République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université YAHIA FARES De Médéa

Faculté des sciences biologiques
Département des sciences de la vie et la terre

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

En sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée.

Présenté par :

- *ABDMEZIEM Karima.*
- *HADRI Abir.*

THEME :

Effet d'un facteur d'origine bactérien (LPS) sur le déclenchement du syndrome métabolique chez la souris (*Mus musculus*).

Obtenu publiquement le 21 juin 2018 devant un jury composé de :

-	**Mr. NABI**	***Président***	***maitre assistant de classe A.***
-	**Mr. BENHAFRI**	***Promoteur***	***maitre assistant de classe A.***
-	**Mme. MOUZAOUI**	***Examinatrice***	***maitre assistante de classe A.***
-	**Mr. BENADJI**	***Examinateur***	***maitre assistant de classe A.***
-	**Mr. REHAL**	***Co- promoteur***	***maitre assistant de classe A.***

2017/2018

Remerciement

Avant tout, nous remercions **Dieu** *tout puissant de nous avoir aidé et donné la force pour achever ce travail.*

Nous tenons à remercier sincèrement notre promoteur **Mr BENHAFRI NADHIR**, *pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu nous consacrer et sans lui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

Nous remercions notre Co-promoteur **Mr RAHAL MOHAMED**, *pour sa disponibilité et pour les conseils.*

Nous remercions chaleureusement tous les membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail :

Nos remerciements s'adressent également envers l'équipe du groupe SAIDAL de Médéa, pour leur générosité et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges professionnelles.

Je ne laisserai pas cette occasion passer, sans remercier tous les enseignants et le personnel du département biologie et particulièrement ceux de la section microbiologie appliquée pour leur aide, leurs précieux conseils et pour l'intérêt qu'ils portent à ma formation.

Je ne manquerais pas de remercier **Dr Abdmeziem Farid, Mr Nourddine** *et* **Dr Rouis Mohamed** *pour leur aide technique et leur soutien moral.*

Dédicace

*Merci **ALLAH** de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve.*

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, à la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ;

***MAMAN** que j'adore.*

*A mon **PERE**, à l'homme de ma vie, qui a veillé à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.*

Aucune dédicace, ne saurait exprimer à sa juste valeur le profond amour que je vous porte. Merci d'être tout simplement mes parents.

A mes sœurs KHOULOUD, WIDAD, YASMINE et FATIMA ZOHRA et ma cousine IMENE, mes belles fleurs que j'aime si fort.

A Mes frères, AYOUB et la joie de la famille : YOUNES

A mon binôme KARIMA, à la fille qu'avec je partage beaucoup de passion Merci pour les bons moments que nous avons passé ensemble.

À mes amis et mes collègues : Madina, Soumia, Meriem, Mohamed Rouis, Mohamed Benrouissi, Takieddine Sofiane, Othmen et à toute l'équipe de la pharmacie BELHADJ MOHAMED.

Veuillez trouver tous dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

«Melle. Abir».



Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie mon travail A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, à ma chère ***maman (Safia)*** *que j'adore,* qui est le guide de réussite dans ma vie et Qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

A mon ***père (Rachid)*** *celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir,*

A ***ma sœur (Naila)****,* ***mon frère (Farid)*** *qui ma toujours motivé.*

A mon binôme ***(Abir),*** *et tous les amis de la promo 2013 : Naziha, Newel, Amel, Rahim, Adel.*

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études.

«Melle. Karima».



ملخص

لا يمكن أن يكون التطور السريع للأمراض الأيضية على المستوى العالمي هو الحقيقة الوحيدة للطفرات الجينية ، بل هو النتيجة المنسقة للصفات الجينية والتغيرات في العادات الغذائية. لفهم تأثير عامل بكتيري معوي المنشأ (LPS) على الاضطرابات الأيضية ، لدينا على أساس نماذج حيوانية في الجسم الحي: فئران من نوع *Mus musculus* ، 10 فئران مراقبة,11 فأر تم تغذيتها بنظام غذائي مفرط الدهون (72 ٪) و 12 فأرا تتغذى علىLPS. لهذا الغرض ، تم إجراء الرصد اليومي لمستوى السكر في الدم ووزن الجسم واختبار عدم تحمل الجلوكوز ، اختبار نسبة LPS في الدم باختبارLAL والأقسام النسيجية من الأنسجة الدهنية الحشوية والكبد. في نهاية التجربة. أظهرت النتائج التي توصلنا إليها في الدفعة المغذاة بنظام غذائي مفرط الدهون و نفسها بالنسبة لدفعة الـ LPS: زيادة في وزن الجسم ، وزيادة في نسبة السكر في الدم ، فضلا عن عدم تحمل الجلوكوز وتطوير التسمم بالدم endotoxemia نتيجة للزيادة في تركيز البلازما منالLPSالمحفزةلعملية الالتهاب التي لوحظت على الأقسام النسيجية في الأنسجة الدهنية الحشوية وتنكس دهني كبدي خاصة بسبب السمنة.

الكلمات الرئيسية:

LPS ، الأمراض الأيضية ، عدم تحمل الجلوكوز ، السمنة ,التسمم بالدم.

Résumé

Le développement rapide des maladies métaboliques à l'échelle mondiale ne peut être le seul fait de mutations génétiques mais plutôt la conséquence coordonnée des traits génétiques et de changements d'habitudes alimentaires. Pour appréhender l'impact d'un facteur bactérien d'origine intestinal (LPS) sur les désordres métaboliques, nous nous sommes basées sur des modèles animaux *in vivo*: souris d'espèce *Mus musculus*, 10 souris témoin, 11 souris nourris par une alimentation hyper lipidique (72%) et 12 souris gavées par les LPS. Pour cela, un suivi journalier de la glycémie à jeun et du poids corporel et un test d'intolérance au glucose, un dosage des LPS dans le sang par le test LAL ainsi que des coupes histologiques du tissu adipeux viscéral et du foie ont été réalisées à la fin de l'expérimentation. Nos résultats ont révélés chez le lot nourris par un régime hyper lipidique de même pour le lot LPS : un gain de poids corporel, une augmentation de la glycémie à jeun ainsi qu'une intolérance au glucose et un développement d'une endotoxémie métabolique suite à l'augmentation de la concentration plasmatique des LPS stimulant un processus inflammatoire observé sur les coupes histologiques au niveau du tissu adipeux viscéral et une stéatose hépatique notamment due à l'obésité.

Mots clés :

LPS, obésité, maladies métaboliques, intolérance au glucose ; endotoxémie.

Abstract

The rapid development of metabolic diseases on a global scale can't be the only fact of genetic mutations but rather the coordinated consequence of genetic traits and changes in dietary habits. To understand the impact of a bacterial factor of intestinal origin (LPS) on metabolic disorders, we based on animal models *in vivo*: mice of *Mus musculus* species, 10 control mice, 11 mice were fed with a hyper lipid diet (72%) and 12 mice fed with LPS. For this purpose, daily monitoring of fasting blood glucose and body weight and a glucose intolerance test, an assay of the LPS in the blood by the LAL test and histological sections of visceral adipose tissue and liver were performed at the end of the experiment. Our results revealed in the batch fed a diet hyper lipid same for the batch LPS: a gain in body weight, an increase in fasting blood glucose as well as a glucose intolerance and a development of a metabolic endotoxemia following the increase in the plasma concentration of LPS stimulating an inflammatory process observed on histological sections in the visceral adipose tissue and a hepatic steatosis especially due to obesity.

Key words:

LPS, metabolic diseases, glucose intolerance, obesity, endotoxémia.

Sommaire

- **Liste des abréviations**
- **Liste des figures**
- **Liste des tableaux**
- **Introduction**

Chapitre I : Rappel bibliographique

I. Microbiote intestinal et son rôle…….……..……...page 04

I.1. Microbiote intestinal……..…….……page 04

I.2. Rôle du microbiote intestinal. ……...page 04

II. Lipopolysaccharide…….…… ..page 04

II.1. Localisation des endotoxines……...page 05

II.2. Structure des endotoxines…….....page 06

II.2.1. Fraction polysaccharidique……..…….…… page 06

II.2.1.1. Chaine O spécifique……..... …..page 06

II.2.1.2. Noyau d'oligosaccharide……..…... …..page 07

II.2.2. Fraction phospholipidique……..…….....page 07

II.2.2.1. Lipide A ...……..... …..page 07

II.3. LPS, régime hyper lipidique et la barrière intestinale ……..…… page 08

II.4. Lipoprotéine et LBP (LPS Binding Protein)……..... page 08

II.5. Signalisation…...……...page 08

III. Microbiote intestinal et pathologies associées……..……..…page 09

III.1. Maladies métaboliques…….……...page 09

III.1.1. Obésité et inflammation du tissu adipeux …..…….. page 09

III.1.2. Obésité et inflammation et insulino-résistance…….…....page 12

III.1.3. Stéatose hépatique non alcoolique……... .page 13

III.2. Autres pathologies……..……... page 13

II.2.1. Maladies inflammatoires intestinales.....…… page 13

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel biologique……page 16

I.1.1. Souris…….....……. …page 16

I.1.2. LPS……..... page 16

I.1.3. Granulés……..…….. page 16

I.1.4. Alimentation hyper lipidique……...…… page 17

I.1.5. Huile de maïs……..... ..page 18

I.1.4. Réactif LAL……...page 18

I.1.5. lyophilisat d'endotoxine purifié d'Escherichia coli. ……page 18

I.2. Matériel non biologique ……page 18

I.2.1. Appareillage et autres…….....page 18

I.2.2. Produits chimiques……....page 20

II. Méthodes

II.1. Prise de glycémie……..page 21

II.2. Evolution du poids corporel et prise alimentaire……..……....page 21

II.3. Préparation de la suspension des LPS ….....page 22

II.4. Test de tolérance au glucose. ……...page 23

II.5. Sacrifices et prélèvement d'organes..……page23

II.6. Prélèvement du sang…….....page 24

II.7. Test LAL par méthode de gélification……..……...page 25

II.7.1. Le principe du test LAL……..……....page 25

II.7.2. Préparation des échantillons……..…..page 25

II.7.3. Préparation du témoin négatif ……page 25

II.7.4. Préparation du témoin positif …… page 25

II.8. Etude histologique……..…… ... page 27

III. Analyse statistique……page 30

Chapitre III: Résultats et discussion

I. Résultats

I.1.phase d'adaptation……..……page 32

I.2. Evolution pondérale er prise de poids…….....page 32

I.2.1. Evolution pondérale…….....page 35

I.2.2. Evolution de l'alimentation consommée…….....page 35

I.3. Evolution de la glycémie…….....page 35

I.4. Test d'intolérance au glucose……..….....page 37

I.5. Test LAL ……..……page 38

I.7. Aspect histologique……..……..... page 40

I.7.1. Aspect histologique du tissu adipeux viscéral…….....page 40

I.7.2. Aspect histologique du tissu hépatique……..... page 42

II. Discussion

II.1. Poids corporel…….....page 44

II.2. Glycémie……....….page 47

II.3. Dosage des endotoxines dans le sang…….. ..page 48

II.4. Coupe histologique……..page 49

II.4.1. Tissu adipeux viscéral……..……...…page 49

II.4.2. Tissu hépatique……..……..……..page 52

- **Conclusion et perspectives.**
- **Références bibliographiques.**
- **Annexes.**

LPS : Lipopolysaccharide.

HL : Hyper-lipidique.

KDO : Acide 3-désoxy-D-manno-2-octulosonique.

LBP : LPS binding protein.

HDL : Lipoprotéine de haute densité.

CD14s : CD14 soluble.

TG : Triglycéride.

GPI : Glycosyl phosphatidyl inositol.

MD-2 : Myeloid differentiation protein-2.

TLR4 : Toll like receptor 4.

AP1: Protéine activatrice 1.

NFκB : Facteur nucléaire de transcription κB.

CD14s : CD14 soluble.

CD14 KO : Déficient pour le récepteur CD14.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

TNFα : Tumor Necrosing Factor-a.

PAI1 : Plasminogen activator inhibitor-1.

IL : Interleukine.

MCD : Régime déficient en méthionine et choline.

MC : Maladie de Crohn.

CU : Colite Ulcérante.

IFN : Interferon.

FISH : Hybridation *in situ* en fluorescence.

PBS : Tampon phosphate salin.

LAL : Lysat d'Amœbocytes de Limule.

UE : Unité Endotoxine.

PH : Potentiel hydrogène.

E.P.P.I : Eau pour préparation injectable.

mCAM : Digital microscope eye-piece.

SEM, ESM : Erreur standard à la moyenne.

P : Probabilité.

NS : Non-significatif.

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1.

ICAM : InterCellular Adhesion Molecule.

VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule.

JNK : kinases c-Jun N-terminal.

MIF : Macrophage Inhibitory Factor.

M-CSF : Macrophage ColonyStimulating Factor.

VEGF : Vacular Endothelial Growth Factor.

PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor.

AEBP1 : Adipocyte enhancer-binding protein 1.

COX-2 : Cyclo-oxygénase2.

NAFLD : Non-alcoholic fatty liver disease.

SIBO : Prolifération bactérienne intestinale.

WT : Wild type.

FIAF : Fasting-induced adipocyte factor.

AGCC: Acide gras à court chaine.

Liste des figures

Figure 01: Bactérie à Gram négatif.

Figure 02 : Paroi de bactéries à Gram négatif.

Figure 03 : Structure chimique de LPS.

Figure 04 : Signalisation cellulaire du complexe LPS/CD1.

Figure 05 : Colonisation des souris axéniques avec le microbiote de souris minces ou obèses.

Figure 06 : Aspect microscopique des macrophages dans le tissu d'un sujet obèse.

Figure 07: *Mus musculus*

Figure 08 : Alimentation standard.

Figure 09: Alimentation hyper lipidique.

Figure 10 : A: réactif LAL **; B :** lyophilisat d'endotoxine purifié *d'Escherichia coli.*

Figure 11 : Stérilisation des tubes.

Figure 12 : Prise de glycémie.

Figure 13 : Prise de poids.

Figure 14: Préparation de la suspension des LPS.

Figure 15 : Technique de gavage.

Figure 16 : Dissection des souris.

Figure 17 : Centrifugation du sang.

Figure 18 : Incubation des tubes dans la plaque d'incubation.

Figure 19 : Evolution du poids corporel.

Figure 20: Évolution De la glycémie à jeun des souris des trois lots.

Figure 21 : Evolution de la glycémie à jeun, après 15-30-60 min de gavage par solution glucosée des souris des trois lots.

Figure 22: résultat du procédé gel-caillot.

Figure 23 : Quantité d'endotoxine détectée lors du test LAL pour les trois lots.

Figure 24 : Observation microscopique d'une inflammation a bas bruit du tissu adipeux viscéral chez les souris *Mus musculus.*

Figure 25 : Observation au microscope optique d'une stéatose métabolique chez les souris *Mus musculus.*

Liste des tableaux

Tableau I : Sensibilité du LAL à l'endotoxine d'*Escherichia coli*.

Tableau II : Tableau récapitulatif des différentes étapes des techniques histologiques.

Introduction

L'apparition d'un régime riche en gras dans les pays occidentaux devient un problème de la plus haute importance **(Cani *et al.,* 2007).** L'obésité est le résultat d'une interaction complexe entre la génétique et les facteurs de l'environnement principalement les changements dans les habitudes alimentaires impliqués dans le survenue accrue de maladies métaboliques, telles que l'obésité et le diabète, qui sont porteurs du syndrome métabolique **(Cani *et al* ., 2007*;* Nathalie et *at.,* 2011).** En outre, il a récemment été déterminé que l'obésité et la résistance à l'insuline sont associées à une inflammation systémique chronique de bas grade **(Wellen *et al.,* 2005).** Dans les modèles de obésité génétique et induite par l'alimentation, le tissu adipeux présente une expression et une teneur accrues de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF)-α **(Hotamisligil *et al.,* 1993 ; Weisberg *et al.,* 2003)**, interleukine (IL) -1 (**Hotamisligil *et al.,* 1993 ; Weisberg *et al.,* 2003)** et IL-6 (**Weisberg *et al.,* 2003).** Cette production de cytokine est alors délétère pour l'action de l'insuline, comme le TNFα capable de provoquer l'insuline résistance en augmentant la phosphorylation de la sérine sur l'insuline substrat récepteur-1 **(Hotamisligil *et al.,* 1996)**, conduisant à son inactivation ce qui favorisera l'hyper insulinémie et un stockage excessif des lipides dans les tissus hépatiques et adipeux **(Cani *et al.,* 2007).**Une hypothèse innovante a récemment été proposée dans laquelle l'écologie microbienne des humains pourraient être un facteur important affectant l'énergie l'homéostasie **(Ley *et al.,* 2005 ; Backhed *et al.,* 2007).** À cet égard, nous avons cherché pour un facteur d'origine microbien qui déclencherait une obésité, une insulino-résistance, une endotoxémie métabolique systémique ainsi qu'un état inflammatoire continu à faible tonalité induit par un régime riche en graisses ou par gavage directe d' LPS (lipopolysaccharides) chez les souris *mus musculus*.

Nous avons émis l'hypothèse que le LPS est :

1) Continuellement produit dans l'intestin par les de bactéries Gram-négatives (phase exponentiel).
2) Physiologiquement transloquer dans les capillaires intestinaux par un mécanisme dépendant de TLR4 **(Neal *et al.,* 2006)**.
3) Transporté de l'intestin vers les tissus cibles par un mécanisme facilité par les lipoprotéines (LBP)

4) Provoquant une inflammation a bas bruit au niveau périphérique (tissu adipeux - foie muscle) ainsi qu'une stéatose hépatique **(Vreugdenhil *et al.*, 2006).**

Chapitre I :

Rappel bibliographique

I. Microbiote intestinal et son rôle:

I.1. Microbiote intestinal :

Selon la définition d'**Isolauri *et al* en 2002,** le microbiote intestinal normal est une collection complexe et équilibrée de microorganismes qui habitent le tractus gastro-intestinal et remplissant un rôle dans la nutrition, la physiologie et le contrôle du système immunitaire de l'hôte. Après une colonisation complète, la microflore intestinale est constituée de divers espèces microbiennes assurant différentes fonctions pour l'hôte car elle a été estimée au près de 10^{13} – 10^{14} cellules microbiennes représentant 400 à 500 espèces et sous espèces et présente environ 10 fois le nombre total des cellules du corps humain **(Moore *et al.*, 1974; Bjorksten *et al.*, 2004)**.

I.2. Rôle du microbiote intestinal :

Chez l'adulte, le microbiote est décrit comme étant relativement stable et vit en parfaite symbiose avec son hôte **(Zoetendal *et al.*, 1998)**. En effet, les bactéries du tractus digestif jouent des rôles essentiels pour la santé de l'hôte et permettent la digestion de composés alimentaires que l'homme ne peut pas digérer. Ainsi, elle est capable de digérer des carbohydrates végétaux inutilisables tels quels par l'homme et de synthétiser des vitamines comme l'acide folique, la vitamine K et la biotine **(O'Hara et Shanahan 2006; Zoetendal *et al.*, 2006)**. Certaines bactéries, *les Lactobacillus species*, présentes dans la flore, sont capables de convertir les protéines du lait en acide lactique **(Gorbach *et al.*, 1990)**. La flore qui joue un rôle d'inhibition par compétition sur l'établissement de bactéries pathogènes, a également des effets bénéfiques directs pour l'hôte tel que l'éducation du système immunitaire, sur le renforcement de la barrière mucorale, la modulation de la motilité du tractus gastro-intestinal, l'homéostasie et la maturation intestinale **(Abrams et Bishop 1967; Ouwehand *et al.*, 2002; Backhed *et al.*, 2005).**

II. Lipopolysacchrides :

Les endotoxines sont des complexes macromoléculaires toxiques présents de manière constitutive dans la membrane externe chez toute bactérie à Gram négatif **(grff mirguet *et al.*, 2000)**. Les termes « endotoxine » et « lipopolysaccharide » sont souvent indifféremment utilisés dans la littérature scientifique **(Euzeby *et al.*, 2004)** .Le terme « endotoxine »désigne une toxine en majorité polysaccharidique, thermostable et retrouvée dans le filtrat de culture sous forme encore liée à la cellule au niveau des protéines de la membrane externe ;ce terme avait donc été

choisi par opposition au premier type de toxine connue « l'exotoxine » de nature protéique, thermolabile retrouvé libre, détaché de la cellule dans le filtrat de culture **(Sow *et al*., 1996)**.

L'endotoxine est la forme trouvée usuellement dans la nature, bien que des lipopolysaccharides puissent se trouver dans l'eau où se développent les bactéries à Gram négatif **(Grff-Mirguet *et al*., 2002)**.

II.1. Localisation des endotoxines :

Les lipopolysaccharides (LPS) constituent la couche la plus externe de la membrane externe des bactéries à Gram négatif **(Reeves Peter, 1995)**. La paroi des bactéries à Gram négatif est constituée de trois couches (**Grff-Mirguet, 2002) :**

- Une membrane interne ou cytoplasmique qui sert de barrière osmotique.
- Une membrane intermédiaire, à base de peptidoglycanes, qui maintient l'intégrité de la structure et la forme caractéristique de la bactérie.
- Une membrane externe contenant les lipopolysaccharides, identifiés dans toutes les bactéries Gram négatif étudiées, responsable d'une partie de l'activité biologique.

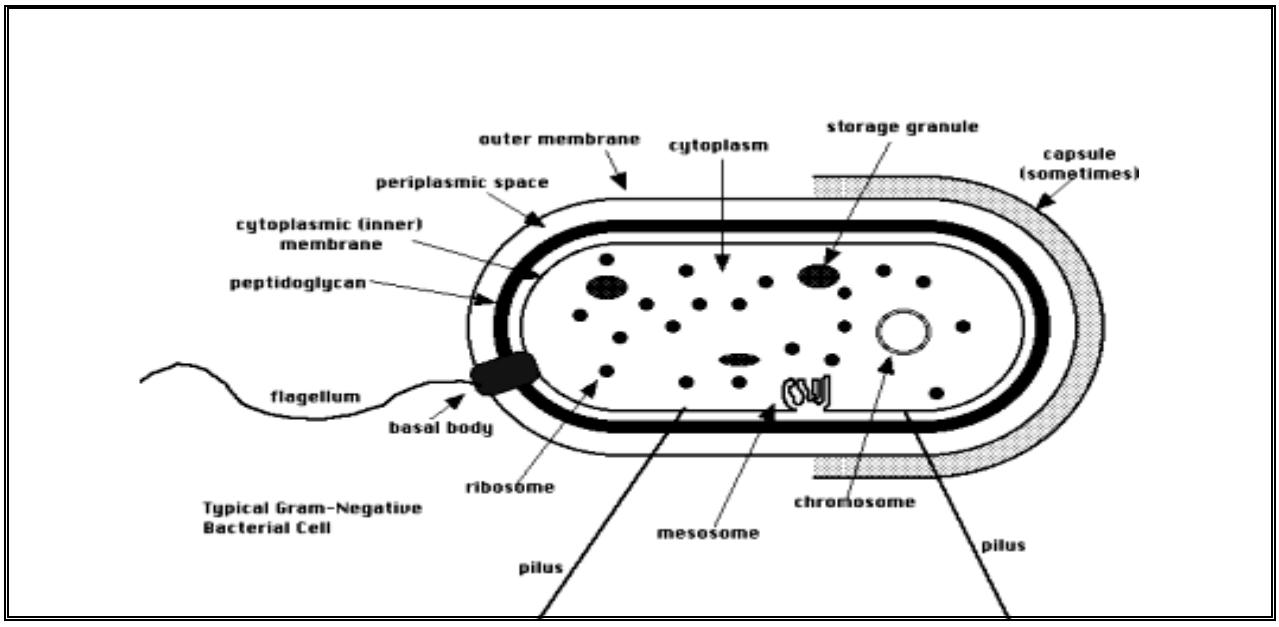


Figure 01: Bactérie à Gram négatif **(Colton et Russel, 2003).**

II.2. Structure des endotoxines :

Les endotoxines sont donc constituées d'un fragment de paroi de bactérie Gram négatif et du lipopolysaccharide donc les LPS ne sont pas des molécules uniques mais une famille de composés, chaque genre et chaque espèce de bactéries produit un LPS spécifique, c'est la partie biologiquement active des endotoxines, ils sont constitués de deux parties :

- Une partie polysaccharidique, fabriquée à partir d'un noyau oligosaccharidique ; le « core » ou base et d'une chaîne O spécifique **(Friberger, 1987)**.
- Une partie phospholipidique ou le lipide A, siège de l'activité pro inflammatoire **(Grff-Mirguet, 2002)**.

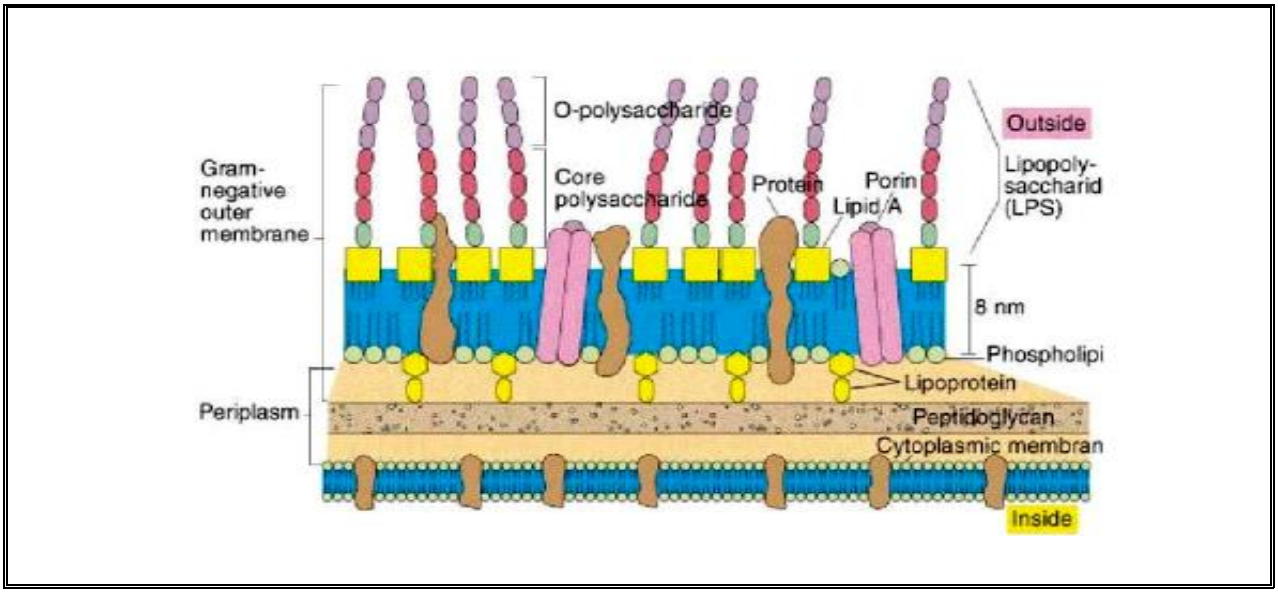


Figure 02 : Paroi de bactéries à Gram négatif **(Colton et Russel,2003).**

II.2.1. Fraction polysaccharidique :

II.2.1.1. Chaîne O spécifique :

Elle s'insère sur le « core » polysaccharidique ou base : cette chaîne O spécifique peut avoir une grande diversité de structure **(Friberger, 1987 ; Grff-Mirguet*et al*., 2002)**.

Elle est constituée « d'unités d'oligosaccharides » (chaînons) qui se répètent, chacune contenant cinq à sept monosaccharides ; et la nature, la séquence, le type de liaison et le groupe de fonction de substitution des monosaccharides varient avec chaque genre et chaque espèce de bactéries **(Euzeby *et al*., 2004).**

II.2.1.2. Noyau d'oligosaccharide :

Le noyau d'oligosaccharide est composé de noyau (ou core) interne, attaché au lipide A, en position 6 du N-acetyl-glucosamine, il contient deux sucres inhabituels : l'heptose et l'acide 3-desoxy-D-manno-2-octulosonique (KDO) qui est une molécule spécifique des lipopolysaccharides **(Robert *et al*., 1984)**.

II.2.2. Fraction phospholipidique :

II.2.2.1. Lipide A :

Constitué d'un dimère de N-acetyl-glucosamine phosphorylé comprenant six ou sept acides gras (le plus souvent six), ils sont saturés, certains sont liés directement au dimère, d'autres le sont par l'intermédiaire d'une fonction ester. Le lipide A fixe le LPS à la couche externe de la membrane cellulaire et constitue l'ultime spécificité entre les espèces (**Austin *et al*., 1990).**

Le lipide A isolé n'existe pas dans la nature, en tant que précurseur du LPS : au niveau de la membrane cytoplasmique, il se forme un composé précurseur du lipide A, puis les sucres composant le core viennent s'ajouter de façon séquentielle pour former l'unité « lipide A – core oligosaccharide » **(Sow *et al*., 1996).**

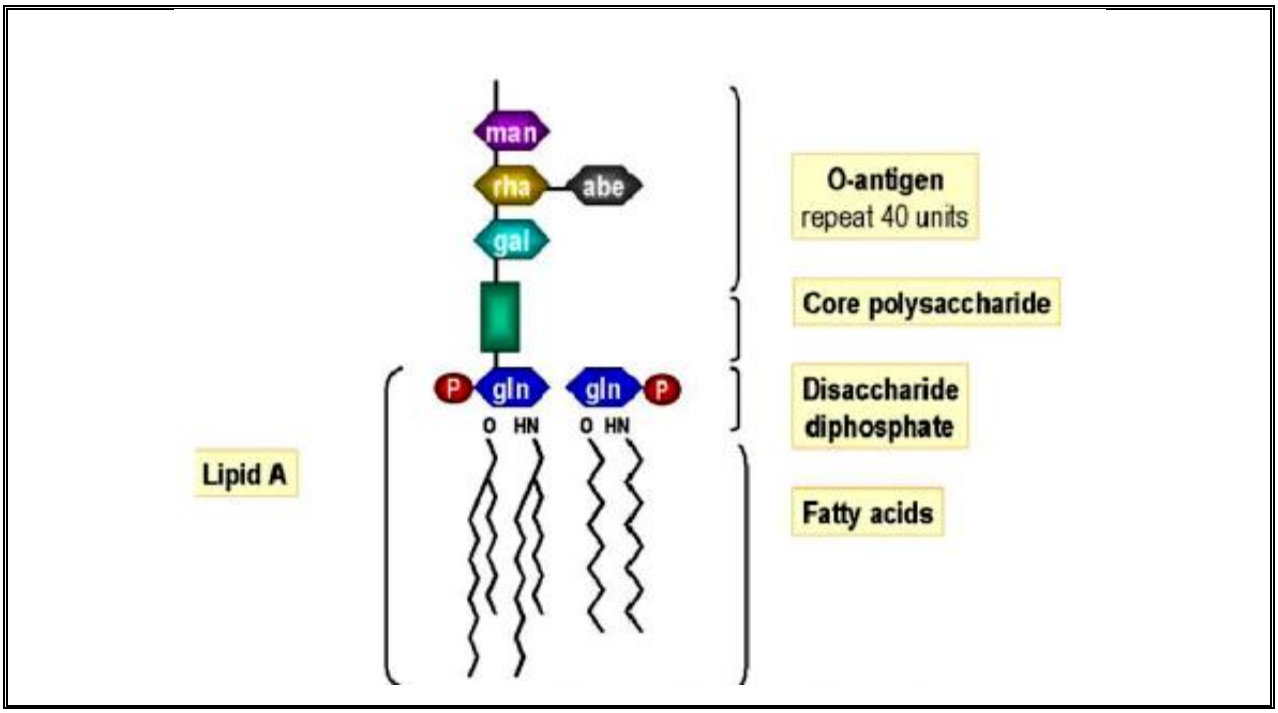


Figure 03 : Structure chimique de LPS **(Colton et Russel, 2003)**

II.3. LPS, alimentation hyper-lipidique et la barrière intestinale :

Une alimentation riche en lipides semble favoriser l'absorption du LPS à travers la barrière intestinale **(Cani *et al*., 2007; Erridge *et al*., 2007)**. Très récemment**, Ghoshal *et al*** ont démontré que la formation de chylomicrons promet l'absorption de LPS dans un modèle de cellules épithéliales humaines issues d'un adénocarcinome colorectal **(Ghoshal *et al*., 2009)**. Pour cela, les auteurs ont incubés les cellules avec de l'acide oléique capable d'induire la formation de chylomicrons (acides gras à chaines longues) ou avec de l'acide butyrique qui n'induit pas de chylomicrons (acides gras à chaines courtes). Les cellules incubées avec l'acide oléique ont relargué plus de LPS que celles étant en contact avec l'acide butyrique **(Elodie *et al*., 2011).**

II.4. Lipoprotéine et LBP (LPS binding protéine) :

Les LPS ne sont pas libres dans la circulation sanguine, ils sont transportés par une glycoprotéine, la LBP (la LPS binding proteine), ces derniers peuvent transporter les LPS de façon dépendante du nombre de phospholipides à la surface des lipoprotéines. En condition physiologique, les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont les principaux vecteurs de LPS et au cours d'inflammation ou d'infection, le taux plasmatique de HDL est diminué alors que les triglycérides (TG) sont augmentés **(Levine *et al*., 1993).**

II.5. Signalisation:

Une fois que le LPS est fixé à la LBP, cette protéine va permettre le transfert du LPS vers le récepteur CD14 qui est une glycoprotéine de 53 kDa ancré à la membrane par un glycosylphosphatidyl inositol (GPI). Ne possédant pas de partie cytoplasmique, le complexe CD14/LPS est reconnu par la protéine myeloid differentiation protein-2(MD-2) qui est associée au récepteur TLR4 (Toll like receptor 4), ce dernier possède un domaine de signalisation intracellulaire et va, via son activation, recruter différents adaptateurs aboutissant à l'activation des voies de signalisation NF-kB (Facteur nucléaire de transcription κB) et AP1(protéine activatrice 1) **(Heumann et Roger, 2002; Rakoff-Nahoum *et al*., 2004)**.

Il existe une forme soluble du récepteur CD14 (CD14s) capable de lier le LPS via la LBP et ce complexe peut se lier sur des cellules n'exprimant pas le CD14 comme les cellules endothéliales **(Heumann et Roger, 2002)**.

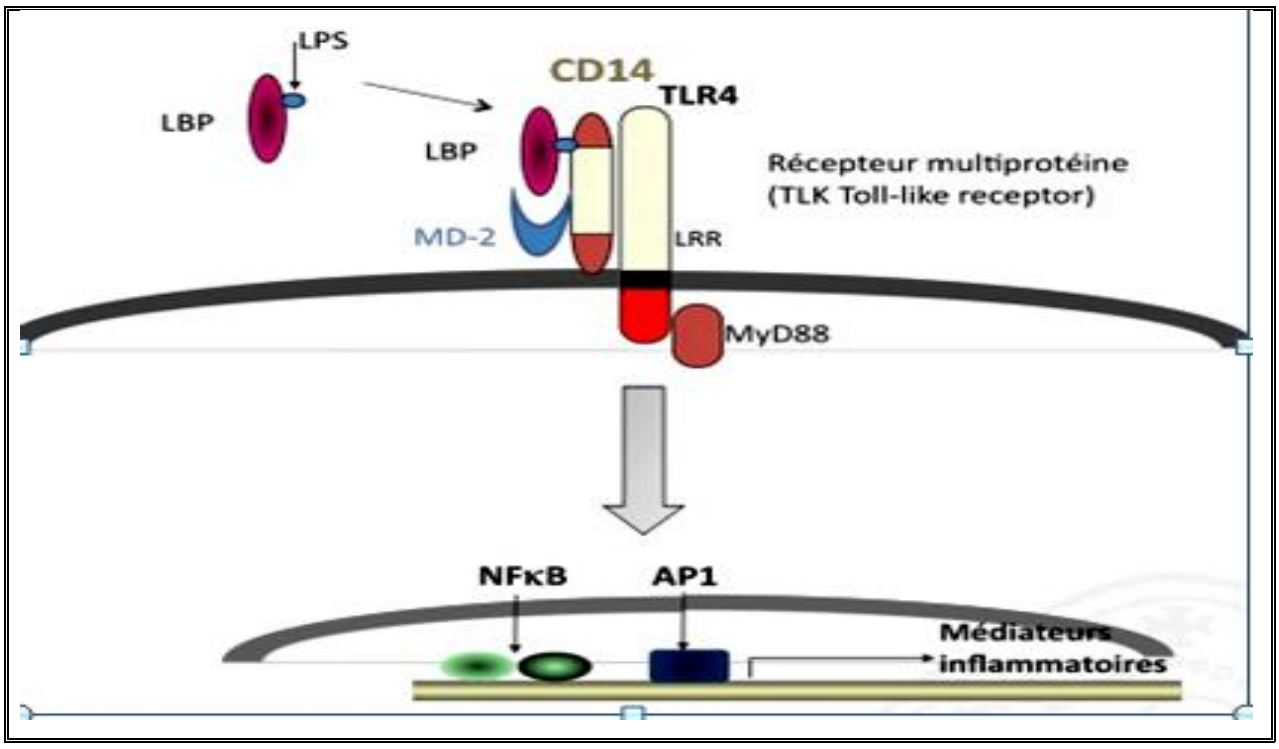


Figure 04 : Signalisation cellulaire du complexe LPS/CD1 **(Heuman et Roger, 2002; Rakoff-Nahoum *et al*., 2004).**

III. Microbiote intestinal et pathologies associées :

III.1. Maladies métaboliques:

Selon l'organisation mondiale de santé **(OMS)** (publiée en 1998 puis amendée en 1999), le syndrome métabolique regroupe dans sa définition la présence au minimum de trois anomalies métaboliques associées à l'obésité abdominale, hypertriglycéridémie, HDL-cholestérol bas, glycémie a jeun élevée, l'intolérance au glucose ou diabète de type 2 et l'hypertension.

III.1.1. Obésité et inflammation du tissu adipeux :

L'obésité est reconnue comme maladie chronique depuis 1997 par l'**OMS**. Cette organisation définit le surpoids et l'obésité comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé.

Deux groupes de souris axéniques ont été colonisées avec la flore provenant soit de souris conventionnelles sauvages, soit de souris obèses (ob/ob). Après 10 jours de colonisation, les souris colonisées avec la flore de souris (ob/ob) présentaient une augmentation de leur poids corporel de plus de 40% alors que l'augmentation chez les souris ayant reçu la flore issue de

souris sauvages n'était que de 20% **(Turnbaugh *et al*., 2006)**. La flore des souris obèses semble donc être une « super-flore » avec des capacités plus importantes dans la récupération de l'énergie ingérée. Dans ce sens, le caecum de souris obèses comparé à celui de souris normo pondérales contient plus d'acides gras à chaines courtes de type acétates et butyrates.

Cette « super-flore » avec un ratio *Firmicutes* sur *Bacteroidetes* augmenté, a donc des capacités d'extraction d'énergie supérieures à celle de la flore normale **(Turnbaugh *et al*., 2006).**

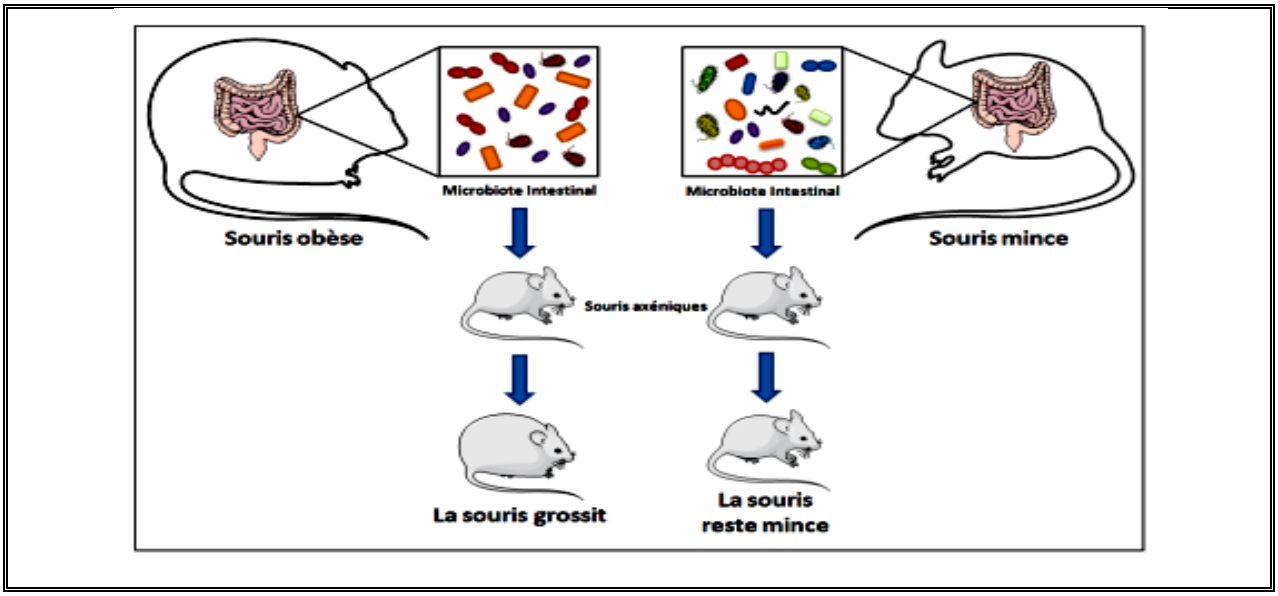


Figure 05 : Colonisation des souris axéniques avec le microbiote de souris minces ou obèses **(Turnbaugh *et al*., 2006).**

L'obésité est également associée à un dérèglement de la réponse inflammatoire. En effet, elle se caractérise par le développement d'une inflammation chronique dite « à bas bruit ».

Durant le développement de l'obésité, le tissu adipeux blanc subit en continu des modifications morphologiques majeures en réponse à des stimuli et/ou à des altérations de la balance énergétique. Dans le cas d'un apport énergétique (apport calorique) excessif, le tissu adipeux blanc subit un réarrangement mettant en jeu un renouvellement de la matrice extracellulaire et des adipocytes afin d'assurer son expansion et le stockage de l'énergie. Ce réarrangement est accompagné d'une modification de la composition cellulaire du tissu, notamment des cellules immunes, modifiant l'homéostasie énergétique et le statut inflammatoire du tissu adipeux ainsi que l'état métabolique général de l'organisme (résistance à l'insuline) **(Makki *et al*., 2014).**

L'intervention de nombreux facteurs est évoquée, mais il reste difficile d'établir clairement le ou les événements à l'origine de l'inflammation dans le tissu adipeux. Des travaux récents chez l'homme et chez l'animal suggèrent d'ailleurs que la sécrétion de molécules liées à l'inflammation par les macrophages puisse jouer un rôle particulièrement délétère chez l'obèse **(Bouloumie *et al*., 2005 ; Wellen et Hotamisligil, 2003).**

L'accroissement de la taille des adipocytes, qui caractérise l'état obèse, altère leur profil de sécrétion et induit un statut pro-inflammatoire, alors que les signaux impliqués ne sont pas clairement définis. La répartition caractéristique des macrophages en couronne autour d'adipocytes présentant des signes de mort cellulaire **(Shi *et al*., 2006) (figure 06)** suggère l'intervention de facteurs attractants spécifiques. Dans le tissu adipeux, des signaux exogènes comme les acides gras ou les lipopolysaccharides (LPS) d'origine bactérienne induisent une réponse inflammatoire en activant le récepteur TLR4 et les voies de signalisation intracellulaires principalement la voie NFκB **(Suganami *et al*., 2009).** Localement, les adipocytes inflammatoires, dont l'activité lipolytique est élevée, libèrent des acides gras qui stimulent la voie TLR4/NFκB dans les macrophages, contribuant ainsi à une boucle paracrine délétère entre les deux types cellulaires **(Kopp *et al*., 2010).**

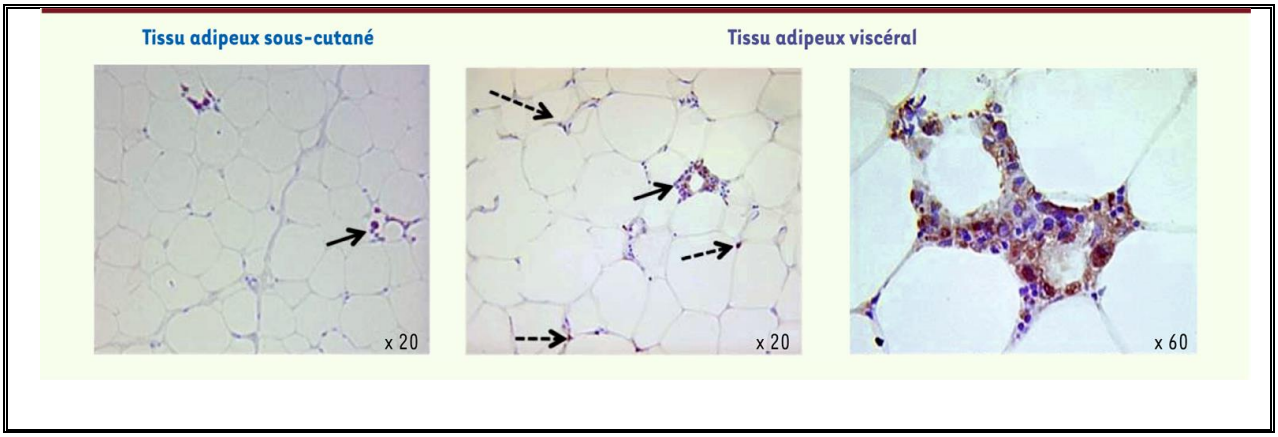


Figure 06 : Aspect microscopique des macrophages dans le tissu d'un sujet obèse. *Des biopsies chirurgicales de tissu adipeux sous-cutané et viscéral ont été traitées par un anticorps spécifique des macrophages. Les flèches pleines indiquent les macrophages disposés en couronne autour d'un adipocyte ; les flèches pointillées indiquent les macrophages disposés à l'intersection des adipocytes dans le parenchyme* **(Shi *et al*., 2006).**

III.1.2. Obésité, inflammation et insulino-résistance :

L'existence d'un lien entre la flore intestinale et l'obésité est connue depuis plus de 50 ans. Des travaux montrent qu'un changement de régime alimentaire notamment riche en graisses est associé à des modifications de la flore intestinale **(Cani *et al*., 2007; Cani *et al*., 2008 ; Turnbaugh *et al*., 2009)**. Ce lien entre l'adiposité et la flore intestinale apparaît également vrai chez l'homme. En effet, 12 volontaires obèses ont été soumis à un régime hypocalorique appauvri en lipides ou en glucides puis le séquençage des gènes bactériens dans les selles des sujets a permis de retrouver une forte diminution du rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* quasi similaire à celui observé chez des sujets sains **(Ley *et al*., 2006)**. Ainsi, sur la durée de l'expérience, une augmentation des *Bactéroidetes* et ce; de façon proportionnelle à la perte de poids, donc ces données suggèrent que le poids corporel dépendant de la nature du régime alimentaire qui intervient dans la gestion du profil des bactéries intestinales **(Ley *et al,* 2006).**

Des auteurs se sont alors attachés à étudier l'effet in vivo de l'endotoxémie métabolique sur la prise de poids, l'insulino-résistance et l'inflammation de basse intensité **(Cani *et al*., 2007).**

Des souris sauvages ont été équipées de mini pompes osmotiques délivrant du LPS sous-cutanée en faible quantité pendant 1 mois afin de retrouver les concentrations plasmatiques de LPS décrites lors d'un régime hyperlipidique contenant 72% de gras.

Les souris perfusées par le LPS ou nourries par un régime gras, montrent une augmentation de la concentration de glucose et d'insuline dans le sang par rapport à des souris nourries par un régime standard. De ce fait, La réponse insulinique à une administration orale de glucose est diminuée dans le groupe des souris nourries par un régime gras par rapport au groupe contrôle, mais ce n'est pas le cas dans le groupe des souris perfusées par le LPS **(Elodie *et al*., 2011).**

La détermination de l'expression génique des cytokines inflammatoires TNFα (Tumor Necrosing Factor-a), PAI1(plasminogen activator inhibitor-1), IL-1 (interleukine 1) et IL-6 (interleukine 6) montre une réponse inflammatoire au niveau du muscle, du foie et du tissu adipeux des souris perfusées au LPS et nourries par un régime gras, cependant cette inflammation semble être dépendante du récepteur CD14 puisque l'injection en intra veineuse de LPS chez des souris déficientes pour ce récepteur (CD14 KO) ne montre pas d'augmentation des cytokines inflammatoires dans le tissu adipeux, alors qu'une très forte augmentation de ces cytokines est retrouvée chez des souris sauvages, et les souris CD14 KO perfusées par du LPS via une mini-pompe osmotique ne développent pas d'hyperglycémie, d'hyper insulinémie ni de stockage des triglycérides au niveau hépatique **(Cani *et al*., 2007).**

III.1.3. Stéatose hépatique non alcoolique :

La stéatose non alcoolique est un aspect caractéristique du syndrome métabolique **(Musso *et al*., 2002).** Certaines études suggèrent que la flore bactérienne contribue à cette pathologie hépatique.

En effet, chez des patients atteints exclusivement d'une stéatose hépatique, une augmentation du taux de LPS circulant a aussi été retrouvée ainsi qu'une plus grande perméabilité intestinale et une augmentation de l'expression du récepteur TLR4 au niveau du foie (**Farhadi *et al*., 2008; Miele *et al*., 2009).**

Ces observations pourraient découler d'une plus forte croissance bactérienne observée au niveau intestinal chez ces patients **(Sabate *et al*., 2008).** Le taux de la protéine LBP est également augmenté chez ces malades et ceci de façon corrélée à l'expression hépatique du TNFα **(Ruiz *et al*., 2007).** De plus, des souris déficientes pour le récepteur TLR4 sont protégées de l'induction de stéatose hépatique induit par un régime déficient en méthionine et choline (MCD). Ainsi, le rôle de l'axe LPS-TLR4 semble donc participer dans la mise en place de la pathologie **(Rivera *et al*., 2007).**

III.2. Autres pathologies :

Le déséquilibre du microbiote intestinal pourrait également être impliqué dans d'autres maladies inflammatoires, comme la rectocolite hémorragique **(Kassinen *et al*., 2007)**, le syndrome de l'intestin irritable **(Kassinen *et al*., 2007)** et aussi dans des maladies auto-immunes telles que l'allergie **(Sjogren *et al*., 2009)**, et dans les troubles du spectre autistique **(Parracho *et al*., 2005).** La liste des maladies pour lesquelles on implique le microbiote intestinal s'allonge pratiquement tous les jours **(Burcelin*et al*., 2013)** sans qu'un véritable lien de causalité entre le déséquilibre du microbiote et ces maladies ne soit réellement démontré **(Burcelin *et al*., 2013)**.

III.2.1. Maladies inflammatoires intestinales :

Les maladies inflammatoires telles que la maladie de Crohn (MC) et la colite ulcérante (CU) sont la conséquence d'une réponse immunitaire aberrante au niveau du tractus intestinal. La maladie de Crohn est associée à une production excessive d'IL-12, IL-23 et IFN-g (Interferon) au niveau de l'intestin grêle et aboutissant très souvent à la formation de granulome **(Podolsky *et al*., 2002)**. La colite ulcérante est associée à une production excessive d'IL-13 affectant dans un premier temps le colon puis se développant souvent jusqu'au rectum. De nombreuses études

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

Chapitre II :

Matériel et méthodes

I. Matériel :

I.1. Matériel biologique :

I.1.1. Souris :

33 souris d'espèce *Mus musculus* âgées de 12 semaines de sexe male **(figure 07).** Les animaux ont été logés dans des cages individuelles, nourris *ad libitum* aux granulés et à l'eau, maintenus dans des conditions de température 22-23°C, une humidité relative 37% et de photopériode (12h D/12h L).

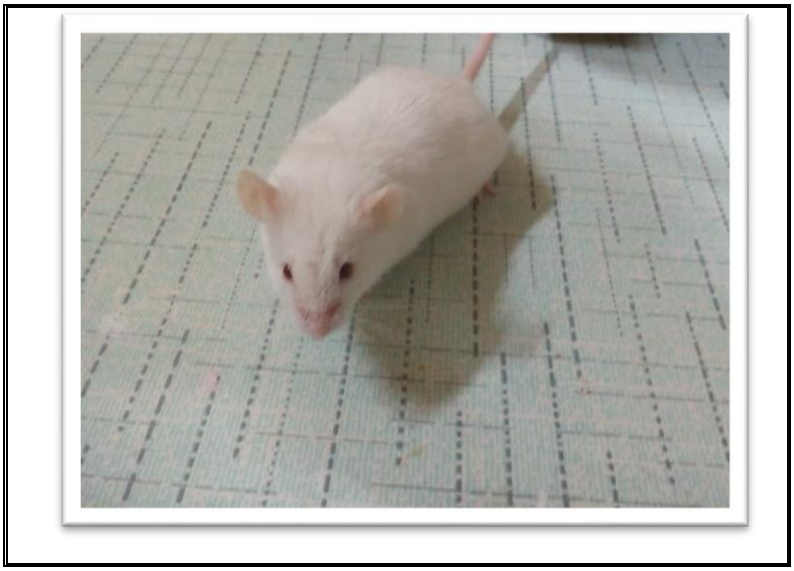


Figure 07: *Mus musculus (photo originale)*.

I.1.2. LPS :

Lipopolysaccharides (d'*Escherichia coli* 055: B5, Sigma, St. Louis, MO) de concentration 500mg/ul dilués dans 100ul de PBS (tampon phosphate salin) conservés au réfrigérateur à -4°C.

I.1.3.Granulés :

Composés de : protéine 20%, teneur en matières grasses 4%, cellulose brute 4%, cendres brutes 7%, calcium 1,1%, phosphore 0,8%.



Figure 08 : Alimentation standard (photo originale).

I.1.4. Alimentation hyper-lipidique : composée de 72% de graisse animal (crépine) **(figure 09).**



Figure 09: Alimentation hyper lipidique (photo originale).

I.1.5. Huile de maïs :

Commercialisée, composée : 59,6 % d'acides gras polyinsaturés dont acide linoléique (54 %), 27,4 % d'acides gras mono-insaturés (acide oléique), 12,9 % d'acides gras saturés (3 % sont sous forme d'acides gras libres, et acide linolénique (1 %)). Cette huile est utilisée pour le gavage des souris.

I.1.4.Réactif LAL (Lysat d'Amœbocytes de Limule):

Extrait aqueux provenant de limulus amoebocytes qui est prévu pour la détection qualitative d'endotoxines par la méthode de gèle –caillot **(figure 10)**.

I.1.5. Lyophilisat d'endotoxine purifié d'*Escherichia coli* :

Etalonné en UE (unité endotoxine) par rapport au standard international **(figure 10).**

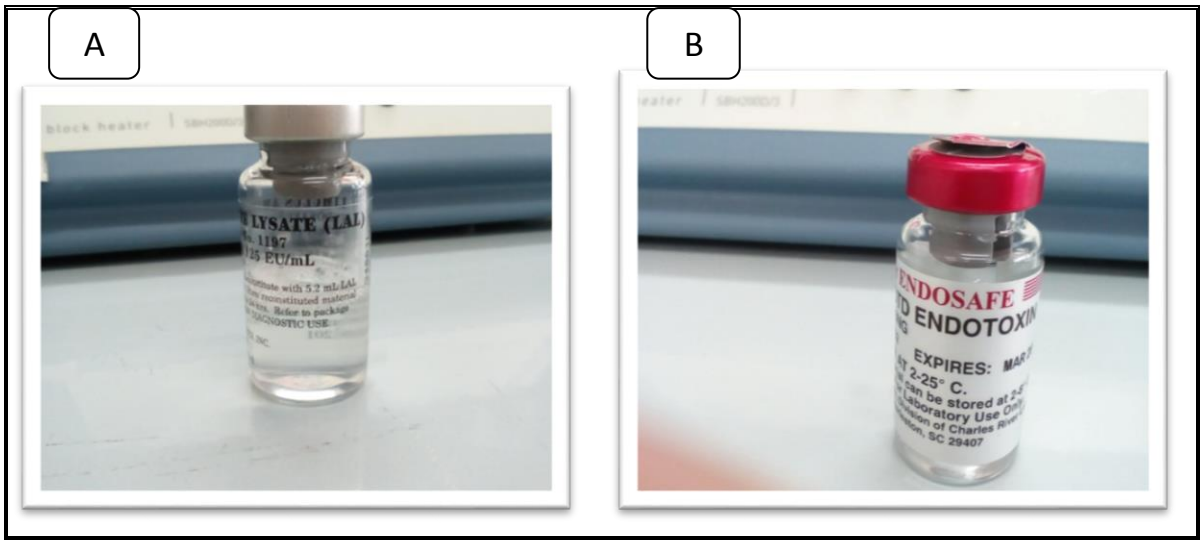


Figure 10 : A: réactif LAL **; B :** lyophilisat d'endotoxine purifié *d'Escherichia coli* (photo originale).

I.2. Matériel non biologique :

I.2.1. Appareillage et autres:

- **Broyeur :** pour le broyage des granulés.
- **Pipette graduée et micropipette** :(Batch No.18497) pour faire le prélèvement à partir de la suspension des LPS et l'huile de maïs.
- **Tubes à essais stériles :** les tubes de types pyrex sont stérilisés après chaque utilisation à l'étuve à 170°-180°C de 30 minutes à 1 heure **(figure 11).**



Figure 11 : Stérilisation des tubes (photo originale).

- **Sonde de gavage pour souris.**
- **Vortex :**(cat/Art.No.444-1372 (EU)) **.**
- **Cages :** pour le maintien des souris.
- **Baromètre et minuterie.**
- **Glucomètre :**(bionime).
- **PH mètre :** (e4120500).
- **Tubes hependorff.**
- **Centrifugeuse :** (278280) pour la séparation du plasma à partir du sang .

- **Tubes heparinés :** pour le prélèvement du sang lors du sacrifice.
- **Glacière.**
- **Balance :**(Item ;PA4102).
- **Bloc incubateur:** (5y9620).
- **Tubes dépyroginés.**
- **Seringues jetables, stériles et dépyrogénées.**
- **Chronomètre.**
- **Loupes pour dissection.**
- **Boite de dissection.**
- **Microtome :**(E6685A).
- **Lames et lamelles.**
- **Microscope optique :**(2A4004Z).

I.2.2 Produits chimiques :

- **PBS (solution saline tamponnée phosphate PH=7.4):**

Dissolution de 2.38g de phosphate di-sodique, 0.19g de phosphate mono-potassique et 8g de chlorure de sodium dans 900ml d'eau, ajustement du PH à 7.4 puis compléter à 1000ml avec le même solvant.

- **Ethanol.**
- **Formol.**
- **Xylène.**
- **Solvant de paraffine (butanol).**
- **Paraffine.**
- **Eosine et hématoxyline.**
- **Gélatine.**
- **Eukit.**

II. Méthodes :

Apres une phase d'adaptation de 15 jours, les souris ont été reparties en trois lots soumises à des régimes alimentaires différents durant 45 jours d'expérience:

- Le 1er lot (témoin : N =10) : recevant un régime standard (granulés +eau) avec un gavage journalier à l'huile de maïs en raison de 0,2ml.
- Le 2eme lot (N =11) : recevant un régime hyper-lipidique (72% de matière grasse d'origine animal et 28%de granules) et l'eau.
- Le 3eme lot (N= 12) : recevant un régime standard avec un gavage journalier par des LPS (300 ug/ kg/j) dilués dans 0.2 ml d'huile de maïs.

II.1. Prise de glycémie :

Une prise journalière de glycémie a été effectuée à 7h du matin après 12h de jeun à l'aide d'un glucomètre (bionime) sur du sang prélevé au niveau de la veine de la queue **(figure 12).**



Figure 12 : Prise de glycémie (photo originale).

II.2. Evolution du poids corporel et prise alimentaire :

Une prise de poids est effectuée chaque matin pour les animaux **(figure 13),** ainsi la quantité d'aliment consommée.



Figure 13 : Prise de poids (photo originale).

II.3. Préparation de la suspension des LPS :

Une dilution de LPS préalablement conservé dans du PBS, est réalisée dans des conditions stériles pour obtenir une solution mère d'un volume de 10 ml et de concentration de 2.10^{-5} ug/ul **(figure 14).** De cette dernière, un volume adapté au poids de chaque souris du 3ème lot est prélevé à l'aide d'une micropipette, dilué dans 0.2 ml de l'huile de maïs , homogénéisée et administrée par voie orale matinal à jeun **(figure 15)**.

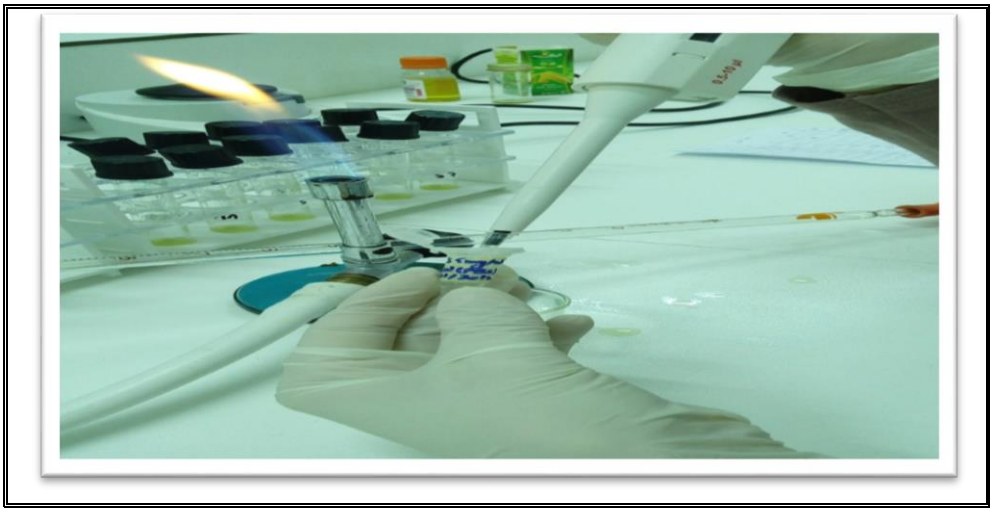


Figure 14: Préparation de la suspension des LPS (photo originale).



Figure 15 : Technique de gavage (photo originale).

II.4. Test d'intolérance au glucose :

Les trois lots de souris mis à jeun pondant 6 heures, ont reçu, par gavage, une solution glucosée de 66% en raison de 3 g / kg de souris, la glycémie a été mesurée sur 04 temps différents : 30 min avant le gavage puis, 15, 30 et 60 min après l'administration de la solution glucosée **(Cani, Amar *et al*., 2007).**

II.5. Sacrifices et prélèvement d'organes :

A la fin de l'expérimentation, les animaux ont été sacrifiés par décapitation. Le sang et les organes sont récupérés afin de réaliser le test enzymatique et les analyses histologiques prévues **(figure 16).**

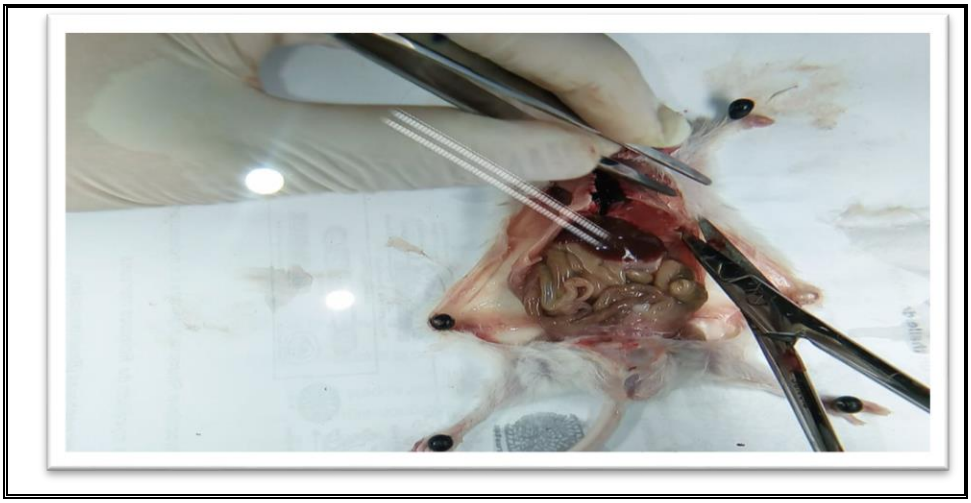


Figure 16 : Dissection des souris (photo originale).

II.6. Prélèvement du sang :

Le sang est récupéré dans des tubes héparinés, après une centrifugation de 2500g /min pendant 15 min **(figure 17)**, le plasma est recueilli, conservé à -4°C jusqu'à la réalisation du test enzymatique (test LAL).

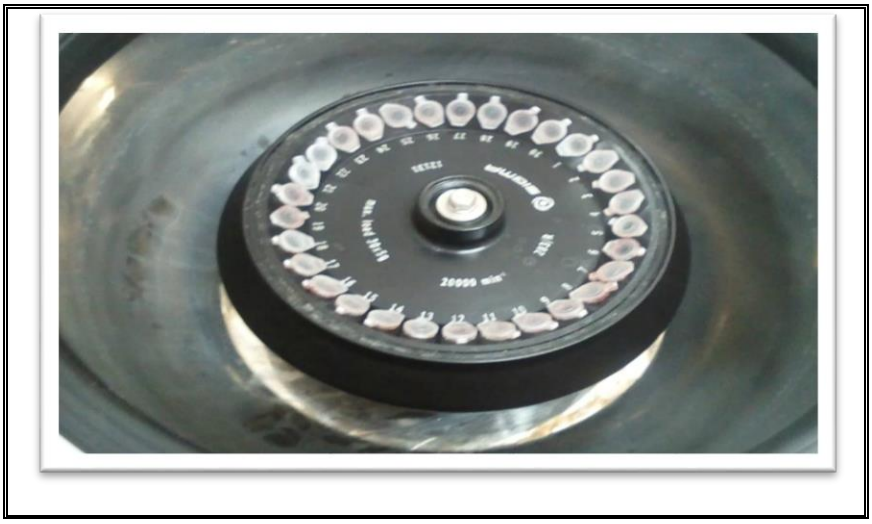


Figure 17 : Centrifugation du sang (photo originale).

II.7. Test LAL par méthode de gélification :

II.7.1. Principe du test LAL:

L'hémolymphe de limule, cet arthropode marin ressemblant à un crabe ayant une forme de fer de cheval, ou son nom, est de couleur bleue à la présence d'hémocyanine au lieu d'hémoglobine. Ses cellules son des amoebocytes qui réagissent en présence d'endotoxines bactériennes en produisant une protéine qui transforme l'hémolymphe en gel **(Young *et al.*, 1972).**

Depuis 1970, le sang de limule est utilisé pour produire un réactif, le lysat d'amoebocytes de limule (LAL), employé pour tester l'absence d'endotoxine dans les produits biologiques. Le mélange LAL-échantillon est réalisé dans un tube à essai à 37 °C et la gélification se produit avant 1 heure d'incubation en cas de résultat positif.

II.7.2. Réalisation du test LAL :

La détermination du LPS dans le plasma des souris a été réalisée par le test LAL selon le protocole suivant :

II.7.2.1. Préparation des échantillons:

- Dilution à 1/40 du plasma recueilli dans de l'eau pour préparation injectable (E.P.P.I).
- Mesure de pH (réaction LAL-endotoxine est optimal à la neutralité).
- Chaque 0.1 ml de la dilution préparé et additionné à 0.1 ml du réactif LAL dans des tubes stériles étiquetés.

II.7.2.2. Préparation du témoin négatif :

Mettre dans un tube stérile apyrogène, 0.1ml de lysat et 0.1ml de l'eau pour préparation injectable (E.P.P.I).

II.7.2.3. Préparation du témoin positif :

- Mélange de 0.1ml d'eau de LAL (E.P.P.I) avec 0.1ml de l'endotoxine de contrôle (sensibilité de contrôle 2λ).
- Incubation des tubes dans un bloc à chauffage étalonné à 37±2°C pondant 60 ±2min en évitant les vibrations **(figure 18).**



Figure 18 : Incubation des tubes dans la plaque d'incubation (photo originale).

- La réaction est suivie en fonction du temps en cherchant la formation d'un gel consistant dans le tube **(tableau I).**
- La lecture se fait en retournant le tube délicatement une seule fois à 180°C.
  - Si le gel formé tenant au fond du tube, la réaction est positive.
  - Si le gel coule le long de la paroi du tube, la réaction est négative.

Tableau I : Sensibilité du LAL a l'endotoxine d'*Escherichia coli* **(Société française des sciences et techniques pharmaceutique)**

Temps de gélification (min)	Concentration en endotoxines (ng/ml)
5	500
5-6	50
9	5
14-15	5.10^{-1}
18	5.10^{-2}
31	5.10^{-3}
34	5.10^{-4}
60	5.10^{-5}
Gel visqueux	5.10^{-6}
Gel visqueux	5.10^{-7}
1h30	Témoin négatif

II.8. Etude histologique :

Afin d'étudier l'aspect histologique du foie et du tissu adipeux des trois lots, des coupes histologiques ont été réalisées après dissection au niveau du laboratoire de la faculté (**Figure 16)**. Les différentes étapes sont présentées comme suite **(Tableau II)** :

- Fixation par immersion dans du formol à 10%.
- Déshydratation des pièces de foies et des tissus adipeux dans des bains successifs d'alcool à concentration croissantes.
- Imprégnation dans du butanol puis dans la paraffine.
- Confection des blocs de paraffine puis les conserver à +4°C pendant 24heures.
- Réalisation des coupes histologique d'une épaisseur de 7um à l'aide du microtome.
- Etalement des fragments histologiques sur des lames gélatinées (0,4%) **(annexe 01)**.
- Déparaffinage par le xylène et réhydratation puis lavage dans l'eau distillée.
- Coloration à Hématoxyline et Eosine (HE).

- Après coloration, les coupes ont été déshydratées dans des bains d'alcool croissants puis montées entre lame et lamelle à l'aide de l'Eukit.
- Les coupes ont été observées au microscope optique et la prise des photos a été réalisée à l'aide du «mCAM» digital microscope eye-piece.

Tableau II : Tableau récapitulatif des différentes étapes des techniques histologiques.

Etapes	Produits	Nombre de bains	Temps	Température
Fixation	Formol	1 bain	/	Ambiante
Déshydratation	Alcool à degré croissant 70° 90° 100°	 2 bains 2 bains 3 bains	 10 min/bain 10 min/bain 15 min/bain	Ambiante
Imprégnation	Butanol Paraffine pure	1 bain 2bains	24H 2H/bain	Ambiante Etuve à 60°C
Confection des blocs (barres de Leukart)	Paraffine pure	/	/	Ambiante
Coupes et étalement (avec de l'eau gélatinée à 0,4%)				
Déparaffinage	Xylène	1bain	30min	Ambiante
Réhydratation	Alcool décroissant: 100°	 1 bain	 2 min	

	95° 70° Eau distillée	1 bain 1 bain 1 bain	2min 2min 2min	Ambiante
Coloration	Hématoxyline Eau distillée Eosine Eau distillée	1 bain 1 bain 1 bain 1bain	4min 2min 2min 2min	Ambiante
Déshydratation	Alcool à degré croissant 70° 90° 100°	1 bain 1 bain 1 bain	Quelques secondes	Ambiante
Montage entre lame/lamelle à l'aide de l'eukitt				

III-Analyse statistique :

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± erreur standard à la moyenne (SEM). La signification statistique des moyennes entre les deux groupes expérimentaux est évaluée par le test « *t* » de Fisher- Student à un seuil de 0,05.

La différence entre deux moyennes comparées est statistiquement significative si la probabilité « p », lu en fonction du nombre de degrés de liberté (ddl = $n1+n\ 2-2$) est égale ou inferieure à 5%

- Si p > 0.05 : la différance est non significative par rapport au lot témoin (NS).
- Si P < 0.05 : la différence est significative par rapport au lot témoin (*).
- Si < 0.01 : la différance est très significative par rapport au lot témoin (**).
- Si < 0.001 : la déférence est hautement significative par rapport au lot témoin (***).

Résultat

et

Discussion

I. Résultats :

I.1 Phase d'adaptation : (annexe 02).

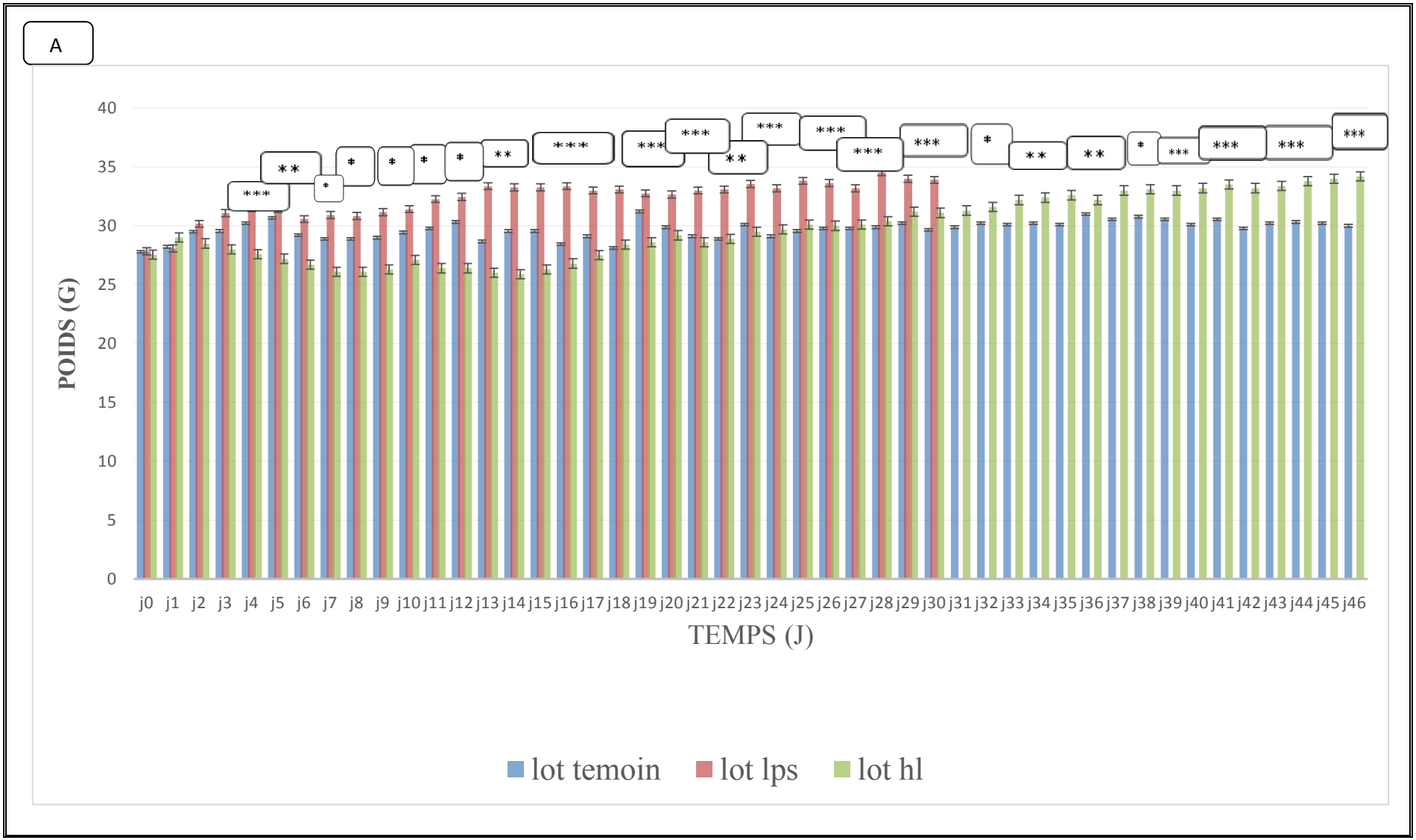
I.2.Évolution pondérale et prise alimentaire :

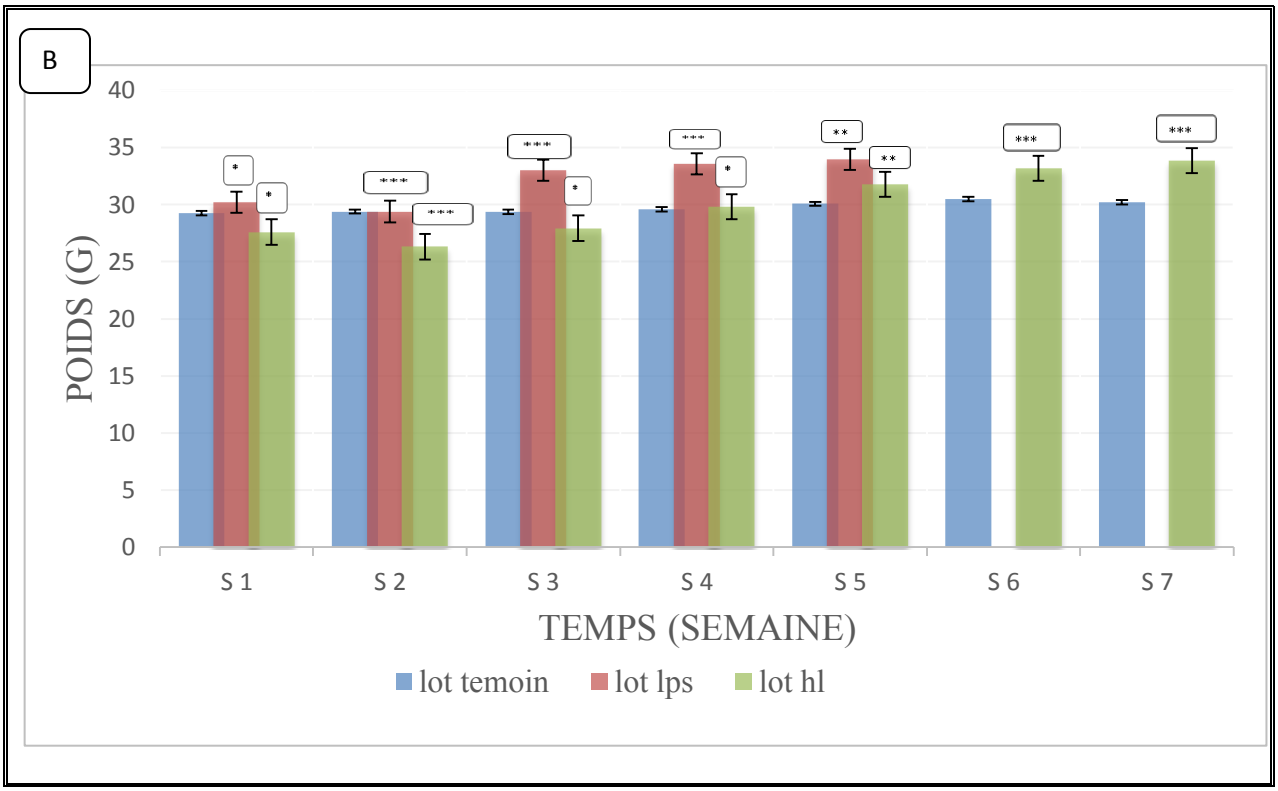
I.2.1. Évolution pondérale :

Au début de l'expérimentation (J0), le poids corporel moyen des souris du lot témoin, lot soumis à un régime hyper lipidique et le lot gavé par les LPS était de:27.8 ±0.29 g,27.83 ±0.28 g et 27.5±0.86g respectivement.

Au bout de la 4^{éme}semaine, une augmentation du poids corporel de 21% a été observée chez les souris gavées par les LPS atteignant un poids de 33.90 ±0.71g à (J30) de même pour les souris nourris par l'alimentation hyper lipidique qui enregistrent une augmentation de 12% à (j30) puis 23,45% à(J45). Par contre, chez lot témoin, le poids corporel été relativement constant.

Ces variations sont hautement significatives ($p< 0,001$) à (J30) pour le lot LPS et à (J45) pour le lot du régime gras **(figure 19).**


A
POIDS (G)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
j0 j1 j2 j3 j4 j5 j6 j7 j8 j9 j10 j11 j12 j13 j14 j15 j16 j17 j18 j19 j20 j21 j22 j23 j24 j25 j26 j27 j28 j29 j30 j31 j32 j33 j34 j35 j36 j37 j38 j39 j40 j41 j42 j43 j44 j45 j46
TEMPS (J)
lot temoin
lot lps
lot hl



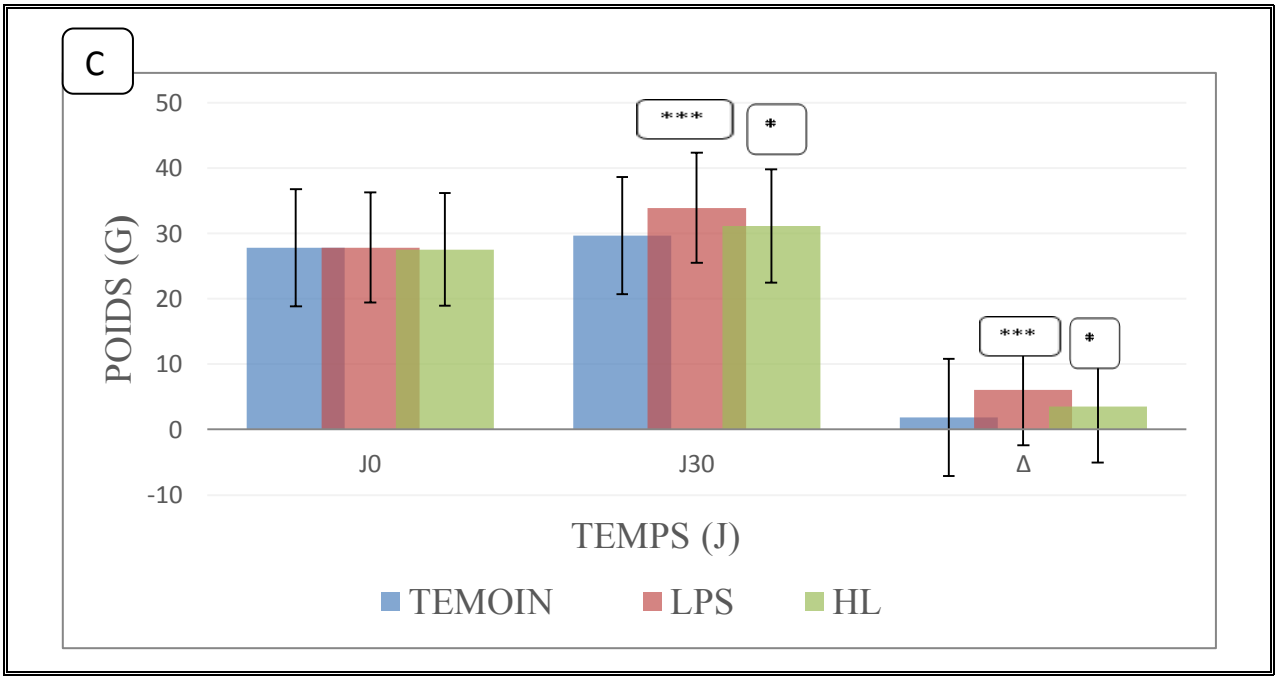


Figure 19 : Evolution du poids corporel; **A :** moyenne journalière. **B :** moyenne par semaine. **C:** la moyenne de poids des 3 lots, Δ représente l'augmentation du poids corporel durant 30 jours.

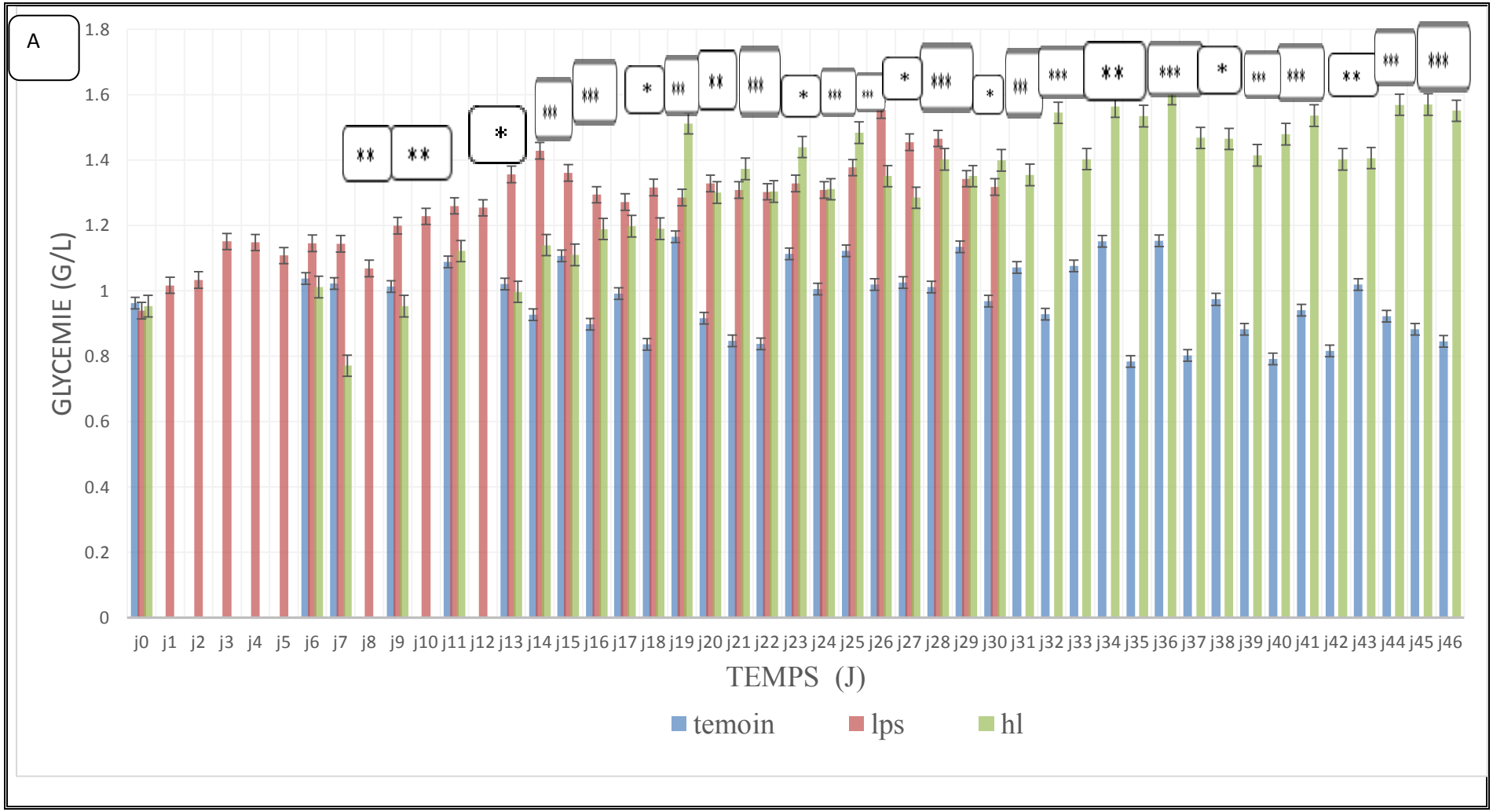
Une augmentation du poids corporel des souris du lot LPS et du lot sous alimentation hyper lipidique à la fin de l'expérience, contrairement aux souris témoins où l'évolution du poids corporel reste relativement stable (Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM).Les deux lots LPS et hyper lipidique sont comparés au témoin.

I.2.2. Evolution de l'alimentation consommée :(annexe 02).

I.3. Evolution de la glycémie :

Au premier jour de l'expérience, la glycémie des souris du lot témoin, lot LPS et du lot nourris par le régime hyper lipidique était de : 0.96 ±0.0257g/l, 0.93 ±0.046g/l et 0.95±0.061g/l respectivement.

A partir de la 2éme semaine, une augmentation de glycémie par rapport au témoin a été observée, la glycémie des souris gavées par les LPS a augmenté de 41% enregistrant 1.32 ±0.05 g/l à (J30), conformément au souris nourries par l'alimentation hyper lipidique où une élévation de 46% à (J30) puis 65% à (J45) est observée en enregistrant 1.39 ±0.11g/l et 1.57 ±0.067 g/l respectivement. Ces variations sont très significatives ($p< 0,001$) à (J30) pour le lot LPS et hautement significatives à (J45) pour le lot du régime gras **(figure20).**


A
GLYCEMIE (G/L)
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
j0 j1 j2 j3 j4 j5 j6 j7 j8 j9 j10 j11 j12 j13 j14 j15 j16 j17 j18 j19 j20 j21 j22 j23 j24 j25 j26 j27 j28 j29 j30 j31 j32 j33 j34 j35 j36 j37 j38 j39 j40 j41 j42 j43 j44 j45 j46
TEMPS (J)
temoin
lps
hl

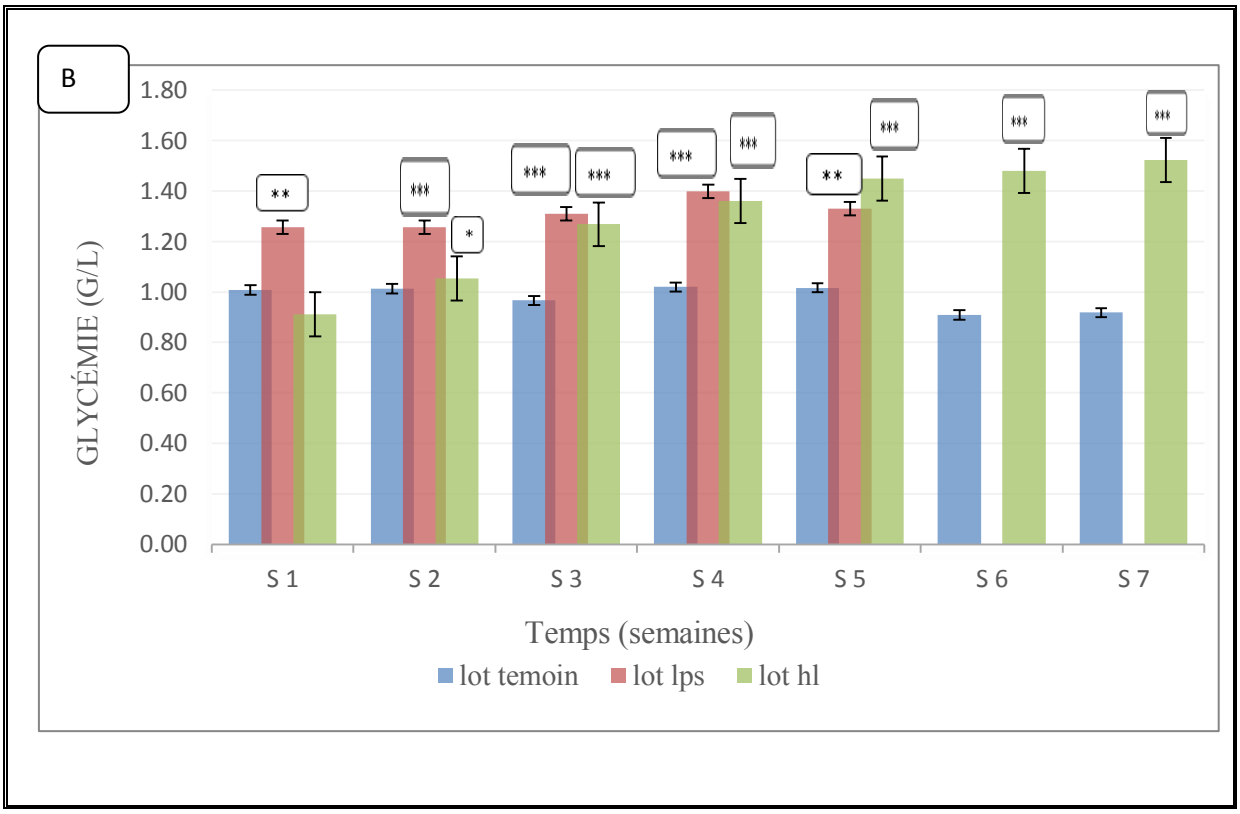


Figure 20: Évolution De la glycémie à jeun des souris des trois lots ;**A :** moyenne journalière, **B :** moyenne par semaine**.**

Une augmentation de la glycémie des souris du lot LPS et du lot nourris avec alimentation hyper lipidique contrairement à celle des souris témoins relativement dans les normes jusqu'à la fin de l'expérience (Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM).Les deux lots LPS et hyper lipidique sont comparés au témoin.

II.4 Test d'intolérance au glucose :

Après 15 min d'administration de la solution glucosée, la glycémie à jeun du lot gavé par LPS et celui nourris par alimentation hyper lipidique était élevée par rapport au témoin.

Cette élévation de la glycémie continue à augmenter chez deux lots : lot gavé par les LPS et lot du régime hyper lipidique, contrairement au lot témoin où la glycémie est redevenue normale après 1h de temps.

Les variationsdes résultats sont hautement significatives ($p<0.001$)**(figure 21).**

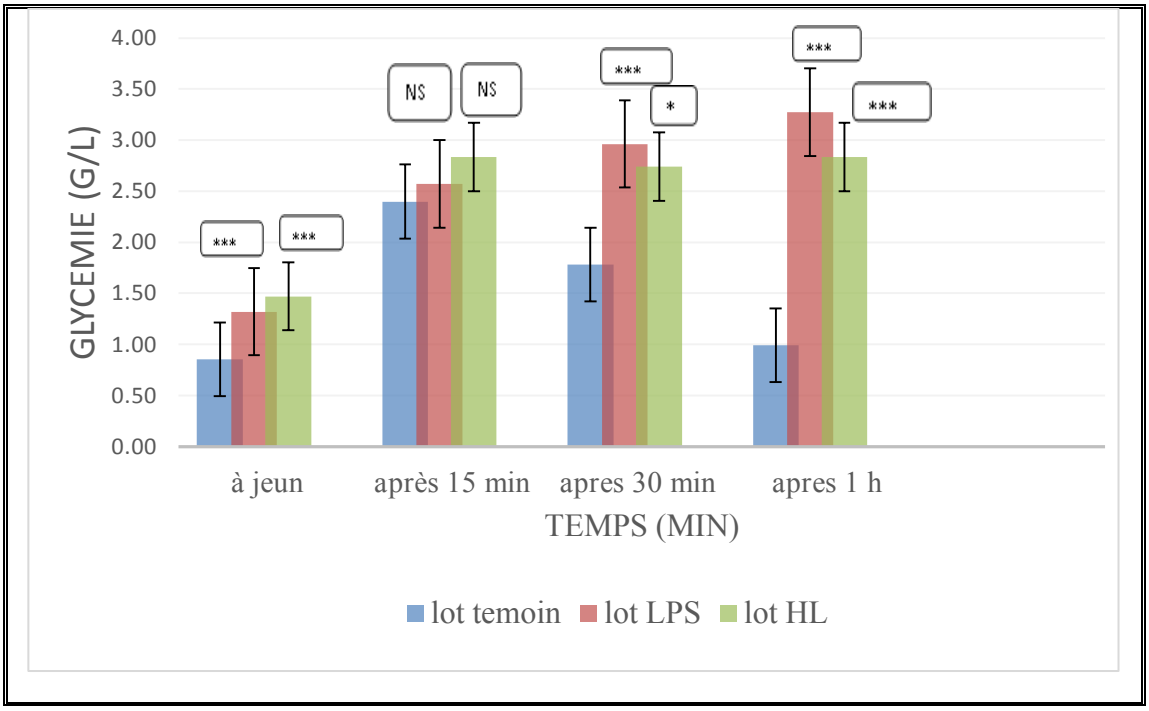


Figure 21 : Evolution de la glycémie à jeun, après 15-30-60min de gavage par solution glucosée des souris des trois lots.

Une augmentation de la glycémie de souris du lot LPS et du lot nourris avec alimentation hyper lipidique durant les 04 temps alors que les souris témoin enregistrent une augmentation de la glycémie après 15 min d'administration de la solution glucosée puis une baisse graduellement après 30 et 60 min (les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM). Les deux lots LPS et hyper lipidique sont comparés au témoin.

II.5.Test LAL :

Par le faite de la concentration faible d'endotoxine (<5. 10^{-7} ng/ml) chez le témoin il n'a pas été possible de mettre en évidence la formation du gel au fond du tube contrairement au lot du régime hyper lipidique où une grande concentration d'endotoxine a été détectée (409.182±60.923 ng/ml) qui apparut sous forme de gel consistant au fond du tube **(figure 22)**, de même, chez le lot LPS où la quantité d'endotoxines trouvée était maximale (454.591 ± 47.625ng/ml) **(figure23).**

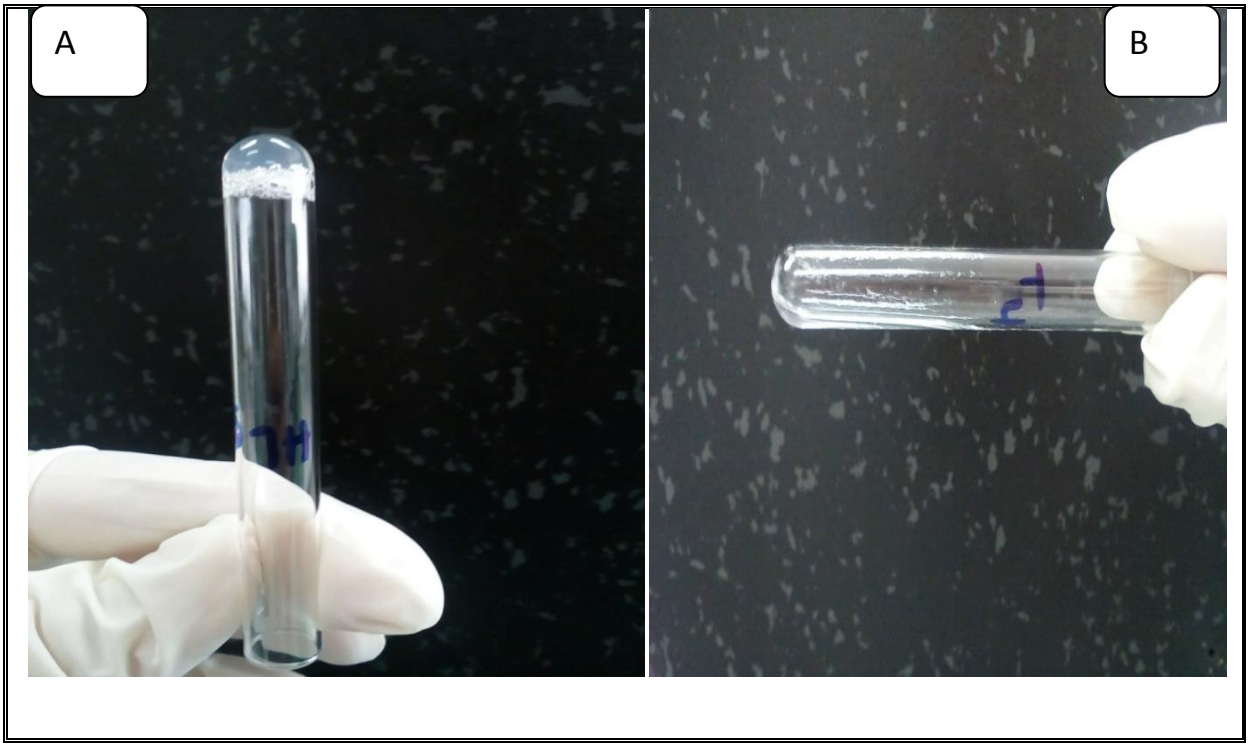


Figure 22:Résultat du procédé gel-caillot; **A :** gel ferme qui se maintien à 180°, **B :** absence de gel, masse visqueuse qui ne tient lorsque le tube est inversé.

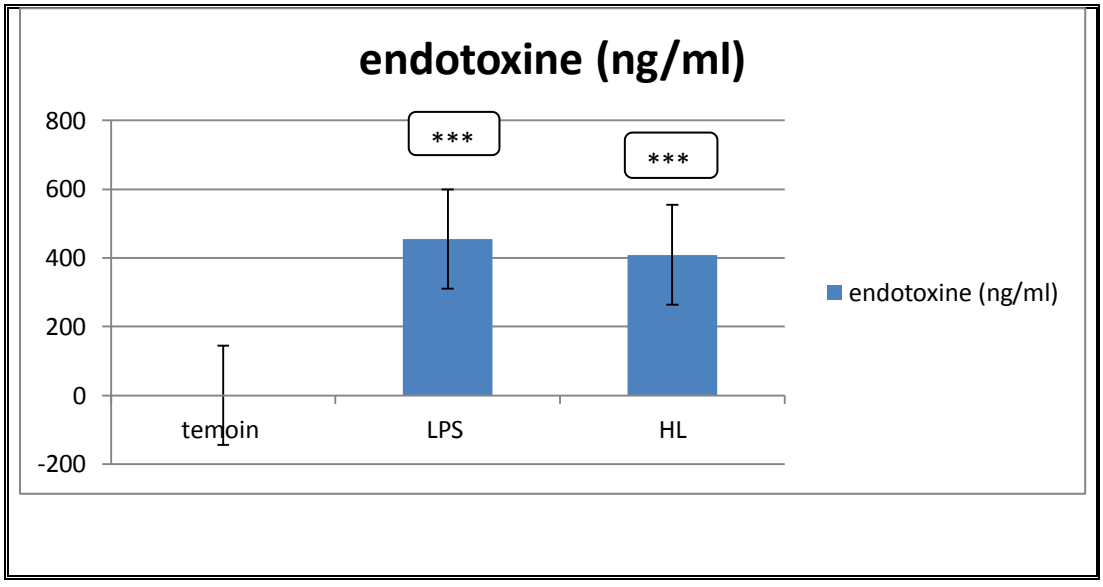


Figure 23 : Quantité d'endotoxine détectée lors du test LAL pour les trois lots (Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM).*Les deux lots LPS et hyper lipidique sont comparés au témoin.*

II.6.Aspect histologique :

II.6.1.Aspect histologique du tissu adipeux viscéral :

L'examen au microscope photonique, des coupes histologiques colorées a l'hématoxyline et à l'éosine du tissu adipeux viscéral, nous a permis d'observer chez le lot témoin un tissu organisé en lobules séparés par des cloisons de tissu conjonctif lâche. Ces lobules sont constitués principalement par des adipocytes séparées par une mince couche de matrice extracellulaire comprenant un squelette de fibres, notamment des fibres de collagène et de nombreux vaisseaux alors que chez les deux lots (LPS et Hl) une modification cellulaire a été constatée, une infiltration des cellules inflammatoires qui se disposent en couronne autour des adipocytes. Notons que l'étude histologique a été réalisée sur les échantillons prélevés à la fin de l'expérimentation : (j30) pour le lot LPS et (j45) pour le lot du régime hyper lipidique **(figure 24).**

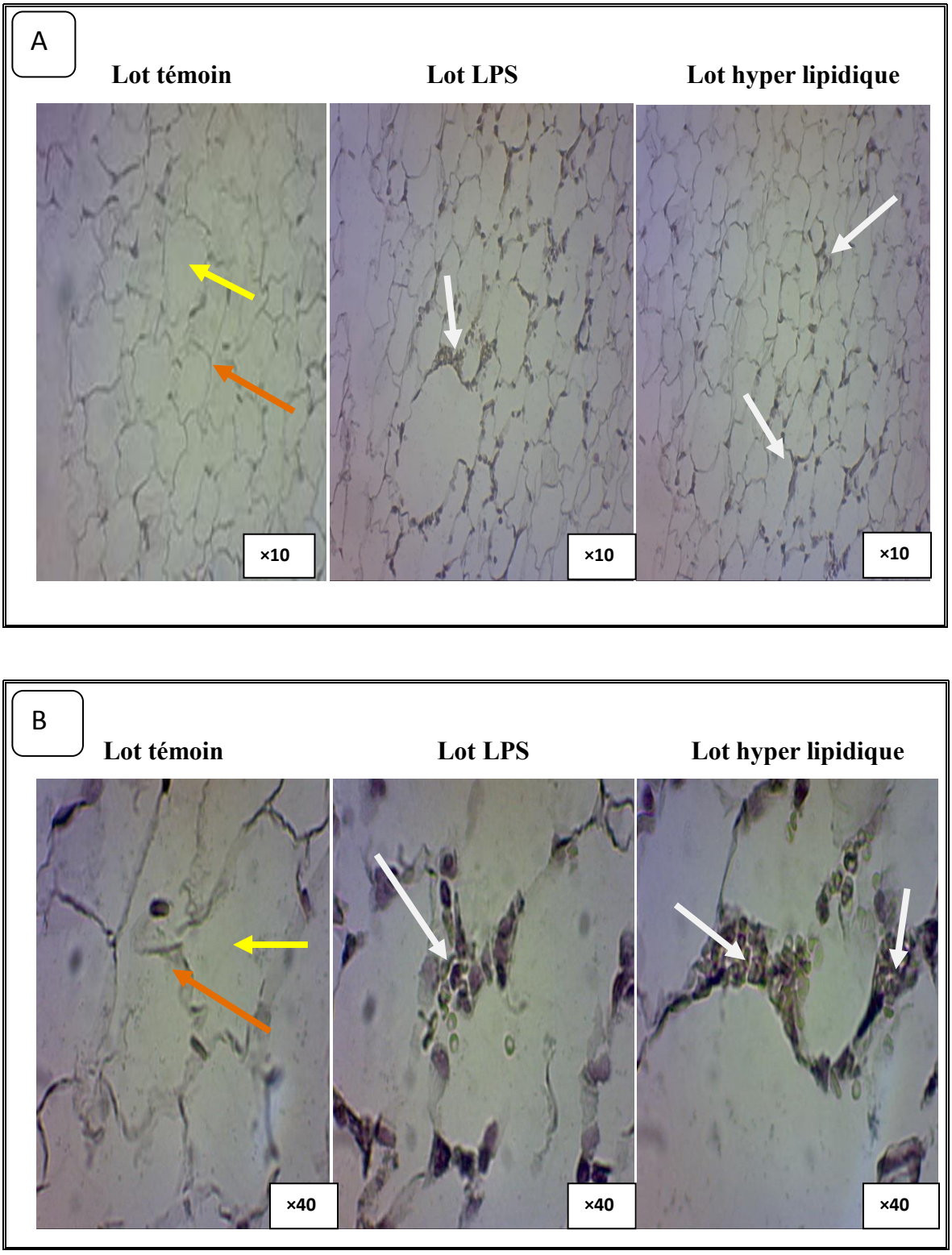


Figure 24 : Observation microscopique d'une inflammation a bas bruit du tissu adipeux viscéral chez les souris *Mus musculus.* **A**: AG×10; **B:**AG×40.*Les flèches blanches représentent l'infiltration des cellules inflammatoires, la flèche jaune représente l'adipocyte, la flèche orange représente les cloisons adipocytaires. A noter que les coupes ont été réalisés après (30jrs) d'expérience pour le lot LPS et (45jrs)pour le lot hyper lipidique.*

II.6.2.Aspect histologique du foie:

Les coupes histologiques du foie observées au microscope optique et colorées par l'hématoxyline et l'éosine ont révélé chez le lot témoin un espace porte et une veinule hépatique terminale (veine centro-lobulaire) entourées de cellules hépatocytaires polyédriques avec un cytoplasme très abondant fortement éosinophile, alors que chez le lot LPS, une stéatose hépatique métabolique de type micro-vésiculaire a été observée conformément chez le lot du régime gras, où une macro-stéatose a été constatée.

Cette stéatose se caractérise par un cytoplasme hépatocytaire contenant une vésicule optique vide qui refoule le noyau en périphérie. Notons que l'étude histologique a été réalisée sur les échantillons prélevés à la fin de l'expérimentation : (j30) pour le lot LPS et (j45) pour le lot du régime hyper lipidique **(figure25).**

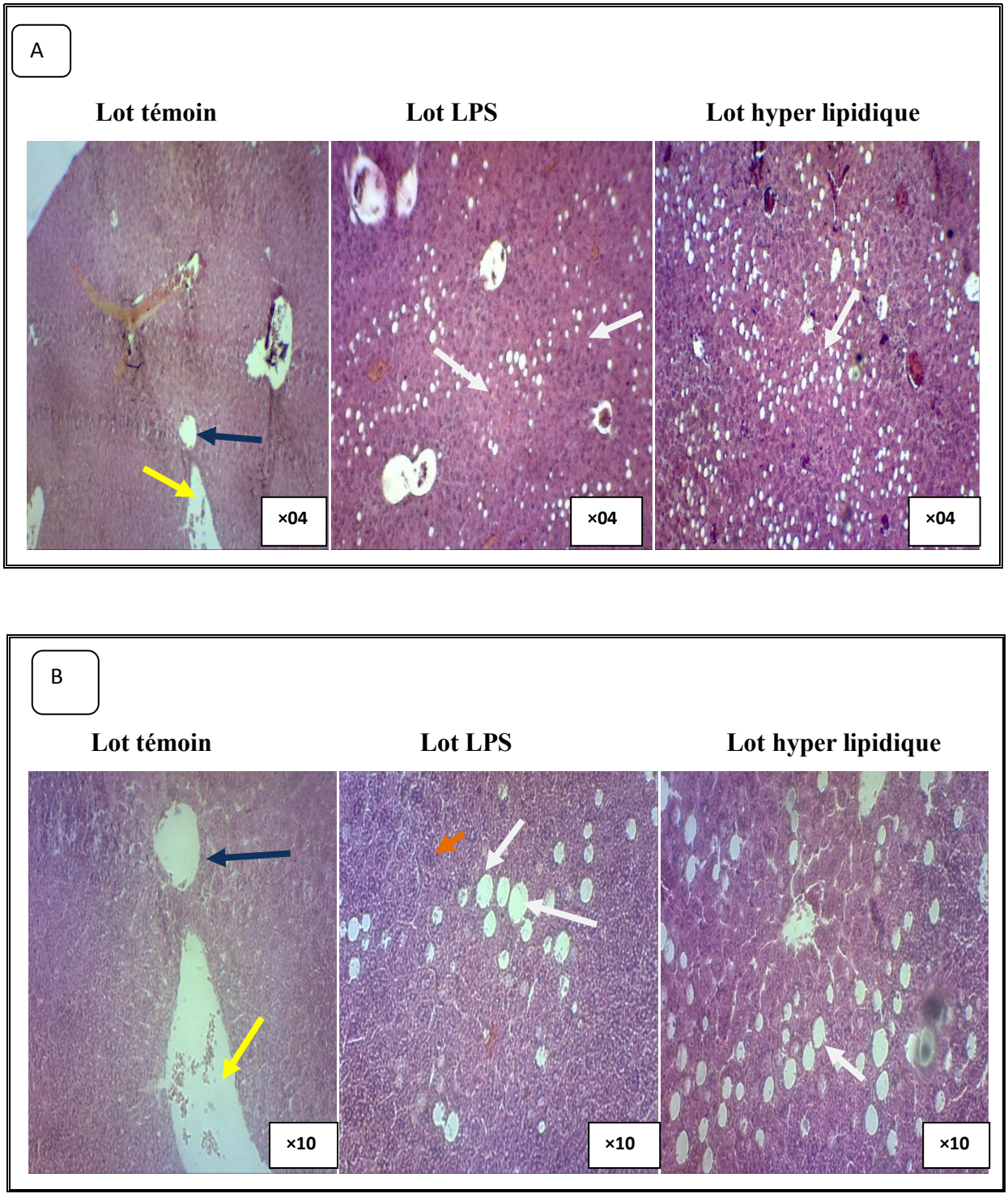


Figure 25 : Observation au microscope optique d'une stéatose métabolique chez les souris *Mus musculus.* **A:** AG×04; **B:**AG×10. *Les flèches blanches représentent des gouttelettes lipidiques (triglycérides) au niveau des hépatocytes. La flèche jaune représente l'espace porte au niveau du lobule. La flèche bleue représente la veine centro-lobulaire, la flèche orange représente l'hépatocyte. A noter que les coupes ont été réalisés après (30jrs) d'expérience pour le lot LPS et (45jrs) pour le lot hyper lipidique.*

II. Discussion :

Dans le but de comprendre l'effet de la flore intestinal sur le métabolisme, nous avons soumis nos souris de l'espèce *Mus musculus* aux régimes alimentaires différents: le premier lot alimenté par un régime riche en matière grasse, le deuxième témoin avec un régime standard et le 3ème recevant un gavage par les LPS.

L'étude a été portée sur l'évolution du poids corporel, la glycémie, la recherche d'endotoxines dans le sang et l'analyse histologique du foie ainsi que le tissu adipeux viscéral.

II.1. Poids corporel :

A la fin de l' experimentation, nos resultats ont revélé une augmentation hautement significative du poids corporel des souris sous régime hyper-lipidique d'environ **24.16%,**ainsi pour les souris ayant reçu des LPS par gavage d'environ **21.8%** par rapport au poids de souris témoins.

Plusieurs travaux ont montré que l'alimentation à long terme des rats et de souris avec un régime riche en graisses (60% de graisse pour les rats et 35% pour les souris) a augmenté significativement le poids corporel par rapport au contrôle après 4 semaines **(Sutherland *et al.,* 2008)**.

Par ailleur une étude a montré chez les rats mâles *Wistar* nourris avec une alimentation hyper lipidique à base de saindoux (graisse animal), que l'augmentation du poids final de ce groupe a été de 14% ce qui est significativement plus élevé par rapport au groupe contrôle **(Buettner *et al.,* 2006)**.

En outre, de nombreux travaux réalisés sur des rats mâles *Sprague-Dawley* nourris avec un régime hyper lipidique et hyper calorique entraînait une augmentation significative du poids corporel des animaux en condition d'obésité contre les animaux en condition normale **(Backhed *et al.,* 2007).**

Cependant, les travaux de **Milagro et *al* (2006)** ont indiqué qu'un régime hyper lipidique chez le rat *Wistar* induit une augmentation de la prise alimentaire et du poids corporel avec une accumulation des lipides dans le tissu adipeux.

Ainsi, Un régime riche en graisses de seize semaines des gerbilles *Psammomys obesus* a entraîné un gain significatif du poids corporel et une hyperlipidémie par rapport au témoin **(Sahraoui *et al*., 2016).** Un autre genre de gerbilles, *Meriones unguiculatus,* nourris avec un régime riche en graisses et en sucres simples, ont développé une obésité dont l'augmentation de poids était hautement significative par rapport aux animaux contrôles sous régime standard **(Ventura *et al*., 2017).**

Des troubles métaboliques chez des souris CD-1 femelles non consanguines, nourries avec une régime alimentaire hyper lipidique (60% de lipide) pendant 10 semaines, dont ces dernières ont gagné graduellement plus de masse grasse et présentent par conséquent un gain de poids corporel significatif accéléré **(Gao *et al*., 2015).**

Des auteurs ont établi que la cause principale de l'obésité est un excès d'apport calorique associé à une diminution des dépenses physiques **(Daubresse *et al*., 2005 ; Pasquet *et al*., 2007 ; Deruelle, 2011).** Cependant, l'augmentation de l'apport calorique ne semble pas être le seul facteur important dans la genèse de l'obésité. Récemment, certaines études ont montré l'importance de la flore intestinale dans la régulation du métabolisme énergétique **(Spencer *et al*., 2011 ; Frazier *et al*., 2011).** Lorsque l'équilibre de la flore intestinale est perturbé, le métabolisme énergétique est également modifié en conséquence **(Bäckhed *et al*., 2004)**, par la faculté du microbiome intestinal d'induire le stockage des triglycérides circulants dans les adipocytes en supprimant l'expression intestinale d'un inhibiteur de la lipoprotéine lipase : le FIAF (fasting-induced adipocyte factor)**(Bäckhed *et al*., 2004)**.

Ainsi la diffusion continue des LPS mime les effets du régime hyper-lipidique et provoque une augmentation du poids corporel et une dérégulation des paramètres métaboliques et inflammatoires **(Cabou *et al.,* 2007).**

L'obésité induite par l'alimentation hyper lipidique serait due à un microbiote intestinal particulier révélé par le pyrosequençage caractérisé par l'abondance relative de *Firmicutes* en condition d'obésité par rapport à celle de la normale, tandis que l'abondance relative de *Bacteroidetes* est diminuée substantiellement **(Esteve *et al.*, 2011 ; Turnbaugh *et al., 2006*)**. De ce fait, l'implantation de la flore l'intestinale des souris obèses à des souris normales sans germes induit une augmentation du poids allant de 10% à 20% de différence entre les souris

maigres et les souris obèses ce qui confirme les propriétés défavorables de cette flore **(Turnbaughet *et al., 2008* ; Ridaura *et al., 2013*).**

Une autre étude a rapporté que l'alimentation hyper calorique chez des souris conduit à une augmentation de LPS **(Amar *et al.,* 2008).** Leur augmentation est 2 à 3 fois plus dans le contenu de l'intestin et le sang des souris **(Cani *et al.,* 2007 ; Membrez *et al.,* 2008)** et des humains **(Burcelin *et al.,* 2008)** nourris par un régime hyper lipidique. Cela est en accord avec nos résultats et les résultats de plusieurs travaux comme l'étude de **Cani *et al*** en **2007** portée sur les souris d'espèce *Mus musculus*, qui a montré que la perfusion sous-cutanée chronique des LPS pendant 4 semaines, a augmenté le poids corporel dans la même mesure qu'un régime alimentaire riche en graisses.Cette augmentation de poids peut être aussi expliquée par d'autres rapports de la littérature qui montrent qu'après un repas hyper lipidique, les leucocytes circulants expriment la forme activée du facteur nucléaire de transcription κB (NFκB) qui stimule plusieurs marqueurs de l'activation leucocytaire. L'IL-8 (interleukine 8) et le nombre de polynucléaires neutrophiles augmentent après un repas gras **(Van *et al.*, 2004 ; Van *et al.*, 2006)**; de même, des marqueurs de l'activation des cellules endothéliales ICAM (InterCellular Adhesion Molecule), VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule) et le TNFα (Tumor Necrosing Factor-a : cytokine pro-inflammatoire) augmentent après un repas gras **(Nappo *et al.*, 2002)**. Or le LPS augmente après un repas hyper-lipidique et interagit avec les récepteurs CD14 (le complexe CD14/TLR4 présent à la surface des cellules immunitaires et des monocytes) qui stimulent la production de cytokines au niveau de plusieurs tissus et types cellulaires impliqués dans l'athérosclérose et l'obésité **(Nappo *et al.*, 2002).**

II.2. Glycémie :

Nos résultats ont montré une augmentation très significative de la glycémie à jeun d'environ **53.9%** pour les souris sous régime hyper-lipidique et **40%** pour les souris recevant des LPS par gavage par rapport aux souris contrôles qui ont gardé un taux de glycémie normale tout au long de l'expérimentation.

Les résultats du test d'intolérance au glucose a expliqué l'hyper glycémie observée chez les souris expérimentales dont la glycémie est restée élevée même après 1h pour les 2 lots (Hl et LPS), contrairement aux souris contrôles qui ont montré une bonne tolérance au glucose.

Cette intolérance au glucose peut être expliquée par une résistance à l'insuline.
Les même résultats ont été décrit par **Cani** et ***al*** en **2007**, dont la concentration en glucose était plus élevée chez les souris nourries avec un régime riche en graisses par rapport aux LPS et aux souris témoins durant une période d'un mois.

Une autres étude a été réalisée sur les rats *Wistar* nourris par différant type de gras (huile d'olive, huile de coco) durant un mois a montré que la glycémie à jeun été modérément élevée (12 à 6%); et une légère augmentation est observée chez les rats nourris par le saindoux que statistiquement n'était pas significative **(Buettner *et al.*, 2006)**.
Ainsi plusieurs études portées sur les rats de différentes espèces soumis à des régimes riches en graisses avec différentes concentrations et pendant différentes périodes, ont rapporté le développement d'une résistance à l'insuline tel que l'étude de **Lekic *et al* (2010); Rico et *al* (2010) ; Wu *et al* (2007) ; Pussinen *et al* (2011) ; Sutherland *et al* (2008) ; Sahraoui *et al* (2016).**

Par ailleurs, l'étude d'**El Aoufi *et al* (2007),** conçue pour déterminer si un régime hypercalorique induit le diabète de type II chez le rat de sable *Psammomys obesus*, a démontré que 40% des animaux développent un diabète de type II dans une durée de 3 mois. Aussi, les gerbilles *Meriones unguiculatus* ont montré une augmentation significative du taux de glucose, suite à une consommation d'un régime hyper lipidique pendant 11 semaines **(Ventura *et al*., 2017).**

Notamment, l'inflammation chronique adipeuse et les dépôts lipidiques dans le foie et les graisses brunes, chez les souris nourries avec un régime hype rlipidique pendant 10 semaines, était accompagnée d'une intolérance au glucose et d'une résistance à l'insuline **(Gao *et al.*, 2015).**Cela peut être du au faite que l'insulino-résistance et l'obésité, associés au facteur de risque que représente le régime gras, sont caractérisés par une inflammation intestinale dite métabolique de basse intensité due aux composantes moléculaires, issues du microbiote appelés LPS produits lors du déséquilibre de la flore intestinal (augmentation des bactéries Gram-) et notamment due aux molécules acides gras à courtes chaines considérés comme des signaux de l'inflammation **(Bouloumie *et al.*, 2008 ; Bouloumie *et al.*, 2005)**. La voie NF-κB et JNK (kinases c-Jun N-terminal) qui est activée par les molécules LPS et les acides gras à courte chaine connues pour interférer avec la voie de l'insuline (**Hirosumi *et al.*, 2002 ; Aguirre *et al.*,2002).** Ces voies contribuent à l'augmentation de la sécrétion des cytokines inflammatoires et donc à l'accumulation des cellules immunes inflammatoires au sein du tissu adipeux. De ce fait, un foyer inflammatoire se développe au sein de ce tissu défini par une inflammation locale qui s'étend au niveau systémique provoquant ainsi l'installation progressive d'une résistance à l'insuline dans l'organisme **(Aguirre *et al.*, 2002).**

II.3. Dosage des endotoxines dans le sang :

Nous avons détecté, par le test LAL, la présence d'une moyenne de **409,182ng/ml** et de **454,591ng/ml** de LPS dans le plasma des souris nourries par le régime riche en graisses et les souris gavées par les LPS respectivement, ce qui représente une différence hautement significative par rapport aux souris contrôles avec une concentration de LPS< **5.10^{-7}ng/ml**. Par conséquent, cette augmentation de la concentration plasmatique de LPS induite par le régime alimentaire riche en matière grasse et le gavage par LPS, est peut être définie en tant qu'endotoxémie métabolique à l'origine du syndrome métabolique.

Des études réalisées chez l'homme montrent qu'une alimentation régulière riche en matières lipidiques augmente l'endotoxémie chez l'Homme **(Erridge *et al., 2007*, Pendyala *et al.*, 2012).** Tel que l'étude portée sur 54 individus recevant un repas riche en graisse (75 g de matières grasses, 5 g de glucides, 6 g de protéines) après une nuit de jeûne, qui a montré une augmentation significative du taux d'endotoxines chez les sujets diabétiques de type 2, IGT (Impaired Glucose Tolerance) et obèses au cours de la période de 4h après le repas **(Alison *et al.*, 2012).**

Notamment, l'étude de **Cani *et al* (2007)** est la première suggérant qu'un facteur issu de la flore bactérienne pourrait être responsable de la prise de poids, de l'inflammation de basse intensité et du développement de l'insulino-résistance. Il a donc été suggéré que le LPS puisse être le facteur moléculaire initiateur de ces phénomènes. Dans un premier temps **Cani *et al*** ont mis en évidence la relation étroite existant entre un régime hyper lipidique et le taux plasmatique de LPS. Pour cela l'endotoxémie plasmatique a été observée chez des souris nourries par un régime hyper lipidique pendant 4 semaines. Alors que le taux de LPS au cours d'une journée atteint son maximum à l'état nourri pour diminuer a la fi de la journée. Dernièrement, il a été démontré que des modifications du microbiote intestinal associées à l'obésité (soit induite par une alimentation riche en gras, soit génétique ob/ob) pouvaient induire une altération de la barrière intestinale et donc augmenter la perméabilité de l'intestin. Des études ont montré que lors de l'obésité, une altération de la barrière intestinale observée serait responsable du développement de l'endotoxémie métabolique. Ce dysfonctionnement au niveau de la barrière intestinale est associé à une augmentation de la perméabilité du tissu intestinal chez les souris obèses, laissant ainsi la translocation des molécules pathogènes (LPS) **(Brun *et al.,* 2007 ; Cani *et al.,* 2008).** Ce qui contribue à une augmentation de l'absorption des LPS trouvés dans le sang lors du test LAL induisant une réponse inflammatoire localisée dans le tissu adipeux et le foie **(Guha *et al.*, 2001 ; Gioannini *et al.*, 2007).**

II.4. Coupe histologique :

II.4.1. Tissu adipeux viscéral :

Les coupes histologiques démontrent une inflammation à bas grade chez les souris des deux lots (LPS et régime hyper-lipidique) ce qui n'est pas le cas pour le lot témoin.

Une étude rapporte que l'alimentation hyper lipidique de 10 semaines des souris, a provoqué un gain de poids corporel accéléré, associé à une hypertrophie des adipocytes et à une expression régulée des chimiokines inflammatoires adipeuses et des cytokines telles que Mcp-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1). Tnf-α, ce qui témoigne le développement d'une inflammation au niveau du tissu adipeux **(Gao *et al.*, 2015).**Cela est peut être du au changement de la flore intestinale induit par alimentation hyper lipidique aboutit à la production de nouveaux facteurs bactériens : les lipopolysaccharides (LPS). Ces derniers endogènes ou même exogènes (cas de gavage par LPS) interagissent avec le système

immunitaire et conduisent à une modification de la composition en cellules immunes en formant des micro-environnements inflammatoires responsables d'une inflammation dites métabolique de basse intensité **(Bouloumie *et al.*, 2008 ;Bouloumieet *et al.*, 2007).**
Par la suite, les cellules immunes anti-inflammatoires quittent le tissu adipeux et les cellules inflammatoires de type macrophagique et lymphocytaire sont recrutées d'une manière séquentielle en sécrétant des facteurs inflammatoires comme le TNFα, l'IL-6 (interleukine 6) et l'IL-1β (interleukine 1β)**(Bouloumie *et al.*, 2008 ;Bouloumie *et al.*, 2007).**Ces dernières inhibent le récepteur à l'insuline en activant des phosphatases, ce qui induit progressivement à un état d'insulino-résistance et une intolérance au glucose **(Hotamisligil, 2006 ; Shoelson*et al.*, 2006).**

Dans des conditions physiologiques, les macrophages « résidents » du tissu adipeux (5 à 10 %) jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie de ce tissu en l'éliminant des molécules étrangères **(Stout *et al.*, 2000).** Au cours de l'obésité induite par l'alimentation, le nombre de macrophages peut atteindre 60 % des cellules du tissu adipeux **(Weisberg *et al.*, 2003).** En réponse à divers stimuli immunitaires et/ou inflammatoires, l'augmentation du nombre et de l'activité des macrophages est liée principalement à trois mécanismes distincts : le recrutement de monocytes, leur infiltration et la survie des macrophages différenciés. Chez l'Homme ou la souris obèses, la chemokine MCP-1, produite par les adipocytes, augmente le recrutement, l'adhérence et la migration de monocytes dans le tissu adipeux, d'autres chemokines ou facteurs de croissance, dont la production est augmentée chez les sujets obèses, et assurent ensuite la survie des macrophages différenciés. C'est le cas du facteur de croissance VEGF (Vacular Endothelial Growth Factor) ou des « chemokines » MIF (Macrophage Inhibitory Factor) et M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor)
(Curat *et al.*, 2004).

Les résultats de notre étude sont similaires à ceux obtenir par **Chung *et al* (2006)**, l'étude qui a été basée sur la culture des adipocytes de l'Homme nouvellement différenciés et initialement fractionnés après stimulation par LPS et la mesure par la suite de l'expression de marqueurs de pré-adipocytes (par ex. Pref-1 et AEBP-1) et des adipocytes (par exemple APM-1 et PPAR) et des cytokines inflammatoires, a montré que les pré-adipocytes et les adipocytes ont une grande réponse inflammatoire aux LPS (plus grandes chez les pré-adipocytes).
Et sont associés probablement à la suppression de l'activité PPAR (peroxisome proliferato ractivated receptor) et la suppression de l'expression du gène de l'adiponectine par LPS, qui

est exclusivement sécrété par les adipocytes et positivement associé à la sensibilité à l'insuline **(Ajuwon *et al*., 2005)**. Ces données soulignent l'importance des pré-adipocytes dans la médiation de la résistance à l'insuline **(Chung *et al.*, 2006)**. Les mêmes résultats sont obtenus par **Harkins *et al* (2004).**

L'accumulation de graisse viscérale augmente la libération d'AGCC (acide gras a court chaine) dans la veine porte et diminue la production d'adiponectine induisant une diminution de la sensibilité à l'insuline **(Youssef, 2009).**A l'inverse, la graisse sous- cutanée est métaboliquement moins active que la graisse viscérale en raison de sa plus faible densité en récepteursβ-adrénergiques et sa plus forte densité enrécepteurs α- adrénergiques **(Carlson *et al*., 1969)**. Malgré la structure moins active du tissu adipeux sous cutané, l'étude d'**Elodie *et al*** en **2011** a montré son rôle dans le développement de l'inflammation chez les souris de l'espèce *Mus musculus,* dont des coussinets adipeux provenant de souris dépourvues de CD14 ou de souris de type sauvage ont été greffés à des souris dépourvues de CD14. Les animaux ont ensuite été perfusés pendant un mois avec un faible taux de LPS ou nourris par une alimentation grasse. Des changements observés sont directement liés à la présence de CD14 ainsi l'action inflammatoire directe a été déterminée par immuno-histochimie.

Les données montrent qu'à la fois chez les souris traitées par LPS et nourries par une alimentation riche engraisse (72%), le nombre de cellules inflammatoires qui a été augmenté dans les coussinets adipeux de type sauvage, mais pas dans le coussin adipeux des souris dépourvues de CD14.

Par conclusion, le tissu adipeux est une source de médiateurs de l'inflammation, facteurs suggérés pour causer l'inflammation induite par l'obésité et la résistance à l'insuline (suppression de l'absorption du glucose par les adipocytes) **(Chung *et al*., 2006).**

II.4.2. Tissu hépatique :

L'examen microscopique du tissu hépatique, coloré par l'hématoxyline et l'éosine a montré une accumulation intra-hépatocytaire de triglycérides caractéristique d'une stéatose hépatique métabolique macro vésiculaire chez le lot LPS et micro vésiculaire pour le lot du régime hyper lipidique, ce qui n'est pas le cas pour le lot témoin. Cela est peut être du a l'activité lipolytique importante des cellules du tissu adipeux viscéral qui pourrait participer à exposer le foie, via la veine porte, à des quantités élevées d'acides gras libres utilisés par l'hôte comme

source d'énergie et issus de la digestion des fibres alimentaires qui ne sont pas encore assimilées.

Cette augmentation dans les concentrations d'acides gras libres diminuerait l'extraction hépatique d'insuline et contribuerait ainsi à l'hyper insulinémie systémique **(Björntorp *et al.*, 1990)**. De plus, ces taux élevés d'acides gras libres favoriseraient également une surproduction hépatique de glucose. L'arrivée de ces mêmes acides gras libres au foie empêcherait la dégradation de l'apo B et contribuerait ainsi à l'augmentation du nombre de lipoprotéines riches en triglycérides et en apo B en circulation **(Després *et al.*, 1993 ;Després *et al.*, 1994).**

Cette explication peut être soutenue par l'étude de **Buettner *et al* (2006)**, dont l'examen histologique du foie (coloration à l'hématoxyline-éosine) des rats mâles *Wistar* recevant un régime riche en matières grasse (saindoux, d'huile d'olive ou huile de coco) durant 4 semaines a montré un dépôt de graisse principalement microvésiculaire caractéristique d'une stéatose hépatique chez touts les lots contrairement au groupe contrôle**.** Ainsi, une vacuolisation lipidique hépatique et même la fibrose chez les gerbilles *Meriones unguiculatus* étaient grandement formées avec une altération de la fonction hépatique en réponse à l'alimentation riche en graisses pendant 16 semaines **(Ying *et al.*, 2012).**

Une autre étude portée aussi sur les gerbilles *Meriones unguiculatus,* nourries avec un régime riche en graisses et en sucres simples, a démontré que les animaux ont développé des niveaux élevés de graisse totale hépatique, de cholestérol et de triglycérides contribuant au développement de la stéatose observée dans les coupes histologiques du foie colorées par l'HE (hématoxyline et éosine)**(Ventura *et al.*, 2017).**

En outre, une étude consiste à l'administration d'un régime hyper lipidique à base de jaune d'oeuf cuit chez *Psammomys obesus* a indiqué des grandes variations tant plasmatiques et tissulaires et cellulaires sont engendrées par le régime hyper lipidique, une hyperglycémie, une hypercholestérolémie et une hyper triglycéridémie accompagnées d'un déséquilibre de la balance lipoprotéinémique (augmentation des LDL, baisse des HDL), L'hypercholestérolémie et l'hyper triglycéridémie ont induit une augmentation des lipides hépatiques marquant une stéatose hépatique **(Rezkallah, 2007).**

Ainsi, plusieurs recherches sur des modèles d'animaux et des études humaines fournissent de plus en plus de preuves que la progression de la stéatose hépatique non alcoolique est liée à la détérioration de la fonction de la barrière physique de l'intestin. Il a été observé chez les patients atteints de NAFLD (Non-alcoholicfatty liver disease) une augmentation significative de la perméabilité intestinale par rapport aux sujets sains **(Navaneethan *et al*., 2011).** Lorsque les jonctions serrées sont altérées, la perméabilité intestinale augmente ce qui permet l'entée du lipopolysaccharide, LPS, dans le système porte. L'augmentation des niveaux de LPS entrant dans le foie ont de multiples effets biologiques. Tout d'abord, le LPS induit le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires et la production de cytokines Pro-inflammatoires. Deuxièmement, le LPS module les fonctions hépatocytaires ce qui produit la cholestase **(Navaneethan *et al*., 2011).** Troisièmement, le LPS et les cytokines Pro-inflammatoires induisent la production par les hépatocytes de protéines inflammatoires de la phase aiguë y compris la protéine de liaison du LPS (LBP) et l'IL-6 **(Szabo, 2015).**

Le profil du microbiote dans NAFLD **(Mouzaki *et al,* 2013)** est beaucoup moins bien documenté que dans l'obésité. La plupart des études ont observé une augmentation des *Firmicutes* par rapport aux *Bactéroïdetes* **(Wong *et al*, 2013).** La prévalence élevée de SIBO (prolifération bactérienne intestinale) a été observée chez les sujets obèses, les adultes **(Wigg *et al*, 2001 ; Miele *et al*., 2009)** et les enfants atteints de NAFLD et est associée à la sévérité de la stéatose hépatique et l'élévation sanguine du LPS **(Giorgio *et al*., 2014).**

L'idée que le déséquilibre de la flore intestinale est associé à NAFLD est aussi supportée par des données provenant d'expérimentation sur des souris, dont l'activation des récepteurs toll-like présents sur différentes cellules présentes dans le foie comme les cellules de Kupffer, les cellules stellaires et les hépatocytes par des produits bactériens **(Creely *et al*., 2007)** qui atteignent le foie par la veine porte. Le LPS, un composant de la paroi cellulaire des bactéries Gram-négative et ligand de TLR4 (Toll like receptor 4) le plus étudié. Le passage du LPS à travers la barrière intestinale contribue au développement d'un état inflammatoire infraclinique, à la résistance à l'insuline associée au diabète de type 2 et à l'obésité en stimulant le système immunitaire inné et le déclenchement de la libération de cytokines pro-inflammatoires **(Creely *et al*., 2007).** Cette résistance à l'insuline est associée à la stéatose **(Cani *et al*., 2007).** Ainsi, les récepteurs Toll-like (TLR), exprimés par l'épithélium intestinal sont liés à l'évolution de la stéatose hépatique non alcoolique.

Des souris de type sauvage (WT) nourries avec une alimentation riche en graisses, riche en fructose, ou une alimentation déficiente en méthionine / choline développent une stéatose sévère ou une stéatohépatite. En revanche, les souris mutantes pour TLR4 ont moins de stéatose ou stéatohépatite en suivant ces même régimes, bien que les niveaux de LPS soient équivalents à celles des souris (WT) **(Miura *et al*., 2010).**

Conclusion et perspectives

Conclusion et Perspectives

Nous avons essayé de prouver la relation entre le microbiote intertinal, l'endotoxémie et les maladies métaboliques (diabète et obésité) en suggérant qu'un régime riche en graisses modifie la composition du microbiote intestinal et favorise l'augmentation de l'absorption des LPS des parois bactériennes. Il en résulte une endotoxémie métabolique stimulant les processus inflammatoires du tissu adipeux et l'obesité qui sont à l'origine d'une stéatose hépatique et une l'insulino-résistance.

Au terme des 45 jours d'expérimentation, notre étude a montré chez les souris *Mus musculus* soumises à un régime alimentaire riche en matière grasse et aussi chez les souris gavées pas le facteur bactérien (LPS) :

- Une inflammation qui apparait sous forme d'infiltration de cellules inflammatoires au niveau du tissu adipeux viscéral.
- Un développement d'une stéatose hépatique retrouvée lors de l'examen histologique du foie.

Il serait donc intéressant d'envisager des stratégies nutritionnelles basées sur des manipulations nutritionnelles à base de compléments alimentaires, tels que les pré- et pro-biotiques ainsi que la transplantation fécale qui devrait permettre, à terme, de prendre en charge le changement d'écologie intestinale afin de restaurer les fonctions saines de ce nouvel organe métabolique que représente le microbiote intestinal.

Références bibliographiques

A.

Ajuwon KM, Spurlock ME 2005 Adiponectin inhibits LPS-induced NF_B activation and IL-6 production and increases PPAR_2 expression in adipocytes. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 288:R1220–R1225.

Alison L, Madhusudhan C, Gyanendra T, Kirsty C, Nasser M, Omar S, Shaun S, Joseph P, Antonio C, Ponnusamy S, Sudhesh K, Philip G, **(2012)** : » High Fat Intak Leads to Acute Postprandial Exposure to Circulating Endotoxin in Type 2 Diabetic Subjects »p :376

Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB et *al.*(2008) :Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. Am J Clin Nutr;87:1219-23.

Austin E.A., Graves J.F. et *al.*,(1990). Genetic analysis of lipopolysaccharide core biosynthesis by Escherichia coliK12 insertion mutagenesis of the rfa locus.J. BACT, ***172***(9),

B.

Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI: Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:979–984, 2007.

Neal MD, Leaphart C, Levy R, Prince J, Billiar TR, Watkins S, Li J, Cetin S, Ford H, Schreiber A, Hackam DJ: Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J Immunol* 176:3070–3079, 2006.

Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I., 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 15718–15723. doi:10.1073/pnas.0407076101.

Backhed, F., J. K. Manchester, et *al.* (2007). "Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice." Proc Natl Acad Sci U S A 104(3): 979-984.

Backhed, F., R. E. Ley, et *al.* (2005). "Host-bacterial mutualism in the human intestine." Science 307(5717): 1915-1920.

Björkstén B, Naaber P, Sepp E.,(1999). The intestinal microflora in allergic Estonian andSwedish 2–year -old children. Clin Exp Allergy 1999;29: 342– 6.

Björntorp P. Visceral fat accumulation: the missing link between psychosocial factors and cardiovascular disease? J Intern Med 1991, 230, 195-201.

Bouloumie A, Casteilla L, Lafontan M, (2008). Adipose tissue lymphocytes and macrophages in obesity and insulin resistance: makers or markers, and which comes first? Arterioscler Thromb Vasc Biol;28:1211-3.

Bouloumie A, Curat CA, Sengenes C, Lolmede K, Miranville A, Busse R, (2005). Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. Curr Opin Clin Nutr Metab Care;8:347-54.

Bourlier, V., A. Zakaroff-Girard, et *al.* (2008). "Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages." Circulation 117(6): 806-815.

Brugman S, Klatter FA, Visser JT, Wildeboer-Veloo AC, Harmsen HJ, Rozing J, Bos NA, (2006): Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the bio-breeding diabetes-prone rat: is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia* 49:2105–2108.

Brun, P., I. Castagliuolo, V. Di Leo, A. Buda, M. Pinzani, G. Palu, And D. Martines, (2007). Increased Intestinal Permeability In Obese Mice: New Evidence In The Pathogenesis Of Nonalcoholic Steatohepatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292:G518-525.

Buettner R, Ottinger I, Scholmerich J & Bollheimer LC(2004) : Preserved Direct Hepatic Insulin Action In Rats With Diet-Induced Hepatic Steatosis. *Journal Of Molecular Endocrinology*286E828-E833.

Burcelin R, Chabo C, Blasco-Baque V, et *al,* (2013). Le microbiote intestinal à l'origine de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les maladies métaboliques ? Med Sci (Paris) 2013 ; 29 : 800–806.

C.

Cabou, C., P. D. Cani, G. Campistron, C. Knauf, C. Mathieu, C. Sartori, J. Amar, U. Scherrer, And R. Burcelin, (2007). Central Insulin Regulates Heart Rate And Arterial Blood Flow: An Endothelial Nitric Oxide Synthase-Dependent Mechanism Altered During Diabetes. Diabetes 56:2872-2877.

Cani, P. D., N. M. Delzenne, et *al.* (2008) : "Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding."Pathol Biol(Paris).

Cani, P. D., R. Bibiloni, C. Knauf, A. Waget, A. M. Neyrinck, N. M. Delzenne, And R. Burcelin, **(2008) :** Changes In Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation In High-Fat Dietinduced Obesity And Diabetes In Mice. Diabetes 57:1470-1481.

Cani, P. D., S. Possemiers, et *al.* (2009). "Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability." Gut 58(8):1091-1103.

Cani, P., J. Amar, et *al.* (2007). "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance." Diabetes 56: 1761-1772.

Cavaillon, J. M., C. Fitting, et *al.* (1990). "Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide." Infect Immun 58(7):

Chou, C. J., M. Membrez, et *al.* (2008). "Gut decontamination with norfloxacin and ampicillin enhances insulin sensitivity in mice." Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program 62: 127-137; discussion 137-140.

Colton R.C., Russel J.N.,(2003). Struture de la bactérie.Science, Mars 2003, p : 4, 39, 44, 45.

Creely, S.J., McTernan, P.G., Kusminski, C.M., Fisher, ff M., Da Silva, N.F., Khanolkar, M., Evans, M., Harte, A.L., Kumar, S., 2007. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 292, E740–747. doi:10.1152/ajpendo.00302.2006

Curat CA, Miranville A, Sengenes C et *al.* (2004) From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. Diabetes 53: 1285–92.

D.

Daubresse JC., Cadière GB., Sternon J. (2005). Obesity in adult patients : check up and treatment. Rev Med Brux. 26 : 33-42.

Deruelle P. (2011). Obésité et grossesse. Gynécologie Obstétrique & Fertilité. 39 : 100–105.

Després JP. Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome. Nutrition 1993, 9, 452-459.

Després JP. Dyslipidaemia and obesity. Baillieres Clin Endocrinol Metab 1994, 8, 629-660.

Dethlefsen, L., S. Huse, et *al.* (2008). "The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing." PLoS Biol 6(11): e280.

E.

E. Esteve, W. Ricart, And J.-M. Fernandez-Real, (2011) : "Gut Microbiota ´ Interactions With Obesity, Insulin Resistance And Type 2 Diabetes: Did Gut Microbiote Co-Evolve With Insulin Resistance?" *Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care*, Vol. 14, No. 5, Pp. 483–490.

El Aoufi.S, P. Gendre,S. R. Sennoune, P. Rigoard, J.M. Maixent, L. Griene,2007 :A high calorie diet induces type 2 diabetes in the desert sand rat (psammomys obesus).Cellular andMolecularBiology TM53, OL943-OL953 ISSN 1165-158X .DOI 10.1170/108.
Elodie, L,(**2011**) : rôle de l'endotoxemie metabolique sur le tissuadipeux blanc au cours du developpement des maladiesmetaboliquesVol. 14, No. 5, Pp. 483–490.
Erridge, C., T. Attina, C. M. Spickett, And D. J. Webb, (2007) : A High-Fat Meal Induces Low-Grade Endotoxemia: Evidence Of A Novel Mechanism Of Postprandial Inflammation. Am J Clin Nutr 86:1286-1292.
Euzeby J.P.,(2004). Lipopolysaccharides (antigènes O et endotoxines).Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.Janvier 2004, p : 1-5.
F.
Frazier, T.H., DiBaise, J.K., McClain, C.J., 2011. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. JPEN J Parenter Enteral Nutr 35, 14S–20S. doi:10.1177/0148607111413772.
Friberger P.,(1987). A new method of endotoxin determination.American clin. Products Rev., 1987, 13, p : 12-17.
G.
Gain, systemic metabolic alterations, adipose tissue inflammation, hepatic steatosis, and oxidative stress in gerbils (Meriones unguiculatus). PubMed 28265495.
Gao, Yongjie Ma, et Dexi Liu(2015) : High-Fat Diet-Induced Adiposity, Adipose Inflammation, Hepatic Steatosis and Hyperinsulinemia in Outbred CD-1 Mice.PLoS One. 2015; 10(3): e0119784.
gastrointestinal motility."Proc Soc Exp Biol Med 126(1): 301-304.
Ghoshal, S., J. Witta, et *al.* (2009). "Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides."J Lipid Res 50(1): 90-97.
Gill, S. R., M. Pop, et *al.*(2006). "Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome." Science 312(5778): 1355-1359.
Gioannini TL, Weiss JP, (2007) : Regulation of interactions of Gramnegative bacterial endotoxins with mammalian cells. Immunol Res;39:249-60.
Giorgio, V., Miele, L., Principessa, L., Ferretti, F., Villa, M.P., Negro, V., Grieco, A., Alisi, A., Nobili, V., 2014. Intestinal permeability is increased in children with non-alcoholic

fatty liver disease, and correlates with liver disease severity. Dig Liver Dis 46, 556–560. doi:10.1016/j.dld.2014.02.010.

Gorbach, S. L, (1990) : "Lactic acid bacteria and human health." Ann Med 22(1): 37-41.

Grff-Mirguet.G.,(2002) : Echantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air. Cahier de notesdocumentaires- hygiène et sécurité du travail- N°187.INRS, 2002, p : 73-83.

Guha M, Mackman N, (2001) : LPS induction of gene expression in human monocytes. Cell Signal ;13:85-94.

H.

Harkins JM, Moustaid-Moussa N, Chung Y, Penner KM, Pestka JJ, North CM, Claycombe KJ 2004 Expression of interleukin-6 is greater in preadipocytes than in adipocytes of 3T3–L1 cells and C57BL/6J and ob/ob mice. J Nutr 134:2673–2677.

Harris, H. W., C. Grunfeld, et *al.* (1993). "Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death." J Clin Invest 91(3): 1028-1034.

Henao-Mejia, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W.Z., Strowig, T., Thaiss, C.A., Kau, A.L., Eisenbarth, S.C., Jurczak, M.J., Camporez, J.-P., Shulman, G.I., Gordon,

Hornef, M. W., T. Frisan, et *al.* (2002). "Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells." J Exp Med **195**(5): 559-570.

Hotamisligil G, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White M, Spiegelman B: IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha-and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271:665–668, 1996.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM: Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87–91, 1993.

Hotamisligil GS,(2006) : Inflammation and metabolic disorders. Nature;444:860-7.

Hua-Zong Ying1 , Chen-huan Yu1 , Zhi-yuan Wang1 , Bing Yu2 , Jia-Na Zang 2 , et Yue-huan Liu1(2012) : Characterization and mechanisms of lipid metabolism in high-fat diet induced hyperlipidemia in Mongolian gerbil (Meriones unguiculatus). African Journal of Biotechnology Vol. 11(97), pp. 16347-16352. DOI: 10.5897/AJB12.336.

I.

Isolauri E., Kirjavainen P. V., & Salminen S.,(2002). Probiotics: a role in the treatment of Intestinal infection and inflammation. Gut, 50, 54-59.

J.I., Hoffman, H.M., Flavell, R.A., 2012. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. Nature 482, 179–185. doi:10.1038/nature10809.

K.

K. L. Sweazea, M. Lekic, And B. R. Walker,(2010) "Comparison Of Mechanisms Involved In Impaired Vascular Reactivity Between High Sucrose And High Fat Diets In Rats," *Nutritionans And Metabolism*, Vol. 7, Article 48.

Kassem Makki, (2014). Role de modulateurs immunologiques et m_etaboliques dans le d_eveloppement de l'ob_esit_e et de la r_esistance _a l'insuline : administration de larapamycine ou de probiotiques chez la souris ob_ese. M_edecine humaine et pathologie. Universit_e du Droit et de la Sant_e – Lille II, 2014 : 49.

Kopp A, Bala M, Buechler C et *al*(2010). C1q/TNF-related protein-3 represents a novel and endogenous lipopolysaccharide antagonist of the adipose tissue. Endocrinology 2010 ; 151 : 5267–5278.

L.

L. N. Sutherland, L. C. Capozzi, N. J. Turchinsky, R. C. Bell, et D. C, (2008) :Wright, "Time Course Of High-Fat Diet-Induced Reductions In Adipose Tissue Mitochondrial

Levels, J. H., P. R. Abraham, et *al*. (2003). "Distribution and kinetics of lipoprotein-bound lipoteichoic acid." Infect Immun 71(6): 3280-3284.

Levine, D. M., T. S. Parker, et *al*. (1993). "In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein." Proc Natl Acad Sci U S A 90(24): 12040-12044.

Ley R. E., P. J. Turnbaugh, et *al*. (2006). "Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity." Nature 444(7122): 1022-1023.

Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI: Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11070– 11075,2005.

Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI,(2005): Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11070–11075.

Luciana L.A. Ventura, Nathália C.L. Fortes, Helton C. Santiago, Marcelo

V. Caliari, Maria A. Gomes, Dirce R. Oliveira(2017) : Obesity-induced diet leads to weight

M.

Mahowald, M. A., F. E. Rey, et *al.* (2009). "Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla." Proc Natl Acad Sci U S A 106(14): 5859-5864.

Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, *et al* (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. Gut 2006 ; 55 : 205–211.

Miele, L., Valenza, V., La Torre, G., Montalto, M., Cammarota, G., Ricci, R., Mascianà, R., Forgione, A., Gabrieli, M.L., Perotti, G., Vecchio, F.M., Rapaccini, G., Gasbarrini, G., Day, C.P., Grieco, A., 2009. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 49, 1877–1887. doi:10.1002/hep.22848.

Milargo FI., Campion J., Martinez JA. (2006). Weight gain induced by high fat feeding involves increased liver oxidative stress. Obesity. 14 : 1118-1123.

Miura, K., Seki, E., Ohnishi, H., Brenner, D.A., 2010. Role of toll-like receptors and their downstream molecules in the development of nonalcoholic Fatty liver disease. Gastroenterol Res Pract 2010, 362847. doi:10.1155/2010/362847.

Moore W. E. C., Holdeman L. V.,(1974). Human faecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians.Applied Microbiology, 27, 961-979.

Mouzaki, M., Comelli, E.M., Arendt, B.M., Bonengel, J., Fung, S.K., Fischer, S.E., McGilvray, I.D., Allard, J.P., 2013. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 58, 120–127. doi:10.1002/hep.26319.

Musso, G., R. Gambino, et *al.*"Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update." Obes Rev 11(6): 430-445.

N.

Nappo F, Esposito K, Cioffi M et *al*, (2002).Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. J Am Coll Cardiol;39:1145-50.

Navaneethan, U., Jayanthi, V., Mohan, P., 2011. Pathogenesis of cholangitis in obstructive jaundice-revisited. Minerva Gastroenterol Dietol 57, 97–104.

Neal, M. D., C. Leaphart, et *al.* (2006). "Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier." J Immunol 176(5): 3070-3079.

O.

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

Ouwehand, A., E. Isolauri, et *al*. (2002). "The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood." Eur J Nutr 41 Suppl 1: I32-37.
p : 25.

P.

Parracho HM, Bingham MO, Gibson GR, McCartney et *al*, (2005). Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. J Med Microbiol 2005 ; 54 : 987–991.

Pasquet P., Frelut ML., Simmen B., Hladik CM., Monneuse MO. (2007). Taste perception in massively obese and in non-obese adolescents. Int J Pediatr Obes. 2(4):242-8.

Pendyala, S., J. M. Walker, And P. R. Holt, (2012). A High-Fat Diet Is Associated With Endotoxemia That Originates From The Gut. Gastroenterology 142:1100-1101 E1102.

Podolsky, D. K. (2002). "Inflammatory bowel disease." N Engl J Med 347(6): 417-429.

Poggi, M., D. Bastelica, et *al*, (2007)."C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet." Diabetologia 50(6): 1267-1276.

Proteins: Potential Mechanisms And The Relationship To Glucose Intolerance," *American Journal Of Physiology*, Vol. 295, No. 5, Pp. E1076– E1083.

Pussinen, P. J., A. S. Havulinna, M. Lehto, J. Sundvall, And V. Salomaa (2011). Endotoxemia Is Associated With An Increased Risk Of Incident Diabetes. Diabetes Care 34:392-397.

R Buettner, K G Parhofer1,et al**, (2006)** :'Defining High-Fat-Diet Rat Models: Metabolic And Molecular Effects Of Different Fat Types'J Molecular Endocrinology 36, 485–501.

R.

Reeves Peter,(1995). *Role of O antigen variation in the immune response. Trends in Microbiology. Oct. 1995, **3**(10),* p: 81-86.

Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, et *al*, (2013) :Gut Microbiota From Twins Discordant For Obesity Modulate Metabolism In Mice. Science;341:1241214. Doi:10.1126/Science.1241214.

S.

S. M. Kim, C. W. Rico, S. C. Lee, And M. Y. Kang,(2010) :"Modulatory Effect Of Rice Bran And Phytic Acid On Glucose Metabolism In High Fat-Fed C57BL/6N Mice," *Journal Of Clinical Biochemistry And Nutrition*, Vol. 47, No. 1, Pp. 12–17.

Sadelain, M. W., H. Y. Qin, et *al.*(1990). "Prevention of type I diabetes in NOD mice by adjuvant immunotherapy." Diabetes 39(5): 583-589.

Sahraoui,Dewachter,Medina,Naeije,Aouichat Bouguerra et Dewachter (2016) : Myocardial Structural and Biological Anomalies Induced by High Fat Diet in *Psammomys obesus* Gerbils.PLoS One. 2016; 11(2): e0148117.

Seksik, P., H. Sokol, et *al.* (2006). "Review article: the role of bacteria in onset and perpetuation of inflammatory bowel disease." Aliment Pharmacol Ther 24 Suppl 3: 11-18.

Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, et *al* (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. J Clin Invest ; 116 : 3015–3025.

Shoelson S, Lee J, Goldfine A, (2006). Inflammation and insulin resistance. J Clin Invest;116:1793-801.

Société française des sciences et techniques pharmaceutique.

Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, *et al,* (2008) : Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proc Natl Acad Sci USA 2008 ; 105 : 16731–16736.

Soonkyu Chung, Kathleen LaPoint, Kristina Martinez, Arion Kennedy, Maria Boysen Sandberg, and Michael K. McIntosh *:* Inflammation in Preadipocytes Triggers Insulin Resistance Endocrinology, November 2006, 147(11):5340–5351.

Sow A.M.,(1996). Electrophorétypes des lipopolysaccharides de souches de bacilles à Gram négatif. Interet de l'etude de la virulence et de la résitance aux antibiotiques Thèse Pharm., Dakar, 1996, n°33.

Spencer, M.D., Hamp, T.J., Reid, R.W., Fischer, L.M., Zeisel, S.H., Fodor, A.A., 2011 : Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development

Suganami T, Yuan X, Shimoda Y, et *al*(2009). Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. Circ Res 2009 ; 105 : 25–32.

Sweet MJ, Hume DA(1996): Endotoxin signal transduction in macrophages.*J Leukoc Biol* 60:8–26.

Sweet MJ, Hume DA: Endotoxin signal transduction in macrophages.*J Leukoc Biol* 60:8–26, 1996.

Szabo, G., 2015. Gut-liver axis in alcoholic liver disease. Gastroenterology 148, 30–36. doi:10.1053/j.gastro.2014.10.042.

T.

Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-Induced Obesity Is Linked To Marked But Reversible Alterations In The Mouse Distal Gut Microbiome. Cell Host Microbe 2008;3:213-223.

Turnbaugh, P. J., M. Hamady, et *al.* (2009). "A core gut microbiome in obese and lean twins." Nature 457(7228): 480-484.

Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, et *al.* (2006). "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest." Nature 444(7122): 1027-1031.

Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, et *al.* (2007). "The human microbiome project." Nature 449(7164): 804-810.

V.

Van Oostrom AJ, Rabelink TJ, Verseyden C et *al*,(2004). Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers. Atherosclerosis;177:175-82.

Van Wijk JPH, Cabezas MC, Coll B et *al*, (2006) : Effects of rosiglitazone on postprandial leukocytes and cytokines in type 2 diabetes. Atherosclerosis;186:152-9.

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

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

W.

Weisberg SP, McCann D, Desai M et *al*. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest 112: 1796–808.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796–1808, 2003.

Wellen KE, Hotamisligil GS(2003). Obesity-inducedinflammatory changes in adipose tissue. J Clin Invest 2003;112 (12):1785-8.

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

Wheat Robert W.,(1984). *Bacterial morphology and ultrastructure, in : Jolik W. K., Willett H. R. et al., Zinsser microbiology, 18th ed., Acc / Norwalk, Connecticut,* 1984, p : 19, 23, 33.

Wigg, A.J., Roberts-Thomson, I.C., Dymock, R.B., McCarthy, P.J., Grose, R.H., Cummins, A.G., 2001. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestin permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. Gut 48, 206–211.

Wong, V.W.-S., Tse, C.-H., Lam, T.T.-Y., Wong, G.L.-H., Chim, A.M.-L., Chu, W.C.-W., Yeung, D.K.-W., Law, P.T.-W., Kwan, H.-S., Yu, J., Sung, J.J.-Y., Chan, H.L.-Y., 2013. Molecular characterization of the fecal microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis--a longitudinal study. PLoS ONE 8,e62885.doi:10.1371/journal.pone.0062885.

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* (249):1431–1433, 1990.

Wu, G. X. Xi Et Al (2007) "An Experimental Study Of Impaired Glucose Tolerance In Wistar Rats," Chinese Remedies & Clinics, Vol. **7**, No. 4, Pp. 281–283.

X.

Xu, J. and J. I. Gordon (2003). "Inaugural Article: Honor the symbionts." Proc Natl Acad Sci U S A 100**(18):** 10452-10459.

Y.

Young, N.S., J. Levin, et R.A. (1972). Prendergast. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: Evidence for enzymatic mechanism. J. Clin. Invest. 51:1790.

Z.

Zaneveld, J., P. J. Turnbaugh, et *al.* (2008). "Host-bacterial coevolution and the search for new drug targets." Curr Opin Chem Biol 12(1): 109-114.

Zoetendal, E. G., A. D. Akkermans, et *al.* (1998). "Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of activebacteria." Appl Environ Microbiol 64(10): 3854-3859.

Zoetendal, E. G., E. E. Vaughan, et *al.* (2006). "A microbial world within us." Mol Microbiol 59(6):1639-1650.

Annexes

Annexe 01

Eau gélatinée :

Dissoudre 0,4g de gélatine en poudre dans 100ml d'eau distillée, après chauffage et dissolution, ajouter une pincé de thymol puis filtrer et laisser refroidir.

Annexe 02

Phase d'adaptation :

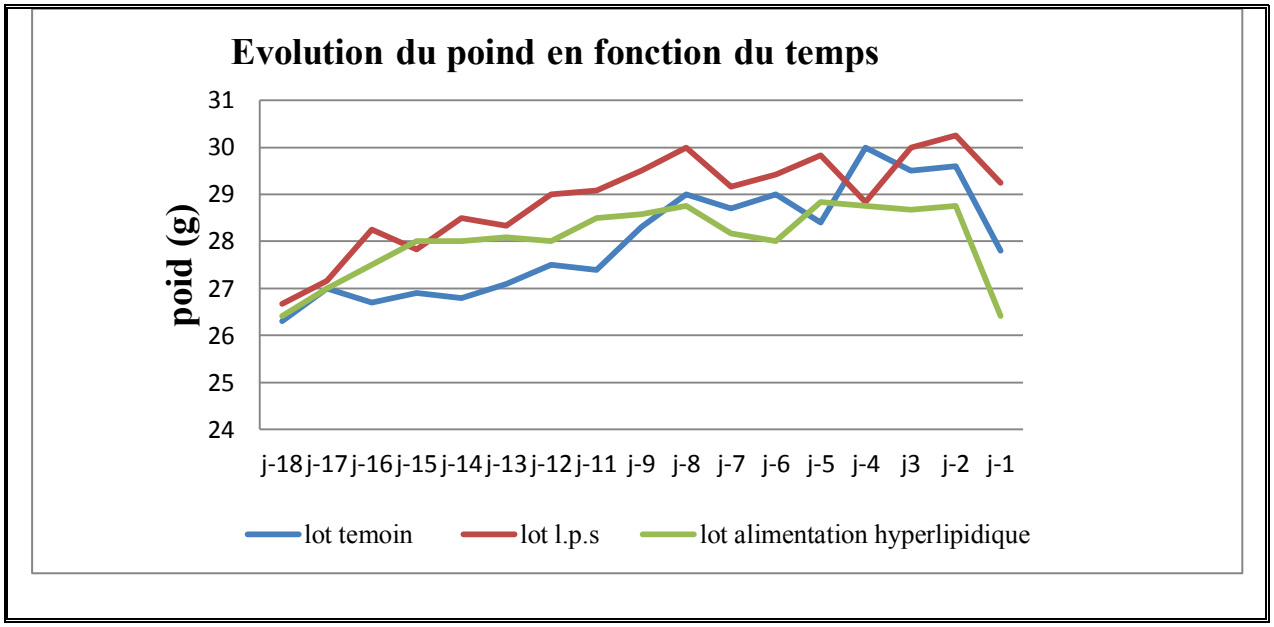


Figure 01: Evolution du poids.

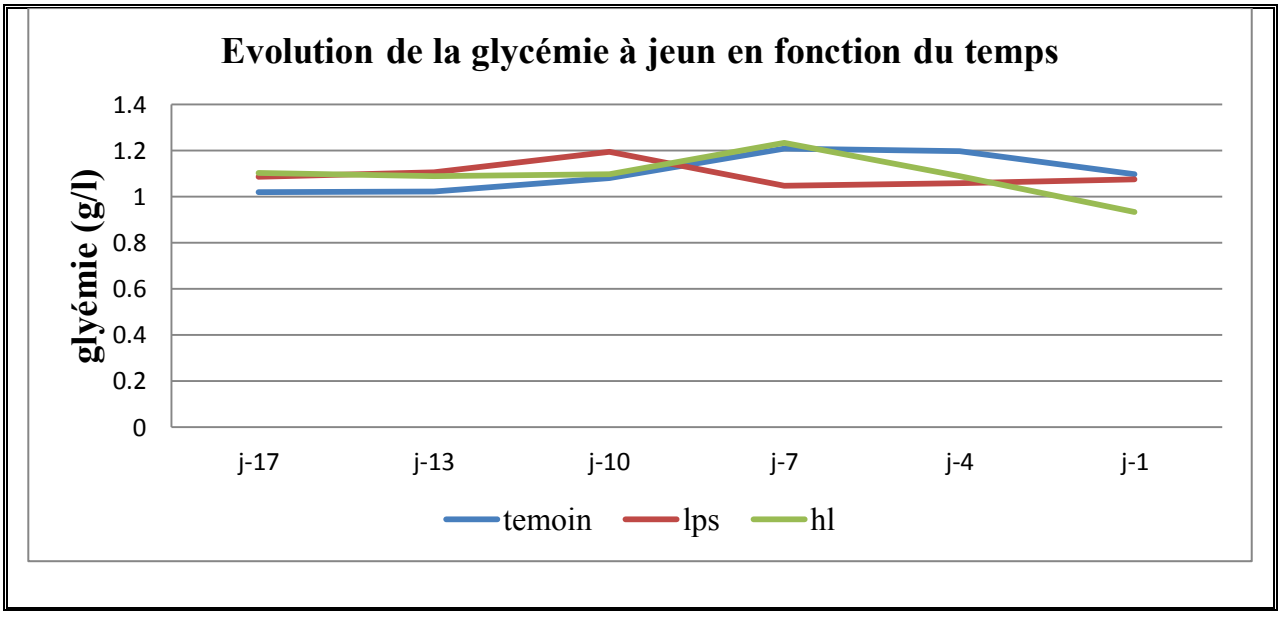


Figure 02 : Evolution de la glycémie à jeun.

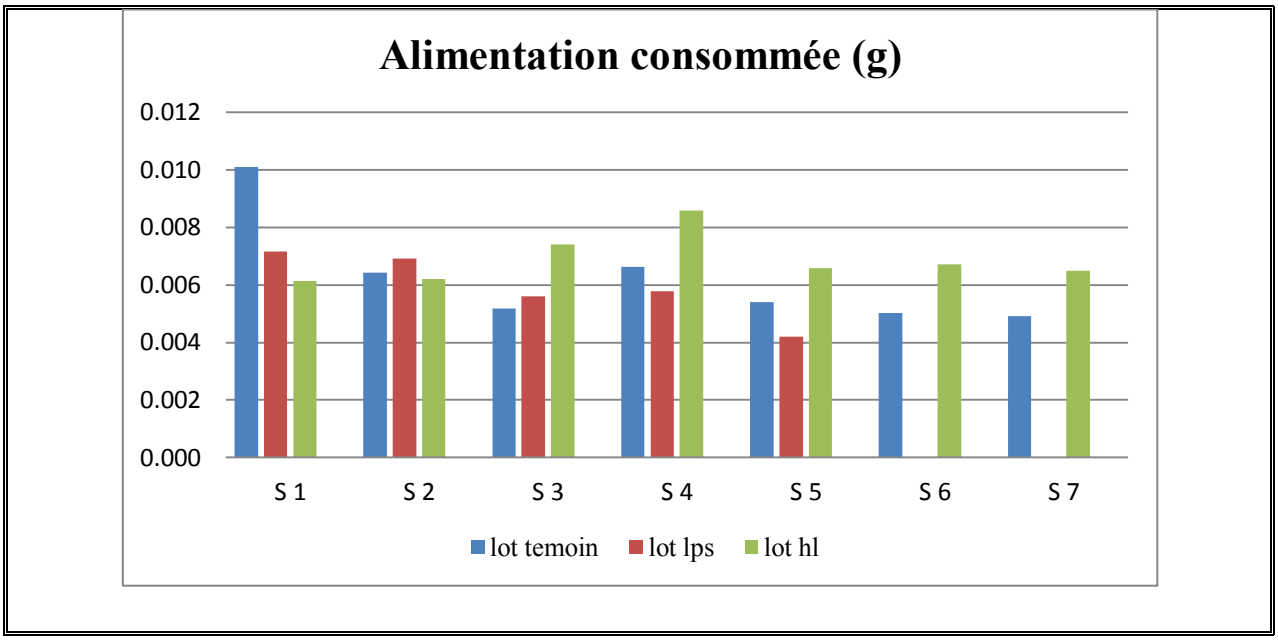


Figure 03 : Alimentation consommée par semaine (phase expérimentale).

Annexe 03

Tableau I : Poids (g) des souris.

		J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6
Lot témoin	moyenne	27,8	28,22	29,5	29,556	30,222	30,667	29,222
	ESM	0.283	0.395	0.613	0.818	0.808	0.818	0.787
Lot LPS	moyenne	27,833	28,083	30,167	31,083	31,5	31,417	30,583
	ESM	0.283	0.395	0.613	0.818	0.808	0.818	0.787
Lot HL	moyenne	27,545	29	28,5	28	27,6	27,2	26,7
	ESM	0.865	0.803	0.687	0.730	0.670	0.712	0.804

J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14
28,889	28,889	29	29,444	29,778	30,333	28,667	29,556
0,633	0,564	0,667	0,580	0,722	0,527	0,289	0,412
30,917	30,833	31,167	31,417	32,273	32,455	33,364	33,273
0,721	0,832	0,769	0,744	0,634	0,623	0,622	0,689
26,1	26,1	26,3	27,1	26,4	26,4	26	25,9
0,888	0,674	0,895	0,971	0,846	0,859	0,931	0,836

J15	J16	J17	J18	J19	J20	J21	J22
29,56	28,444	29,111	28,111	31,222	29,889	29,111	28,889
0,503	0,648	0,455	0,309	0,401	0,309	0,261	0,261
33,273	33,364	33	33,091	32,75	32,667	33	33,091
0,675	0,664	0,700	0,595	0,717	0,684	0,633	0,595
26,3	26,8	27,5	28,4	28,6	29,2	28,6	28,9
0,844	0,827	0,910	0,748	0,718	0,743	0,921	0,912

sJ23	J24	J25	J26	J27	J28	J29	J30
30,111	29,111	29,56	29,778	29,778	29,889	30,222	29,667
0,200	0,200	0,242	0,278	0,364	0,455	0,596	0,333
33,545	33,182	33,818	33,636	33,182	34,545	34	33,909
0,665	0,711	0,644	0,592	0,724	0,767	0,713	0,719
29,5	29,7	30,1	30	30,1	30,4	31,2	31,1
0,958	0,955	0,994	0,196	1,028	0,872	0,916	0,809

J31	J32	J33	J34	J35	J36	J37	J38
29,889	30,222	30,111	30,222	30,111	31	30,556	30,778
0,324	0,389	0,434	0,351	0,471	0,377	0,364	0,294
/	/	/	/	/	/	/	/
31,3	31,6	32,2	32,4	32,6	32,2	33	33,1
0,968	0,928	0,789	0,687	0,727	0,789	0,809	0,577

Tableau II : Poids(g) des souris par semaine.

		Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	Semaine 4	Semaine 5	Semaine 6	Semaine7	
Lot témoin	moyenne	29,26	29,381	29,35	29,588	30,063	30,476	30,194	
	Ecart type	1,95285714	1,61157143	1,23671429	0,85714286	1,22157143	1,08242857	1,0945	
	ESM	0,65	0,5371	0,412238	0,2856	0,4071	0,3608	0,3648	
Lot LPS	moyenne	30,198	29,381	33,021	33,571	33,9545	/	/	
	Ecart type	2,014228571	2,34242857	2,23842857	2,16214286	2,432	/	/	
	ESM	0,6714	0,7808	0,7461	0,7207	0,81066	/	/	
Lot HL	moyenne	27,581	26,314	27,914	29,814	31,771	33,167	33,85	
	Ecart type	2,38085714	2,73928571	2,54157143	2,69428571	2,79085714	2,279	2,385	
	ESM	0,7936	0,91	0,8471	0,898	0,9302	0,75966	0,795	

Tableau III: Glycémie (g/l) des souris par jours.

		J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
Lot témoin	moyenne	0,963	/	/	/	/	/	1,038	1,022
	ESM	0,0257	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0473	0,0643
Lot LPS	moyenne	0,939	1,017	1,033	1,151	1,148	1,108	1,146	1,144
	ESM	0,046	0,048	0,107	0,032	0,031	0,081	0,072	0,064
Lot HL	Moyenne	0,953	/	/	/	/	/	1,012	0,771
	ESM	0,061	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,054	0,061

J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15
/	1,013	/	1,089	/	1,021	0,927	1,107
0,0000	0,0713	0,0000	0,0907	0,0000	0,0597	0,0600	0,1010
1,069	1,199	1,228	1,26	1,254	1,356	1,429	1,361
0,036	0,045	0,049	0,053	0,047	0,067	0,067	0,098
/	0,953	/	1,122		0,997	1,14	1,11
0,000	0,049	0,000	0,054	0,000	0,051	0,086	0,051

J16	J17	J18	J19	J20	J21	J22	J23
0,898	0,992	0,837	1,166	0,917	0,847	0,838	1,113
0,0860	0,0757	0,0893	0,0517	0,0730	0,0597	0,0440	0,0423
1,294	1,272	1,316	1,285	1,328	1,308	1,303	1,328
0,056	0,057	0,051	0,047	0,044	0,059	0,050	0,096
1,189	1,198	1,19	1,512	1,301	1,373	1,304	1,44
0,072	0,087	0,080	0,125	0,065	0,090	0,096	0,079

J24	J25	J26	J27	J28	J29	J30	J31
1,006	1,122	1,02	1,026	1,012	1,134	0,968	1,071
0,0700	0,1023	0,1070	0,0663	0,0747	0,0977	0,0973	0,0443
1,309	1,377	1,553	1,455	1,466	1,343	1,318	
0,039	0,046	0,047	0,107	0,047	0,054	0,054	0,000
1,311	1,484	1,351	1,285	1,402	1,351	1,399	1,355
0,076	0,086	0,082	0,115	0,060	0,067	0,110	0,055

J32	J33	J34	J35	J36	J37	J38	J39
0,929	1,076	1,152	0,784	1,153	0,802	0,974	0,883
0,1050	0,0530	0,1277	0,1120	0,1200	0,1183	0,1127	0,0923
/	/	/	/	/	/	/	/
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1,545	1,403	1,564	1,535	1,602	1,468	1,465	1,415
0,096	0,075	0,075	0,115	0,084	0,085	0,044	0,063

J40	J41	J42	J43	J44	J45	J46
0,791	0,941	0,816	1,02	0,923	0,883	0,845
0,0640	0,0427	0,0783	0,0470	0,0457	0,0653	0,0527
/	/	/	/	/	/	/
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1,479	1,536	1,402	1,406	1,569	1,57	1,551
0,092	0,082	0,060	0,051	0,071	0,067	0,109

Tableau IV : Glycémie (g/l) des souris par semaine.

		Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	Semaine 4	Semaine 5	Semaine 6	Semaine7
Lot témoin	moyenne	1,008	1,013	0,966	1,020	1,016	0,909	0,918
	Ecart type	0,137	0,211	0,230	0,217	0,273	0,269	0,158
	ESM	0,046	0,070	0,076	0,072	0,091	0,090	0,053
Lot LPS	moyenne	1,256	1,256	1,309	1,399	1,3305	/	/
	Ecart type	0,198	0,171	0,199	1,468	0,171333	/	/
	ESM	0,060	0,051	0,060	0,443	0,05165		
Lot HL	moyenne	0,912	1,053	1,268	1,360	1,450	1,481	1,524
	Ecart type	0,181	0,170	0,255	1,974	0,242	0,256	0,227
	ESM	0,055	0,051	0,077	0,595	0,072	0,077	0,084

Tableau V : Alimentation consommée (g) par semaine.

		Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	Semaine 4	Semaine 5	Semaine 6	Semaine7
Lot témoin	moyenne	10,102	6,429	5,190	6,635	5,396	5,016	4,917
	ESM	0,651	0,428	0,467	0,163	0,257	0,327	0,426
Lot LPS	moyenne	7,167	6,923	5,613	5,770	4,2	/	/
	ESM	0,588	0,400	0,414	0,318	0,34		/
Lot HL	moyenne	6,148	6,214	7,414	8,585	6,586	6,714	6,500
	ESM	0,812	0,985	0,969	0,960	0,668	0,728	0,708

Tableau VI : Moyenne des glycémies (g/l) par lot avant et après le gavage (test d'intolérance au glucose).

	A jeun	**Après 15 min**	**Après 30 min**	**Après 1 h**
Lot témoin	0,868	2,409	1,821	1,007
Lot LPS	1,32	2,5725	2,963	3,273
Lot HL	1,47	2,837	2,743	2,837

Tableau VII : Moyenne d'endotoxines trouvées lors du test LAL.

	Endotoxine (ng/ml)
Lot témoin	$< 5.10^{-7}$
Lot LPS	454,591
Lot HL	409,182