology and quality of life in irritable bowel syndrome patients. *World J. Gastroenterol.* **10**: 1802–1805.

Sirwi, A., and M. Mahmood Hussain. 2018. Lipid transfer proteins in the assembly of apoB-containing lipoproteins. *J. Lipid Res.* **59**: 1094–1102.

Smith, C., X. Wang, and H. Yin. 2015. Caspases come together over LPS. *Trends in Immunology*. **36**: 59–61.

Snoeck, V., B. Goddeeris, and E. Cox. 2005. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect.* **7**: 997–1004.

Song, G., C. Zong, M. Shao, Y. Yu, Q. Liu, H. Wang, T. Qiu, P. Jiao, Z. Guo, P. Lee, Y. Luo, X. C. Jiang, and S. Qin. 2019. Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency attenuates high fat diet induced obesity and insulin resistance. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. **1864**: 1305–1313.

Specian, R. D., and M. G. Oliver. 1991. Functional biology of intestinal goblet cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **260**.

Sponton, C. H., T. Hosono, J. Taura, M. P. Jedrychowski, T. Yoneshiro, Q. Wang, M. Takahashi, Y. Matsui, K. Ikeda, Y. Oguri, K. Tajima, K. Shinoda, R. N. Pradhan, Y. Chen, Z. Brown, L. S. Roberts, C. C. Ward, H. Taoka, Y. Yokoyama, M. Watanabe, H. Karasawa, D. K. Nomura, and S. Kajimura. 2020. The regulation of glucose and lipid homeostasis via PLTP as a mediator of BAT –liver communication . *EMBO Rep.* **21**: 1–17.

Sprong, T., M. G. Netea, P. Van Der Ley, T. J. G. Verver-Jansen, L. E. H. Jacobs, A. Stalenhoef, J. W. M. Van Der Meer, and M. Van Deuren. 2004. Human lipoproteins have divergent neutralizing effects on E. coli LPS, N. meningitidis LPS, and complete Gram-negative bacteria. *J. Lipid Res.* **45**: 742–749.

Stenman, L. K., R. Holma, and R. Korpela. 2012. High-fat-induced intestinal permeability dysfunction associated with altered fecal bile acids. *World J. Gastroenterol.* **18**: 923–929.

Sun, X., H. Yang, K. Nose, S. Nose, E. Q. Haxhija, H. Koga, Y. Feng, and D. H. Teitelbaum. 2007. Decline in intestinal mucosal IL-10 expression and decreased intestinal barrier function in a mouse model of total parenteral nutrition. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **294**: 139–147.

Suzuki, T., N. Yoshinaga, and S. Tanabe. 2011. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J. Biol. Chem.* **286**: 31263–31271.

Suzuki, T. 2013. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**: 631–659.

Swidsinski, A., J. Weber, V. Loening-Baucke, L. P. Hale, and H. Lochs. 2005. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 3380–3389.

T

Teixeira, L. K., B. P. F. Fonseca, B. A. Barboza, and J. P. B. Viola. 2005. The role of interferon-γ on immune and allergic responses. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **100**: 137–144.

Teixeira, T. F. S., M. C. Collado, C. L. L. F. Ferreira, J. Bressan, and M. do C. G. Peluzio. 2012. Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. *Nutr. Res.* **32**: 637–647.

Terawaki, H., K. Yokoyama, Y. Yamada, Y. Maruyama, R. Iida, K. Hanaoka, H. Yamamoto, T. Obata, and T. Hosoya. 2010. Low-grade endotoxemia contributes to chronic inflammation in hemodialysis patients: Examination with a novel lipopolysaccharide detection method. *Ther. Apher. Dial.* **14**: 477–482.

Thomas, C. J., M. Kapoor, S. Sharma, H. Bausinger, U. Zyilan, D. Lipsker, D. Hanau, and A. Surolia. 2002. Evidence of a trimolecular complex involving LPS, LPS binding protein and soluble CD14 as an effector of LPS response. *FEBS Lett.* **531**: 184–188.

Tobias, P. S., K. Soldau, and R. J. Ulevitch. 1989. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J. Biol. Chem.* **264**: 10867–10871.

Tobias, P. S., J. Mathison, D. Mintz, J. D. Lee, V. Kravchenko, K. Kato, J. Pugin, and R. J. Ulevitch. 1992. Participation of lipopolysaccharide-binding protein in lipopolysaccharide-dependent macrophage activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **7**: 239–245.

Topchiy, E., M. Cirstea, H. J. J. Kong, J. H. Boyd, Y. Wang, J. A. Russell, and K. R. Walley. 2016. Correction: Lipopolysaccharide is cleared from the circulation by hepatocytes via the low density lipoprotein receptor. *PLoS One*. **11**: 1–15.

Torekov, S. S., S. Madsbad, and J. J. Holst. 2011. Obesity - An indication for GLP-1 treatment? Obesity pathophysiology and GLP-1 treatment potential. *Obes. Rev.* **12**: 593–601.

Trent, M. S. 2004. Biosynthesis, transport, and modification of lipid A. *Biochem. Cell Biol.* **82**: 71–86. Triantafilou, M., and K. Triantafilou. 2004. Heat-shock protein 70 and heat-shock protein 90 associate with Toll-like receptor 4 in response to bacterial lipopolysaccharide. *Biochemical Society Transactions*. **32**: 636–639.

Trier, J. S. 1991. Structure and function of intestinal M cells. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **20**: 531–547.

Tso, P., and J. A. Balint. 1986. Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **250**.

Tzotzas, T., C. Desrumaux, and L. Lagrost. 2009. Plasma phospholipid transfer protein (PLTP): Review of an emerging cardiometabolic risk factor. *Obes. Rev.* **10**: 403–411.

V

Vaara, M. 2020. Lipopolysaccharide and the Permeability of the Bacterial Outer Membrane. *Endotoxin Heal. Dis.* 31–38.

Vakkilainen, J., G. Steiner, J. C. Ansquer, F. Aubin, S. Rattier, C. Foucher, A. Hamsten, and M. R. Taskinen. 2003. Relationships between low-density lipoprotein particle size, plasma lipoproteins, and progression of coronary artery disease: The Diabetes Atherosclerosis Intervention Study (DAIS). *Circulation*. **107**: 1733–1737.

Vanaja, S. K., V. A. K. Rathinam, M. K. Atianand, P. Kalantari, B. Skehan, K. A. Fitzgerald, and J. M. Leong. 2014. Bacterial RNA:DNA hybrids are activators of the NLRP3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **111**: 7765–7770.

Vanaja, S. K., A. J. Russo, B. Behl, I. Banerjee, M. Yankova, S. D. Deshmukh, and V. A. K. Rathinam. 2016. Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation. *Cell*. **165**: 1106–1119.

Van Haperen, R., A. Van Tol, T. Van Gent, L. Scheek, P. Visser, A. van Der Kamp, F. Grosveld, and R. De Crom. 2002. Increased risk of atherosclerosis by elevated plasma levels of phospholipid transfer protein. *J. Biol. Chem.* **277**: 48938–48943.

Van de Waterbeemd, H., and E. Gifford. 2003. ADMET in silico modelling: Towards prediction paradise? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**: 192–204.

Velde, A., R. Huijbens, K. Heije, J. de Vries, and C. Figdor. 1990. Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. *Blood*. **76**: 1392–1397.

Vernon, G., A. Baranova, and Z. M. Younossi. 2011. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **34**: 274–285.

Vesy, C. J., R. L. Kitchens, G. Wolfbauer, J. J. Albers, and R. S. Munford. 2000. Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes. *Infect. Immun.* **68**: 2410–2417.

Visser, J., J. Rozing, A. Sapone, K. Lammers, and A. Fasano. 2009. Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity: Celiac disease and type 1 diabetes paradigms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1165**: 195–205.

Vollmer, K., J. J. Hoist, B. Bailer, M. Ellrlchmann, M. A. Nauck, W. E. Schmidt, and J. J. Meier. 2008. Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. *Diabetes*. **57**: 678–687.

Vreugdenhil, A. C., M. A. Dentener, A. M. Snoek, J. W. Greve, and W. A. Buurman. 1999. Lipopolysaccharide binding protein and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response. *J. Immunol.* **163**: 2792–8.

W

Wang, C. S., W. McConathy, H. U. Kloer, and P. Alaupovic. 1985. Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *J. Clin. Invest.* **75**: 384–390.

Wang, H., and R. H. Eckel. 2009. Lipoprotein lipase: From gene to obesity. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **297**: 271–288.

Wang, T., H. H. Cheng, O. Heimbürger, J. Waniewski, J. Bergström, and B. Lindholm. 2000. Effect of peritonitis on peritoneal transport characteristics: Glucose solution versus polyglucose solution. *Kidney Int.* **57**: 1704–1712.

Wang, X., S. Fu, Y. Wang, P. Yu, J. Hu, W. Gu, X. M. Xu, and P. Lu. 2007. Interleukin-1β mediates proliferation and differentiation of multipotent neural precursor cells through the activation of SAPK/JNK pathway. *Molecular and Cellular Neuroscience*. **36**: 343–354.

Van de Waterbeemd, H., and E. Gifford. 2003. ADMET in silico modelling: Towards prediction paradise? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**: 192–204.

Wells, C. L., R. G. Barton, C. S. Wavatne, D. L. Dunn, and F. B. Cerra. 1992. Intestinal bacterial flora, intestinal pathology, and lipopolysaccharide- induced translocation of intestinal bacteria. *Circ. Shock*. **37**: 117–123.

Wolska, A., R. L. Dunbar, L. A. Freeman, M. Ueda, M. J. Amar, D. O. Sviridov, and A. T. Remaley. 2017. Apolipoprotein C-II: New findings related to genetics, biochemistry, and role in triglyceride metabolism. *Atherosclerosis*. **267**: 49–60.

Wong, L. H., A. Čopič, and T. P. Levine. 2017. Advances on the Transfer of Lipids by Lipid Transfer Proteins. *Trends Biochem. Sci.* **42**: 516–530.

Won, Y., J. I. Yang, S. Park, and J. S. Chun. 2021. Lipopolysaccharide Binding Protein and CD14, Cofactors of Toll-like Receptors, Are Essential for Low-Grade Inflammation–Induced Exacerbation of Cartilage Damage in Mouse Models of Posttraumatic Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* **73**: 1451–1460.

Wurfel, M. M., B. G. Monks, R. R. Ingalls, R. L. Dedrick, R. Delude, D. Zhou, N. Lamping, R. R. Schumann, R. Thieringer, M. J. Fenton, S. D. Wright, and D. Golenbock. 1997. Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein gene leads to profound suppression of LPS responses ex vivo, whereas in vivo responses remain intact. *J. Exp. Med.* **186**: 2051–2056.

Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, and J. C. Mathison. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* **249**: 1431–1433.

Y

Yang, X. P., D. Yan, C. Qiao, R. J. Liu, J. G. Chen, J. Li, M. Schneider, L. Lagrost, X. Xiao, and X. C. Jiang. 2003. Increased atherosclerotic lesions in ApoE mice with plasma phospholipid transfer protein overexpression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**: 1601–1607.

Yang, S., B. Guo, L. Ao, C. Yang, L. Zhang, J. Zhou, and P. Jia. 2020. Obesity and activity patterns before and during COVID -19 lockdown among youths in China . *Clin. Obes.* **10**: e12416.

Yesudhas, D., V. Gosu, M. A. Anwar, and S. Choi. 2014. Multiple roles of toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *Frontiers in Immunology*. **5**.

Yu, J., X. Xia, T. Lin, N. Huang, Y. Qiu, X. Yang, H. Mao, W. Chen, and F. Huang. 2021. Non-high-density lipoprotein cholesterol and mortality among peritoneal dialysis patients. *J. Clin. Lipidol.*

Yue, C., B. Ma, Y. Zhao, Q. Li, and J. Li. 2012. Lipopolysaccharide-induced bacterial translocation is intestine site-specific and associates with intestinal mucosal inflammation. *Inflammation*. **35**: 1880–1888.

Z

Zanoni, I., R. Ostuni, L. R. Marek, S. Barresi, R. Barbalat, G. M. Barton, F. Granucci, and J. C. Kagan. 2011. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of toll-like receptor 4. *Cell*. **147**: 868–880.

Zannis, V. I., A. Chroni, and M. Krieger. 2006. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J. Mol. Med.* **84**: 276–294.

Zhang, X. Y., C. C. Guo, Y. X. Yu, L. Xie, and C. Q. Chang. 2020. Establishment of high-fat diet-induced obesity and insulin resistance model in rats. *Beijing Da Xue Xue Bao.* **52**: 557–563.

Zhao, X. M., Y. Wang, Y. Yu, H. Jiang, A. Babinska, X. Y. Chen, K. G. He, X. D. Min, J. J. Han, C. X. Yang, K. Deng, J. Xue, X. Zhang, G. H. Song, S. C. Qin, and X. C. Jiang. 2018. Plasma Phospholipid Transfer Protein Promotes Platelet Aggregation. *Thromb. Haemost.* **118**: 2086–2097.

Zhao, Q., J. Wang, Z. Miao, N. R. Zhang, S. Hennessy, D. S. Small, and D. J. Rader. 2021. A mendelian randomization study of the role of lipoprotein subfractions in coronary artery disease. *Elife*. **10**.

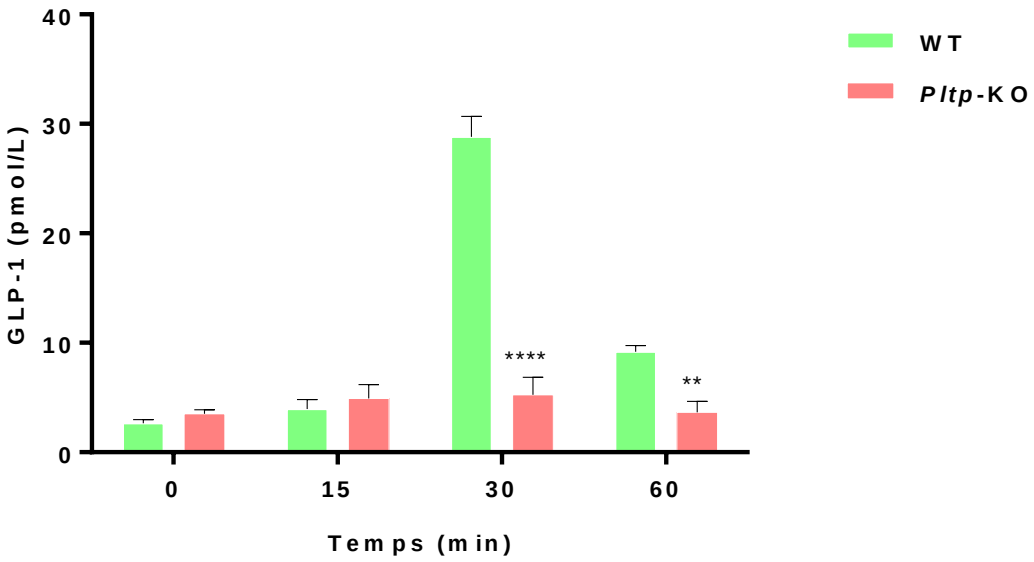
Zietek, T., and E. Rath. 2016. Inflammation meets metabolic disease: Gut feeling mediated by GLP-1. *Front. Immunol.* **7**: 1–17.

Zoicas, F., M. Droste, B. Mayr, M. Buchfelder, and C. Schöfl. 2013. GLP-1 analogues as a new treatment option for hypothalamic obesity in adults: Report of nine cases. *Eur. J. Endocrinol.* **168**: 699–706.

- **BEH Investigation, Santé publique France**, 42-43, novembre 2010
- **BEH, Santé Publique France**, 27-28, novembre 2017.
- **EASD (European Association for the Study of Diabetes) 2015 :** https://www.endocrinologyadvisor.com/home/conference-highlights/easd-2015/
- **Encyclopédie Britannica, 2014 :** https://www.britannica.com/science/gastrointestinal-tract
- **ENS Lyon :** http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/immunite-et-vaccination/thematiques/immunite-innee-barrieres-naturelles-et-reaction-inflammatoire/2-reaction-inflammatoire
- **Institut Pasteur (2018).** Sepsis / Septicémie. https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/sepsis-septicemie
- **ObEpi (2012)**. ObÉpi-Roche 2012. Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité [Internet]. 2012. Available from: http://www.roche.fr/content/dam/corporate/roche_fr/doc/obepi_2012.pdf
- **USRDS annual data report**: Epidemiology of kidney disease in the United States, 2014.
- **World Health Organization (WHO):** http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity. Accessed February 2019.
- **World Health Organization (WHO)**, Fact Sheet (updated February 2018) : https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight. Accessed February 2019. WHO, (2018) http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en

ANNEXES

Annexe 1 : Sécrétion de GLP-1 altérée chez les souris *Pltp*-KO



Cinétique de sécrétion de GLP-1 total plasmatique (pmol/L) après administration orale de LPS (0,5 mg.kg^{-1}) chez des souris WT vs *Pltp*-KO (n=7 vs 7).

Annexe 2 : Poster NSFA 2021 (prix poster)

Influence de la protéine plasmatique de transfert des phospholipides sur la translocation intestinale des LPS, leur prise en charge par les lipoprotéines et leurs effets métaboliques

G. Pallot, M. Nguyen, A. Tavernier, A. Dusuel, V. Deckert, T. Pilot, J. P. Pais de Barros, N. Le Guern, L. Lagrost, D. Masson, T. Gautier et J. Grober

Équipe Lipness, INSERM U1231, « Lipides, Nutrition, Cancer » Université de Bourgogne Franche-Comté

Contexte : Les LPS (lipopolysaccharides, endotoxines) provenant des bactéries à Gram négatif sont connus pour avoir la capacité d'interagir avec la barrière intestinale et de perturber son intégrité. Ces molécules sont ensuite capables de passer dans le compartiment sanguin et de provoquer une inflammation métabolique à bas bruit (endotoxémie). Cependant, certaines protéines circulantes telles que la PLTP (Protéine de Transfert des Phospholipides) sont capables de transférer les LPS aux lipoprotéines et de favoriser leur détoxification. Les objectifs principaux de ce travail étaient d'étudier la cinétique de translocation intestinale de ces LPS ainsi que l'influence de la PLTP sur ce phénomène.

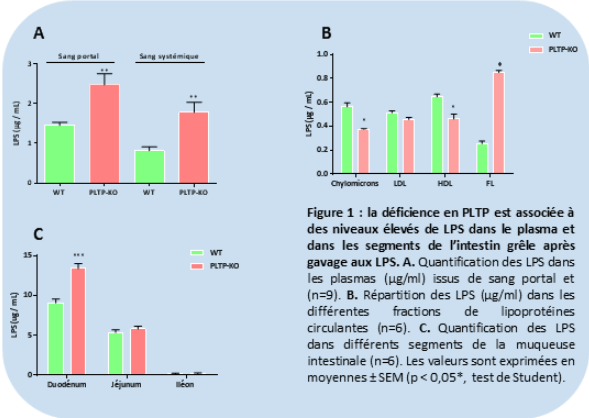


Figure 1 : la déficience en PLTP est associée à des niveaux élevés de LPS dans le plasma et dans les segments de l'intestin grêle après gavage aux LPS. A. Quantification des LPS dans les plasmas (µg/ml) issus de sang portal et (n=9). **B.** Répartition des LPS (µg/ml) dans les différentes fractions de lipoprotéines circulantes (n=6). **C.** Quantification des LPS dans différents segments de la muqueuse intestinale (n=6). Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM (p < 0,05*, test de Student).

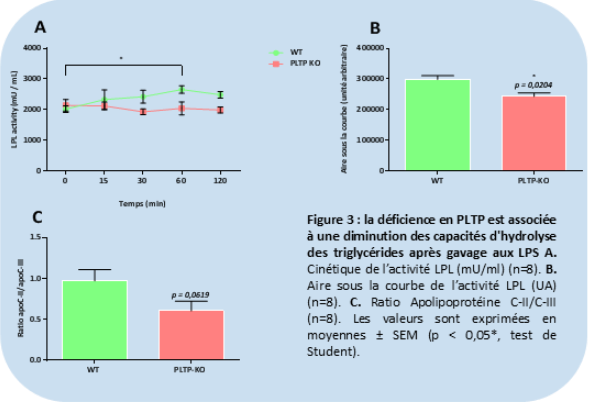
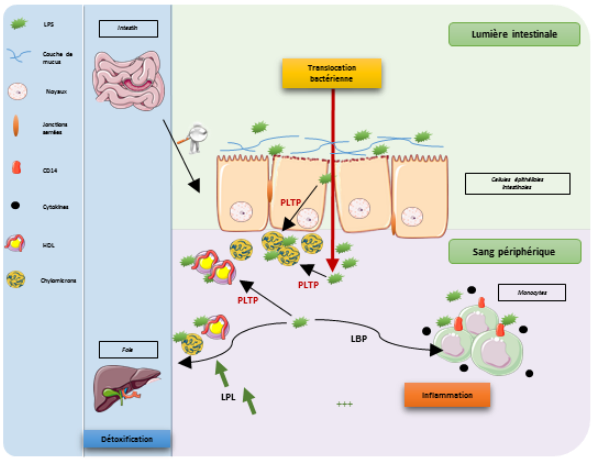
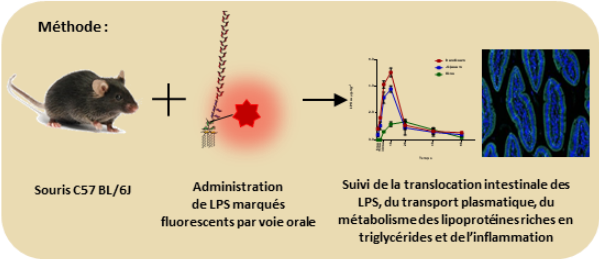


Figure 3 : la déficience en PLTP est associée à une diminution des capacités d'hydrolyse des triglycérides après gavage aux LPS A. Cinétique de l'activité LPL (mU/ml) (n=8). **B.** Aire sous la courbe de l'activité LPL (UA) (n=8). **C.** Ratio Apolipoprotéine C-II/C-III (n=8). Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM (p < 0,05*, test de Student).





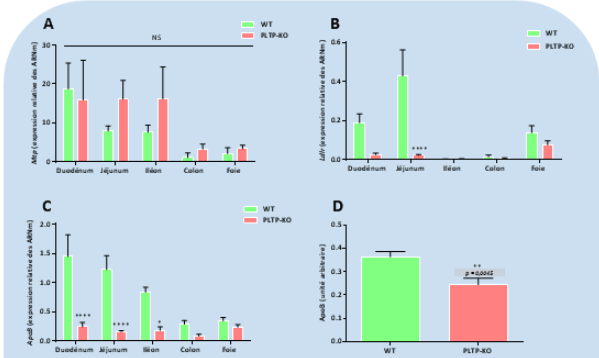


Figure 2 : la déficience en PLTP est associée à une altération de la formation des lipoprotéines riches en triglycérides dans l'intestin après gavage aux LPS. A. Expression relative du gène codant pour *Mtp* (n=5). **B.** Expression relative du gène codant pour *Ldlr* (n=5). **C.** Expression relative du gène codant pour *Apob* (n=5). **D.** Analyse de la présence d'apolipoprotéine B dans le sang portal (n=5). Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM (p < 0,05*, test de Student et ANOVA à 2 facteurs).

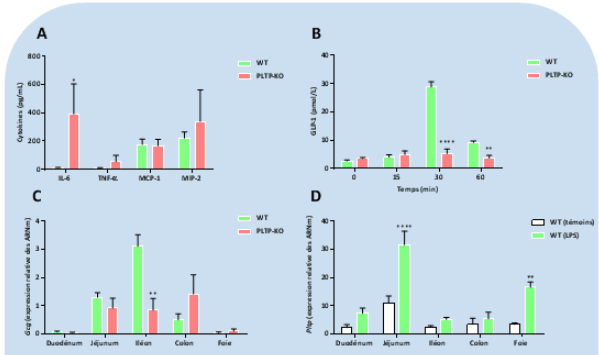


Figure 4 : Augmentation de la réponse inflammatoire chez les souris déficientes en PLTP après gavage aux LPS. A. Concentration en cytokines (pg/ml) (n=7). **B.** Cinétique du GLP-1 plasmatique (pmol/L) (n=7). **C.** Expression relative du gène codant pour le pré-proglucagon (n=5). **D.** Expression relative du gène codant pour la *Pltp* (n=5). Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM (p < 0,05*, ANOVA à deux facteurs).

Conclusion : La déficience en PLTP favorise le passage du LPS de la lumière intestinale vers la circulation, où il est retrouvé davantage sous forme libre au détriment de son association aux chylomicrons et aux HDL. Parallèlement à ce phénomène, un défaut de clairance des lipoprotéines riches en triglycérides a pu être mis en évidence. L'absence de PLTP induit une forte incapacité à inactiver efficacement les LPS d'origine intestinale, conduisant à une augmentation de la réponse inflammatoire chez les souris déficientes. La PLTP possède donc un rôle majeur dans le contrôle de la translocation intestinale des LPS et sur leur devenir métabolique. Notre but est maintenant d'investiguer l'impact de cette déficience en PLTP sur la translocation intestinale des LPS chez des souris soumises à un régime riche en graisse afin de déterminer l'impact sur les désordres métaboliques associés à l'inflammation à bas bruit.

Annexe 3 : Participation à une étude sur la Covid-19

Durant mon projet de thèse, j'ai eu l'occasion de participer à une étude clinique qui est en relation avec la thématique du laboratoire, portant sur le lien entre obésité, lipides et forme grave de la maladie Covid-19. Il a été mis en évidence que les hautes concentrations d'acides gras polyinsaturés sont associées au cas sévère de coronavirus.
Pour cela, nous nous sommes concentrés sur le métabolisme des lipoprotéines chez les patients hospitalisés atteints de pneumonie sévère, Covid ou non Covid. Nous avons ainsi étudié le taux de lipides plasmatiques et les cytokines plasmatiques.

Nous avons démontré que la pneumonie associée à la Covid-19 était associée à des concentrations : i) plus élevées d'acide linoléique et d'acide arachidonique et ii) moins élevées pour l'apolipoprotéine E et le HDL cholestérol. Ces observations pourraient ainsi être des médiateurs impliqués dans la pathogénèse de cette maladie et pourraient être la base du développement de nouvelles approches thérapeutiques.

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

OPEN

High plasma concentration of non-esterified polyunsaturated fatty acids is a specific feature of severe COVID-19 pneumonia

Maxime Nguyen[1,2,3,4]✉, Abderrahmane Bourredjem[5], Lionel Piroth[5,6], Bélaïd Bouhemad[1,2,3,4], Antoine Jalil[3], Gaetan Pallot[3], Naig Le Guern[3], Charles Thomas[2,3,4], Thomas Pilot[3], Victoria Bergas[8], Hélène Choubley[8], Jean-Pierre Quenot[2,3,4,5,7], Pierre-Emmanuel Charles[2,3,4,5,7], Laurent Lagrost[2,3,4], Valerie Deckert[2,3,4], Jean-Paul Pais de Barros[3,8], Pierre-Grégoire Guinot[1,2,3,4], David Masson[2,3,4,9], Christine Binquet[5], Thomas Gautier[2,3,4], Mathieu Blot[2,3,4,6] & Lymphonie study group*

COVID-19 pneumonia has specific features and outcomes that suggests a unique immunopathogenesis. Severe forms of COVID-19 appear to be more frequent in obese patients, but an association with metabolic disorders is not established. Here, we focused on lipoprotein metabolism in patients hospitalized for severe pneumonia, depending on COVID-19 status. Thirty-four non-COVID-19 and 27 COVID-19 patients with severe pneumonia were enrolled. Most of them required intensive care. Plasma lipid levels, lipoprotein metabolism, and clinical and biological (including plasma cytokines) features were assessed. Despite similar initial metabolic comorbidities and respiratory severity, COVID-19 patients displayed a lower acute phase response but higher plasmatic concentrations of non-esterified fatty acids (NEFAs). NEFA profiling was characterised by higher level of polyunsaturated NEFAs (mainly linoleic and arachidonic acids) in COVID-19 patients. Multivariable analysis showed that among severe pneumonia, COVID-19-associated pneumonia was associated with higher NEFAs, lower apolipoprotein E and lower high-density lipoprotein cholesterol concentrations, independently of body mass index, sequential organ failure (SOFA) score, and C-reactive protein levels. NEFAs and PUFAs concentrations were negatively correlated with the number of ventilator-free days. Among hospitalized patients with severe pneumonia, COVID-19 is independently associated with higher NEFAs (mainly linoleic and arachidonic acids) and lower apolipoprotein E and HDL concentrations. These features might act as mediators in COVID-19 pathogenesis and emerge as new therapeutic targets. Further investigations are required to define the role of NEFAs in the pathogenesis and the dysregulated immune response associated with COVID-19.
Trial registration: NCT04435223.

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which causes coronavirus disease 2019 (COVID-19), recently emerged as a major threat for human health. In its severe form, COVID-19 often leads to severe acute respiratory distress syndrome (ARDS). It also has specific features and outcomes that suggest a unique immunopathogenesis. A high proportion of obese patients has been reported among severe COVID-19 cases, and obesity has been associated with disease severity[1–3]. Obesity is characterized by metabolic disorders. We therefore assume that specific metabolic disorders rather than obesity per-se contribute to the severity of

[1]Department of Anesthesiology and Intensive Care, CHU Dijon and University of Burgundy, François Mitterrand University Hospital, LNC UMR1231, 21000 Dijon, France. [2]Univ. Bourgogne Franche-Comté, LNC UMR1231, 21000 Dijon, France. [3]INSERM, LNC UMR1231, 21000 Dijon, France. [4]FCS Bourgogne-Franche Comté, LipSTIC LabEx, 21000 Dijon, France. [5]Inserm, CIC1432, Clinical Epidemiology Unit, Clinical Epidemiology/Clinical Trial Unit, Dijon University Hospital, Dijon, France. [6]Infectious Diseases Department, François Mitterrand University Hospital, Dijon, France. [7]Department of Intensive Care, François Mitterrand University Hospital, Dijon, France. [8]Lipidomic Analytic Platform, University of Burgundy, Dijon, France. [9]Laboratory of Clinical Chemistry, François Mitterrand University Hospital, Dijon, France. ✉email: maxime.nguyensoenen@gmail.com

COVID-19[4]. In this context, lipid metabolism is of particular interest. Indeed, obesity is associated with impaired lipid metabolism (i.e. increased plasma triglyceride levels, decreased low density lipoprotein (LDL) and high density lipoprotein (HDL) concentrations[5], and disturbed lipolysis and fatty acid metabolism[6]). Lipoproteins were previously shown to be involved in inflammation and innate immunity[7]. During SARS-CoV-2 infection, it was recently reported that lipid metabolism is dysregulated[8–11], and lipid abnormalities were associated with poorer prognoses[12,13]. It has also been demonstrated that HDL-scavenger receptor B type 1 (SR-B1) facilitates SARS-Cov2 entry into ACE2-expressing cells[14]. Furthermore, a pocket for linoleic acid has been described on SARS-CoV-2 spike protein and linoleic acid appeared to stabilized SARS-CoV-2 spike protein in its closed form, resulting in reduced ACE2 interaction in vitro[15]. In addition, lipids are bioactive molecules that can act as inflammatory mediators[16]. Thus, it can be hypothesized that dysregulation of lipid metabolism influences virus pathogenicity and participate in the specific immune response. The current study aims to investigate the contribution of blood lipids and plasma lipoprotein abnormalities in COVID-19 pathogenesis by comparing lipoprotein metabolism between non-COVID-19 and COVID-19 patients with severe pneumonia.

Results

Patient characteristics. Sixty-one patients were enrolled (34 in the non-COVID-19 group and 27 in the COVID-19 group). Bacterial, viral, or mixed etiologies were proven in 9 (26%), 10 (29%) and 3 (9%) patients, respectively, from the non-COVID-19 group. Patient characteristics are shown in Table 1. Mean age was lower in the COVID-19 group than in the non-COVID-19 group (62 ± 11 vs. 69 ± 12; $p = 0.03$). Diabetes and dyslipidaemia were not significantly different between the two groups. Obesity was more frequent in the COVID-19 group (52%; n = 14) than in the non-COVID-19 group (35%; n = 12) but the difference did not reach statistical significance. At inclusion, global severity (assessed by SOFA score) and respiratory severity, (assessed by PaO_2:FiO_2 ratio) were not significantly different between the two groups ($p = 0.43$ for both). However, we observed a higher proportion of ARDS (93% vs 62%; $p < 0.01$) and a lower proportion of septic shock (0% vs 32%; $p < 0.01$) among COVID-19 patients. In the biological parameters, we observed lower plasma concentrations of C-reactive protein (CRP), lactate and glucose in COVID-19 patients.

Outcomes. COVID-19 patients had significantly higher duration of mechanical ventilation (15 [7–22] vs. 4 [0–15] days; $p < 0.01$). The 30-day mortality rate was 6% in the non-COVID-19 group and 4% in the COVID-19 group ($p = 0.70$) (Table 1).

Plasma lipid profile is discriminating factor for non-COVID-19 vs COVID-19 patients. Plasma concentration of total cholesterol, phospholipids and triglycerides were not significantly different between non-COVID-19 and COVID-19 patients (Fig. 1, Table S1).

By contrast, COVID-19 patients showed higher HDL diameter ($p = 0.02$), lower ApoE concentrations ($p = 0.01$) and lower phospholipid transfer protein (PLTP) activity ($p < 0.01$) than non-COVID-19 patients, while the plasma levels of HDL cholesterol, apo A1 and cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity were not significantly different (Fig. 1).

The study of LDL metabolism revealed higher concentrations of apoprotein B (ApoB) in COVID-19 patients ($p = 0.03$), while LDL cholesterol levels and particle size were not different in the two groups (Fig. 1).

Plasma triglyceride concentrations and VLDL size did not significantly differ between the two groups ($p = 0.86$ and $p = 0.12$), whereas the plasma concentration of non-esterified fatty acids (NEFAs) was significantly higher in COVID-19 patients (0.35 ± 0.22 vs. 0.21 ± 0.18 mg/dl; $p = 0.01$).

Principal component analysis (PCA) identifies two patterns linking lipid metabolism and outcomes that enables distinguishing between non-COVID-19 and COVID-19 patients. Using PCA, four factors were retained for interpretation. These factors preserve 58.4% of the total information contained in the 25 original correlated variables (Figure S1). The first component represents 26.6% of the data variability and was correlated to initial severity (SOFA score, pneumonia severity index (PSI)) and acute phase response (CRP). Levels of HDL cholesterol, Apolipoprotein A1 (ApoA1), HDL size, PLTP activity, LDL, ApoB, and LDL size were negatively correlated with this first component, while PLTP activity was positively correlated (Table 2). The second component represents 13.8% of the data variability and was correlated with outcomes (duration of mechanical ventilation, ICU length of stay). NEFAs concentrations were correlated with this second dimension, as were ApoA1 and HDL diameter (Table 2). The third component (10.1% of the data variability) represents the relationship between HDL, LDL and VLDL metabolism, but there was not a strong correlation with the outcome. The fourth component (7.8% of the data variability) is correlated with glucose metabolism and body mass index (BMI) (Table 2). The projection of patient data on the plan defined by factors 1 and 2 made it possible to discriminate COVID-19 from non-COVID-19 patients (Fig. 2). By plotting patients according to pneumonia etiology, we noticed that non-COVID-19 patients with pneumonia of proven bacterial origin were represented by high factor 1 values, while COVID-19 patients were represented by high factor 2 values and moderate factor 1 values (Fig. 2).

COVID-19 status is independently associated with NEFAs, HDL cholesterol and ApoE. Multiple linear regression showed that COVID-19 status was associated with high plasma NEFAs, low HDL cholesterol levels and low ApoE plasma concentrations, independently from body mass index (BMI), SOFA score and plasma CRP (Table 3). In COVID-19 patients, we estimated a proper excess of 0.12 ± 0.06 mg/dl for NEFAs ($p = 0.04$), and reductions of 0.36 ± 0.10 mmol/L in HDL cholesterol ($p < 0.01$) and 116.05 ± 45.49 ug/ml in Apoli-

	non-COVID-19 N = 34	COVID-19 N = 27	*p*
Demographic data			
Male, n (%)	27 (79%)	17 (63%)	0.15
Age (year)	69 (± 12)	62 (± 11)	0.03
BMI (kg/m^2)	29 (± 7)	31 (± 8)	0.40
Medical history			
Active smoking, n (%)	9 (26%)	2 (7%)	0.06
Chronic kidney insufficiency (moderate to severe), n (%)	2 (6%)	1 (4%)	0.70
Cerebrovascular disease, n (%)	5 (15%)	3 (11%)	0.68
Cardiovascular disease, n (%)	12 (35%)	5 (19%)	0.15
Pulmonary disease, n (%)	11 (32%)	5 (19%)	0.22
Diabetes, n (%)	10 (29%)	11 (41%)	0.36
Insulin-based therapy, n (%)	1 (3%)	2 (7%)	0.58
Metformin, n (%)	7 (21%)	10 (37%)	0.16
Dyslipidemia, n (%)	14 (41%)	12 (44%)	0.80
Statin therapy, n (%)	11 (32%)	8 (30%)	1
Hypertension, n (%)	18 (53%)	16 (59%)	0.62
Initial severity			
SOFA score	7.3 (± 3.7)	6.7 (± 2.0)	0.43
PSI score	121 (± 37)	94 (± 27)	< 0.01
Septic shock, n (%)	11 (32%)	0	< 0.01
Invasive mechanical ventilation, n (%)	23 (68%)	23 (85%)	0.11
ARDS at inclusion, n (%)	21 (62%)	25 (93%)	< 0.01
PaO_2/FiO_2 mmHg	126 (± 54)	136 (± 50)	0.43
Biology			
CRP (mg/l)	275 (± 149)	173 (± 63)	< 0.01
PCT (µg/l)	34 (± 63)	3 (± 7)	< 0.01
AST (UI/l)	89 (± 95)	86 (± 55)	0.90
ALT (UI/l)	49 (± 46)	70 (± 54)	0.11
Bilirubin (µmol/l)	15 (± 8)	12 (± 6)	0.13
Albumin (g/l)	23 (± 4)	23 (± 2)	0.11
NT-ProBNP (pg/ml)	5972 (± 7828)	2225 (± 229)	0.04
Serum creatinine (µmol/l)	137 (± 95)	90 (± 41)	0.01
Lactate (mmol/l)	2.7 (± 1.9)	1.7 (± 0.7)	< 0.01
Glucose metabolism			
Fructosamine (µmol/l)	493 (± 179)	516 (± 288)	0.73
Glycaemia (mmol/l)	16 (± 8)	12 (± 6)	0.02
Insulin (mU/l)	15 (± 25)	13 (± 12)	0.60
Outcomes at 30 days			
Thrombotic events, n (%)	2 (6%)	7 (26%)	0.03
Median days of mechanical ventilation	4 (0–15)	15 (7–22)	< 0.01
Median ICU length of stay (days)	12.5 (4–20)	20 (12–29)	0.03
Median hospital length of stay (days)	21 (13–30)	29 (20–30)	0.12
30-day mortality, n (%)	2 (6%)	1 (4%)	0.70

Table 1. Patient characteristics according to COVID-19 status. *BMI* body mass index, *SOFA* sequential organ failure assessment, *PSI* pneumonia severity index, PaO_2 arterial oxygen partial pressure, FiO_2 fraction of inspired oxygen, *RRT* renal replacement therapy, *CRP* C-reactive protein, *PCT* procalcitonin, *AST* aspartate transaminase, *ALT* alanine transaminase, *BNP* brain natriuretic peptide; ICU: intensive care unit. Quantitative data are presented as mean ± SD or Median (IQR).

poprotein E (ApoE) concentrations (p = 0.01). LDL cholesterol, HDL diameter and PLTP activity were independently associated with CRP concentration but not with COVID-19 status (Table 3).

Non-esterified fatty acid profile is characterized by high poly unsaturated fatty acid (PUFA) levels in COVID-19 patients. To gain further insights regarding the increase in plasma NEFAs, we performed a GC–MS profile of fatty acids (Fig. 3, Table S2). As expected, saturated and monounsaturated fatty acids (C16:0, C18:0 and C18:1) were the most represented fatty acids. However, the increase in NEFAs in COVID-

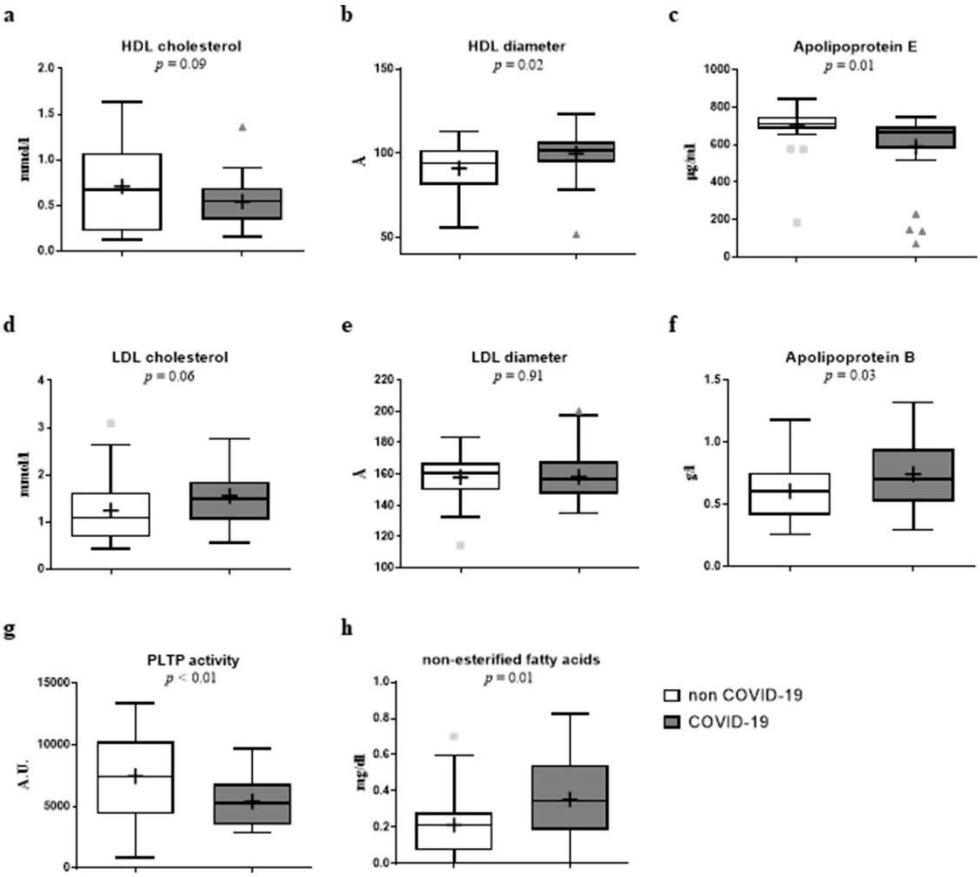


Figure 1. Boxplot representing selected lipid parameters depending on the COVID-19 status. Plasma concentration and lipoprotein diameter were measured in 34 non-COVID-19 and 27 COVID-19 patients with severe pneumonia. COVID-19 patients had significantly higher plasma concentrations of apolipoprotein B and NEFA and lower concentrations of Apolipoprotein E and phospholipid transfer protein. High density lipoprotein diameter was higher in COVID patients. HDL: High density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; PLTP: phospholipid transfer protein.

19 patients was mainly driven by an increase in PUFA levels. Indeed among the lipid species with a plasma concentration higher than 10 nmol/mL, linoleic acid (C18:2 n-6) and arachidonic acid (C20:4 n-6) were significantly increased in COVID-19 patients (207 ± 109 vs. 113 ± 67 nmol/ml; $p < 0.01$ and 16 ± 6 vs 12 ± 5 nmol/ml $p < 0.01$, COVID-19 vs non-COVID-19 patients). Moreover, the relative proportion of linoleic acid among FAs was significantly higher in COVID-19 patients than in non-COVID-19 patients (12.8 ± 3.6 vs. 8.3 ± 2.3%; $p < 0.01$) (Fig. 2). However, sPLA2, Lp-PLA2, Leukotriene B4 and prostaglandin E concentrations did not differ significantly between the two groups (Table S1).

Fatty acid metabolism cascade exploration. As phospholipase A2 (PLA_2) mediates the release of fatty acids from membrane phospholipids, including linoleic and arachidonic acids, we measured both, secreted PLA_2 ($sPLA_2$) and lipoprotein-associated PLA_2 ($lp\text{-}PLA_2$) plasma concentrations. Plasma sPLA2 and $lp\text{-}PLA_2$ concentrations were not significantly different between the two groups (respectively $p = 0.93$ and $p = 0.25$) (Table S1). In addition, we did not observe any correlation between plasma concentration of $sPLA_2$ and $lp\text{-}PLA_2$ and PUFAs (Table S3).

	Factor1	Factor2	Factor3	Factor4
HDL cholesterol	– 0.50	–	0.68	–
HDL diameter	– 0.67	0.32	–	–
Apolipoprotein A1	– 0.58	0.33	0.59	–
Apolipoprotein E	–	–	–	–
PLTP activity (A.U./min)	0.79	–	–	–
LDL cholesterol	– 0.69	–	–	0.34
LDL diameter	–	–	–	–
Apolipoprotein B	– 0.44	–	– 0.53	0.39
Total triglycerides	0.48	–	-0.58	–
VLDL diameter	– 0.50	–	0.48	–
Non-esterified fatty acid	–	0.33	–	–
Glycaemia	–	–	–	0.61
Insulin	–	–	–	0.77
BMI	–	–	–	0.64
PSI	0.52	–	0.46	–
SOFA	0.62	0.35	–	–
CRP	0.69	– 0.41	–	–
PCT	0.72	–	–	–
Creatininemia	0.66	–	0.31	–
NT-proBNP	0.69	–	0.38	–
Lactatemia	0.61	–	–	–
ICU length of stay	0.42	0.82	–	–
Duration of MV	0.42	0.85	–	–
Ventilator-free days	– 0.39	– 0.79	–	–
Hospital length of stay	0.46	0.67	–	–

Table 2. Principal component analysis of clinical and lipid characteristics. Data are expressed as correlation coefficients. Values less than 0.3 are not edited. *HDL* high density lipoprotein, *PLTP* phospholipid transfer protein, *LDL* low density lipoprotein, *VLDL* very low density lipoprotein, *BMI* body mass index, *PSI* pneumonia severity index, *SOFA* sequential organ failure assessment, *CRP* C reactive protein, *PCT* procalcitonin, *BNP* brain natriuretic peptide, *ICU* intensive care unit, *MV* mechanical ventilation.

In addition, two final products of the arachidonic cascade were measured, namely leukotriene B4 and prostaglandin E2 (PGE2). We observed a correlation between arachidonic acid and leukotriene B4 concentrations ($r = 0.302$, $p = 0.02$) but not with PGE2 ($r = -0.048$, $p = 0.9$) (Fig. 4).

Relationship between NEFAs, plasma cytokines and outcomes. Plasma NEFAs concentrations were marginally correlated with CXCL10, GMCSF, and IL-10 (respectively $p = 0.064$, $p = 0.091$, $p = 0.075$), but negatively correlated with CRP levels ($r = -0.343$, $p = 0.007$). In addition, linoleic and arachidonic acids proportions were marginally negatively correlated with IL-6 ($p = 0.05$ for both) and TNF-α concentrations (respectively $p = 0.05$ and $p = 0.04$) (Fig. 4).

Plasma NEFAs concentrations and linoleic acid proportion were inversely correlated with the number of ventilator-free days (respectively $r = -0.279$, $p = 0.029$ and $r = -0.404$, $p = 0.001$) (Fig. 4).

Discussion

In patients with severe pneumonia, we report here an independent association between lipid metabolism disorders and COVID-19. Multivariate analysis showed that high NEFAs, low ApoE and low HDL cholesterol concentrations are significantly associated with COVID-19 status, independently of body mass index, baseline severity (SOFA score) and acute phase response (CRP level). The characterization of NEFAs highlighted an increase in polyunsaturated fatty acids (mainly linoleic and arachidonic acids). The concentrations of NEFAs, and particularly linoleic acids, were correlated with the duration of the mechanical ventilation.

COVID-19 pneumonia has unique features when compared with pneumonia from other origins, and it displays a specific inflammatory pathogenesis[17–19]. The beneficial effect of dexamethasone in the most severe forms of COVID-19 argues in favor of a dysregulated immune response that mediates lung injury and outcome[20]. We recently identified a unique cytokine response in COVID-19 patients with severe pneumonia with higher plasma GM-CSF and CXCL10 (a Th-1 chemokine) in COVID-19 patients, that were independently associated with the longer duration of mechanical ventilation[21,22]. Obesity has been described as a factor of poor prognosis in COVID-19 patients and associated with disease severity[1,2]. In various medical settings, obese patients display immune dysregulation (e.g. Th1 hyperpolarization) and metabolic disorders, and there is an obvious relationship between the two[23]. We assumed that metabolic disorders may contribute to the pathophysiology of COVID-19.

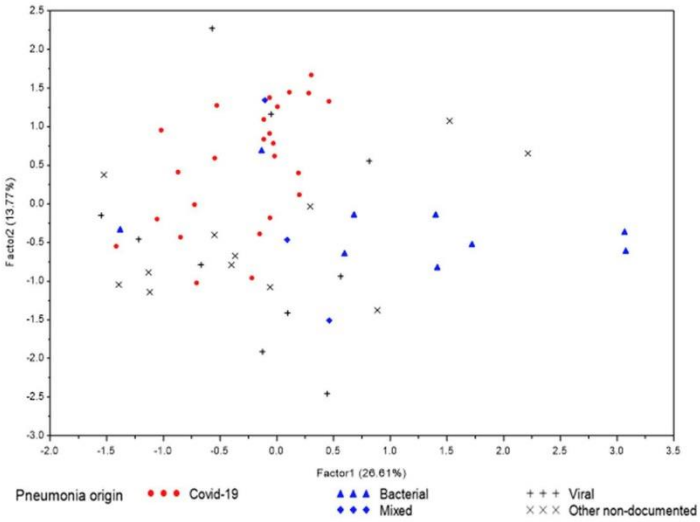


Figure 2. Factorial map for the primary component analysis. Patients are located according to their representation on each axis. Factor 1 appears to separate bacterial and viral pneumonia whereas factor 2 appears to separate COVID-19 and non-COVID pneumonia.

Outcome variable effect	HDL cholesterol (mmol/l)			HDL diameter			Apo E (ug/ml)			LDL cholesterol (mmol/l)			PLTP activity (A.U)			NEFA (mg/dl)		
	Mean diff	± SE	*p*	Mean diff	± SE	*p*	Mean diff	± SE	*p*	Mean diff	± SE	*p*	Mean diff	± SE	*p*	Mean diff	± SE	*p*
COVID-19 (Yes vs No)	**−0.36**	**0.10**	**<0.01**	1.95	3.22	0.55	**−116.05**	**45.49**	**0.01**	0.087	0.16	0.58	−187.65	562.23	0.74	**0.12**	**0.056**	**0.04**
BMI (+1 kg/m^2)	0.0068	0.0062	0.20	0.34	0.20	0.10	-2.92	2.86	0.31	0.0073	0.0096	0.45	−18.51	34.66	0.59	−0.0019	0.0035	0.58
SOFA (+1 point)	−0.0054	0.016	0.74	**−1.15**	**0.50**	**0.03**	−4.21	6.96	0.55	**−0.072**	**0.024**	**<0.01**	144.85	87.22	0.10	0.017	0.0087	0.05
CRP (+10 mg/L)	**−0.015**	**0.0041**	**<0.01**	**−0.50**	**0.113**	**<0.01**	−0.52	1.78	0.77	**−0.018**	**0.006**	**<0.01**	**167.88**	**224.11**	**<0.001**	−0.0038	0.002	0.09
R^2	29%			42%			14%			34%			61%			20%		

Table 3. Factors associated with lipid parameters in 61 patients with severe pneumonia (multivariate linear regression). *SE* standard error, *BMI* body mass index, *SOFA* sequential organ failure assessment, *CRP* C reactive protein, *NEFA* non-esterificrd fatty acid, *LDL* low density lipoprotein, *HDL* high density lipoprotein, *PLTP* phospholipid transfer protein, *ApoE* apolipoprotein E. Significant differences ($p < 0.05$) are written in bold

In the present study, although obesity was highly frequent in COVID-19 patients (52% of patients), BMI, diabetes, dyslipidaemia and plasma fructosamine levels did not significantly differ between non-COVID-19 and COVID-19 patients. Therefore, obesity has a similar frequency in severe pneumonia regardless of the origin and was not likely to acts as a confounding factor between the 2 groups of patients.

Sepsis is associated with profound modifications in HDL (dramatic reduction in HDL-cholesterol, extensive remodelling of HDL particles) and LDL metabolism (lower LDL cholesterol concentrations)[24]. However, the mechanisms underlying this decrease are poorly described. PLTP activity is known to increase during systemic inflammation[25]. HDL and LDL were found to be protective in patients with sepsis[26]. The lower PLTP activity we observed in COVID-19 patients is consistent with the lower proportion of extra-pulmonary organ dysfunction (septic shock, lactatemia, RRT and creatininemia) and the lower acute phase response (CRP levels). With multivariate analyses, negative correlations between CRP and both HDL and LDL cholesterol levels were also consistent with these clinical settings. By contrast, low HDL and ApoE concentrations were independently associated with COVID-19 status. Interestingly, HDL particles are endowed with immune-modulatory properties partly through interaction with lipid rafts[27] and HDL-scavenger receptor B type 1 (SR-B1) has been demonstrated to

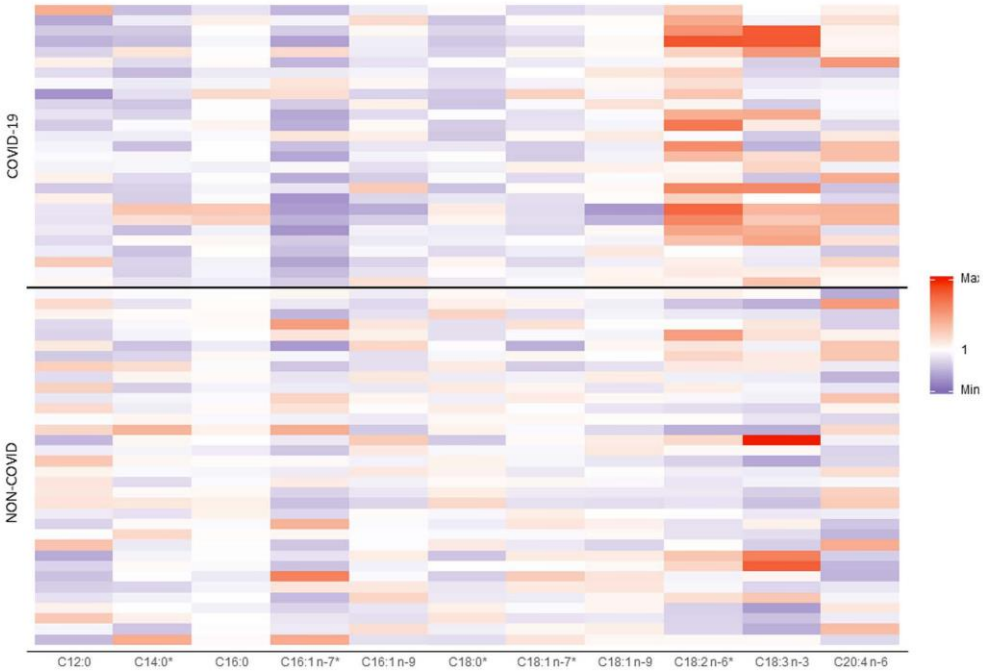


Figure 3. Heatmap of non-esterified fatty acid (NEFA) representation (as percentage normalized to the mean percentage in non-COVID-19 patients) according to COVID-19 status. Plasma concentration of NEFAs was measured in 34 non-COVID-19 and 27 COVID-19 patients with severe pneumonia. Rows represent patients. Colours represent the ratio between the percentage of NEFAs in the patient and the mean percentage of NEFAs in non-COVID-19 patients. In COVID-19 patients, linoleic acid appeared in red, reflecting a higher representation. *significant between-group differences ($p < 0.05$).

facilitate SARS-CoV-2 entry into ACE2-expressing cells[14]. Consequently, we assume that the more pronounced drop in HDL associated with COVID-19 origin could be the consequence of a higher consumption of HDL particles and/or the upregulation of SR-B1 expression. However, as in the ApoCOVID study, we did not find any association between HDL concentrations and outcomes[11].

Then, we depict here higher plasma PUFAs concentrations (higher C18:2 n-6 and C20:4 n-6) and a higher proportion of PUFAs among NEFAs in COVID-19 patients as compared to non-COVID-19 patients. High plasma NEFAs concentrations (including PUFAs) were previously reported in COVID-19 patients as compared to healthy patients, independently of the acute phase response[28]. However, to our knowledge, there has not yet been a comparison between patients with severe pneumonia according to COVID-19 status. This absolute and relative increase in PUFAs supports a specific alteration of the fatty-acid metabolism of COVID-19 patients. PUFAs are precursors of eicosanoids and platelet activating factor. Such metabolite production could contribute to the dysregulated immune response and coagulopathy that characterize COVID-19. For example, MAPK activation has previously been suggested to activate cytosolic PLA_2, which in turn increases thromboxane and platelet hyperactivity (31). These recent data support the hypothesis that PUFAs and the PLA_2 pathway are potential key players in the pathogenesis of COVID-19. In our study, we did not find any correlation between the two plasmatic forms of PLA_2 (namely s-PLA_2 and lp-PLA_2) and PUFAs, but we do not rule out an increase in cytosolic PLA_2 expression and activity in COVID-19 patients, that we were unable to measure. However, we found a marginal positive correlation between NEFAs (and linoleic acid) and the three cytokines previously identified in higher concentrations and associated with poorer outcomes in COVID-19 patients[21]. That suggests the possible involvement of NEFAs in the specific immune response associated with COVID-19. Interestingly, SARS-CoV-2 comprises a high-affinity pocket that specifically accretes linoleic acids, modifying ACE_2 interaction in-vitro[15]. The interaction between linoleic acids and SARS-CoV-2 represents an emerging appealing therapeutic target that requires further investigation. The correlations between NEFAs concentrations (and linoleic acids proportion) and the longer duration of mechanical ventilation we observed in COVID-19 strengthens these hypotheses.

To date, only corticosteroids have been proved to be effective in reducing mortality in severe COVID-19[20], strengthening the host-immune response as one of the most promising therapeutic targets. Since corticosteroids have many side effects, targeted therapies likely to dampen the dysregulated immune response in COVID-19

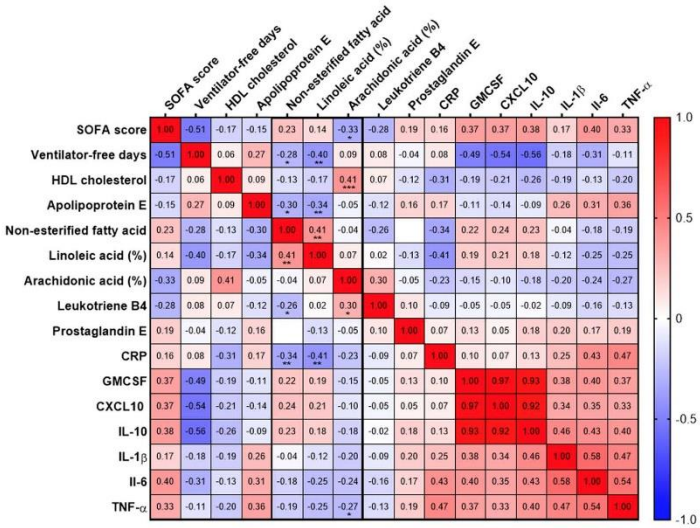


Figure 4. Correlations between NEFAs, PUFAs proportion, inflammation, and outcomes. Heatmap of the Spearman correlation (r) between lipids parameters, clinical severity and outcome, plasma cytokine concentrations. Spearman correlations: $p<0.05$, $*p<0.01$, $**p<0.001$, ***between each variable. CRP: C-reactive protein; GMCSF: granulocyte–macrophage colony-stimulating factor; HDL: High density lipoprotein; IL: interleukin; SOFA: sequential organ failure assessment; TNF-α: tumor-necrosis factor alpha.

are urgently needed. Our data highlight NEFAs as a potential driver of this dysregulated immune response that could drive poorer outcome. Restoring lipid homeostasis could represent a promising approach likely to dampen some features of the dysregulated immune response in COVID-19, and as a consequence outcomes. For this purpose, PLA-2 inhibitor is a potential candidate. In unselected patients with severe sepsis, PLA-2 inhibitors was shown to be ineffective in reducing mortality[29]. However, as for sepsis, personalized medicine with targeted immunomodulatory therapy, guided by immune-related biomarkers is mandatory to deal with the heterogeneity of the host-immune response[30]. Modulating lipid metabolism, using lipid-associated biomarkers (e.g. NEFAs concentrations) for decision making could represent a promising therapeutic strategy that deserve to be investigated in COVID-19.

There are some limitations in our work. Because this is an observational study, only association and not causality can be inferred. Statistical analysis may suffer from a lack of power since only 61 patients were included, but this was compensated, at least in part, by the strong observed differences and the use of several statistical methods including PCA and multivariate analysis. However, given this small sample size, our results need to be confirmed in larger cohorts. At this stage, the comparison of fatty acids metabolism and immune response between non-COVID-19 and COVID-19 patients with severe pneumonia is still scarce in the literature. We used CRP as a surrogate for acute phase response. However, CRP is also a known acute phase reactant[31]. Finally, we used plasma collection, and cytosolic PLA_2 could not be measured to ascertain of the origin of plasma NEFAs.

In conclusion, COVID-19 was independently associated with high concentrations of polyunsaturated NEFAs and low concentrations of apolipoprotein E and HDL. These parameters may be key mediators of the COVID-19 pathogenesis and potential therapeutic targets. Further investigations are required to explore the role of cytosolic phospholipase A2 and PUFAs in the dysregulated immune response and the pathogenicity of COVID-19.

Methods

Design. This ancillary study of the ongoing prospective Lymphonie study (ClinicalTrials.gov NCT03505281) was registered in ClinicalTrials.gov (NCT04435223)[21]. The study fulfilled legal and ethics requirements: Approval was obtained from the CPP (Full name: *Comité de Protection des Personnes* SUD MEDITERRANEE V (reference 17.092); Registration number: 2017-A03404-49) for the original study and an amendment was obtained to include supplementary patients with severe COVID-19. All subjects (or their legal representatives) received written information and provided their consent to participate. The present report was drafted in line with the STROBE statement[32].

Patients. Patients were enrolled in this prospective monocentric cohort if they fulfilled the criteria for the Lymphonie study (previously presented on the original report[21]) : severe community-acquired pneumonia

(CAP): (1) pneumonia (≥ 2 acute signs including cough, purulent sputum, dyspnea, chest pain, temperature < 35 °C or ≥ 38.5 °C, and novel radiological pulmonary infiltrate); (2) at least two criteria of poor prognosis according to the quick-SOFA score (systolic blood pressure ≤ 100 mm Hg, respiratory rate ≥ 22, Glasgow score < 15) and/or the need for mechanical ventilation (MV) and/or vasopressors; and (3) diagnosed within 48 h following admission. Non-inclusion criteria were: age < 18 years, pregnancy, person subject to a measure of legal protection, decision to limit care, known immune deficiency, chronic disorder known to cause deep lymphopenia (Cirrhosis, lympho or myeloproliferative syndrome, solid cancer or active systemic lupus), hospitalization for sepsis in the past 3 months. Non-COVID-19 CAP patients were included until February 20, 2020, one month before the COVID-19 pandemic started in Burgundy, France. COVID-19 patients were eligible if they tested positive for SARS-CoV-2 by reverse transcriptase-polymerase chain reaction on one respiratory sample. Patient with no available plasma sample were excluded from this analysis.

Study procedures. Ethylenediaminetetraacetic acid blood was obtained after inclusion of the patient and within 48 h of hospital admission. Plasma was collected in the biological resource center (CRB Ferdinand Cabanne; NF S96-900 certification), centrifuged at 2000 × g for 10 min at 4 °C and stored at − 80 °C.

Variables of interest, clinical outcomes, and data collection. Clinical and biological parameters, severity scores (Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) (9) and the Pneumonia Severity Index (PSI) (11)) were calculated at the time of inclusion. Obesity was defined as body mass index (BMI) higher than 30. ARDS was defined according to the Berlin definition[33]. Septic shock was defined according to the third international consensus definitions for sepsis and septic shock[34]. Clinical outcomes were recorded up to 30 days after the hospital admission: 30-day mortality, number of hospital-, ICU-, and ventilator-free days. The 'ventilator-free days' outcome was defined as the number of days alive from day 1 of severe pneumonia to day 30 during which the patient was breathing without MV. Acute phase response is the systemic response to tissue damage[35]. We used CRP concentrations as a surrogate for APR because it is recognized as the prototype for acute phase reactant[31].

Biological judgment criteria. The primary judgment criterion was cholesterol concentration. Secondary judgment criteria were HDL metabolism parameters (HDL cholesterol, HDL size, ApoA1, ApoE, SAA), LDL metabolism parameter (LDL cholesterol, LDL size, ApoB), VLDL parameters (triglyceride concentration, VLDL size), NEFAs, lipid peroxydation and lipid transfer protein activity (PLTP and CETP activity).

Measurement of lipid parameters. Total cholesterol concentration, total triglyceride concentration, high density lipoprotein cholesterol concentration (HDL-c) and low-density cholesterol concentration (LDL-c) were determined by colorimetric enzymatic methods. LDL-c and HDL-c were determined by direct methods. Apolipoprotein A1 (ApoA1) and B (ApoB) were measured by immunonephelemetry. All these parameters were determined on Dimension Vista analyzers using dedicated kits (SIEMENS).

Apolipoprotein E (ApoE) was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., Massachusetts). Serum amyloid A was measured by immunoassays using the proQuantum method (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., Massachusetts). Lipid peroxidation was measured by fluorescence using the Tbars method (BIOASSAY SYSTEMS, Hayward, USA).

Lipoprotein size determination. The different fractions of plasma were separated according to their density by ultracentrifugation (TLA100.2 rotor, BECKMAN, Palo Alto, CA). Densities were adjusted by adding appropriate volumes of potassium bromide solution. Three consecutive ultra-centrifugations were conducted at the appropriate densities in order to separate the plasma into 4 fractions: the triglyceride-rich fraction ($d < 1.006$), the LDL fraction ($1.006 < d < 1.063$), the HDL fraction ($1.063 < d < 1.21$) and the lipoprotein-free fraction ($d > 1.21$).

Triglycerides, cholesterol (free and total) and phospholipids in lipoproteins fractions isolated by ultracentrifugation were measured enzymatically by colorimetry with commercially available kits (DIASYS DIAGNOSTIC SYSTEMS GMBH, Holtzheim, Germany) according to manufacturer's instructions. Lipoprotein size in isolated fractions was calculated based on the lipid composition as follows[36]: lipoprotein diameter (Å) = 20 * (radius of surface + radius of core); radius of surface being equal to 2.05 nm; radius of core being equal to 3 * [1.556*(moles%TG) + 1.068* (moles%CE)]/[0.685 (moles%PL) + 0.391 (mol%UC)].

PLTP and CETP activity measurement. Phospholipid transfer protein (PLTP) activity was measured using a commercially available fluorescence activity assay (ROAR BIOMEDICAL INC., New York) according to the manufacturer's instructions. Fluorescence measurements were performed over time on a Vicor^2 multilabel counter (PERKIN ELMER). Phospholipid transfer activity was calculated from the slope of fluorescence increase between 1 and 30 min.

Cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity was measured using a commercially available fluorescence activity assay (ROAR BIOMEDICAL INC., New York) according to the manufacturer's instructions. Fluorescence measurements were performed over time on a Vicor^2 multilabel counter. Cholesteryl ester transfer activity was calculated from the slope of fluorescence increase between 1 min and 2 h.

Measurement of glucose metabolism parameters. Fructosamine and glucose concentrations were measured on total plasma by colorimetry using commercially available kits (CLINISCIENCES, Nanterre, France, for fructosamine and glucose). Insulin concentrations were measured by ELISA (MERCODIA AB, Sweden).

Total NEFA concentrations. Total non-esterified fatty acids (NEFAs), fructosamine and glucose concentrations were measured on total plasma by colorimetry using commercially available kits (DIASYS DIAGNOSTIC SYSTEMS GMBH, HOLTZHEIM, Germany for NEFA).

Characterization of NEFAs. The abundance of individual free fatty acids was determined by negative chemical ionization mode (NCI) GCMS in plasma. Deuterated fatty acids were from Cayman (BERTIN PHARMA, Montigny le Bretonneux, France). Chemicals of the highest grade available were purchased from SIGMA ALDRICH (Saint-Quentin Fallavier, France). LCMSMS quality grade solvents were purchased from FISCHER SCIENTIFIC (Illkirch, France). 25 µL plasma were spiked with 5 µL of free fatty acids internal mix containing 635 ng, 326 ng, 95 ng, of linoleic acid d4, arachidonic acid-d8, and DHA-d5, respectively. Samples were mixed with 1.2 ml of Dole's reagent (Isopropanol/Hexane/Phosphoric acid 2 M 40/10/1 v/v/v). Free fatty acids were further extracted with 1 ml of Hexane and 1 ml of distilled water. Organic phase was collected and evaporated under vacuum. Fatty acids were analyzed as pentafluorobenzyl esters (PFB-FA esters) by NCI-GCMS as previously described (5). Calibration curves were obtained using linoleic acid (2–8 µg) arachidonic acid (1–4 µg) docosahexaenoic acid (0.4–16 µg) and docosapentaenoic acid (0.1–0.4 µg) extracted by the same method used for plasma. Linear regression was applied for calculations.

Plasma PLA2, leukotriene B4 and prostaglandin E concentrations. Plasma sPLA2 and Lp-PLA2 concentrations were measured by ELISA (THERMOFISHER SCIENTIFIC, Massachusetts, United States). Plasma leukotriene B4 and prostaglandin E concentrations were measured by ELISA (CAYMAN CHEMICAL, MICHIGAN, United States).

Plasma cytokines measurement. Plasma IL-1β, IL-6, IL-10, CXCL-10, GM-CSF and TNF-α, were quantified using a Luminex® Human Magnetic assay (R&D SYSTEMS, USA) to study the potential link between immune response and plasma lipids[21].

Statistical analyses. Collected data were described according to COVID-19 status. Continuous variables were expressed as means + /− standard deviations (SDs) or medians and interquartile ranges (IQRs) according to their distribution. Categorical variables were described as frequencies and percentages. Univariate analysis consists of comparisons between variables according to COVID-19 status, performed using the chi-square test (or Fisher's exact test when appropriate) for percentages, the Student's t-test for means and the Wilcoxon Mann–Whitney test for medians and IQRs. Lipoprotein metabolism parameters with $p < 0.05$ for Student's t-tests were presented as boxplots to visualize potential associations between these parameters and COVID-19 status.

For multivariate analysis, principal component analysis (PCA) was used first to identify potentially significant patterns among the 25 variables (supplementary material): lipoprotein metabolism parameters (13 variables) and the following 12 clinical and biological parameters: BMI, PSI, SOFA, Lactate, ICU and hospital length of stay, ventilation duration and free days at day 30, CRP, PCT, creatinine and NT-ProBNP. PCA identifies factors, called principal components, that induce the most variation in the overall data. These factors are uncorrelated and can be expressed as a linear combination of the correlated original variables (OV). We can inverse these formulas to express each OV as a linear combination of factors. Coefficients defining these linear combinations are interpreted as correlation coefficients. A positive (or negative) coefficient means that the OV is positively (or negatively) associated with the factor. An absolute value approaching 1 indicates that the original variable has a strong influence on the value of the factor, while an absolute value below 0.3 is weak. Each factor describes a percent variation of the OVs. In order to determine the number of components to retain, we used the scree plot test: the number of factors to retain corresponds to the break point between factors with large eigenvalues and those with small eigenvalues on the scree plot[37] and the clinical interpretability of these factors[38]. The labeling was primarily descriptive and based on our interpretation of the factors structure for the OVs strongly associated with the factor. In addition, OVs data can be projected and plotted on the plans defined by the retained factors, which reduces the dimensionality of a large amount of potentially interrelated OVs into a smaller set of factors. This makes it possible to observe variations and strong patterns among patients in a new, two-dimensional space without losing important information[39].

Spearman's rank correlations were computed between clinical characteristics and pertinent lipoprotein metabolism parameters associated with COVID-19 status in univariate analysis comparison tests. Multivariable linear regression was then performed between the selected lipoprotein metabolism parameters as independent variables and the COVID-19 status as a principal explicative covariate. To account for potential confounders, we constructed models adjusted for BMI, CRP and SOFA score. Absence of autocorrelation and heteroscedasticity were assessed using the DW statistic and the White test[40], respectively. Model variability explicative power was quantified using the R^2 coefficient. Association results were expressed as mean differences ± SE. A p-value below 0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed using SAS software (version 9.4, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

Ethics approval and consent to participate. This ancillary study of the ongoing prospective Lymphonie study (ClinicalTrials.gov NCT03505281) was registered in ClinicalTrials.gov (NCT04435223). The study fulfilled legal and ethics requirements: Approval was obtained from the CPP (*Comité de Protection des Personnes* SUD MEDITERRANEE V; 2017-A03404-49) for the original study and an amendment was obtained to include supplementary patients with severe COVID-19. All subjects (or their legal representatives) received written information and provided their informed consent to participate.

Data availability

All relevant data are within the paper. Raw data are available after notification and authorization of the competent authorities. In France, all computer data (including databases, particular patient data) are protected by the National Commission on Informatics and Liberty (CNIL), the national data protection authority for France. CNIL is an independent French administrative regulatory body whose mission is to ensure that data privacy law is applied to the collection, storage, and use of personal data. As the database of this study was authorized by the CNIL, we cannot make available data without prior agreement of the CNIL.

Received: 17 December 2020; Accepted: 4 May 2021
Published online: 24 May 2021

References

1. Lemyze, M. *et al.* Implications of obesity for the management of severe coronavirus disease 2019 pneumonia. *Crit. Care Med.* https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000004455 (2020).
2. Gao, F. *et al.* obesity is a risk factor for greater COVID-19 severity. *Diabetes Care* **43**, E72–E74 (2020).
3. Simonnet, A. *et al.* high prevalence of obesity in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) requiring invasive mechanical ventilation. *Obesity* **28**, 1195–1199 (2020).
4. Stefan, N., Birkenfeld, A. L., Schulze, M. B. & Ludwig, D. S. Obesity and impaired metabolic health in patients with COVID-19. *Nat. Rev. Endocrinol.* **16**, 341–342 (2020).
5. Klop, B., Elte, J. W. F. & Cabezas, M. C. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients* **5**, 1218–1240 (2013).
6. Blaak, E. E. Fatty acid metabolism in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Proc. Nutr. Soc.* **62**, 753–760 (2003).
7. Navab, M., Anantharamaiah, G. M. & Fogelman, A. M. The role of high-density lipoprotein in inflammation. *Trends Cardiovasc. Med.* **15**, 158–161 (2005).
8. Shen, B. *et al.* Proteomic and metabolomic characterization of COVID-19 patient sera. *Cell* https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.032 (2020).
9. Hu, X., Chen, D., Wu, L., He, G. & Ye, W. Low serum cholesterol level among patients with COVID-19 infection in Wenzhou China. *SSRN Electron. J.* https://doi.org/10.2139/ssrn.3544826 (2020).
10. Wei, X. *et al.* Hypolipidemia is associated with the severity of COVID-19. *J. Clin. Lipidol.* https://doi.org/10.1016/j.jacl.2020.04.008 (2020).
11. Tanaka, S. *et al.* Lipoprotein concentrations over time in the intensive care unit COVID-19 patients: results from the ApoCOVID study. *PLoS ONE* **15**, e0239573 (2020).
12. Fan, J. *et al.* Low-density lipoprotein is a potential predictor of poor prognosis in patients with coronavirus disease 2019. *Metabol. Clin. Exp.* **107**, 154243 (2020).
13. Wang, G. *et al.* Low high-density lipoprotein level is correlated with the severity of COVID-19 patients. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-34659/v1
14. Wei, C. *et al.* HDL-scavenger receptor B type 1 facilitates SARS-CoV-2 entry. *Nat. Metab.* https://doi.org/10.1038/s42255-020-00324-0 (2020).
15. Toelzer, C. *et al.* Free fatty acid binding pocket in the locked structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Science* **370**, 725–730 (2020).
16. Tam, V. C. Lipidomic profiling of bioactive lipids by mass spectrometry during microbial infections. *Semin. Immunol.* **25**, 240–248 (2013).
17. Helms, J. *et al.* High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Med.* **46**, 1089–1098 (2020).
18. Marini, J. J. & Gattinoni, L. Management of COVID-19 respiratory distress. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **323**, 2329–2330 (2020).
19. Luciani, M. *et al.* Coinfection of tuberculosis pneumonia and COVID-19 in a patient vaccinated with Bacille Calmette-Guérin (BCG): case report. *SN Compr. Clin. Med.* **2**, 2419–2422 (2020).
20. Recovery Collaborative Group. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19: preliminary report. *N. Engl. J. Med.* https://doi.org/10.1056/nejmoa2021436 (2020).
21. Blot, M. *et al.* The dysregulated innate immune response in severe COVID-19 pneumonia that could drive poorer outcome. *J. Transl. Med.* **18**, 1–14 (2020).
22. Blot, M. *et al.* CXCL10 could drive longer duration of mechanical ventilation during COVID-19 ARDS. *Crit. Care* **24**, 1–15 (2020).
23. Viardot, A. *et al.* Obesity is associated with activated and insulin resistant immune cells. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **28**, 447–454 (2012).
24. van Leeuwen, H. J. *et al.* Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.* **31**, 1359–1366 (2003).
25. Barlage, S. *et al.* ApoE-containing high density lipoproteins and phospholipid transfer protein activity increase in patients with a systemic inflammatory response. *J. Lipid Res.* **42**, 281–290 (2001).
26. Murch, O., Collin, M., Hinds, C. J. & Thiemermann, C. Lipoproteins in inflammation and sepsis I. Basic science. *Intensive Care Med.* **33**, 13–24 (2007).
27. Norata, G. D., Pirillo, A., Ammirati, E. & Catapano, A. L. Emerging role of high density lipoproteins as a player in the immune system. *Atherosclerosis* **220**, 11–21 (2012).
28. Thomas, T. *et al.* COVID-19 infection alters kynurenine and fatty acid metabolism, correlating with IL-6 levels and renal status. *JCI Insight* **5**, (2020).
29. Zeiher, B. G. *et al.* LY315920NA/S-5920, a selective inhibitor of group IIA secretory phospholipase A2, fails to improve clinical outcome for patients with severe sepsis*. *Crit. Care Med.* **33**, 1741–1748 (2005).
30. van der Poll, T., van de Veerdonk, F. L., Scicluna, B. P. & Netea, M. G. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 407–420 (2017).
31. Gewurz, H., Mold, C., Siegel, J. & Fiedel, B. C-reactive protein and the acute phase response. *Adv. Intern. Med.* **27**, 345–372 (1982).
32. von Elm, E. *et al.* The Strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *PLoS Med.* **4**, e296 (2007).
33. Ranieri, V. M. *et al.* Acute respiratory distress syndrome: The Berlin definition. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **307**, 2526–2533 (2012).
34. Singer, M. *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801 (2016).
35. Baumann, H. & Gauldie, J. The acute phase response. *Immunol. Today* **15**, 74–80 (1994).
36. Kuksis, A., Breckenridge, W. C., Myher, J. J. & Kakis, G. Replacement of endogenous phospholipids in rat plasma lipoproteins during intravenous infusion of an artificial lipid emulsion. *Can. J. Biochem.* **56**, 630–639 (1978).
37. Cattell, R. B. The scree test for the number of factors. *Multivariate Behav. Res.* **1**, 245–276 (1966).
38. Cattell, R. B. & Vogelmann, S. A comprehensive trial of the scree and kg criteria for determining the number of factors. *Multivariate Behav. Res.* **12**, 289–325 (1977).
39. Jolliffe, I. T. Principal Components in Regression Analysis. in 129–155 (Springer, New York, NY, 1986). https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1904-8_8.

40. White, H. A heteroskedasticity-consistent covariance matrix estimator and a direct test for heteroskedasticity. *Econometrica* **48**, 817 (1980).

Acknowledgements
The authors would like to acknowledge the contribution of all investigators of the Lymphonie study group, the CIC-EC1432 (Alexandra Lamotte-Felin, Lydie Rossie and Delphine Pecqueur), the Intensive Care Medicine Research team (Solenne Villot, Mathilde Audry and Samantha Lima) and Shaliha Bechoua from the CRB (Centre de Ressource Biologique). We thank the patients and healthcare team. We thank Suzanne Rankin for proofreading and editing the manuscript.

Author contributions
M.N., M.B., T.G., D.M., C.B., L.P., C.T. and B.B. conceived and guided the project. M.N., A.J., G.P., N.L.G., J.P.P., T.P., V.B., H.C., T.G. and D.M. carried out the experiments. M.N., D.M., T.G., A.B. and A.J. analyzed the data. M.N., M.B., B.B., J.P.Q. and P.E.C. were clinical investigators of the original study. M.N., T.G., D.M., M.B. and A.B. wrote the manuscript. L.L., V.D., P.G.G., L.P., J.P.Q., C.B., C.T. and B.B. reviewed and edited the manuscript. All the authors have read and approved the manuscript.

Funding
This study was supported by grant (MN) from the COVIDOLIP – AOIc2020 (Institutional grant), by the INSERM (Centre de Recherche UMR 1231) and the ANR Investissements d'Avenir Grant (ANR-11 LABX-0021-01, Labex Lipstic).

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Additional information
Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41598-021-90362-9.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.N.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2021

Lymphonie study group

Pascal Andreu[7], François Aptel[7], Jeremy Barben[10], Guillaume Beltramo[11], Philip Bielefeld[12], Philippe Bonniaud[11], Bernard Bonnotte[13], Jean-Baptiste Bour[14], Marielle Buisson[6], Pascal Chavanet[6], Auguste Dargent[7], Marjolaine Georges[11], Alexandre Guilhem[13], Julien Guy[15], Marie Labruyère[7], Serge Monier[2,3,4,16], Suzanne Mouries-Martin[12], Sébastien Prin[7] & Alain Putot[10]

[3]INSERM, LNC UMR1231, 21000 Dijon, France. [4]FCS Bourgogne-Franche Comté, LipSTIC LabEx, 21000 Dijon, France. [10]Geriatrics Internal Medicine Department, Dijon Bourgogne University Hospital, Dijon, France. [11]Department of Pneumology, Dijon Bourgogne University Hospital, Dijon, France. [12]Department of Internal Medicine and Systemic Diseases, Dijon Bourgogne University Hospital, Dijon, France. [13]Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Dijon Bourgogne University Hospital, Dijon, France. [14]Laboratory of Virology, Dijon Bourgogne University Hospital, Dijon, France. [15]Hematobiology, Dijon Bourgogne University Hospital, Dijon, France. [16]Cytometry Core Facility, University of Burgundy Franche-Comté, Dijon, France.

Résumé

Les LPS (lipopolysaccharides), endotoxines provenant des bactéries à Gram négatif, sont connus pour avoir la capacité d'interagir avec la barrière intestinale et provoquer la désorganisation de cette dernière. Ces molécules sont ensuite capables de passer dans le compartiment sanguin (endotoxémie) pour provoquer une inflammation métabolique à bas bruit ou une syndrome inflammatoire aigu. Cependant, certaines protéines circulantes telles que la PLTP (Protéine de Transfert des Phospholipides) permettent de transférer les LPS aux lipoprotéines circulantes dans le sang afin de procéder à leur détoxification. Les objectifs principaux de ces travaux de recherche étaient d'étudier le devenir métabolique des LPS d'origine intestinale ou injectés dans la cavité péritonéale ainsi que l'influence de la PLTP sur ces LPS dans un contexte de maladies inflammatoires et infectieuses telles que l'obésité, le diabète de type 2 (DT2) ou encore une péritonite. Des souris type-sauvage (présence de PLTP endogène active) ont été comparées à des souris génétiquement modifiées déficientes en PLTP après administration de LPS par voie orale ou intrapéritonéale. Au niveau intestinal, la déficience en PLTP est associée à une augmentation de la translocation des LPS de la lumière intestinale vers la circulation, où leur association aux lipoprotéines plasmatique est diminuée en parallèle à un défaut de clairance des lipoprotéines riches en triglycérides (TRL) causé par une diminution de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme clé nécessaire à l'hydrolyse des triglycérides. Au niveau de la cavité péritonéale, l'absence de PLTP diminue la liaison des LPS aux lipoprotéines de haute densité (HDL) *in situ* empêchant ainsi leur inactivation précoce et *in fine*, leur détoxification par la voie hépatobiliaire. L'absence de PLTP induit ainsi une forte incapacité à détoxifier efficacement les LPS d'origine intestinale et péritonéale, conduisant à une augmentation de la réponse inflammatoire et à de possibles complications plus sévères (obésité, insulinorésistance, syndrome inflammatoire systémique). La PLTP possède donc un rôle majeur dans la neutralisation précoce des LPS dans la cavité abdominale, faisant d'elle une cible thérapeutique intéressante dans le traitement des maladies métaboliques et infectieuses.

Abstract

LPS (lipopolysaccharides) are endotoxins originating from Gram-negative bacteria. They have been extensively described for their ability to interact with and disrupt the intestinal barrier. These toxins are able to cross the gut barrier and to pass into the blood (endotoxemia), leading to low-grade metabolic inflammation or to a severe inflammatory syndrome (SIRS). Fortunately, some circulating proteins such as PLTP (Phospholipid Transfer Protein) are able to transfer LPS to plasma lipoproteins in order to inactivate and detoxify them. The main goals of this study were to investigate the metabolic fate of LPS from the gut and peritoneal cavity but also the influence of PLTP on these toxins in a context of inflammatory and infectious diseases such as obesity, type 2 diabetes (T2D) or peritonitis. Wild-type mice (presence of active endogenous PLTP) were compared with PLTP-deficient genetically engineered mice after oral or intraperitoneal administration of LPS. After oral administration of LPS, PLTP deficiency leads to increased translocation of LPS from the gut lumen to the circulation, where its association with plasma lipoproteins is strongly decreased together with a defect of clearance of triglyceride-rich lipoproteins (TRL) due to decreased lipoprotein lipase (LPL) activity, a key enzyme involved in triglycerides hydrolysis. After intraperitoneal administration of LPS, the absence of PLTP leads to a decrease binding of LPS to high-density lipoproteins (HDL) *in situ*, preventing their early inactivation and their detoxification by the hepatobiliary pathway.

The absence of PLTP is associated with a strong inability to efficiently detoxify LPS originating from the gut or from peritoneal cavity leading to an increased inflammatory response and potential more severe complications (obesity, insulin resistance, systemic acute inflammatory syndrome). Thus, PLTP plays a major role in the early neutralization of LPS in abdominal cavity and it could be an interesting therapeutic target in the treatment of metabolic and infectious diseases.