

**Université de Lille**

**Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille**

Année universitaire 2024-2025

Thèse soutenue en vue de l'obtention du titre de Docteur

Discipline : Biologie, médecine et santé

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Etude des effets de l'hippurate et de ses  
cibles sur la biologie des cellules bêta et  
hépatiques**

Présenté par

**Maxime Deslande**

Sous la direction du Docteur Marc-Emmanuel Dumas

**Le 9 décembre 2024**

**Jury :**

Fabienne Foufelle (rapporteur)

Isabelle Fournier (président de jury)

Remy Burcelin (rapporteur)

Marc-Emmanuel Dumas (directeur de thèse)



## Remerciements

---

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin, intensément ou succinctement, à l'accomplissement de cette thèse, par leur soutien, leurs conseils et leur présence bienveillante.

En premier lieu, je remercie Marc-Emmanuel Dumas, mon directeur de thèse, pour m'avoir offert l'opportunité de travailler sur ce projet. Son soutien scientifique et ses conseils avisés ont été déterminants pour la réussite de ce travail. Je tiens également à remercier Amélie Bonnefond, chef d'équipe, dont l'expertise et l'accompagnement m'ont été d'une grande aide, ainsi que Philippe Froguel, directeur du laboratoire, qui m'a permis de mener mes recherches dans un environnement stimulant.

Un remerciement particulier à Lucas et Vincent, avec qui j'ai partagé de très nombreuses heures dans l'open space. Leur soutien tant moral que scientifique, ainsi que l'atmosphère de travail conviviale qu'ils ont créé, ont été d'un immense appui. Je tiens également à remercier Justine qui en a fait partie un temps ainsi que pour son aide sur les manip. Ces trois personnes ont joué un rôle majeur dans mon quotidien au laboratoire.

Je n'oublie pas Jared, Zhaojie et Chaima, dont la présence et l'esprit de camaraderie ont aussi grandement contribué à l'ambiance positive au sein de l'équipe.

Une grande partie de mes remerciements va également à Michael, Francesc, Romina et Inès, mes aînés, dont les conseils scientifiques et les échanges enrichissants, en particulier pour l'article, ainsi que leur humanité ont été cruciaux.

Un remerciement tout particulier pour l'aide, les conseils et les discussions enrichissantes et agréables de Nawel, Frederik, Sarah, Lise, Vincent, Audrey, Yasmina, Petros, Bénédicte, Jérôme, Hélène et Victoria.

Je tiens à souligner et remercier Mélanie, Hélène, Nicolas, Frédérique et Constance pour leur soutien précieux, en particulier dans l'organisation des missions et démarches logistiques. Leur aide et leur sympathie m'a grandement aidé durant ce projet.

Je tiens également à remercier Gilles et Lisa pour leur remarquable organisation des événements auxquels j'ai eu la chance de participer, qu'il s'agisse d'activités de cohésion, comme les away days, ou purement scientifiques tels que la thematic school et les symposiums. Ces moments ont enrichi mon parcours tant professionnel que personnel.

Je remercie également Isabelle Hatin de l'I2BC pour son accueil chaleureux et son expertise précieuse dans les manipulations du gradient de polysome.

De plus, je tiens à exprimer ma gratitude aux membres du jury CSI, Catherine Postic et Magalie Ravier, pour leurs conseils avisés et particulièrement Olivier Namy pour l'opportunité qu'il m'a offert à l'I2BC. Merci également à Stéphane Audebert et Luc Camoin du CRCM pour leur

collaboration fructueuse sur le protéome, ainsi qu'à Mahima Swamy du MRC PPUU pour son expertise dans le screening du kinome.

Enfin et non des moindres, je tiens à adresser mes remerciements les plus chaleureux à ma famille, qui a été un pilier tout au long de cette aventure. À mes parents, sans qui cette thèse, et plus largement mon parcours académique, n'auraient jamais été possibles. Grâce à leur soutien constant, leur éducation bienveillante et les valeurs qu'ils m'ont inculquées, j'ai pu poursuivre mes études et choisir une voie qui me passionne. Ils m'ont toujours donné les moyens de m'épanouir, tant sur le plan personnel que professionnel, et m'ont apporté tout ce dont j'avais besoin pour devenir la personne que je suis aujourd'hui. Leur soutien indéfectible et leurs encouragements constants ont été essentiels tout au long de ce chemin.

À ma compagne, Camille, pour sa patience, sa compréhension et son inestimable présence à mes côtés tout au long de cette thèse, même dans les moments les plus difficiles. À Edith, pour son aide aussi bien scientifique qu'humain et son soutien bienveillant. Et enfin, à mon fidèle compagnon canin, Pyronucleus, dont la joie et l'affection de tous les jours ont souvent été une source de réconfort et de motivation.

À tous, merci infiniment pour votre concours précieux à cette aventure scientifique et humaine.

## Résumé

---

Les maladies cardiométaboliques telles que l'obésité, la maladie du foie associée à un dysfonctionnement métabolique (MASLD) et le diabète de type 2 voient leur prévalence augmenter. Le microbiome intestinal joue un rôle clé dans ces pathologies, non seulement par ses interactions directes avec l'hôte, mais surtout à travers la production et la transformation de molécules, les métabolites. Parmi ces derniers, l'hippurate émerge comme un acteur important. Ce métabolite est associé à plusieurs marqueurs de santé métabolique, notamment une meilleure tolérance au glucose, une amélioration de la sécrétion d'insuline et une corrélation négative avec la stéatose hépatique. Toutefois, bien que des études suggèrent un impact bénéfique sur le métabolisme hépatique et pancréatique, la manière dont l'hippurate influence directement la fonction de ses tissus reste à élucider. L'hippurate pourrait agir directement sur le métabolisme des organes majeurs tels que le pancréas et le foie, en améliorant la physiologie des cellules bêta et des hépatocytes, permettant de renforcer leur capacité à répondre aux situations de stress rencontrées dans les maladies cardiométaboliques.

L'analyse d'une cohorte regroupant des échantillons de sang, de tissu et des analyses du transcriptome de patients souffrant ou non de MASLD, en fonction de la concentration d'hippurate, a été réalisée en premier lieu. Par la suite, le phénotype des cellules en réponse à l'hippurate, dans des contextes de stress induits par le palmitate ou l'hyperinsulinémie chronique, a été évalué à travers la sécrétion d'insuline, l'internalisation du glucose et le stockage des triglycérides. En parallèle, le métabolisme des hépatocytes et son altération par l'hippurate ont été analysés et quantifiés par spectrométrie de masse. Enfin, les effets fonctionnels de l'hippurate sur les voies de signalisation, le contrôle de la traduction et la composition du protéome cellulaire ont été explorés à l'aide de techniques d'immunologie, de fractionnement des ribosomes et de protéomique, dans des conditions associées aux maladies cardiométaboliques.

Ces résultats ont confirmé la corrélation positive entre les niveaux d'hippurate, notamment hépatique, et la santé métabolique, avec une corrélation négative pour les marqueurs de la MASLD ainsi que les gènes liés à la stéatose et à l'inflammation. Les phénotypes observés corroborent ces observations : l'hippurate améliore la sécrétion d'insuline des cellules bêta, inhibe la stéatose hépatique dans des conditions basales, lipotoxiques ou d'hyperinsulinémie chronique, et agit comme un antagoniste subtil à l'insulinémie chronique. Par ailleurs, l'hippurate, partiellement internalisé par les transporteurs MCT1 et MCT2 dans les hépatocytes, a démontré sa capacité à modifier directement le métabolisme hépatique, aussi bien en condition basale qu'en hyperinsulinémie chronique. Il favorise l'augmentation relative des métabolites liés à l'homéostasie énergétique tout en réduisant ceux associés à l'inflammation et à la résistance à l'insuline. Enfin, il a été montré que l'hippurate, via l'inhibition des kinases Mnk1 et Mnk2, réduit la traduction des cellules bêta, diminuant les protéines pro-inflammatoires tout en favorisant celles impliquées dans la régulation énergétique. Ces travaux apportent de nouvelles preuves précliniques et cellulaires, soulignant le rôle proactif de l'hippurate, et ils pavent la voie à une meilleure compréhension de son mécanisme d'action, bien que des questions subsistent encore, consolidant ainsi sa place en tant qu'agent favorable pour la santé.

## Abstract

---

Cardiometabolic diseases such as obesity, metabolic dysfunction-associated liver disease (MASLD), and type 2 diabetes are increasing in prevalence. The gut microbiome plays a key role in these conditions, not only through its direct interactions with the host but especially through the production and transformation of molecules, known as metabolites. Among these, hippurate has emerged as an important player. This metabolite is associated with several markers of metabolic health, including improved glucose tolerance, enhanced insulin secretion, and a negative correlation with hepatic steatosis. However, while studies suggest a beneficial impact on hepatic and pancreatic metabolism, how hippurate directly influences the function of these tissues remains unclear. Hippurate is thought to act directly on the metabolism of major organs such as the pancreas and liver by improving the physiology of beta cells and hepatocytes, enhancing their ability to respond to stress conditions seen in cardiometabolic diseases.

The aim is to characterize the functional effects of hippurate on signaling, translation control, and metabolism in hepatocytes and pancreatic beta cells *in vitro*, under conditions associated with cardiometabolic diseases, such as excess free fatty acids and chronic hyperinsulinemia. To this end, an analysis was conducted on a cohort including blood, tissue, and transcriptome data from patients with or without MASLD, depending on hippurate concentration. The phenotype of these cells in response to hippurate, under stress conditions induced by palmitate or chronic hyperinsulinemia, was assessed by measuring insulin secretion, glucose uptake, and triglyceride storage. Additionally, the metabolism of hepatocytes and its alteration by hippurate were evaluated and quantified using mass spectrometry. Furthermore, the signaling pathways targeted by hippurate, as well as their influence on translation and cellular proteome composition, were analyzed using immunology techniques, ribosome fractionation, and proteomics.

The results confirmed the positive correlation between hippurate levels, particularly in the liver, and metabolic health, with a negative correlation for MASLD markers and genes related to steatosis and inflammation. The observed phenotypes align with proteomic and metabolomic data, revealing that hippurate inhibits hepatic steatosis under basal, lipotoxic, or chronic hyperinsulinemic conditions, while also improving insulin secretion from beta cells. More specifically, it was demonstrated that hippurate, through the inhibition of Mnk1 and Mnk2 kinases, inhibits translation in beta cells, reducing proteins linked to inflammation while promoting those involved in energy regulation. Hippurate, partially internalized by MCT1 and MCT2 transporters in hepatocytes, showed its capacity to directly alter hepatic metabolism, both in basal conditions and chronic hyperinsulinemia. It increases the relative abundance of metabolites involved in energy homeostasis and reduces those associated with inflammation and insulin resistance, acting as a subtle antagonist to chronic hyperinsulinemia. These findings provide new preclinical and cellular evidence, highlighting the proactive role of hippurate and paving the way for a better understanding of its mechanism of action, though many questions remain, reinforcing its potential as a beneficial agent for health.

## Liste des abréviations

---

**μM** : microMolaire

**4E-BP1** : Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

**5-HT** : Récepteur sérotoninergique

**40S/60S/80S** : Coefficient de sédimentation (Svedberg) de 40, 60 et 80

**ABCC8** : ATP-binding cassette transporter sub-family C member 8

**ABOS** : Atlas Biologique de l'Obésité Sévère

**ACN** : Acétonitrile

**ACTH** : Adreno CorticoTropic Hormone

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : Acide désoxyribonucléique clonale

**AgRP/NPY** : Agouti-related protein/neuropeptide Y

**AhR** : Aryl hydrocarbon receptor

**Akt** : Protein Kinase B (PKB)

**ALD** : Adrénoleucodystrophie liée à l'X

**AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique

**AMY1** : Alpha-amylase 1

**ANOVA** : Analysis of variance / Analyse de la variance

**ANR** : Agence nationale de la recherche

**APPL1** : Adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1

**ARID1A** : AT-rich interactive domain-containing protein 1A gene

**ARN** : Acide RiboNucléique

**ARNm** : ARN messenger

**ARNr** : Acide ribonucléique ribosomique

**ARNsi** : Petit ARN interférent / Small interferant RNA

**ARNt** : ARN de transfert

**ASD** : Standard analytique / Authentic analytical StanDards

**ATF4** : Activating transcription factor 4

**AVC** : Arrêt vasculaire cérébral

**AXIN1** : Axine 1 gene

**BAX** : Bcl-2-associated X protein

**BCA** : BicinChoninic Acid

**BCAA** : Branched-chain amino acid

**BLK** : Tyrosine-protein kinase BLK

**BSA** : Bovin Serum Albumin

**C/EBP** : CCAAT-enhancer-binding proteins

**CCL2** : Chemokine ligand 2  
**CEL** : Carboxyl Ester Lipase  
**CHC** : Carcinome hépatocellulaire  
**CHOP** : C/EBP homologous protein  
**CHX** : Chlorhexidine  
**CKK** : Cholécystokinine  
**CLD** : Chronic Liver Disease  
**CO2** : Dioxyde de Carbone  
**CoA** : Coenzyme A  
**COX** : Cyclooxygénase  
**CRCM** : Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille  
**CsH** : Cellules stellaires hépatiques  
**CTLA4** : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4  
**CTNNB1** : Catenin beta 1 gene  
**CV-AUROC** : Cross-Validated Area Under the curve for Receiver Operating Characteristic  
**CXCL** : Nomenclature internationale de l'Interleukine  
**CYP7A1** : Cholestérol 7-alpha hydroxylase  
**DAO** : Diamine oxydase  
**DDA** : Data-Dependent Acquisition  
**DEXA** : Dual-energy X-ray absorptiometry  
**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium  
**DMSO** : DiMéthylSulfOxide  
**DO** : Densité Optique  
**DT1A/B** : Diabète de type 1 A/B  
**DT2** : Diabète de type 2  
**DTT** : Dithiothréitol  
**eIF4E** : eukaryotic Initiation Factor 4E  
**ELISA** : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay  
**ERK** : Extracellular signal-Regulated Kinase  
**FDR** : False discovery rate  
**Features** : Pics spectrométriques associés à un métabolite  
**FTO** : Fat mass and obesity-associated protein  
**FXR** : Farnesoid X Receptor  
**GABA** : Gamma-aminobutyric acid  
**GCK** : Glucokinase gene  
**GDM** : Diabète gestationnel  
**GEI** : Interactions gène-environnement / Gene-environment interactions

**GIP** : Peptides Inhibiteurs Gastriques  
**GLP-1** : Glucagon-like peptide-1  
**GLUT4** : Glucose transporter type 4  
**GMP** : Guanosine monophosphate  
**GNPS** : Global Natural Products Social Molecular Networking  
**GO** : Gene ontology  
**GPR** : G protein-coupled receptors  
**GSEA** : Gene set enrichment analysis  
**GSH** : Glutathion réduit  
**GSIS** : Glucose Stimulated Insulin Secretion  
**GWAS** : Genome-Wide Association Studies  
**HA** : Acide hippurique (en solution) ou hippurate (en cellule)  
**HA-d5** : Acide hippurique-d5  
**Hb1Ac** : Hémoglobine glyquée  
**HCA2** : Hydroxycarboxylic acid receptor 2  
**HDL** : High density lipoprotein  
**HEPES** : Acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1-pipérazine éthane sulfonique  
**HFD** : High fat diet  
**HLA** : Human Leukocyte Antigen  
**HNF1A** : HNF1 homeobox A  
**hPL** : Human placental lactogen  
**HRMS** : High Résolution Mass Spectrometry  
**I2BC** : Integrative Biology of the Cell  
**IA** : Acide Indoleacrylique  
**IA-2** : Tyrosine phosphatase  
**IAA** : Acide Indoleacétique  
**IAld** : Indolealdéhyde  
**ICAM** : InterCellular Adhesion Molecule  
**IDO** : Indoleamine-2,3-dioxygénase  
**IE** : Indoéthanol  
**IFN $\gamma$**  : Interféron gamma  
**IGF-1** : Insulin-like growth factor 1  
**IL** : Interleukine  
**ILA** : Acide indolelactique  
**IMC** : Indice de Masse Corporelle  
**IMP** : Inosine monophosphate  
**InChIKey** : Hashed version of International Chemical Identifier

**INS** : Insuline

**IPA** : Acide indolepropionique

**IR** : Insulin receptor

**IROA** : Database from IROA technologies

**IRS-1** : Insulin Receptor Substrate-1

**ISD** : Stable-isotope labeled (SIL) internal standard

**JNK** : c-Jun N-terminal kinase

**KCNJ11** : Potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11

**KEGG** : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

**KLF11** : Krueppel-like factor 11

**KO** : Knock-out

**LEPR** : Leptin receptor

**LPS** : Lipopolysaccharide

**LSD de Fisher** : Différence Significative Minimale de Fisher

**MadCAM** : Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1

**MAFA** : v-Maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A

**MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinases

**MASH** : Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis

**MASLD** : Metabolic dysfunction-associated liver disease

**MCR** : MelanoCortin Receptor

**MCT** : Monocarboxylate transporter

**MEM** : Minimum Essential Medium

**MeOH** : Méthanol

**mM** : milliMolaire

**Mnk1/2** : MAP kinase interacting serine/thréonine kinase 1 and 2

**MODY** : Maturity-onset diabetes of the young

**MS-DIAL** : Mass Spectrometry Data Independent Acquisition Logical

**NAD+** : Nicotinamide adénine dinucléotide

**NADP** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**NAFLD** : Non-alcoholic fatty liver disease

**NAS** : NAFLD Activity Score

**NEUROD1** : Neurogenic differentiation 1

**NF-κB** : Nuclear factor-kappa B

**NO** : Monoxyde d'azote

**NTP** : Nucleoside Triphosphate

**o1** : Composante orthogonale

**OAT** : Organic anion transporter

**O-PLS-DA** : Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis

**OR** : Olfactory receptor

**p1** : Composante prédictive

**P2Y14** : P2Y purinoceptor 14

**PAA-d5** : Acide propanoïque-d5

**PAX4** : Paired box gene 4

**PBS** : Phosphate-buffered saline

**PC1** : Composante principale 1

**PC2** : Composante principale 2

**PCA** : Analyse par Composantes Principales / Principal Component Analysis

**PCR** : Polymerase chain reaction / Réaction en chaîne par polymérase

**PDX1** : Pancreatic and duodenal homeobox 1

**PI3K** : Phosphoinositide 3-kinase

**PKA** : Protein Kinase A

**PKB** : Protein kinase B

**PLS-DA** : Analyse discriminante par Régression des moindres carrés partiels / Partial Least Squares-Discriminant Analysis

**POMC/CART** : Pro-opiomelanocortine/cocaine- and amphetamine-regulated transcript

**PP** : Polypeptides pancréatiques

**PPAR-γ** : Peroxisome proliferator-activated receptor γ

**PTPN22** : Protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22

**PXR** : Pregnane X receptor

**PYY** : Peptide YY

**QC** : Quality Control

**R620W** : Arginine620Tryptophane substitution

**RE** : Réticulum endoplasmique

**RER** : Réticulum endoplasmique rugueux

**RIPA** : RadiolImmunoPrecipitation Assay

**ROS** : Reactive oxygen species

**RSD** : Relative Standard deviation

**RT-qPCR** : Retro transcription - quantitative poly chain reaction

**SCFA** : Short chain fatty acids

**SDS-PAGE** : Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis

**siNTP** : small interferon ARN against Nucleoside Triphosphate

**SOD** : Superoxyde dismutase

**SVF** : Sérum de Veau Foetal

**TBST** : Tris-Buffered Saline Tween 20

**TCA** : Cycle de Krebs  
**TCF7L2** : Transcription factor 7-like 2  
**TCR** : T lymphocyte receptor  
**TERT** : Telomerase reverse transcriptase  
**TETG** : Tris-HCL, EDTA, Tween-20, Glycine  
**TGR** : Takeda G protein-coupled receptor  
**TMAO** : Trimethylamine oxyde  
**TNF-a** : Tumor Necrosis Factor  
**TP53** : Tumor protein 53 gene  
**TPH** : Tryptophan hydroxylase  
**TPM** : Transcripts per million  
**UDG** : Uridine diphosphate  
**UHPLC** : Ultra High Performance Liquid Chromatography  
**UMLS** : Unified Medical Language System  
**UPR** : Unfolded protein response  
**UV** : Ultraviolet  
**WWP1** : NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase gene  
**XPB1** : X-box binding protein 1  
**ZnT8** : Zinc 8 transporteur

# Table des matières

---

1	Introduction .....	1
1.1	Introduction aux maladies cardiométaboliques, leurs origines génétiques et environnementales .....	2
1.1.1	Prévalence .....	2
1.1.2	Obésité.....	3
1.1.2.1	Définition, mesure et symptômes .....	3
1.1.2.2	Environnement obésogène .....	4
1.1.2.3	Génétique obésogène.....	6
1.1.3	Les Diabètes .....	8
1.1.3.1	Définition, symptômes, prévalence et risques .....	8
1.1.3.2	Insuline et anatomie du pancréas.....	9
1.1.3.3	Différents diabètes et leurs origines .....	12
1.1.4	Les maladies stéatosiques du foie.....	15
1.1.4.1	Anatomie du foie, définition, mesure, prévalence et symptômes. ....	15
1.1.4.2	De la stéatose à l'hépatocarcinome (le foie gras non alcoolique) .....	17
1.2	Introduction au microbiote intestinal bactérien et à son implication dans la santé de son hôte.....	20
1.2.1	Définition et mesure du microbiote .....	20
1.2.2	Le microbiote intestinal.....	21
1.2.3	Rôle du microbiote intestinal bactérien sur la santé cardiométabolique.....	24
1.2.4	Corrélations entre microbiote intestinal et maladies cardiométaboliques .....	25
1.2.4.1	Corrélations avec l'obésité .....	25
1.2.4.2	Corrélations avec le diabète de type 2 .....	26
1.2.4.3	Corrélations avec la MASLD .....	27
1.2.5	Le microbiote intestinal et ses métabolites .....	28
1.2.5.1	Les acides gras à chaîne courte (SCFA).....	29
1.2.5.2	Acides biliaires .....	30
1.2.5.3	Dérivés du tryptophane .....	31
1.2.5.4	Polyamines .....	32
1.2.5.5	Phénylpropanoïdes .....	33
1.3	Hippurate .....	34
1.3.1	Origine et structure.....	34
1.3.2	Hippurate, d'outil à potentiel postbiotique .....	36
1.3.3	Hypothèse et objectifs de thèse .....	39
2	Matériels et méthodes .....	40

2.1	Analyse de la cohorte ABOS .....	40
2.2	Biologie cellulaire et moléculaire .....	41
2.2.1	Culture cellulaire .....	41
2.2.2	Traitements .....	42
2.2.3	Test de viabilité .....	42
2.2.4	Stimulation de l'insuline par le glucose (GSIS) .....	43
2.2.5	Internalisation du glucose.....	43
2.2.6	Gradient de polysomes .....	43
2.2.7	Dosage des triglycérides intracellulaires.....	44
2.2.8	Protéomique.....	45
2.2.9	RT-qPCR .....	45
2.2.10	Western blot.....	46
2.3	Métabolomique.....	47
2.3.1	Préparation des échantillons pour UHPLC-HRMS.....	47
2.3.2	Génération des données .....	47
2.3.2.1	Séparation des échantillons .....	47
2.3.2.2	Acquisition des données .....	49
2.3.3	Traitement des données UHPLC-HRMS .....	51
2.4	Analyses statistiques : .....	52
2.4.1	Analyse de la cohorte ABOS .....	52
2.4.2	Biologie cellulaire et moléculaire .....	52
2.4.3	Métabolomique.....	53
3	Association de l'hippurate avec les phénotypes et transcriptome hépatiques dans la MASLD chez l'homme .....	54
3.1	Introduction .....	54
3.2	Résultats .....	55
3.3	Conclusion .....	58
4	Impact de l'hippurate sur la physiologie cellulaire et homéostasie métabolique.....	59
4.1	Introduction .....	59
4.2	Résultats .....	60
4.2.1	Sécrétion d'insuline .....	60
4.2.2	Stockage des triglycérides.....	61
4.2.2.1	Accumulation de lipides après traitement au palmitate .....	61
4.2.2.2	Effet de l'hippurate sur l'accumulation de lipides en situation d'insuline chronique 62	
4.2.3	Internalisation du glucose.....	63

4.3	Conclusion .....	64
5	Impact de l'hippurate sur le métabolome hépatocytaire .....	65
5.1	Introduction .....	65
5.2	Résultats .....	66
5.2.1	Influence de l'hippurate sur le métabolome en condition basale .....	66
5.2.2	Influence de l'hippurate en condition d'insulino-résistance .....	68
5.3	Conclusion .....	70
6	Internalisation de l'hippurate .....	71
6.1	Introduction .....	71
6.2	Résultats .....	72
6.2.1	Quantification de l'hippurate intracellulaire .....	72
6.2.2	Inhibition de l'internalisation de l'hippurate .....	73
6.3	Conclusion .....	74
7	Un nouveau rôle de l'hippurate sur le contrôle traductionnel .....	75
7.1	Introduction .....	75
7.2	Résultats .....	77
7.2.1	Phosphorylation de eIF4E et des cibles de la voie MAPK .....	77
7.2.2	Synthèse des protéines (incorporation de puromycine et gradient de polysomes) .....	80
7.2.2.1	Incorporation de puromycine .....	80
7.2.2.2	Gradients de polysomes .....	82
7.2.3	Analyse du protéome .....	84
7.2.3.1	PCA .....	85
7.2.3.2	Volcano plot .....	85
7.2.3.3	Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) .....	86
7.3	Conclusion .....	88
8	Discussion générale .....	89
8.1	Intérêts et limites de ces travaux de recherche .....	89
8.2	Perspectives .....	93
9	Bibliographie .....	95

# 1 Introduction

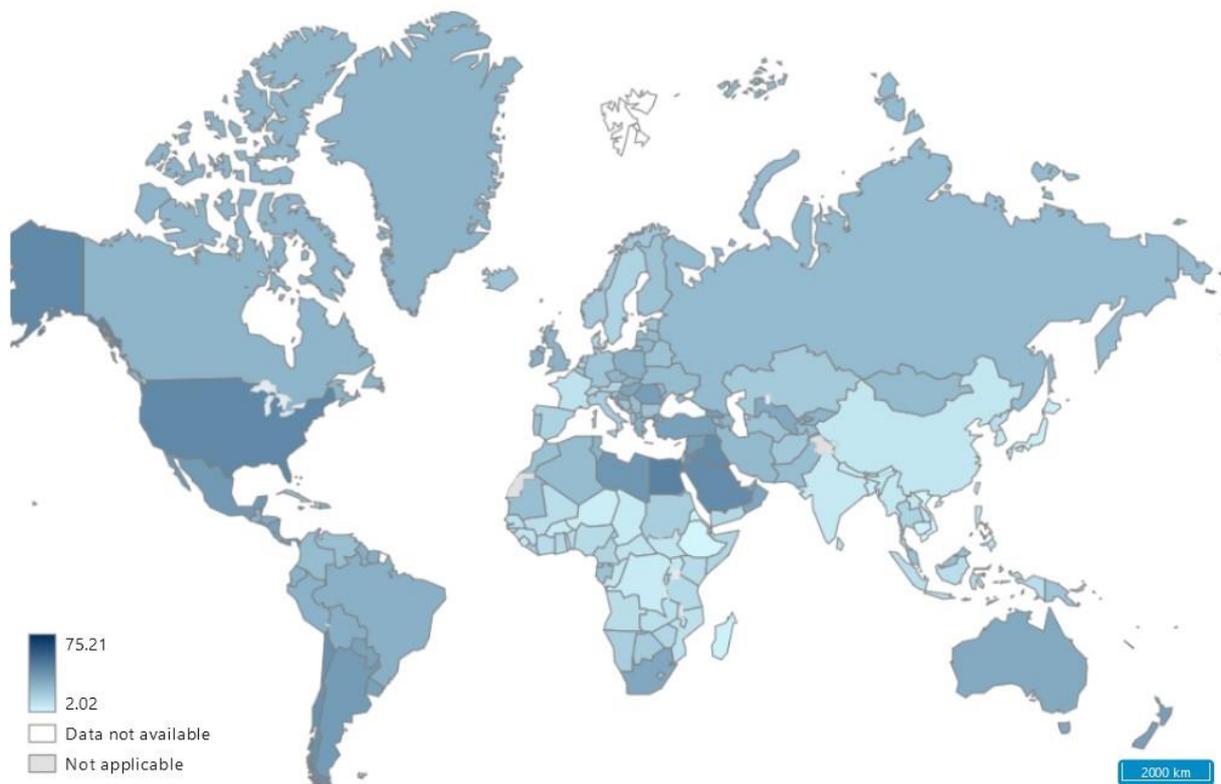
---

Les maladies cardiométaboliques représentent aujourd'hui un défi majeur pour la santé publique mondiale. Ces affections, dont la prévalence ne cesse d'augmenter, trouvent leurs origines dans des facteurs complexes, à la fois génétiques et environnementaux. Parmi les facteurs influençant la santé cardiométabolique, le microbiote intestinal bactérien s'avère être un acteur clé, suscitant un intérêt croissant au sein de la communauté scientifique. La capacité du microbiome à communiquer avec l'hôte par la production de composés issus de son métabolisme, les métabolites, émerge comme un potentiel levier thérapeutique dans cette lutte. L'hippurate est un de ces représentants.

# 1.1 Introduction aux maladies cardiométaboliques, leurs origines génétiques et environnementales

## 1.1.1 Prévalence

Les maladies cardiométaboliques sont parmi les premières causes de mortalité mondiale en 2019, représentant plus de 21% des décès [1]. Ce chiffre regroupe les maladies cardiovasculaires (cardiopathies et AVC), l'obésité, les diabètes et également la stéatose hépatique non alcoolique (MASLD) [2]. Il est intéressant de noter que cette prévalence augmente en corrélation avec le revenu moyen brut des populations. Cela est d'autant plus vrai dans les pays à revenu bas ou moyen dans lesquels la population adopte un mode de vie industrialisé [3] en augmentant les facteurs de risques principaux comme le tabagisme, la sédentarité, la consommation d'alcool et un régime alimentaire riche en graisse [4]. Le changement du comportement alimentaire, possède un lien de causalité avec le facteur de risque principale à l'origine de l'augmentation du nombre de maladies cardiométaboliques : l'obésité [5].



**Figure 1** : Prévalence mondiale de l'obésité en 2022. Pourcentage d'adultes souffrant d'obésité par pays [6].

## 1.1.2 Obésité

### 1.1.2.1 Définition, mesure et symptômes

L'obésité est une maladie chronique évolutive due à une accumulation anormale et excessive de graisse, notamment viscérale, qui présente des risques pour la santé [7]. Elle est généralement diagnostiquée via le calcul de l'indice de masse corporelle (IMC) [8]. Un individu présentant un IMC supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup> sera diagnostiqué "obèse" tandis que le "surpoids" est associé à un IMC supérieur à 25 kg/m<sup>2</sup> et la "corpulence normale" se situe entre 18,5 et 25 kg/m<sup>2</sup>. Cette mesure est très critiquée par le fait qu'elle ne prend pas en compte la morphologie de l'individu (sexe, structure osseuse, répartition graisseuse, masse musculaire etc.) [9]. La non prise en compte de la morphologie de l'individu induit des biais, comme des personnes présentant une IMC supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup> en meilleure santé que des personnes d'un IMC inférieur à 25 kg/m<sup>2</sup>. Ces biais sont à l'origine de l'hypothèse "obesity paradox" [10] qui suggère un effet protecteur de l'obésité. Pour réduire les limites et les biais induits par sa seule utilisation, le calcul de l'IMC peut être remplacé ou accompagné du rapport tour de taille/tour de hanche, la méthode des plis cutanés l'hydro-densitométrie, l'absorptiomètre biphotonique à rayons X (DEXA), ou encore l'analyse d'impédance bioélectrique (BIA) [11] [12].

L'obésité est qualifiée de pandémie mondiale en touchant, en 2016, plus de 650 millions d'adultes, comparativement à 1975 où 105 millions d'adultes étaient concernés. L'IMC moyen de 21,7 kg/m<sup>2</sup> en 1975 passe à 24,5 kg/m<sup>2</sup> en 2016 [13]. Normalisé par la population mondiale [14], le nombre d'obèses a été multiplié par 3,5 en 40 ans ce qui en fait la maladie chronique avec la plus forte croissance [15]. Avec cette augmentation du nombre d'individus obèses vient l'augmentation des complications qui y sont associées comme les différentes pathologies cardiaques, respiratoires, rénales et neuronales, l'hypertension artérielle, les diabètes, l'immunodéficience, la stéatohépatite non alcoolique, l'ostéoarthrite, certains cancers (seins, ovaires, prostate, foie, reins et colon) et les troubles psychologiques tel que la dépression [5].

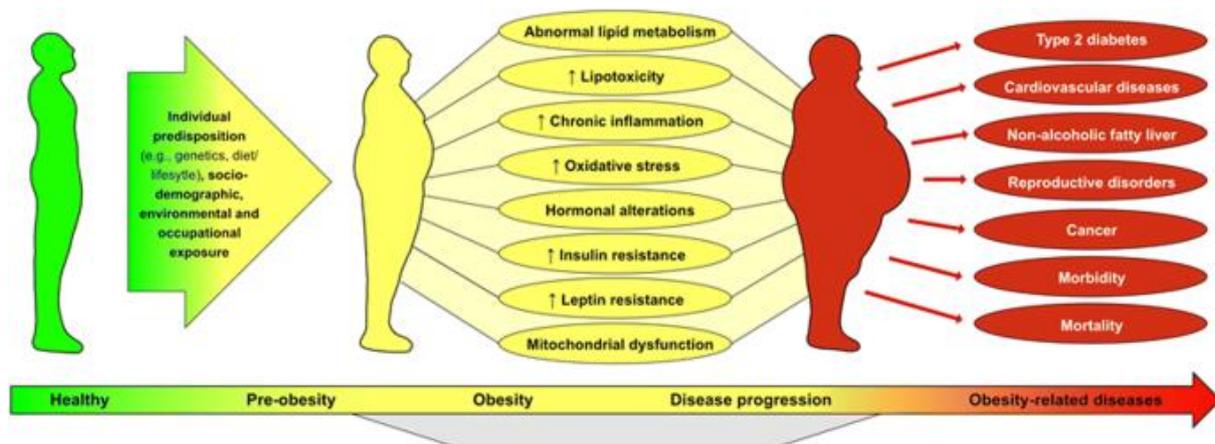


Figure 2 : Complications métaboliques et pathologies associées au surpoids et à l'obésité [16].

Le facteur majeur et déterminant de l'obésité, et du surpoids en général, est le déséquilibre positif entre l'apport d'énergie et la dépense de cette énergie, exprimée en kilocalories (kcal). Ce déséquilibre en faveur de l'apport d'énergie amène le corps à la stocker sous plusieurs formes [5].

Cet excédent peut être stocké sous forme de glycogène, un polymère ramifié de glucose, principalement au sein du foie et des muscles striés squelettiques mais aussi dans une moindre mesure au niveau des reins, du cœur et du tissu adipeux [17]. Cette forme est préférable pour le stockage à court terme du glucose et sa redistribution rapide lors d'efforts physiques et de jeûn non [18]. Le glycogène ne convient pas au stockage de grandes quantités d'énergie sur le long terme notamment par son osmolarité : pour 1g de glycogène, 3g d'eau sont stockés [19] ce qui ne permet que très peu de stock : environ 100g dans le foie et 400g dans les muscles striés squelettiques pour un homme de 70kg [20].

Par conséquent, l'excès d'énergie est préférentiellement stocké sous la forme de triglycérides, au sein de cellules spécialisées, les adipocytes. Ils présentent 20% tissu adipeux [21]. Contrairement au glycogène, l'énergie présente dans ce réservoir n'est pas livrable rapidement mais permet un stockage de long terme dans des quantités indéterminées [22]. C'est ce tissu, le tissu adipeux, plus spécifiquement le tissu adipeux blanc [5], qui se développe de manière disproportionnée chez les personnes en surpoids, et encore plus chez les personnes obèses.

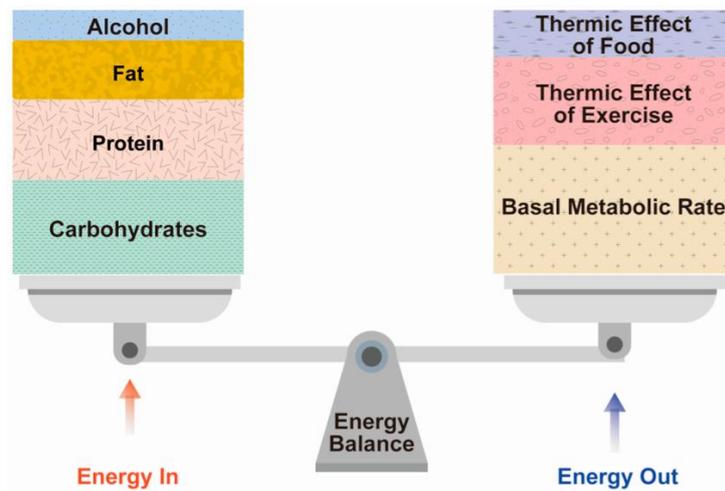
En résumé, tous les facteurs influençant la balance énergétique sur le long terme, aboutissant à l'expansion excessive et anormale du tissu adipeux, sont considérés comme facteurs favorisant l'obésité.

#### 1.1.2.2 Environnement obésogène

L'obésité est avant tout due à des facteurs environnementaux, en particulier le comportement alimentaire de l'individu [3–5]. Celui-ci peut être influencé par nombre de variables comme la vision sociétale du surpoids à laquelle l'individu appartient [23]. L'augmentation du pouvoir d'achat de la population est en corrélation significative avec l'augmentation de l'obésité dans ces pays [24]. Ceci peut également être mis en corrélation avec l'accès à des ressources et des régimes alimentaires différents, notamment des régimes occidentaux. Les aliments riches en graisse animale comme la viande rouge, le lait et ses dérivés apportent beaucoup d'énergie à l'individu pour un volume alimentaire moindre. Ce régime alimentaire riche en énergie et pauvre en vitamines et minéraux, est essentiellement présent dans les pays occidentaux (Amérique du nord et Europe), d'où l'appellation de régime occidental [3,24,25].

La mondialisation et le développement économique permettent le libre-échange de capital et de culture ce qui donne aux pays la possibilité d'adopter leur préférence alimentaire [24]. Cette préférence va en général dans le sens du régime occidental qui induit un système

physiologique de récompense en moyenne plus important à plus bas coût temporel et monétaire (diète palatable), mais qui promeut le surpoids et l'obésité [25,26]. Outre le changement de régime, c'est essentiellement l'augmentation de la quantité d'énergie apportée par ce régime qui est le vecteur de la pandémie d'obésité [27]. Le taux augmente continuellement depuis les années 1970 alors que la dépense énergétique, elle, diminue depuis le début du 20ème siècle. Cette tendance est appelée "The energy flipping point" [5].



**Figure 3** : Balance énergétique entre les entrées (« energy in » présentant les macronutriments caloriques) et les dépenses caloriques (« energy out » représentant le métabolisme de base, l'activité physique et la thermogénèse alimentaire) [28].

En effet, depuis le début du 20ème siècle [29], la dépense énergétique des individus a commencé à diminuer avec l'apport de l'industrialisation, la motorisation des transports, la plus grande proportion d'emplois sédentaires et le développement informatique [30].

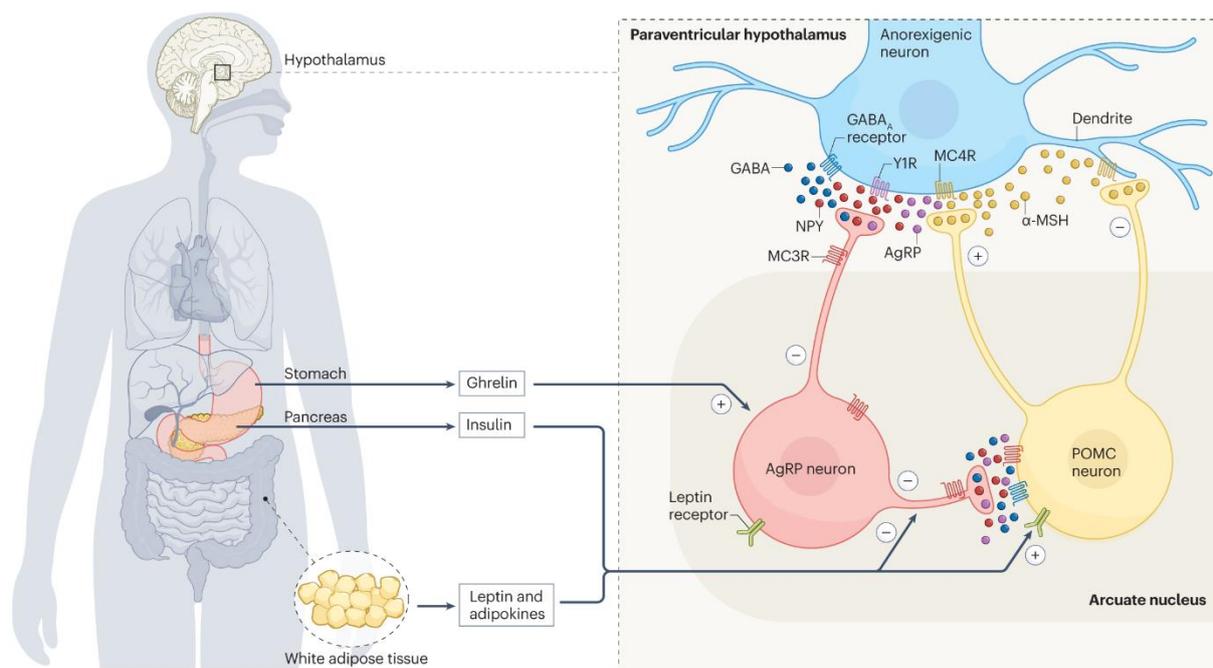
Cependant, même si les causes de l'augmentation de l'obésité de la population peuvent être généralisées à un territoire (Continent, pays, ville), les individus ne sont pas égaux dans leur homéostasie métabolique. Pour de mêmes habitudes alimentaires et une même activité physique, une hétérogénéité interindividuelle persiste. Cette inégalité, dépendante du patrimoine génétique de l'individu, serait estimée à 40-70% [31,32].

### 1.1.2.3 Génétique obésogène

Les facteurs génétiques jouent un rôle prépondérant dans la prédisposition d'un individu à s'adapter à son environnement, ici la prise de poids et l'obésité dans un environnement obésogène. En effet, la régulation de l'appétit tout comme la capacité de stockage sont régis par des mécanismes moléculaires complexes comme la communication entre l'intestin et le système nerveux central et la sensibilité des cellules aux signaux hormonaux [5]. Grâce à l'avancée majeure des techniques et analyse en génomique, le lien entre le patrimoine génétique et l'obésité a pu être démontré, notamment par l'apport des études d'association pangénomique (GWAS) [33]. Un nombre croissant de mutations des gènes corrélés à la pathologie, appelés variants, est identifié chaque année. Ceci permet de distinguer plusieurs formes génétiques d'obésité : polygéniques ou monogéniques, ayant des incidences sur le comportement alimentaire (la satiété entre autres) ou le métabolisme lui-même [31,32]. L'obésité est un exemple d'interaction gène-environnement (GEI) où le matériel héréditaire, associé au risque environnemental, détermine le risque de développer la maladie.

C'est en 2007 que le lien a pu être mis à jour en désignant le gène FTO (fat mass and obesity-associated gene) comme premier gène corrélé à l'IMC [34]. FTO code pour une ARN demethylase qui agit comme régulatrice de l'homéostasie énergétique et de l'adipogenèse [35]. Cette régulation peut se faire de différentes façons. En premier lieu par la déméthylation de l'N6-methyladenosine de l'ARNm de la ghréline ajustant son niveau dans le corps [36]. En deuxième lieu par l'inhibition de la différenciation des cellules souches en adipocytes beiges au profit des adipocytes blanc [37]. En troisième lieu en augmentant et inhibant respectivement la néoglucogenèse et la lipolyse hépatique [38]. Néanmoins, la pléiotropie et la spécificité d'action de FTO en fonction du tissu rendent non exhaustive la liste de ses effets et sont sources de contradictions entre les publications [36–38].

Parmi les systèmes de régulation de l'homéostasie énergétique, la voie de signalisation de la mélanocortine est sans doute le plus important [39–42]. Cette voie est activée par plusieurs hormones comme la leptine, l'insuline, la somatostatine, la cholécystokinine et le peptide YY, et inhibée par des hormones comme la ghréline [43]. Ces hormones sont produites par différentes cellules comme les adipocytes pour la leptine [44], les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas pour l'insuline [45] ou les cellules PD-1 de l'estomac endocrine (et les cellules epsilon du pancréas) pour la ghréline [36]. Ces hormones sont sécrétées, proportionnellement aux réserves énergétiques et à la glycémie de l'individu, et traversent la barrière hémato-encéphalique pour activer les neurones de la voie de la mélanocortine.



**Figure 4 :** Production par l'intestin et le tissu adipeux d'hormones régulant la voie de la mélanocortine au sein de l'hypothalamus [46].

Ces neurones sont situés au sein de l'hypothalamus, plus précisément dans l'un de ces 11 noyaux, le noyau arqué [40,41]. Les neurones POMC/CART, activés par la fixation de la leptine à son récepteur transmembranaire LEPR, ou de l'insuline à son récepteur IR [45], libèrent des neurotransmetteurs comme  $\alpha/\beta/\gamma$ -MSH et ACTH [47]. Les neurones AgRP/NPY inhibés par la leptine et l'insuline, et activés par la fixation de la ghréline à son récepteur GHS libèrent quant à eux les neurotransmetteurs AgRP couplés aux NPY. Tous ces neurotransmetteurs sont les ligands des récepteurs MC1R, MC2R, MC3R, MC4R et MC5R des neurones situés dans le noyau paraventriculaire et le noyau ventromédian de l'hypothalamus [48]. Ces récepteurs, couplés à des protéines G, transduisent, notamment par la voie PKA/ERK1/2, le signal permettant la régulation l'homéostasie énergétique et de l'appétit. La perte de fonction ou l'altération des gènes codant pour des facteurs responsables de l'activation de la voie de la mélanocortine sont associés à une hyperphagie et une obésité infantile sévère ainsi que d'autres perturbations endocriniennes, nerveuses et immunitaires [40,42]. Les souris mutées dans le gène codant MC4R présentent une hyperphagie, une hyperglycémie et des taux élevés de leptine et d'insuline justifiant leur prise de poids supérieure au contrôle [39].

D'autres mutations en dehors de la voie de signalisation de la mélanocortine peuvent être corrélées à un risque élevé d'obésité. C'est le cas de la mutation du récepteur aux acides gras libres insaturés à longue chaîne, GPR120. Sa mutation perte de fonction montre une diminution de la dépense énergétique, une perturbation du métabolisme du cholestérol et de la fonction hépatique, une insulino-résistance, une hyperleptinémie, des marqueurs de

l'inflammation [49] et une augmentation de la lipogenèse chez les jeunes souris HFD (régime riche en graisse). Cette mutation est également retrouvée chez les individus obèses [49]. Cependant il n'y a pas de différence significative entre les souris GPR120-KO et les souris contrôles dans le cas d'un régime équilibré, ce qui montre l'importance de l'interaction gène-environnement (GEI) dans le cas de l'obésité. De même, la réduction du nombre de copies du gène codant pour l'amylase salivaire (AMY1) réduit son efficacité et augmente significativement la prédisposition de développement de l'obésité [50].

Grâce à la meilleure compréhension des systèmes régissant la prise poids, de nombreux traitements en dehors de la gestion du mode de vie de l'individu sont proposés et peuvent s'avérer efficaces, en jouant sur ces mécanismes. C'est le cas de la chirurgie bariatrique, une intervention visant à réduire la taille l'estomac (par gastrectomie, bypass ou anneau) afin de limiter l'entrée (voir l'assimilation pour le bypass) des aliments. Cela a pour effet, en dehors de la réduction physique d'aliments ingérés, une gestion plus rapide des hormones de l'appétit tel que la diminution de la ghréline qui stimule l'appétit et la montée plus rapide de GLP-1 (Glucagon like peptide 1), l'hormone rassasiante [51,52]. Cette dernière, produite par les cellules entéro-endocrines (intestin), joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme, en particulier dans le contrôle de la glycémie en augmentant stimulant la sécrétion d'insuline et la gestion du poids par l'activation des neurones POMC/CART, du noyau du tractus solitaire et du système dopaminergique de récompense est utilisé comme traitements, ou du moins ces analogues (liraglutine et semaglutide notamment) contre l'obésité [53].

L'obésité joue un rôle central dans l'augmentation alarmante des maladies cardiométaboliques. En plus de favoriser les cardiopathies, elle est désormais reconnue comme le principal facteur de risque du diabète de type 2 et des maladies du foie, deux pathologies étroitement liées aux dérèglements métaboliques provoqués par l'excès de tissu adipeux. [5,54–56].

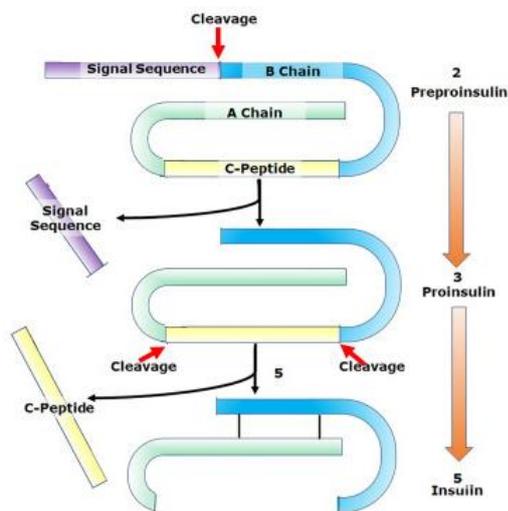
### **1.1.3 Les Diabètes**

#### **1.1.3.1 Définition, symptômes, prévalence et risques**

Le diabète est une maladie chronique caractérisée par une glycémie supérieure à 7 mM (1,26 g/l de sang) à jeun ou supérieure à 11,1 mM (2g/l de sang) à toute heure. Les symptômes amenant aux diagnostics du diabète, hormis l'hyperglycémie, peuvent être la polyurie, la polydipsie, une cétose, la perte de poids, la fatigue ou/et des troubles de la vision. Le diagnostic mené par ces symptômes est confirmé par une prise de sang repérant l'hyperglycémie [57–59]. A travers le globe, près de 537 millions d'individus sont diabétiques en 2021 contre 108 millions en 1980 [59]. Normalisée par la population mondiale, la prévalence du diabète a été multipliée par 2,8 en 40 ans ce qui en fait, avec l'obésité, l'une des maladies

non transmissibles (NTD) progressant le plus vite [14,15]. Non traité, l'individu s'expose à des risques liés à cet excès de glucose rendant notamment le sang plus visqueux. Cette viscosité diminue l'apport et le retrait de sang dans les vaisseaux, spécialement les capillaires. Ce défaut augmente les risques de cécité, d'insuffisance rénale, d'infarctus du myocarde, d'AVC, de nécrose des tissus distaux donc de l'amputation, de formation d'ulcères et d'infections [54]. Ceci est la résultante d'une sensibilité amoindrie des tissus ou d'une réduction ou absence de production de la seule hormone hypoglycémisante : l'insuline produite au sein du pancréas [45].

### 1.1.3.2 Insuline et anatomie du pancréas

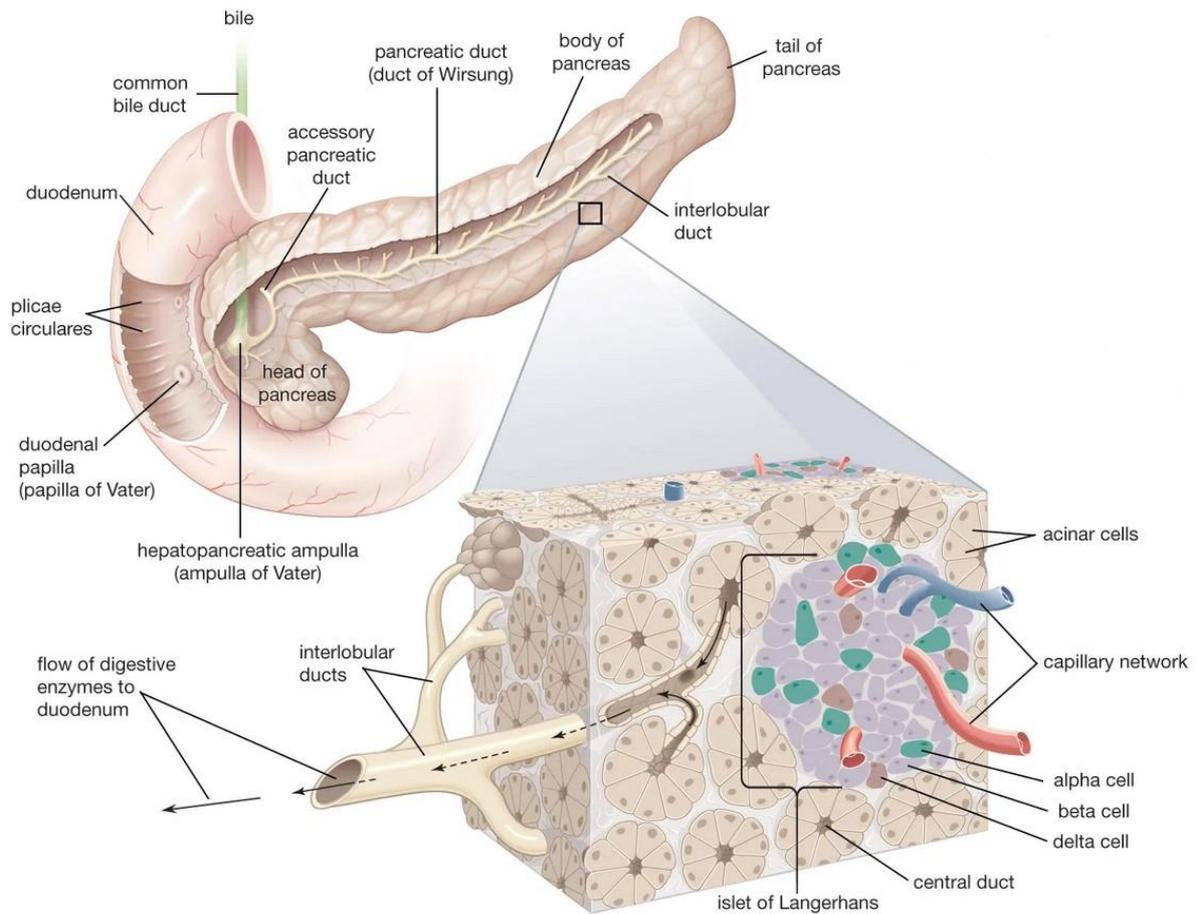


**Figure 5** : Modifications post-traductionnelles de la preproinsuline menant à la molécule active appelée insuline [60].

L'insuline est une protéine codée par le gène INS. Ce gène est localisé sur le chromosome 11 chez l'Homme (Ins1 et Ins2 chez les rongeurs). Elle est tout d'abord produite sous la forme d'un précurseur, la préproinsuline, qui va subir deux étapes de maturations post-traductionnelles. Ce précurseur inactif est clivé de son peptide signal positionné en N-terminal dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER). Il devient alors la proinsuline. La proinsuline est repliée et les deux extrémités de la protéine (chaînes A et B) se lient par des ponts disulfures avant d'être transportée par vésicule dans l'appareil de Golgi où le peptide C (chaîne C) est clivé à son extrémité C-terminale. L'insuline active est alors formée [45]. L'insuline est exclusivement produite par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans au sein du pancréas endocrine.

Le pancréas est un organe particulier ayant une fonction exocrine (80% du volume de l'organe), formée des cellules acinaires et canalaire servant principalement à la digestion par la production respective d'enzymes digestives et de bicarbonate, et d'une fonction endocrine

(1 à 2% du volume de l'organe) [61,62]. Cette dernière sert à la régulation de l'homéostasie glucidique et est permise grâce à l'association de 5 types cellulaires regroupés ensemble pour former les îlots de Langerhans. Ces 5 types cellulaires sont expliqués ci-après :



**Figure 6** : Physiologie du pancréas et types cellulaires qui le composent [63].

**Les cellules alpha.** Ce type cellulaire sécrète le glucagon dont le rôle physiologique est d'augmenter la glycémie, et ceci par la stimulation de la synthèse de glucose par néoglucogenèse ou glycogénolyse par les organes stockeurs comme le foie et les muscles (dans une moindre mesure par la présence modérée de récepteurs au glucagons GPCR) [64]. Le glucagon est inhibé par l'hyperglycémie et stimulé par les niveaux sanguins d'acide aminé, d'adrénaline et la stimulation du nerf vagal. Les cellules alpha produisent également, à moindre mesure, la ghréline qui, par sa fixation au récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance (GHSR), est une protéine pléiotrope dont l'action sur le métabolisme stimule notamment l'appétit et le stockage de masse grasseuse [61,65].

**Les cellules bêta :** L'insuline est produite exclusivement par ces cellules et est stimulée par des niveaux élevés de macro-nutriments (glucides, protéines, lipides) et d'autres hormones comme l'insuline elle-même, le GLP-1 [66], les peptides inhibiteurs gastriques (GIP), les

sécrétines, cholécystokinine (CKK) mais également par l'activation du nerf vagal et des récepteurs b-adrénergiques (la production d'insuline peut donc être augmentée indépendamment de la glycémie) [45,67]. L'insuline a un rôle antagoniste au glucagon en ayant pour effet physiologique l'hypoglycémie par l'absorption de glucose par les cellules, l'arrêt de la production de glucose par les organes stockeurs mais également par la conservation des stocks énergétiques (glycogène, triglycérides). Outre ses effets immédiats sur l'homéostasie glucidique, elle sert notamment d'hormone de croissance par son action anabolisante et sa similitude avec l'insulin-like growth factor (IGF-1) [45,67].

**Les cellules delta** [61]: Au même titre que la ghréline [43], la somatostatine produite par les cellules delta est un neuropeptide à large spectre d'action et d'effets, mais contrairement à elle, la somatostatine est une hormone principalement inhibitrice [68]. Stimulée par les niveaux de macronutriments sanguins, la somatostatine inhibe notamment la CKK, la sécrétine, et la sécrétion de glucagon et d'insuline.

**Les cellules gamma (ou F)** : Les polypeptides pancréatiques (PP) synthétisés par les cellules F ont pour effet physiologique d'améliorer la digestion en augmentant l'acidité gastrique, la motilité de la vésicule biliaire et le péristaltisme intestinal. Leur sécrétion est régulée à la hausse par la teneur en protéines et en lipide des aliments ingérés, de la stimulation des récepteurs cholinergiques et régulée à la baisse par le glucose [69].

**Les cellules epsilon** : Ontogénétiquement différentes des cellules alpha, les cellules epsilons synthétisent principalement la ghréline [61].

Les deux parties du pancréas (endocrine et exocrine), au même titre que les cellules qui y sont associées, communiquent entre elles. Cette communication étroite se fait de façon endocrine par le passage dans la partie exocrine du pancréas des substances sécrétées par les îlots de Langerhans (substances comme la somatostatine, les PP et la ghréline qui ont un effet direct sur la sécrétion et la croissance des cellules acinaires), paracrine par le contact cellulaire direct, laissant passer des molécules comme l'insuline, la somatostatine ou la sécrétine mais également neurocrine par leur réactivité aux stimulations du système nerveux ou des molécules neurotransmetteurs comme l'acétylcholine. La moindre dérégulation d'un type cellulaire, en particulier les cellules bêta, est source de perturbation majeure de l'organisme pouvant dériver sur diverses pathologies [57,59,61,62].

### 1.1.3.3 Différents diabètes et leurs origines

Les différents diabètes se caractérisent par l'origine dysfonctionnelle de l'absence de régulation de l'homéostasie glucidique. De ce fait, l'origine des symptômes du diabète sont décisifs quant à la prise en charge, le traitement et l'évolution de cette pathologie.

**Diabète de type 1 (DT1).** Il est caractérisé par un processus auto-immun (DT1A) ou idiopathique (DT1B) de destruction des cellules bêta entraînant une production insuffisante voire nulle d'insuline. Les symptômes apparaissent généralement dans l'adolescence, lorsque la majorité des cellules bêta ont été détruites, ce qui fait de lui le type de diabète le plus retrouvé chez l'enfant (90%) [70,71]. Son étiologie demeurante floue, les causes environnementales et génétiques sont partagées.

Son caractère auto immun est qualifié par la présence d'auto-anticorps dirigés contre des molécules présentes chez la cellule bêta comme l'insuline, la glutamate décarboxylase 65 (GAD<sub>65</sub>), la tyrosine phosphatase IA-2, et/ou contre le transporteur zinc 8 (ZnT8). Son caractère génétique est défendu fortement par la présence de mutations associées à ce type de diabète comme les gènes codant pour l'antigène de leucocyte humain (HLA, allèles DR3-DQ2 et DR4-DQ8), l'insuline (INS) où une expression trop soutenue pourrait diminuer l'immuno-tolérance à cette hormone, la Protein tyrosine phosphatase non receptor type 22 (PTPN22, mutation R620W) régulant le signal des récepteurs à lymphocyte T (TCR) ou encore Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4 (CTLA4, particulièrement le polymorphisme +49A>G) qui régule à la baisse la réaction immunitaire.

Enfin, l'impact de l'environnement est le même que pour la majorité des cas de maladie auto-immune ou d'allergie, c'est à dire de possibles infections virales, une absence d'expositions à l'environnement pouvant empêcher la maturation du système immunitaire durant l'enfance, la dysbiose du microbiote intestinal ou bien l'alimentation carencé en vitamine D (protection contre l'auto immunité) et/ou riche en lait de vache (antigènes de l'albumine similaires à ceux des cellules bêta) ou en gluten (la gliadine induit une suractivité des cellules bêta) [70,71].

**Diabète de type 2 (DT2).** Aussi appelé diabète insulino-résistant, le DT2 (6,28% de la population mondiale, 96% des cas de diabète [59,72]) est caractérisé par une diminution de la sensibilité des tissus au message porté par l'insuline. En parallèle, le pancréas ne peut compenser à long terme cette perte de résistance par la synthèse de plus d'insuline, notamment à cause d'une perte progressive du nombre de cellules bêta et de leur fonction sécrétrice. Le DT2 est considéré comme le diabète le plus influencé par l'environnement du patient car celui-ci est fortement corrélé à l'obésité et au mode de vie de l'individu. En effet, les cellules bêta sont sensibles au stress lipotoxique [73] engendré par des taux élevés de

lipides sanguin, particulièrement en cas de glycémie élevée (glucolipotoxicité) [74], retrouvé chez les patients atteints d'obésité/surpoids (80% à 90% des DT2 [56]). Cela qui cause à force d'exposition la différenciation voire la destruction de ces cellules bêta. Les phénomènes cellulaires pouvant l'expliquer sont nombreux mais les plus notables sont : le stress prolongé du réticulum endoplasmique (RE) accumulant la pro-insuline mal repliée et activant les facteurs de transcription XBP1 (X-box binding protein 1) ou MAFA (v-Maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A) favorisant la différenciation, la signalisation pro-apoptotique déclenchée par UPR (unfolded protein response) ou CHOP (C/EBP homologous protein) répondant au stress du RE et activant la cascade de régulation aboutissant à l'apoptose. Les causes de la destruction cellulaire sont également le stress oxydatif chronique résultant de l'inflammation endommageant l'ADN et les protéines ou encore la dysfonction mitochondriale libérant des cytochrome c qui active les caspases responsables de la fragmentation de la cellule.

La résistance des tissus périphériques à l'insuline trouve les mêmes causes environnementales, notamment les acides gras circulants ou stockés, que pour la défaillance pancréatique. Les tissus comme le foie, les muscles striés squelettiques ou les adipocytes voient leur voie de signalisation de l'insuline dégradée, particulièrement les molécules clés de celle-ci comme Akt (Protein kinase B (PKB)), GLUT4 (Glucose transporter type 4), JNK (c-Jun N-terminal kinase), IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1) ou encore PI3K (Phosphoinositide 3-kinase). Cependant, et comme généralement, le DT2 est multifactoriel. Les facteurs génétiques ne sont pas négligeables et conduisent également à l'apparition de la maladie et participent à la gravité de celle-ci. Des liens forts ont été trouvés entre le DT2 et les mutations de certains gènes comme TCF7L2 (Transcription factor 7-like 2) régulant la prolifération des îlots de Langerhans, PPAR- $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) [75] favorisant la sensibilité à l'insuline des adipocytes et KCNJ11 (potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11) jouant un rôle crucial dans la sécrétion d'insuline. Enfin, l'alcool, le tabagisme, la sédentarité et les perturbateurs endocriniens sont également des facteurs favorisant le DT2 [76].

**Diabète gestationnel (GDM).** Il est défini par l'apparition temporaire d'une intolérance au glucose durant la gestation, prenant fin peu après la naissance de l'enfant. Représentant 86,6% des 21,3 millions d'hyperglycémies gestationnelles en 2017, le GDM se manifeste généralement à la fin du 2<sup>ème</sup> trimestre de grossesse [77]. Il est corrélé à l'augmentation de certaines hormones clés comme les œstrogènes, la progestérone, le cortisol et les hPL (human placental lactogen) ayant une activité réduisant indirectement la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques de la mère. Ce cocktail hormonal permet de privilégier le fœtus mais

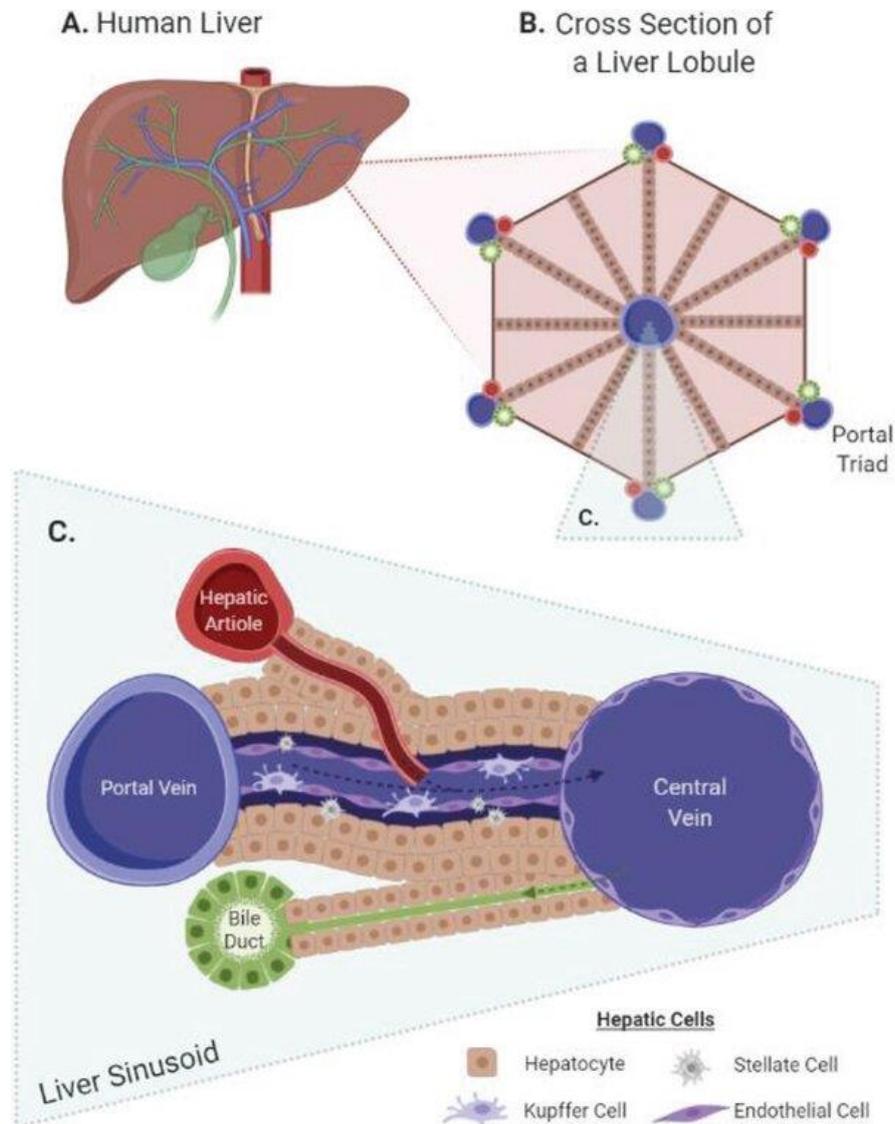
des niveaux supraphysiologiques de ces hormones et/ou face à un individu prédisposé (surpoids, prédiabète, âge, sédentarité, hypertension etc), deviennent pathologiques.

**Diabète “Maturity-onset diabetes of the young” (MODY).** Le MODY ou diabète monogénique, est une forme rare (moins de 5% des diabètes) caractérisée par la mutation d'un seul gène autosomal responsable de la maladie (monofactoriel). Généralement sous-diagnostiqué par sa confusion avec le diabète de type 1, il se déclare tôt dans la vie de l'individu (avant 25 ans mais généralement durant l'enfance) et le degré d'altération de l'insulino-sécrétion, de sévérité de l'hyperglycémie et la fréquence des complications associées dépendent du gène muté (interaction génotype/phénotype). Pour cela, le MODY a été classé en sous-types, chacun désignant le gène causalement associé à la pathophysiologie. La recherche évoluant rapidement sur ce sujet, à date de septembre 2024, 14 sous-types de MODY ont été identifiés, incluant respectivement (MODY1, MODY2 etc) des mutations dans le gène HNF4A, GCK, HNF1A, PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11 et APPL1) [57,78,79].

Cependant, certaines mutations sont plus souvent retrouvées et d'autres très rares. Les MODY les plus communs sont le MODY3 (50%) dont la mutation sur HNF1A (Hepatocyte Nuclear Factor-1 Alpha) amoindrit la différenciation des cellules bêta et donc leur capacité sécrétrice et leur nombre, MODY2 (30%) dont la mutation sur GCK réduit la sensibilité des cellules bêta à la concentration de glucose ce qui augmente leur seuil de sécrétion d'insuline, MODY1 (10%) dont la mutation sur HNF4A et MODY5 (5%) muté en HNF1B perturbent également le développement du pancréas et des cellules bêta. L'influence environnementale étant presque nulle et les gènes mutés différents, chaque MODY possède un traitement (ou non) qui lui est propre : MODY1 et MODY3 pourront être pris en charge par la sulfonylurea tandis que d'autres ne pourront être traités que par des injections d'insuline (MODY5), de médicaments antidiabétiques (MODY13, MODY10) ou sans traitement comme MODY2 [57,78,79].

## 1.1.4 Les maladies stéatosiques du foie

### 1.1.4.1 Anatomie du foie, définition, mesure, prévalence et symptômes.



**Figure 7 :** Représentation schématique de la physiologie du foie humain. A) Foie traversé par la veine porte et connecté à la vésicule biliaire. B) Lobules hépatiques constitués de C) multiples sinusoides hépatiques [80].

Le foie est un tissu organisé en 4 lobes situé sous la partie supérieure droite de l'abdomen, séparé des poumons et du cœur par le diaphragme chez l'Homme. C'est un organe hautement vascularisé, notamment par la veine porte et l'artère hépatique qui se subdivisent par la suite au sein du tissu pour former des vaisseaux extrêmement fins afin d'apporter oxygénation et nutriments. Le foie est connecté à la vésicule biliaire qui stocke la bile produite qui sert à la digestion et qui passe dans le système gastro-intestinal via le canal cholédoque, proche du pancréas et débouchant sur le duodénum. Le foie est composé de millions de microstructures

appelées lobules, regroupant les vaisseaux sanguins dont des veines centrolobulaires qui sont entourées d'hépatocytes, de cellules endothéliales sinusoidales, de cellules stellaires et de cellules immunitaires (Kupffer, Natural Killer etc.). C'est un organe vital pour l'organisme notamment par ses fonctions de synthèse (bile, cholestérol, lipoprotéines, glucose, albumine, antithrombine etc.), de stockage (glycogène, triglycérides, vitamine A etc.) et de détoxification (ammoniac, bilirubine, alcool et autres substances exogènes) [81–83].

Les maladies du foie (ou CLD pour chronic liver diseases) sont un ensemble de pathologies d'origine, de gravité et d'évolution différentes qui ont pour point commun la détérioration du tissu hépatique et de ses fonctions. Avec leur responsabilité quant au décès de plus de 2 millions de personnes par an (4% des morts mondiales), les maladies du foie sont la 11ème cause mondiale de mortalité [84]. Cependant, ce chiffre est à nuancer du fait que ce ne sont que les stades tardifs (cirrhose, cancer) et les infections graves du foie (hépatites virales) qui en sont les causes. Au total, environ 1,5 milliards de personnes souffrent de maladies du foie en 2017 [85,86].

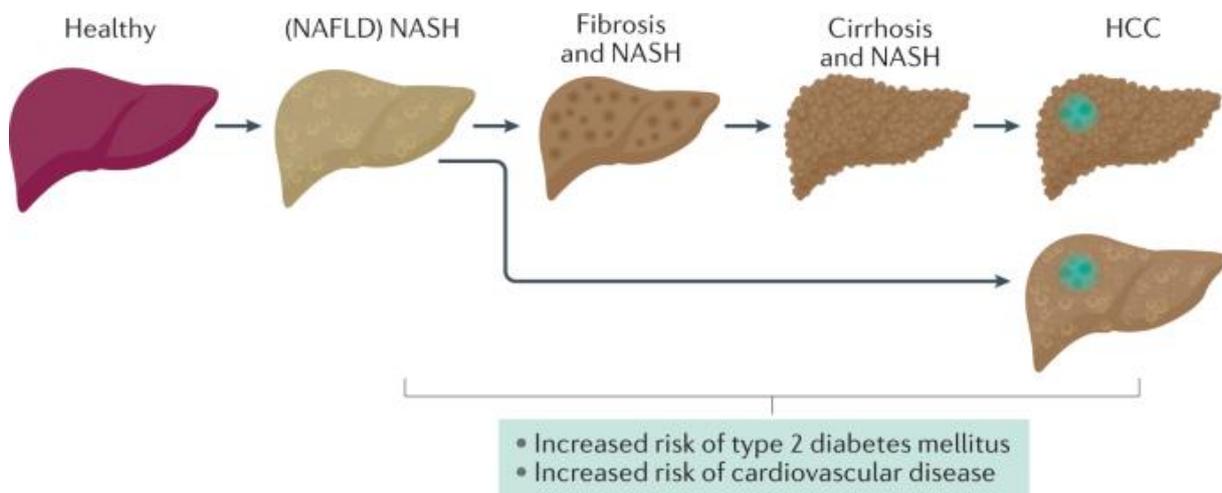
Les maladies du foie peuvent être d'origine infectieuse comme c'est le cas pour les hépatites virales (Hépatites A-E) qui représentent environ 38% des cas et environ 55% des décès, d'origine alcoolique (2% des cas, 25% des décès), d'origine métabolique (59% des cas, 9% des décès) ou d'autres origines comme résultats d'angiocholite, cryptogénique, de maladie auto-immune, maladie de Wilson, de déficit en alpha-1-antitrypsine ou d'hémochromatose (1% des cas, 11% des décès) [86]. Les symptômes d'un dysfonctionnement du foie sont pluriels et adviennent avec la progression de la maladie, allant de la simple stéatose à l'hépatocarcinome, en passant par la cirrhose et beaucoup sont aspécifiques comme la fatigue et la perte de poids. Cependant, il est possible de distinguer certaines manifestations cliniques causées par l'insuffisance hépatocellulaire : l'hypertension portale (surpression de la veine porte hépatique) causant des hémorroïdes, des varices et des ascites (épanchement liquidien intra-abdominal), la jaunisse, des péritonites régulières, une hyperoestrogénie, des coagulopathies, des encéphalopathies ou une perte des fonctions rénales.

En effet, les cellules composant le foie comme les hépatocytes (60% de la masse total), les cellules endothéliales, les cholangiocytes, cellules de Ito et autres cellules immunitaires, du fait de l'inflammation chronique, vont être détruites. Cependant, par la capacité régénérative du foie, celles-ci vont pouvoir être recrées. Néanmoins, si l'inflammation persiste, les processus de régénérations qui deviennent anarchiques peuvent être dépassés et laisser place à la fibrose du tissu, c'est à dire le comblement des cellules détruites par un tissu conjonctif mêlé à la lymphe non résorbée (exsudat) et la perte de fonction de l'endroit fibrosé. La progression importante de cette fibrose engendre la cirrhose qui, si elle n'est pas prise en charge précocement, peut amener à l'hépatocarcinome [85,87].

### 1.1.4.2 De la stéatose à l'hépatocarcinome (le foie gras non alcoolique)

La maladie du foie gras non alcoolique (NAFLD) ou dorénavant nommée maladie du foie associée à la dysfonction métabolique (MASLD), est caractérisée par l'accumulation excessive (>5% de la masse totale) de masse grasse associée au syndrome métabolique. Ce dernier est causé, non pas par l'alcool, mais par le surpoids/obésité, le diabète et/ou l'hypercholestérolémie [88].

La MASLD peut être stable mais peut également être évolutive si elle n'est pas prise en charge par des traitements ou un mode de vie plus adapté. Cette progression est divisée en 4 stades, tous définis par la gravité de l'atteinte des fonctions hépatiques et des symptômes qui en découlent.



**Figure 8** : Evolution dégénérative de la stéatose hépatique au carcinome hépatocellulaire [89].

**Stade 1 : La stéatose** [55]. Ce stade est défini par l'accumulation excessive de masse grasse dans le foie. Le facteur de risque pour la progression de la maladie dépend du pourcentage de masse grasse (séparé en grades : grade 1 : 5%-33%, grade 2 : 34%-66%, grade 3 >66%), du mode de vie et du potentiel génétique de l'individu. La stéatose peut être asymptomatique si absence d'inflammation et est réversible. Cependant, si les causes (maladie cardio-métabolique, mode de vie) ne sont pas traitées, dans de rares cas et à moyen-long terme, la maladie peut évoluer car l'accumulation excessive d'acides gras est toxique et pro-inflammatoire, au même titre que dans l'obésité, par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, qui peuvent endommager les protéines, les lipides et l'ADN) et de produits de la peroxydation des lipides, menant à des dommages macromoléculaires, le stress cellulaire et la mort cellulaire.

**Stade 2 : L'inflammation et la fibrose (MASH).** La stéatohépatite associée au dysfonctionnement métabolique (MASH) [87] est le stade de MASLD où l'accumulation de graisse est accompagnée d'une inflammation chronique. Environ 20-30% des patients présentant la MASLD développent la MASH [90]. Ce stade est symptomatique par son caractère inflammatoire (hépatomégalie ou ballooning, inflammation systémique, dysfonctionnement métabolique) mais également par la destruction des cellules hépatiques et la perturbation de leurs fonctions. Les douleurs abdominales et dorsales ainsi que la fatigue sont des symptômes courants. Cette inflammation chronique est un cercle vicieux d'auto-entretien : les cellules immunitaires du foie comme les cellules de Kupffer (macrophages) alors activées produisent des cytokines pro-inflammatoires comme TNF- $\alpha$ , l'interleukine-6 (IL-6) et l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) permettant le recrutement et l'activation d'autres cellules immunitaires comme les polynucléaires neutrophiles productrices de protéases et de ROS. Ces molécules pro-inflammatoires, amplifiées et soutenues par l'excès d'acides gras, promeuvent également la différenciation des cellules stellaires hépatiques (Csh) en myofibroblastes prolifératifs et fibrogènes, augmentant ainsi l'expression des récepteurs inflammatoires (chimiokines, l'ICAM-1 etc). La perpétuation des Csh, des leucocytes ainsi que la destruction des autres cellules hépatiques entraîne un excès de matrice extracellulaire (exsudat composé de protéines, glycoprotéines et proteoglycane) enrichie en collagène fibillaire et une fibrose progressive qui diminue encore la capacité de gestion du tissu hépatique face à l'inflammation [87,91,92]. Ce stade est encore réversible par la modification du mode de vie de l'individu [90] sous condition qu'il y est peu de fibrose.

Une faible proportion de personnes présentant une MASH évolue vers la fibrose [90]. Les individus, en plus de la fatigue et des douleurs abdominales, peuvent souffrir alors de jaunisse, d'œdèmes/ascite/varices et/ou d'encéphalopathie hépatique dus à l'accumulation de molécules normalement prises en charge par le foie (bilirubine, ammoniacque etc) et du blocage de la circulation sanguine. Le tissu cicatriciel, la fibrose, présente plusieurs dangers pour le foie et l'individu : son accumulation, augmentant rigidité du foie (liver stiffness) [93], peut diminuer l'apport et l'export hépatique de sang, réduisant la communication et l'oxygénation du tissu avec les autres organes mais peut également induire une pression pathologique au niveau de la veine porte (hypertension portale). La masse dite "fonctionnelle" du foie est alors plus ou moins remplacée par du tissu fibrotique sans fonction, réduisant l'efficacité de l'organe pour jouer son rôle (stockage, filtration, détoxification, synthèse) menant donc vers l'insuffisance hépatique qui est mortelle. La régénération, l'homéostasie immunitaire et la clairance des métabolites hépatiques et systémiques sont altérés. La fibrose avancée (pont cicatriciel entre les zones du foie, fibrose portale et atteinte significative des fonctions du foie) peut dériver vers la cirrhose du foie [85,94].

**Stade 3 : La cirrhose** [94]. A cette étape de la détérioration du tissu hépatique, la maladie est irréversible et peut nécessiter une transplantation du foie. L'absence de symptôme est plus rare (cirrhose compensée). En cas de cirrhose décompensée, où le reste de cellules fonctionnelles ne peut compenser la perte, s'ajoute aux symptômes du précédent stade, des varices œsophagiennes pouvant se rompre et donner des toux sanglantes, des infections plus fréquentes comme les péritonites bactériennes spontanées et le dysfonctionnement rénal. L'inflammation, la rigidité du foie, la déformation de sa structure et les problèmes de circulation provoqués par la fibrose sont alors majeurs. Les risques d'insuffisance hépatique sont d'autant plus haut qu'une partie importante du foie n'est plus fonctionnelle et que celle qui le reste est toujours inflammatoire et chaotique comme l'illustre la création de nodules. Ils peuvent être "régénératifs" en étant constitués d'hépatocytes bénins, organisés en amas pour préserver le peu de fonction hépatique restante, ou "dysplasiques" en présentant des hépatocytes atypiques et amenant à la formation de tumeurs [95].

**Stade 4 : L'hépatocarcinome** [95,96]. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est l'étape finale de dégradation du foie. Son développement survient pour la même raison que la plupart des cancers : une accumulation de mutations responsables de la modification de la prolifération, de la survie et du cycle des cellules impliquées. L'inflammation chronique non traitée à temps, et surtout dépassant un système immunitaire hépatique en ruine, est source d'accumulation de mutations (induites notamment par les ROS). Ces mutations ne sont plus prises en charge par les mécanismes de réparation de l'ADN. Si elles surviennent dans des gènes importants pour la régulation du cycle, de la prolifération et/ou survie cellulaire que l'on qualifie de oncogènes (CTNNB1, AXIN1, ARID1A, TP53, WWP1 et la région promotrice TERT), elles peuvent conduire à une prolifération incontrôlée des hépatocytes transformés (cellules malignes) [97–99]. Lorsque les symptômes apparaissent, ils peuvent s'ajouter à ceux des stades précédents, une masse palpable au fur et à mesure que la tumeur grossit, une perte de poids et l'aggravation des symptômes déjà présents. Outre le fait que l'insuffisance hépatique, l'hypertension portale et la thrombose de celle-ci soient à leur paroxysme, le risque de métastases, la propagation des cellules tumorales aux autres organes, augmente.

L'obésité, le diabète, la MASLD et plus généralement les maladies cardio-métaboliques sont fortement corrélées à la dysbiose (perturbation de l'équilibre) du microbiote, notamment le microbiote intestinal pour lequel des liens de causalité dans les deux sens peuvent être mis en évidence [90,100–106].

## 1.2 Introduction au microbiote intestinal bactérien et à son implication dans la santé de son hôte

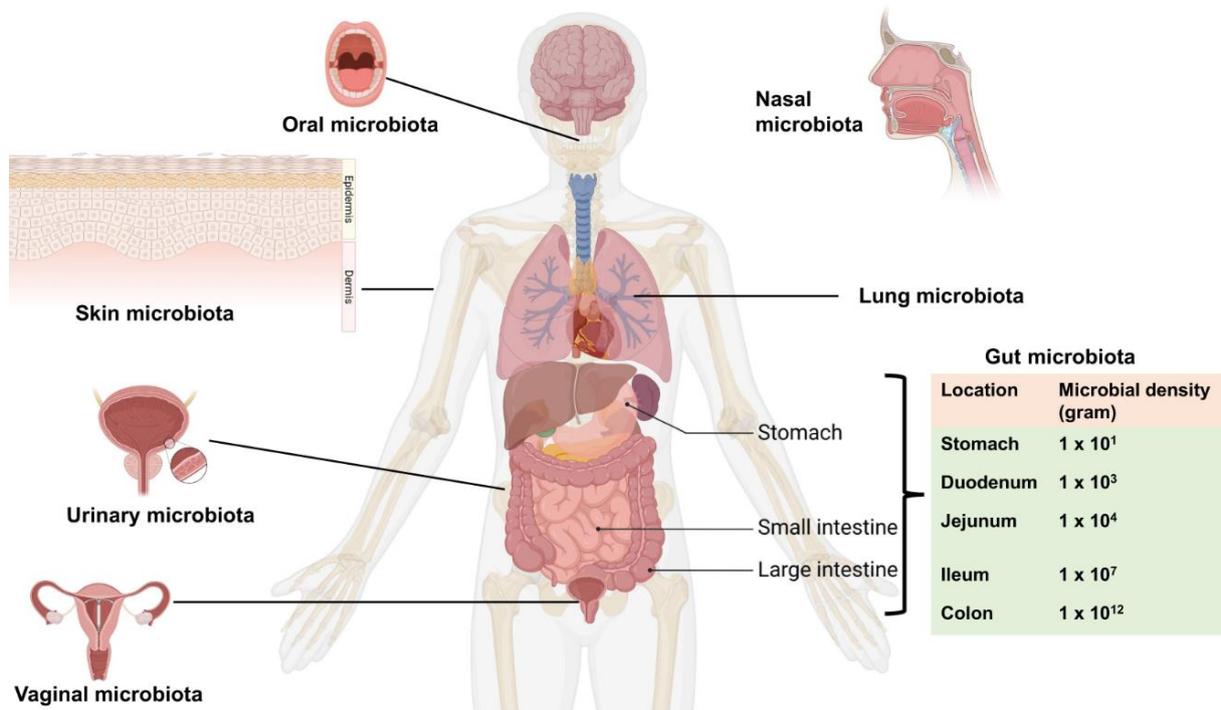
### 1.2.1 Définition et mesure du microbiote

**Description.** Le microbiote est une association symbiotique entre des micro-organismes tels que la bactérie, le champignon, l'archée, le protiste, l'acarien et le virus, et un hôte. Ils forment une entité fonctionnelle : l'holobionte. C'est depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle, que ceux considérés comme les pionniers de la microbiologie comme Louis Pasteur s'intéressent au microbiote intestinal, que de nombreuses recherches publiées, surtout depuis les années 1990 avec la découverte du système nerveux entérique, 2001 par l'introduction du terme « microbiome » par Joshua Lederberg [107] et 2006 avec l'apport du séquençage à haut débit, tendent à montrer l'intérêt de ce système dans la santé de son hôte [106]. En effet, le microbiote représente, chez l'Homme, au moins autant de cellules que n'en contient son hôte [108] mais surtout une richesse génétique bien supérieure [109], permettant à certains de qualifier le microbiote de nouvel organe. Ce dernier peuple toutes les zones non stériles de l'hôte, que ce soit la peau, les poumons, le vagin ou le plus important sur tous les aspects, le tractus digestif de manière commensale (profitable pour le microorganisme et sans danger pour l'hôte) voir mutualiste (profitable pour les deux organismes). Cependant, une perturbation du microbiote, appelée dysbiose, peut être physiopathogène pour l'hôte.

**Mesure.** D'abord basée sur la culture cellulaire et la détermination de caractéristiques phénotypiques et propriétés biochimiques, notre capacité d'étude du microbiote intestinal s'est améliorée grâce à l'émergence de technologie basée sur le séquençage. Le problème rencontré par la culture, comparativement au séquençage, en plus du travail important requis, est l'impossibilité de cultiver la majorité des espèces (76% des organismes sont non cultivables) [110].

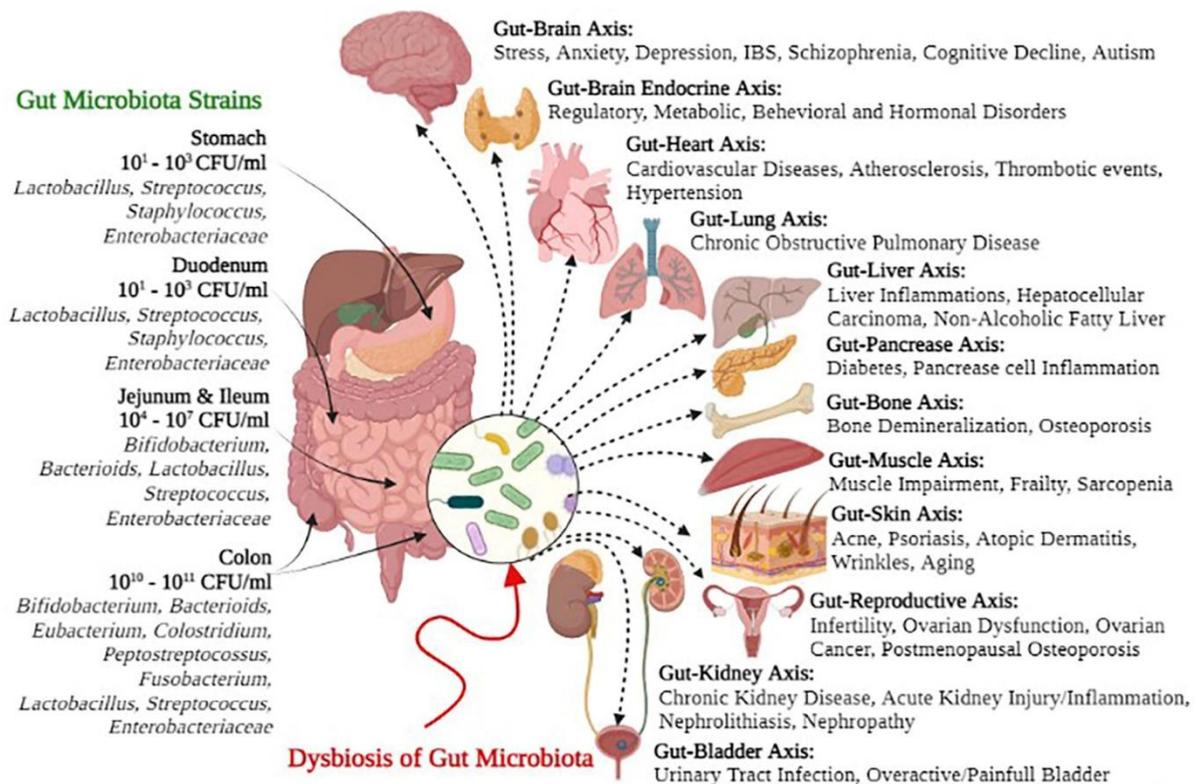
Le séquençage du gène de l'ARN ribosomique (ARNr) 16S bactérien (séquences courte ou total) est utilisé en routine. Cette stratégie, par son caractère ubiquitaire (l'ARNr 16S est présent dans tous les organisme) et la variabilité de sa séquence dans certaines de ses régions, permet de distinguer facilement les espèces. L'augmentation de la résolution et de la sensibilité de ces techniques a permis la réalisation de projet colossaux comme Human Microbiome Project et MetaHit (METAGenomics of the Human Intestinal Tract utilisant une approche shotgun, c'est-à-dire le séquençage aléatoire de brins d'ADN fragmentés). Cette approche a abouti à la vision la plus complète du répertoire microbien associé à l'Homme connue à ce jour [111].

## 1.2.2 Le microbiote intestinal



**Figure 9 :** Microbiote humain peuplant les différents endroits offerts par l'hôte [112].

Il existe plusieurs types de microbiotes dans le corps humain, tels que les microbiotes cutané, vaginal et pulmonaire, chacun avec une composition bactérienne très distincte. Leur point commun est la présence de bactéries commensales, qui cohabitent sans nuire à l'hôte, et de bactéries mutualistes, qui apportent des bénéfices en compétant avec les pathogènes, en soutenant l'immunité et en métabolisant des composés essentiels à la santé. Cependant, un déséquilibre, appelé dysbiose, peut survenir à cause de la prolifération d'un pathogène exogène ou endogène (organisme opportuniste notamment), perturbant l'homéostasie du tissu concerné et la santé de l'hôte. Parmi ces microbiotes, le microbiote intestinal sera le principal objet de ce projet par son rôle crucial dans le bien-être général et la santé métabolique.



**Figure 10 :** Microbiote intestinale et effets négatifs de la dysbiose sur la santé de l'hôte [113].

**Définition.** Le microbiote intestinal est caractérisé par une population de micro-organismes peuplant le tractus digestif, allant de la bouche au rectum, en passant par l'œsophage, l'estomac, et les différents intestins et spécialement le colon. Le microbiote intestinal est considéré comme le microbiote le plus important en termes de population (nombre d'organismes et diversité) et surtout d'échanges avec l'hôte, ce qui corrèle avec l'interface immense que représente le tractus gastro-intestinal et ses connexions avec tous les autres organes. Le microbiote intestinal est impliqué dans des interactions dépassant la barrière du tractus digestif et a une influence significative sur la santé de l'hôte, aussi bien lors de l'état homéostatique que lors de maladies. Cela, en plus de sa visualisation aisée en utilisant les fèces, font de lui le microbiote le plus étudié [90,102–105,110].

**Utilité et échanges.** L'hôte fournit une incroyable richesse de nutriments et la niche écologique la plus étendue. En échange, ce "super-organisme", en plus de jouer le même rôle que les autres microbiotes par la modulation du système immunitaire et la protection contre les organismes exogènes, joue un rôle primordial dans le métabolisme. Il permet la synthèse de divers composés bénéfiques pour l'hôte comme les acides gras à chaîne courte (SCFA), des vitamines ou des anti-inflammatoires. Les fibres alimentaires comme la cellulose et la pectine sont indigestes pour l'homme mais sont métabolisées par les bactéries cellulosiques comme *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides thetaiotaomicron* ou *Roseburia intestinalis*

qui produisent des SCFA actifs utilisés comme nutriments pour les cellules épithéliales de l'intestin [114,115].

Le microbiote intestinal joue un rôle dans l'efficacité d'absorption des nutriments par son implication dans le développement normal de la muqueuse intestinale et des cellules épithéliales. C'est le cas par exemple de *Akkermansia muciniphila* qui dégrade le mucus intestinal et améliore ainsi le recyclage de celui-ci. L'influence entre le microbiote intestinal et son hôte ne se limite pas au tractus digestif mais s'étend sur tous les autres organes, que ce soit le foie, le tissu adipeux, la peau ou encore le cerveau au travers de la circulation sanguine ou du nerf vague (nerf crânien X) [116–118]. En effet, notamment par la production d'acide gamma-aminobutyrique (GABA) [119], de sérotonine [120] ou le butyrate [121,122], mais aussi par le maintien de l'homéostasie immunitaire, certaines bactéries connues du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* modulent la signalisation vagale et leur abondance est retrouvée corrélée à la réduction de l'anxiété, de la douleur et à des effets neuroprotecteurs. Par l'amélioration de la digestion, le maintien de l'homéostasie immunitaire et la production de métabolites actifs, le microbiote intestinal est corrélé positivement à la sensibilité à l'insuline, la satiété et négativement à l'accumulation de graisse dans le foie et les adipocytes, agissant comme prévention pour les maladies métaboliques [90,102–105,110].

**Population.** Les données compilées des différentes études (gutMEGA [123]) ont permis d'identifier plus de 6457 taxons principalement composés de *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Proteus*, *Actinomycetes*, *Fusobacterium* et *Verrucomicrobia*, parmi lesquels les Firmicutes et *Bacteroidota* dominent. La diversité de cet écosystème est, comme pour les autres microbiotes, individu-spécifique mais le microbiote intestinal est particulièrement influencé par l'environnement, notamment l'alimentation de l'hôte.

**Dysbiose.** La perturbation de l'équilibre ou la réduction de la diversité du microbiote intestinal est plurifactorielle : la prise d'antibiotiques et/ou d'anti inflammatoires, un changement alimentaire soudain et/ou riche en acide gras saturés et en glucides et pauvre en fibre alimentaires, un stress psychologique, un manque d'exposition aux bactéries exogènes (trop d'hygiène), la pollution, l'alcool, la gestation, une inflammation aiguë ou chronique, une infection gastro-intestinale, l'âge, trop d'exercice ou trop peu d'exercice. Ces éléments, non exhaustifs, peuvent être la cause mais certains comme les inflammations, infections, prise de poids et stress peuvent être les conséquences d'une dysbiose du microbiote intestinal. En effet, la rupture de l'équilibre physiologique du microbiote intestinal, au même titre que pour les autres microbiotes, ouvre la porte au développement d'organismes opportunistes et pathogènes.

Cela peut être la cause d'une altération de la barrière intestinale (laissant passer les micro-organismes, les toxines et antigènes vers d'autres organes comme le pancréas et le foie), une inflammation aiguë (rectocolite notamment) pouvant déboucher sur une inflammation chronique (syndrome de l'intestin irritable ou la maladie de Crohn) mais également une perturbation de la communication intestin-cerveau (stress, syndromes dépressifs, Parkinson). L'augmentation des risques de maladies cardiométaboliques (athérosclérose, obésité, DT2) ainsi que l'altération de l'efficacité de la digestion et de la production de métabolites d'intérêt pour l'hôte (AGCC, vitamines) au profit de ceux réputés pathogènes (TMAO) sont également reliés à la dysbiose du microbiote intestinal. La dysbiose est cas-spécifique, mais une tendance générale est retrouvée chez les patients souffrant de cette dysbiose avec une diminution globale de la diversité alpha et plus précisément une diminution des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* ainsi que des espèces comme *F. prausnitzii*, *A. muciniphila* et de souches mutualistes d'*E. coli* (Nissle 1917 par exemple). Au contraire, il est généralement noté une augmentation des souches entéro-pathogène d'*E. coli* (O127 par exemple [124]), d'organismes opportunistes comme le genre *Ruminococcus* et les espèces *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, et pathogènes comme le genre *Prevotella* et les espèces *C. difficile* et *Fusobacterium nucleatum* [90,102–105,110].

### **1.2.3 Rôle du microbiote intestinal bactérien sur la santé cardiométabolique**

Les intérêts d'un microbiote intestinal bactérien sain sont nombreux. Cependant, le microbiote intestinal Humain sain ne peut pas faire consensus du fait de la diversité des souches, des différences dans les taux de croissance microbienne mais surtout en raison de la variation interindividuelle considérable comme les expositions environnementales et potentiel génétique de l'hôte. Néanmoins, des critères existent pour déterminer, non de façon impartiale, la santé d'un microbiote intestinal. Il fait consensus de caractériser comme sain le microbiote possédant une grande diversité taxonomique, une grande richesse génétique mais tout aussi important, une stabilité dans les fonctions et les interactions avec son hôte.

A partir de ces critères et de la comparaison de malades avec des individus sains, plusieurs corrélations entre l'état du microbiote intestinal et celui de l'hôte ont été faites et montrent un intérêt significatif de la santé de ce "super-organisme" dans le maintien de l'homéostasie, la prévention des maladies cardiométaboliques et le retour à l'équilibre physiologique de l'hôte. Le microbiote module l'inflammation, interagit avec les constituants alimentaires, impacte la perméabilité intestinale, le métabolisme du glucose et des lipides, la sensibilité à l'insuline et l'homéostasie énergétique globale chez l'hôte [106].

## 1.2.4 Corrélations entre microbiote intestinal et maladies cardiométaboliques

### 1.2.4.1 Corrélations avec l'obésité

C'est à partir de 2004, avec l'association du microbiote comme facteur environnemental du stockage de graisse [125], et 2006, avec la prise de poids d'un échantillon de souris au départ minces après un transfert du microbiote intestinal d'humains obèses [126], que l'obésité a été corrélée à l'état du microbiote intestinal. Le microbiote intestinal des patients obèses, généralement déséquilibré comparativement à un individu sain, peut favoriser l'absorption d'énergie au dépend de son utilisation, ce qui entraîne une accumulation excessive de graisse et une prise de poids accrue [104,105].

Le manque relatif de diversité alpha du microbiote intestinal serait corrélé à l'obésité. Cependant, il est compliqué de statuer sur une diversité spécifique. Plusieurs travaux montrent que l'obésité pourrait être associée à deux phyla bactériens dominants : *Firmicutes* et *Bacteroidota*. Le rapport *Firmicutes/Bacteroidota* se trouverait augmenté chez les personnes et souris obèses, améliorant l'absorption d'énergie apportée par l'alimentation. Pourtant, ces résultats sont critiqués, ce qui montre la faiblesse possible de la généralisation. Un modèle plus précis, le concept d'entérotype a été proposé récemment. Ce concept se base sur la proportion des *Bacteroides*, *Prevotella*, et *Ruminococcus* dont le sous-entérotype Bact2 (*Bacteroides 2*) est fortement corrélée à l'obésité [127,128].

Certains genres voire espèces bactériennes spécifiques sont associés à l'obésité. C'est le cas de *Eubacterium ventriosum*, *Roseburia intestinalis* et des *Lactobacillus* comme *L. reuteri* et *L. gasseri*. *A contrario*, certaines espèces ont montré des associations fortes avec la limitation de la prise de masse grasse ou la diminution de celle-ci comme la famille des *Oscillospira* (dont fait partie *F. prausnitzii*), *Methanobrevibacter smithii*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *A. muciniphila*, la famille des *Christensenellaceae*, le genre *Bifidobacterium* comme *B. animalis* et le genre *Lactobacillus* comme *L. paracasei*, *L. gasseri* ainsi que des espèces comme *A. muciniphila* et *B. acidifaciens* ont par exemple été rapportés comme augmentant l'oxydation des acides gras dans les adipocytes [129].

Certaines d'entre elles comme les *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *Pediococcus pentosaceus*, *B. lactis* et *B. breve* notamment) sont des compléments alimentaires renommés et utilisés généralement pour rétablir un semblant d'équilibre microbiotique ou prévenir d'une éventuelle dysbiose due à la prise d'antibiotiques. Elles sont alors qualifiées de probiotiques.

#### 1.2.4.2 Corrélations avec le diabète de type 2

Le diabète de type 2 s'accompagne de la prise de médicaments qui perturbent l'équilibre du microbiote intestinal bactérien (la metformine par exemple) ce qui rend les travaux de recherche sur les liens de corrélations plus complexes à interpréter. Ils sont alors généralement menés sur des patients prédiabétiques ou DT2 sans médication (dit "naïfs aux traitements") [130].

Chez les personnes atteintes de prédiabète, le microbiote intestinal présente une perte de taxons producteurs de butyrate, une diminution de l'abondance d'*Akkermansia muciniphila* et une augmentation de l'abondance des bactéries ayant un potentiel pro-inflammatoire [105,129–131].

Chez les femmes présentant un diabète gestationnel, il est également retrouvé une perturbation, comparativement aux femmes enceintes normoglycémiquées, du microbiote intestinal. Les femmes présentant un diabète gestationnel possèdent un microbiote intestinal qui présente une richesse bactérienne réduite, notamment au niveau des bactéries productrices de butyrate, associée à une augmentation des pathogènes opportunistes, ressemblant fortement aux patients naïfs de DT2.

Communément, les genres *Bifidobacterium*, *Bacteroides* (*B. acidifaciens*, *B. uniformis* et *B. stercoris*) *Faecalibacterium*, *Akkermansia* (*A. muciniphila*), *Lactobacillus* et *Roseburia* sont corrélés négativement au développement du DT2 tandis que les genres *Ruminococcus*, *Clostridium* (*C. clostridioforme* et *C. hathewayi*), *Fusobacterium*, *Blautia* et des espèces comme *Bacteroides vulgatus* et *Prevotella copri* sont associés au DT2. Cependant, aucun de ces changements n'est spécifique au DT2 car ils se produisent dans de nombreux troubles chroniques caractérisés par une inflammation asymptomatique. A l'échelle plus macroscopique, le rapport *Firmicutes/Bacteroidota* a également été suggéré mais avec la même inconsistance que pour l'obésité [129–131].

Au même titre que l'obésité, la prise de probiotiques a pu montrer des effets prometteurs. *Bacteroides uniformis* et *Bacteroides acidifaciens* sont corrélés à la réduction l'insulinorésistance et la prévention de l'obésité chez les souris diabétiques. *Lactobacillus Bifidus*, via la voie de signalisation IRS/PI3K/Akt, est lié à la réduction de la glycémie, la sensibilité à l'insuline et une augmentation des niveaux d'antioxydants. Enfin, les genres *Actinoplanes* et les *Lactobacillus*, par le blocage l'activité de l'alpha-glucosidase, amélioreraient la glycémie [129–131].

### 1.2.4.3 Corrélations avec la MASLD

De même que le DT2, la MASLD et son évolution sont généralement accompagnées d'un état de surpoids/obésité, d'une mauvaise alimentation et d'inflammation chronique liés à une dysbiose du microbiote intestinal [89,128,132]. Il est donc plus complexe de distinguer les effets de ces changements associés sur le foie des effets médiés par la modification du microbiome dans ces mêmes conditions. De plus, les changements opérés peuvent être similaires. Tout d'abord, la diversité alpha de la flore intestinale est généralement diminuée chez les individus présentant une MASLD, comparativement aux individus considérés sains. De cette diversité fluctuée, certaines espèces ont été associées à la MASLD. La présence d'espèces bactériennes, telles que *Proteobacteria*, *Enterobacteria* et *Bacteroides* est enrichie. Cependant, les espèces dominantes changent en fonction des stades de la maladie [90,132,133].

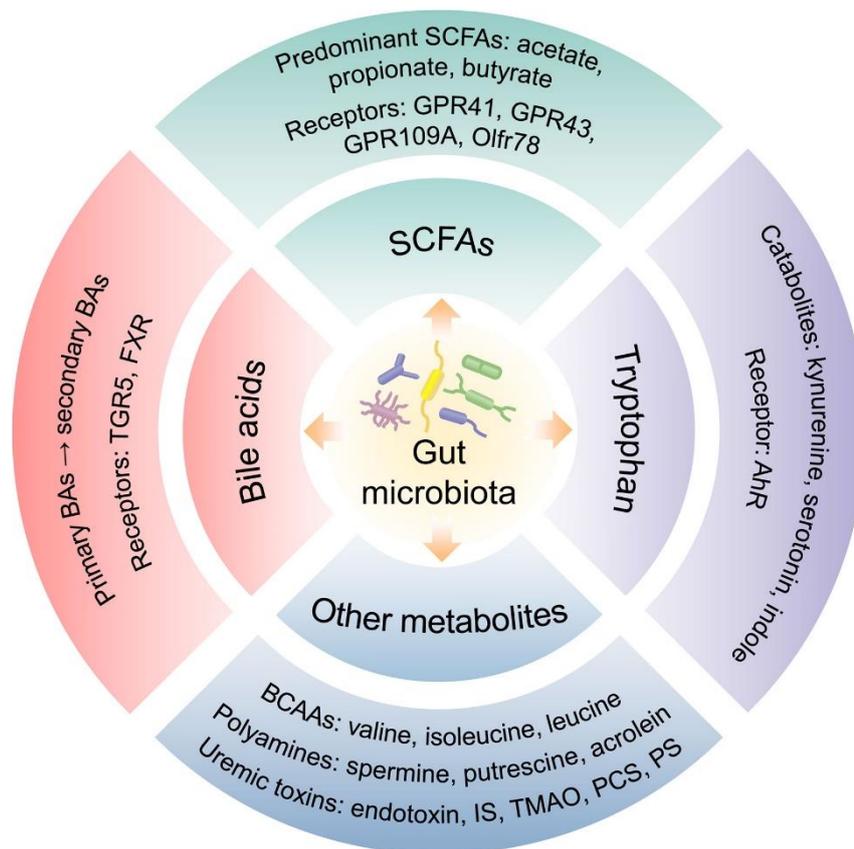
Des niveaux plus élevés de bactéries productrices d'alcool (*Limosilactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis* et *K. pneumoniae* notamment) dans l'intestin et des concentrations d'éthanol dans le sang ont été détectés chez les patients atteints de MASH, ce qui indique que l'alcool endogène pourrait être impliqué dans la pathogenèse de la MASLD [133]. De même, certaines bactéries comme des souches de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Bilophila wadsworthia*, *E. faecalis* ou *Desulfovibrio piger* [134] sont corrélés positivement à la MASLD/MASH par leur production de LPS ou de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S qui est essentiel pour la maintenance de la muqueuse intestinale mais qui dans ce contexte peut être pathologique) passant par la barrière intestinale perturbée et maintenant ou aggravant l'inflammation.

De concert, l'abondance des genres *Prevotella*, *Faecalibacterium* (*F. prausnitzii*), *Bifidobacterium*, *Lachnospiraceae* et *Romboutsia* ou des espèces comme *Ligilactobacillus ruminis*, *M. smithii* réputés pour leurs effets protecteurs sur la MASLD, notamment par leur production de SCFA, est plus faible chez les personnes présentant une MASLD.

La prise de probiotiques qui auraient un effet bénéfique sur la régulation de cette dysbiose et des facteurs associés (obésité, inflammation chronique) ou directement sur la stéatose hépatique est généralement composé des bactéries des genres *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*, *L. casei* et *L. plantarum*) et *Bifidobacterium* (*B. longum* et *B. bifidum*) ou *Akkermansia* (*A. muciniphila*) [135].

Quand bien même il est délicat de pouvoir faire des généralités sur la composition macroscopique d'un microbiote intestinal sain, des espèces et leur corrélation positive avec les marqueurs de la santé métabolique se démarquent : *A. muciniphila*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *F. prausnitzii* et *M. smithii* au même titre que les bactéries pathogènes comme *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, certains *Clostridium* et *Bacteroidota*. Cependant, toutes ces corrélations entre les paramètres de santé de l'hôte et la richesse génétique du microbiote intestinal font fi des interactions directes entre les deux. En effet, outre la diversité, le critère principal d'un microbiote intestinal sain est la stabilité et la qualité des interactions entre celui-ci et l'hôte. Le microbiote interagit via la stimulation du développement des villosités intestinales, la maturation du système immunitaire via notamment ses contacts directs (acide lipotéichoïque, LPS interagissant avec les récepteurs cellulaires de l'hôte comme les Toll-like receptor) et la digestion de composés non-assimilables mais également par la production par de composés bio actifs issus de son métabolisme, les métabolites [100,103,136].

### 1.2.5 Le microbiote intestinal et ses métabolites



**Figure 11** : Métabolites bioactifs produits par le microbiote intestinal [136].

Le microbiote intestinal produit une gamme diversifiée de métabolites, chacun pouvant jouer un rôle dans la régulation de la santé intestinale, la communication entre le microbiote et l'hôte,

et la prévention des maladies cardio-métaboliques et inflammatoires [100,103,136]. Parmi les plus étudiés, il est trouvé non exhaustivement les SCFA (acétate, butyrate, propionate) [115], les acides biliaires secondaires (acide désoxycholique et acide lithocholique) [137], les métabolites du tryptophane (Indole, acide indole-3-acétique et skatole) [138], les polyamines (putrescine, spermidine, cadavérine) [139], les amines biogènes (Sérotonine, Dopamine, Sérine) et les phénylpropanoïdes (acide férulique et acide caféique) [140]. Ces métabolites sont le produit de l'interaction complexe entre les nutriments consommés par l'hôte et le métabolisme du microbiote intestinal. Ainsi, les interventions diététiques peuvent avoir un effet profond sur leur production. Leur étude continue de révéler des implications importantes pour la médecine préventive et thérapeutique, amenant le terme de "postbiotique".

#### 1.2.5.1 Les acides gras à chaîne courte (SCFA)

**Description, production.** Les SCFA sont produits par la fermentation des fibres alimentaires et des oligosaccharides complexes par des bactéries comme *F. prausnitzii*, *Eubacterium* (*E. rectale*, *E. hallii*), *Roseburia* (*R. bromii* et *R. intestinali*), *C. symbiosum*, *A. muciniphila*, *Prevotella* et *Coprococcus* [114,115]. Cette fermentation a lieu dans le gros intestin et l'absorption des SCFAs se produit rapidement au sein du côlon. Les SCFAs incluent les acides gras présentant moins de 6 carbones. De ce nombre dépendent leurs propriétés. 80% des SCFAs retrouvés sont l'acétate (C2), le propionate (C3) et le butyrate (C4) [121]. L'acétate peut être formé par la voie de Wood-Ljungdahl et à partir du pyruvate via l'acétyl-CoA (pouvant être synthétisé à partir du lactate). Le propionate, lui, peut être réduit à partir des voies de l'acrylate, du succinate et du propanediol. Enfin, le butyrate peut être formé à partir de la condensation de deux molécules d'acétyl-CoA ou par la voie butyryl-CoA : acétate CoA-transférase, dans laquelle le butyryl-CoA est converti en butyrate et acétyl-CoA en utilisant de l'acétate d'origine exogène [121].

**Intérêt dans les maladies cardiométaboliques.** Les SCFA agissent comme des molécules de signalisation à la fois sur les cellules de l'intestin et sur les cellules d'autres tissus. Ils peuvent agir selon deux mécanismes différents. Tout d'abord, par action directe sur les entérocytes en étant utilisés comme nutriment par les entérocytes, en diminuant le pH et en augmentant la sécrétion de mucine, maintenant l'intégrité de la barrière intestinale. Secondement, par une action indirecte via leur liaison à six récepteurs différents, activant des cascades de signalisation intracellulaire. Ce dernier mécanisme permet la régulation de la réponse inflammatoire et immunitaire, de la pression artérielle, de l'apport et l'utilisation d'énergie, et de l'homéostasie des lipides et du glucose. Ils peuvent se lier aux récepteurs couplés aux protéines G, GPR41 (FFAR3), GPR43 (FFAR2), GPR109a (HCAR2), GPR42 et aux récepteurs olfactifs OR51E2 (Olfr78) et OR51E1 [114,141].

La liaison des SCFA aux différents GPR permet la transduction d'un signal principalement anti-inflammatoire avec une réduction des cytokines pro-inflammatoires comme TNF-alpha et une augmentation des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 [141,142]. Leur liaison permet également une régulation de l'homéostasie énergétique avec notamment la sécrétion de GLP-1 et PYY, la régulation du métabolisme des lipides (diminution de la lipolyse et des acides gras libres circulants) et la diminution de la pression artérielle par vasodilatation [143]. Leur liaison aux récepteurs OR51E permet l'augmentation des concentrations en AMPc [144] ayant des effets protecteurs contre la MASLD et l'adrénoleucodystrophie, la régulation de la prolifération cellulaire [145] et la sécrétion de rénine (activatrice du système rénine-angiotensine-aldostérone augmentant la vasoconstriction et donc la pression artérielle) [146]

### 1.2.5.2 Acides biliaires

**Description, production.** Les acides biliaires primaires (acide cholique et acide chénodésoxycholique) sont produits à partir du cholestérol. Ils sont conjugués à la taurine ou à la glycine avant d'être stockés dans la vésicule biliaire et/ou dans le tractus digestif, généralement en réponse à la consommation de lipides [147]. Au sein de l'intestin, le microbiote intestinal bactérien produit, à partir de ses acides biliaires primaires, des acides biliaires secondaires (Acide désoxycholique et acide lithocholique) par déconjugaison et 7 $\alpha$ -déshydroxylation. Les bactéries productrices d'acides biliaires secondaires sont généralement les *Clostridium* (*C. Scindens*), les *Bacteroidetes* (*B.fragilis*), les *Eubacterium* (*E. lenta*), les *Ruminococcus* (*R. Gravus*), les *Lactobacillus* (*L. plantarum*) et les *Bifidobacterium* (*B. Longum*) [137].

**Intérêt dans les maladies cardiométaboliques.** Les acides biliaires jouent un rôle crucial dans la digestion des graisses en émulsifiant les lipides alimentaires ce qui facilite leur digestion et leur absorption ainsi que celle des molécules liposolubles comme certaines vitamines. De plus, les acides biliaires aident à la régulation du métabolisme et la régulation de l'inflammation en étant, tout comme les SCFAs, des ligands pour certains récepteurs clés. C'est le cas des récepteurs X farnésioïde (FXR) et Takeda couplé à la protéine G (TGR5). FXR, activé par les acides biliaires, inhibe leur sécrétion en régulant notamment CYP7A1 (hepatic cholesterol 7 $\alpha$ -deshydroxylase). Ce récepteur limite également l'inflammation en diminuant l'expression de molécules pro-inflammatoires comme IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , MadCAM-1, IL-17 et DAO et en augmentant la production de H<sub>2</sub>S par la cystathionine- $\gamma$ -lyase, mais il limite également la glycolyse et la lipogénèse du foie, participant donc à la préservation d'une glycémie normale [148].

Cependant, comme la plupart des récepteurs présents sur plusieurs organes et plusieurs types cellulaires, il est important de noter que les effets de ces récepteurs sont cellule-dépendant, comme en atteste le fait que la suppression de FXR dans le tissu adipeux semble avoir des effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline et le stress oxydatif dans ce tissu [149]. Le récepteur TGR5, activé par les acides biliaires, est un modulateur métabolique notamment pour son effet physiologique sur la dépense énergétique et la sensibilité à l'insuline par la stimulation de la production d'AMPc et la sécrétion de GLP-1 mais aussi inflammatoire en inhibant la voie NF-κB et en améliorant la production de NO (vasodilatateur antiathérogène) [150,151].

### 1.2.5.3 Dérivés du tryptophane

**Description, production.** Le tryptophane, un acide aminé essentiel, est issu de la dégradation des protéines de l'alimentation lors du transit intestinal. Le restant non absorbé par l'hôte est métabolisé par le microbiote intestinal bactérien en divers composés bioactifs. Les catabolites du tryptophane regroupent principalement l'indole, la tryptamine, l'acide indolelactique (ILA), l'indoleéthanol (IE), le skatole, l'acide indoleacétique (IAA), l'indolealdéhyde (IAld), l'acide indolepropionique (IPA) et l'acide indoleacrylique (IA) [138,147,148]. La production de chaque métabolite dépend de l'espèce bactérienne mais les dérivés du tryptophane sont généralement synthétisés par les genres *Clostridium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* et *E. coli* avec quelques espèces sortant du lot comme *Ruminococcus gnavus* (tryptamine), *Desulfovibrio vulgaris* (indole) et *Megamonas hypermegale* (ILA, skatole) [138,147,148]. Il y a trois principales voies de dégradation du tryptophane dans l'intestin : La voie des indoles (produisant l'indole, IAA, IPA et IAld) principalement par le microbiote intestinal, la voie de la kynurénine (produisant la kynurénine et ses dérivés) par l'enzyme indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO) de l'hôte [149] qui peut être modulée par le microbiote intestinal et la voie de la sérotonine par la tryptophane hydroxylase (TPH) de l'hôte, également modulée par le microbiote.

**Intérêt dans les maladies cardiométaboliques.** Les dérivés du tryptophane jouent un rôle certain dans l'homéostasie énergétique, inflammatoire et immunitaire de l'hôte mais également celle du microbiote intestinal [138,148,150]. L'IE agit comme agent anti-microbien contre les bactéries pathogènes comme *L. Plantarum*, *S. Aureus* et *S. enterica* mais inhibe également la réplication des virus (dont les bactériophages). L'AIL aurait également une activité antibactérienne contre *E. coli* et *B. cereus*. L'indole, l'IPA et l'IA diminuent la perméabilité de la barrière intestinale, par l'activation du récepteur PXR, et modulent la réponse inflammatoire par la régulation du récepteur des hydrocarbures aryliques (AhR augmentant la production d'IL-22) et par leurs effets antioxydants via la régulation de l'homéostasie redox

mais également sur le métabolisme énergétique (indole) en augmentant la sécrétion de GLP-1 [138].

La tryptamine (et IAA, IPA) stimule la sécrétion de 5-hydroxytryptamine (5-HT, sérotonine) par les cellules entérochromaffines. La 5-HT est un neurotransmetteur crucial qui régule de nombreux aspects de la physiologie, tant au niveau central que périphérique. La majorité de la sérotonine endogène est synthétisée dans l'intestin, où elle influence des processus variés comme la motilité intestinale, la réponse immunitaire, et même des fonctions neurologiques en influençant la communication entre l'intestin et le cerveau par l'intermédiaire des neurones entériques [120]. Ce métabolite affecte donc le temps de transit intestinal qui est fortement associé à la composition, à la diversité et au métabolisme du microbiote intestinal mais qui pourrait éventuellement être associé au syndrome du côlon irritable comme c'est le cas de *R. gnavus*, qui est sur-représentée dans les maladies inflammatoires intestinales [151]. Au même titre que la kynurénine qui, dans des conditions physiologiques, aide à l'homéostasie immunitaire mais qui peut accentuer les effets délétères d'une condition pathologique comme l'inflammation chronique [149].

#### 1.2.5.4 Polyamines

**Description, production.** Les polyamines sont des molécules contenant plusieurs groupes amines (-NH<sub>2</sub>), qui leur confèrent une charge positive, leur permettant d'interagir avec notamment l'ARN, l'ADN et certaines protéines chargées. Les principales polyamines incluent la putrescine (précurseur des autres polyamines), la spermidine, et la spermine (catabolite de la spermidine). Elles peuvent être trouvées au sein de l'alimentation (Légumes, viandes et poissons, produits laitiers, fruits) et synthétisées par l'hôte et le microbiote. Chez l'hôte, les polyamines sont synthétisées à partir de l'ornithine, un acide aminé de la voie de l'urée, via l'ornithine décarboxylase (ornithine → putrescine) et la spermidine et spermine synthase (putrescine → spermidine et spermidine → spermine) [139,152,153]. Le microbiote intestinal bactérien, lui, permet la synthèse de putrescine à partir d'ornithine mais également d'arginine. Ces bactéries productrices sont généralement *L. plantarum*, *E. coli*, *B. adolescentis* et *E. faecalis* [139].

**Intérêt dans les maladies cardiométaboliques.** Les polyamines participent à la prolifération cellulaire en stabilisant l'ADN et l'ARN qui favorise la transcription et la traduction cellulaire [153], au processus de réparation tissulaire (putrescine) par la régénération des cellules épithéliales et la réparation de la barrière intestinale, à la réponse immunitaire (spermidine) en réduisant les réponses pro-inflammatoires (voie NF-κB, TNF-α et l'IL-6) et en favorisant un phénotype anti-inflammatoire (polarisation des macrophages vers un phénotype M2 anti-inflammatoire) [154,155] mais aussi à la réduction du stress oxydatif notamment lié à l'âge (spermidine) en favorisant l'autophagie [152,156]. Cette amélioration de la gestion de

l'inflammation, le renforcement de la signalisation de l'insuline par la voie Akt/mTor (par la spermidine notamment [157]) et l'inhibition de la lipogenèse dans le foie font des polyamines des agents protecteurs contre le DT2.

#### 1.2.5.5 Phénylpropanoïdes

**Description, production.** Les phénylpropanoïdes sont une large famille de composés organiques dérivés de la phénylalanine (et parfois de la tyrosine), un acide aminé aromatique, que l'on retrouve dans les plantes. Au sein de ces organismes, la phénylalanine est métabolisée en acide cinnamique par la phénylalanine ammoniac-lyase. C'est cette dernière molécule qui sera dérivée en différents phénylpropanoïdes comme l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide coumarique, le resvératrol ou la quercétine [158]. Les phénylpropanoïdes ingérés lors de l'alimentation ont une assimilation limitée et ceux qui ne sont pas assimilés dans l'intestin grêle atteignent le côlon où niche la plus grande communauté de bactéries, dont celle métabolisant les phénylpropanoïdes. Les genres comme *Bacteroides*, *Clostridium* et *Eubacterium* permettent production de molécules plus bio assimilables et bioactifs telles que l'acide phénylpropionique, acide phénylacétique et l'acide hydroxyphénylacétique. Il est même possible pour le microbiote intestinal bactérien de convertir certaines polyphénols comme les flavonoïdes (quercétine, catéchines etc) et fibres végétales (Inuline, pectine, cellulose etc) en phénylpropanoïdes [140].

**Intérêt dans les maladies cardiométaboliques.** Les intérêts des phénylpropanoïdes dans la santé humaine et les maladies cardio-métaboliques sont multiples mais tournent autour de deux choses : leurs effets antioxydants et anti-inflammatoires. L'acide férulique et l'acide caféique sont de puissants antioxydants qui aident à neutraliser les radicaux libres, en stimulant la production d'enzymes antioxydantes endogènes comme la superoxyde dismutase (SOD) ou la glutathion peroxydase, protégeant ainsi les cellules des dommages oxydatifs. Le resvératrol et la quercétine ont montré des effets anti-inflammatoires en inhibant certaines voies inflammatoires, notamment celles liées à l'activation du NF- $\kappa$ B, des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6) ou de la production de molécules pro inflammatoire comme la cyclooxygénase-2 (COX-2) produisant les prostaglandines. Dernier exemple non exhaustif, l'acide phénylpropionique est considérée comme améliorant la barrière intestinale par l'activation du récepteur (AhR) et réduisant l'hépatotoxicité des traitements à base d'acétaminophène [159,160].

Il est également possible de caractériser comme métabolites du microbiote intestinal bactérien des molécules issues de l'effort conjoint de microbiote et de l'hôte. Ils sont alors appelés "co-métabolite microbiote-hôte". C'est le cas de l'hippurate [161].

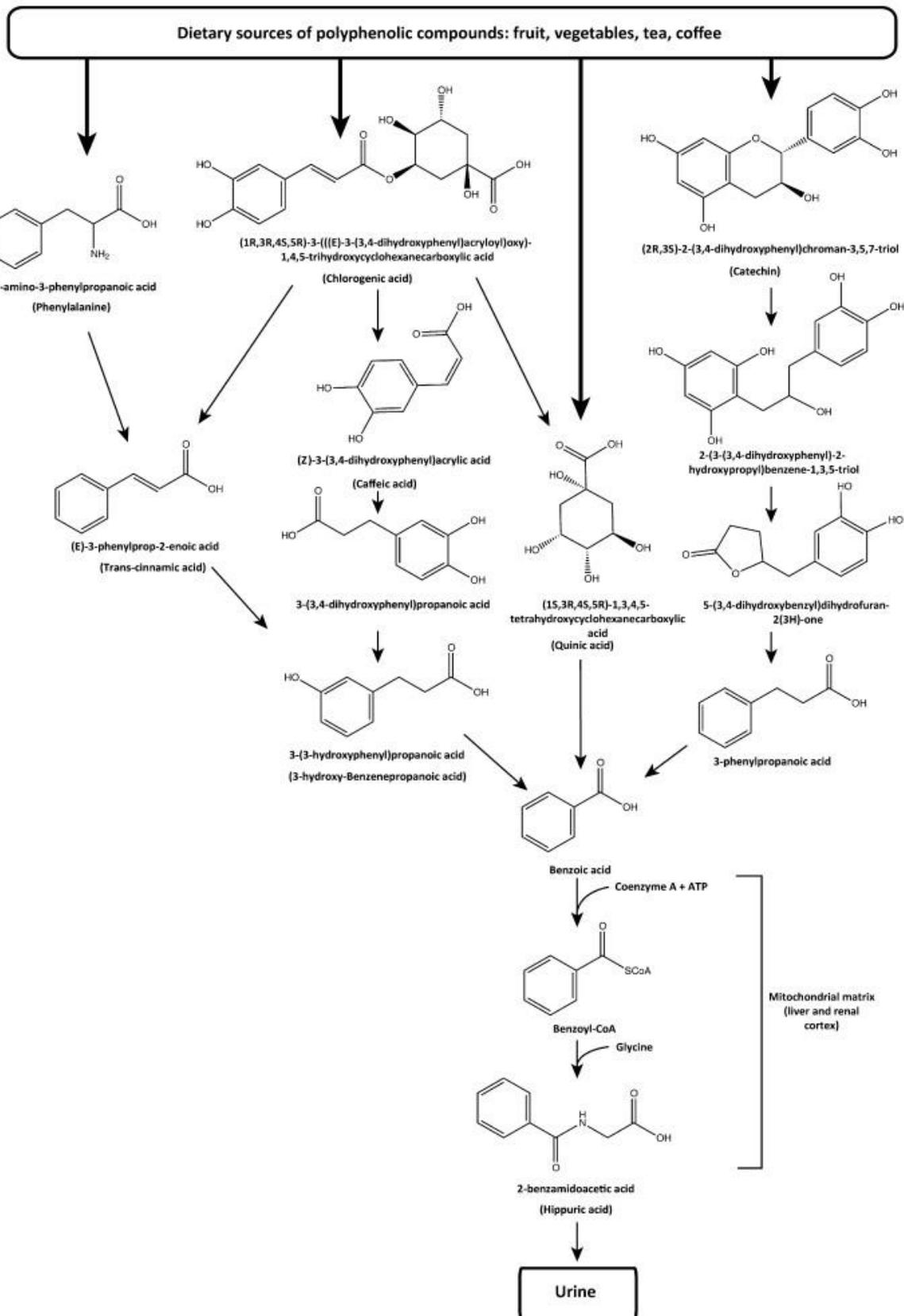
## 1.3 Hippurate

### 1.3.1 Origine et structure

**Découverte.** L'hippurate, l'acide hippurique ou le N-benzoylglycine a été mentionné pour la première fois en 1829 et nommé ainsi à partir de l'animal dans lequel il a été isolé, le cheval (grec hippos, « cheval »). Celui-ci, excrété dans l'urine a permis à cette époque de mieux appréhender les mécanismes d'excrétion et de détoxification du corps [162].

**Structure.** L'hippurate est un acide carboxylique aromatique. Il est composé d'un noyau benzénique ( $C_6H_5-$ ) attaché à un groupe carboxyle ( $-COOH$ ) en extrémité par une liaison amide ( $-CONH-$ ). Sa formule chimique brute est  $C_9H_9NO_3$  et sa masse molaire est de 179,172 g/mol (ratio mass/charge 180,0660 (positif) et 178.0504 (négatif))

**Synthèse.** L'hippurate est issu de la conjugaison, qui a lieu au sein des hépatocytes de l'hôte, de la glycine et du benzoate [163,164]. Le benzoate, un acide carboxylique, se trouve naturellement dans des fruits comme les canneberges, les prunes, les pommes et les baies, ainsi que dans certaines épices. Il est produit par les plantes et aussi utilisé comme conservateur alimentaire (sous le nom de benzoate de sodium notamment) grâce à ses propriétés antimicrobiennes. Le benzoate synthétisé par le microbiote intestinal (*Eubacterium*, *Eubacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Butyribacterium*, *Peptostreptococcus*) est issu de la décarboxylation de composés aromatiques comme les polyphénols (acide gallique, acide p-hydroxybenzoïque, acide vanillique, acide chlorogénique etc.), certains acides phenylpropanoïdes (acide férulique, acide caféique etc.) [165,166]. Après le passage dans la circulation systémique, le benzoate est internalisé dans le foie. Au sein de la mitochondrie, le benzoate est associé à la coenzyme A (CoA) par la benzoyl-CoA ligase. Par la suite, ce benzoyl-CoA est conjugué (lié) à la glycine par la glycine N-acyltransférase pour former l'acide hippurique, ou plutôt au vu du pH cellulaire, sa forme base, l'hippurate [163,164,167]. Il est également produit, dans une moindre quantité, par les reins.

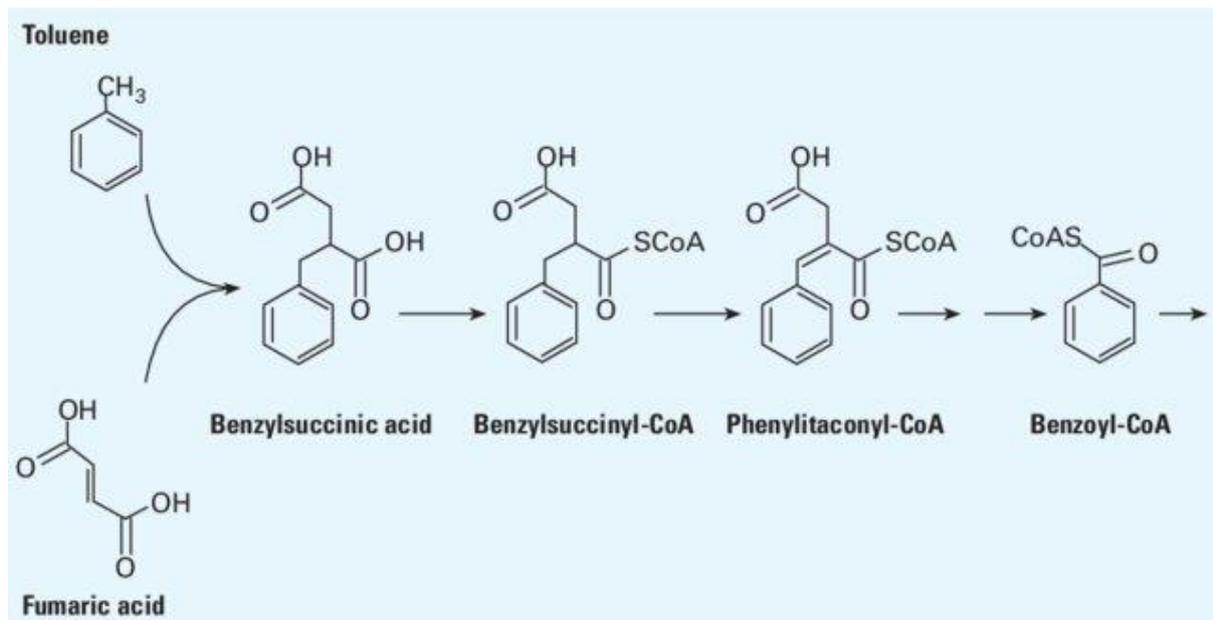


**Figure 12 :** Voies possibles du métabolisme des composés polyphénoliques alimentaires conduisant à la synthèse et à l'excrétion de l'hippurate [162].

**Transport et excrétion.** L'hippurate est exporté des hépatocytes dans la circulation systémique en forme libre grâce à sa nature hydrosoluble. Les transporteurs permettant l'internalisation et l'externalisation de l'hippurate dans les organes autre que les reins demeurent flous. La meilleure piste est la famille des Monocarboxylates transporters, spécialement MCT1 et MCT2. Présents sur la membrane plasmique des hépatocytes et dans une moindre mesure sur celle des cellules pancréatiques bêta, ils permettent le transport d'autres monocarboxylates comme le L-lactate et le pyruvate et permettraient celui de l'hippurate [168–171]. L'hippurate est initialement filtré par le glomérule rénal, un réseau de capillaires situé dans les néphrons du rein. Par la suite une sécrétion tubulaire active (utilisant des transporteurs énergivores) d'hippurate se produit dans le tubule proximal du néphron grâce notamment aux transporteurs OAT1 et OAT3 (transporteurs d'anions organiques) [164,165]. Une partie de l'hippurate peut être réabsorbée (minime), en fonction de la concentration plasmatique, et le reste, contenu dans le filtrat tubulaire, est exfiltré dans l'urine. La concentration retrouvée généralement chez l'Homme, dans l'urine est d'environ 1,83 mM (+/- 1,24 mM) en absolu ou 2,28 (+/- 1,43 mM) normalisé à la créatine chez les individus sains [172]. Sur 24h, l'hippurate mesuré par UPLC-MS/MS avoisinait les 6,28 (+/- 4,0) mmol / 24h chez les hommes et 4,79 (+/- 3,29) mmol / 24h chez les femmes [173]. Ces concentrations fluctuent en fonction du sexe, de l'alimentation (notamment en benzoate), de l'âge, de la composition du microbiote intestinal et de sa stabilité, de l'état de santé de l'individu (qui impacte l'homéostasie du microbiome et le fonctionnement des cellules de l'hôte) mais également de l'exposition à certains composés comme les toluènes [162,174,175].

### **1.3.2 Hippurate, d'outil à potentiel postbiotique**

**Mesure de la clairance rénale.** L'hippurate est avant tout connu comme un marqueur de la clairance rénale depuis 1949 [176]. Il est caractérisé comme une toxine urémique liée aux protéines (PBUT), c'est à dire un métabolite bioactif qui, de par son affinité avec des protéines plasmatiques comme l'albumine, n'est pas éliminé efficacement par l'hémodialyse conventionnelle et s'accumule en cas d'insuffisance rénale [162,177]. L'hippurate permet donc de caractériser l'état urémique de l'individu mais aussi indirectement son état de santé global, notamment lors de maladies cardio métaboliques [177,178].



**Figure 13 :** Métabolisation du toluène jusqu'à la production du précurseur de l'hippurate, le benzoyl-CoA qui sera conjugué à la glycine [179].

**Exposition au toluène.** Les travailleurs des secteurs de la peinture, de la fabrication de caoutchouc, de la production chimique et du raffinage du pétrole peuvent être exposés au toluène. Cette exposition se fait par inhalation ou contact cutané et une fois dans l'organisme, le toluène se distribue rapidement dans les tissus, notamment dans les tissus riches en lipides comme le cerveau et le tissu adipeux. Dépendamment de facteurs tels que la concentration, la durée et la voie d'exposition, l'exposition au toluène peut provoquer des lésions du système nerveux central, des maux de gorge, des vertiges, des maux de tête et une irritation des voies respiratoires supérieures et des yeux [174,175,180]. Cela nécessite donc des méthodes de surveillance rapides et fiables. Sur la quantité totale de toluène inhalé, 15 à 20 % sont éliminés par l'exhalation, tandis que les 80 % restants sont transformés en hippurate qui est excrété par l'urine après 7 heures [181]. La réaction de dégradation anaérobie du toluène implique l'ajout de fumarate au groupe méthyle. Cet intermédiaire subit ensuite une série de réactions jusqu'à la formation de benzoyl-CoA alors conjugué à la glycine. Cependant, comme la concentration d'hippurate est variable en fonction de l'individu et au sein de l'individu lui-même en fonction des jours et de la demi-vie de l'hippurate et son excrétion rapide, l'exposition faible de toluène est difficilement mesurable par l'hippurate. C'est pour cela que d'autres composés comme l'ortho-crésol sont utilisés [180].

**Polyphénols.** En épidémiologie nutritionnelle, l'hippurate peut être utilisé pour évaluer l'apport alimentaire en polyphénols et flavonoïdes (acide chlorogénique, l'acide quinique, l'acide cinnamique, acide chlorogénique et (+) -catéchine par exemple) contenus généralement dans les fruits, légumes, cafés et thés, présentant un intérêt significatif pour la santé. En effet, tout comme pour le toluène, l'hippurate peut être le produit final de la cascade de réaction de la métabolisation de ces polyphénols, tout d'abord par le microbiote intestinal bactérien puis par l'hôte. Dans chaque cas, après ingestion, l'hippurate urinaire reste le métabolite dominant [162,182]. Il en devient un marqueur indirect de la consommation de fruits et légumes et des bienfaits qu'ils apportent à santé notamment dans le cadre des maladies cardiométaboliques ou maladies liées à l'âge [183].

**Diversité alpha et richesse génétique du microbiote intestinal.** L'importance pour la santé du maintien d'une diversité élevée du microbiote pour la santé de l'hôte n'est plus à démontrer et il en va de même pour la richesse génétique de ce microbiote. L'hippurate est un des métabolites les plus corrélés positivement à cette diversité et cette richesse génétique. Précisément, l'hippurate, plasmatique et urinaire, est associé positivement à des bactéries du genre *Ruminococcaeae*, de la famille des *Rikenellaceae*, *Clostridiales*, et *F. prausnitzii*. *A contrario*, l'hippurate est négativement corrélé la classe *Erysipelotrichi*, à l'ordre *Actinomycetales*, à la famille *Lachnospiraceae* et au genre *Ralstonian* [184]. De même, l'hippurate peut être considéré comme un des métabolites les plus fortement associés à la richesse génétique du microbiote intestinal, ce qui fait de lui un témoin direct de l'homéostasie du microbiote intestinal [161,167,173,183].

**Santé métabolique.** Outre son utilité pour mesurer l'exposition et la consommation de certains composés, et la richesse du microbiote, l'hippurate s'est révélé être en corrélation avec la santé métabolique de l'individu [161,184]. Les concentrations d'hippurate plasmatiques sont inversement proportionnels à l'obésité, permettant notamment la discrimination des métabotypes au sein d'un groupe d'individus obèses [185], à l'hypertension [186] et à la stéatose hépatique [187]. De plus, la concentration plasmatique et urinaire d'hippurate est proportionnelle à la tolérance au glucose (capacité à gérer la glycémie) et la sensibilité à l'insuline [161,188].

Plus encore, dernièrement, l'administration chronique d'hippurate à des souris nourries avec un régime riche en graisse, réputé comme étant obésogène, pro-inflammatoire et vecteur d'insulino-résistance, a permis à ces souris de maintenir leur tolérance au glucose, d'améliorer leur sécrétion d'insuline et la densité de leurs îlots de Langerhans [161]. Le traitement de cellules bêta immortalisées (INS-1) a permis à celles-ci d'améliorer significativement leur sécrétion d'insuline [188].

### 1.3.3 Hypothèse et objectifs de thèse

L'hippurate, au-delà de son rôle classique d'outil et de biomarqueur, est désormais reconnu comme un métabolite clé dans la communication entre l'hôte et son microbiote. Les recherches récentes établissent un lien de causalité entre l'hippurate et la santé métabolique, suggérant qu'il pourrait avoir un impact direct sur l'homéostasie métabolique [161]. En préservant des organes essentiels comme le foie et le pancréas ainsi que leurs cellules respectives, les hépatocytes et les cellules bêta, il pourrait contribuer au maintien du métabolisme de l'individu, le préservant dans ce contexte de maladies cardiométaboliques. Toutefois, le mécanisme d'action de l'hippurate reste encore mal compris, ce qui constitue l'enjeu principal des travaux entrepris au cours de mon doctorat.

Les objectifs de ces travaux de thèse sont de disséquer les effets fonctionnels de l'hippurate sur la signalisation, le contrôle de la traduction et le métabolisme *in vitro* des hépatocytes d'une part et des cellules bêta pancréatiques d'autre part, dans le cadre des maladies cardiométaboliques plus spécifiquement le surplus d'acide gras libre et l'insulinémie chronique.

Pour cela, une confirmation des corrélations positives entre des niveaux hépatiques et circulant d'hippurate et la santé métabolique a pu être mise en place par l'analyse d'une cohorte humaine de patients atteints ou non de MASLD. Ces résultats de corrélation ont pu être mis en perspective des données avec des tests fonctionnels sur phénotype des hépatocytes et des cellules bêta en réponse à l'hippurate par la mesure, dans des contextes de stress induits par le palmitate ou l'insulinémie chronique, de la sécrétion d'insuline, de l'internalisation du glucose et du stockage des triglycérides. Pour aller plus profondément, le métabolisme des hépatocytes et sa modification par l'hippurate ont été mesurés et quantifiés par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Enfin, les voies de signalisation potentiellement cibles de l'hippurate ainsi que leur contrôle sur la traduction des ARNm et la composition du protéome ont été analysées au niveau des cellules bêta pancréatiques et des hépatocytes par des techniques simples d'immunologies, de fractionnement de ribosome et de protéomique.

## 2 Matériels et méthodes

---

### 2.1 Analyse de la cohorte ABOS

La cohorte Atlas Biologique de l'Obésité Sévère (ABOS) est une collection de tissus métaboliques (livre, muscle, tissus adipeux viscéraux et sous-cutanés, intestin) et d'échantillons sanguins (plasma, sérum, ADN) collectés dans le cadre d'un essai clinique en cours (NCT01129297). Le projet PreciNASH (PreciNASH ANR-16-RHUS-006), vise à développer des modèles prédictifs de la MASH afin de prédire la progression de la maladie chez les patients à risque et d'évaluer les effets à long terme des traitements ciblés pour une médecine de précision [31]. Pour la présente étude, un sous-ensemble de 318 patients dont les niveaux d'hippurate ont été mesurés à la fois dans le foie et dans le sérum a été étudié. Les patients présentant un score de stéatose  $\geq 1$  (indiquant  $>5$  % de la surface du foie affectée par la stéatose) ont été classés comme patients atteints de MASLD. Parmi eux, les patients présentant à la fois un gonflement des hépatocytes et une inflammation ont été classés dans la catégorie MASH [30]. Selon cette classification, 146 patients souffraient d'une MASLD sans MASH et 81 patients avaient une MASH.

**RNA-seq.** L'ARN a été extrait de biopsies hépatiques et traité à l'aide du kit KAPA RiboErase (Humain, souris, rat, Roche Sequencing) et du kit KAPA RNA HyperPrep (Roche Sequencing). Les bibliothèques ont été séquencées en  $2 \times 75$  bp paired-end reads avec le système NovaSeq6000 Illumina. En moyenne, plus de 72 millions de reads par échantillon ont été générés, et plus de 95 % ont été cartographiés avec précision sur le génome humain (hg38). Le démultiplexage des données de séquence a été effectué à l'aide du logiciel de conversion bcl2fastq (Illumina ; version v2.20.0.422). Le contrôle qualité a été effectué à l'aide du logiciel FastQC (version v0.11.9). L'élimination des séquences adaptatrices et des bases de faible qualité a été réalisée avec Trimmomatic (version v0.39). Les séquences lues ont ensuite été mises en correspondance avec le génome humain (GRCh38) à l'aide de l'aligneur Star (version v2.7.3a). Les étapes de comptage brutes et normalisées ont été calculées à l'aide de RSEM v1.3.0 avec un fichier GTF provenant de GENCODE version 38. La version 104 d'Ensembl a été utilisée pour attribuer des identifiants de gènes pour les comptages RSEM. Ces comptages ont ensuite été lus à l'aide du package R tximport et normalisés à l'aide de la méthode VST du package R DESeq2. Pour chaque patient, les données Transcripts Per Million (TPM) des transcrits de 60 649 gènes différents ont été obtenues. Les valeurs de TPM inférieures à 1 ont été exclues de toute analyse ultérieure chez tous les patients.

**Métabolomique non ciblée.** Les échantillons de plasma et de foie ont été préparés et profilés par Metabolon (Durham, NC) en utilisant la méthode UHPLC-MS/MS décrite en détail en 2017 par Long T. et collaborateurs dans Nature Genetics [32]. Les échantillons hépatiques ont été extraits comme décrit en détail en 2023 par Raverdy V. et al. dans Obesity [31].

Les métabolites annotés et les caractéristiques inconnues ont été identifiés en comparant les caractéristiques de l'échantillon avec les caractéristiques d'un ion dans une base de données de référence de normes chimiques pures et d'inconnus précédemment détectés, suivi d'une inspection visuelle détaillée et d'un contrôle de qualité comme en 2010 par Dehaven C.D. et collaborateurs dans Journal of Cheminformatics [33]. Il a été réalisé par Metabolon, Inc. (Morrisville, USA).

## 2.2 Biologie cellulaire et moléculaire

### 2.2.1 Culture cellulaire

L'ensemble des lignées cellulaires ont été fournies par le laboratoire

**Min6** : Les cellules bêta d'insulinome de souris ont été maintenues proche de la confluence dans du milieu DMEM GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, 10569010) complété de 15% SVF, Pénicilline / Streptomycine 50 U/mL, HEPES 10 mM (Thermo Fisher Scientific, 15630056) 10 mM et 2-mercaptoéthanol 0,05 mM (Gibco™ 31350010) en incubateur à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Elles ont été utilisées entre les passages 20 et 30 et ont été passées 2 fois par semaine par 1/3.

**INS-1E** : Les cellules bêta d'insulinome de rat ont été maintenues proche de la confluence dans du milieu RPMI 1640 (21875034) complété de SVF 10%, Pénicilline / Streptomycine 50 U/mL, Sodium pyruvate (11360039) 1 mM, HEPES 10 mM ((Thermo Fisher Scientific, 15630056)), 2-mercaptoéthanol 0,05 mM (Gibco™, 31350010) et Sodium Pyruvate 1mM (Gibco™, 11360039) comme indiqué par le fournisseur AddexBio, en incubateur à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Elles ont été utilisées entre les passages 10 et 20 et ont été passées 2 fois par semaine au 1/3.

**HEPG2** : Les hépatocytes de carcinome hépatocellulaire ont été maintenues proche de la confluence dans du milieu DMEM GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, 10569010) complété de 10% SVF, Pénicilline / Streptomycine 50 U/mL et d'acides aminés non essentiels MEM 1% (11140035) en incubateur à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> [189]. Elles ont été passées 2 fois par semaine au 1/4.

**IHH** : Les hépatocytes humains immortalisés (IHH) [190] ont été maintenues proches de la confluence dans du milieu William's E (Thermo Fisher Scientific, 12551032) supplémenté avec 10% de FBS, MEM Non-Essential Amino Acids Solution 1X (Thermo Fisher Scientific, 11140035), HEPES 10 mM (Thermo Fisher Scientific, 15630056), 2-mercaptoéthanol 0,05 mM

(Gibco™ 31350010) et pénicilline/streptomycine 50 U/ml (Thermo Fisher Scientific, 15140122) en incubateur à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été utilisées entre les passages 29 et 35. Les cellules ont été passées 2 fois par semaine au ¼. [191].

### 2.2.2 Traitements

**Hippurate** : L'acide hippurique (Sigma 112003-5G) sous forme de poudre est dissous dans du DMSO 100% pour une solution mère de 180 mM et stocké sous forme d'aliquotes à -25°C. Une solution de DMSO 100% est utilisée comme contrôle de l'effet du DMSO sur les cellules.

**eFT508** : L'eFT508 (Tomivosertib Merchpress) est dissout dans du DMSO 20% pour une solution mère de 0,5 mM gardée sous forme d'aliquotes à -80°C.

**Palmitate** : Le palmitate (Sigma P9767-5G) sous forme de poudre a été dissous dans de l'éthanol 50% sous agitation pendant 30 min à 60°C pour une concentration finale de 150 mM. Par la suite, cette solution palmitate-éthanol a été conjuguée à une solution de BSA 10% (dépourvue d'acides gras), dissoute dans du milieu complet (formule dépendant des cellules utilisées), pendant 2 h sous agitation à 37°C pour une concentration finale de 7,14 mM. La solution BSA-palmitate a été filtrée par seringue (0,22 µM) avant d'être stockée sous forme d'aliquotes à -25°C[192] Une solution suivant le même processus de préparation sans le palmitate a été utilisée comme contrôle de l'effet de la solution sur les cellules.

**Insuline** : Les cellules ont été traitées avec une solution d'insuline (Sigma-Aldrich, I9278) pendant 24h à 100 nM afin de mimer une insulino résistance et/ou à 200 nM pendant 1h afin de visualiser les effets de l'insuline sur les différentes métriques analysées [190]

**ARNsi** : 24 h après l'ensemencement en plaque, les cellules ont été transfectées avec un ARNsi (Smartpool, Dharmacon) dirigé contre l'ARNm de Slc16A1, le gène codant pour le transporteur de monocarboxylate 1 (MCT1). Après 48h de transfection au ARNsi, le milieu est complété avec de l'hippurate à 500µM final pendant 1 h pour la quantification par métabolomique ciblée et/ou 24 h pour le profilage du métabolome par méthode non ciblée. Un ARNsi sans cible (siNTP ou NTP) est utilisé comme contrôle de l'effet du ARNsi sur les cellules.

**AZD3965** : Les cellules ont été traitées avec une solution de 10 µM AZD3965 (MedChem Express, HY-12750), un agent inhibiteur des transporteurs MCT1 et MCT2, pendant 10 min avant que le milieu soit complété avec 500 µM d'hippurate pendant 1 h pour la quantification par métabolomique ciblée.

### 2.2.3 Test de viabilité

Les cellules (Min6, INS-1E ou HepG2) ont étéensemencées et cultivées dans du milieu complet à raison de 20 000 cellules par puits dans des plaques 96 puits. 24 h après l'ensemencement, les cellules ont été cultivées dans du milieu complet comprenant les

drogues : DMSO ou eFT508 ou Hippurate pendant 24 h. Le kit CellTiter-Glo® Luminescent (Promega, G7570), son protocole et ses réactifs sont utilisés 48 h après l'ensemencement pour une lecture de la luminescence.

#### **2.2.4 Stimulation de l'insuline par le glucose (GSIS)**

A T = 0 h les cellules ont étéensemencées à raison de 20 000 cellules/puit dans des plaques 96 puits. A T = 48 h, le milieu complet INS-1E a été changé pour du milieu complet INS1E +/- hippurate 500µM. A T = 72 h, une fois fixées, les cellules ont été lavées au PBS et pré incubées dans un tampon de privation de nutriment (Krebs® de Human Cell Design, BSA 0,1%) comprenant les mêmes concentrations de drogues pendant 1h. Le GSIS a été réalisé en incubant des puits en quadruplicata dans ce même tampon de starvation, complété avec du glucose 2,8 mM (condition basale) ou 16,7 mM (condition haute en glucose) pendant 1h. L'insuline sécrétée a été récupérée dans le tampon des puits. Les protéines intracellulaires (dont l'insuline) ont été récupérées après lyse par un tampon TETG avec inhibiteurs de protéases pendant 2 min sur glace. L'insuline sécrétée et l'insuline intracellulaire ont été mesurées à l'aide d'un kit ELISA (Mercodia 10-1113-10) puis l'insuline sécrétée a été normalisée par l'insuline intracellulaire

#### **2.2.5 Internalisation du glucose**

L'absorption du glucose a été évaluée à l'aide du kit de détection colorimétrique du glucose d'Invitrogen™ (EIAGLUC) en suivant les instructions du fabricant. Le milieu de culture a été prélevé à 3 moments : T (0) milieu en contact avec les cellules, T (24) après un traitement des cellules avec de l'hippurate (DMSO (pour le contrôle) et/ou 100 nM d'insuline pendant 24 h et T (25) après 1 h de traitement avec 200 nM d'insuline. Ces échantillons de milieu de culture ont été dilués au 1 :15 avec le tampon de dosage du kit pour s'assurer que la concentration en glucose des échantillons se situe dans la courbe d'étalonnage. Ces échantillons dilués ont été placés dans une plaque à 96 puits. Du concentré de peroxydase de raifort (HRP) à 1X, du substrat et de la glucose-oxydase à 1X ont ensuite été ajoutés à chaque échantillon. Les échantillons ont été incubés pendant 30 min à température ambiante. Ensuite, l'absorbance a été lue à 560 nm avec le Glomax Discoverer (Promega, GM3000).

#### **2.2.6 Gradient de polysomes**

**Préparation biologique** : A T = 0 h, les cellules ont étéensemencées à raison de 10<sup>7</sup> cellules par B10. A T = 48 h, le milieu complet a été changé pour du milieu complet supplémenté en hippurate 500 µM et/ou palmitate 600 µM. A T = 49 h, de la cycloheximide (CHX) a été ajoutée pour une concentration finale de 100 µg/mL pour 15 min à 37°C. Les cellules ont ensuite été

lavées au PBS + CHX à température ambiante avant d'être resuspendues grâce à 90 s de trypsine + CHX. Les cellules ont ensuite été récupérées dans du PBS froid + CHX, centrifugées à 750 rpm pendant 10 min en étant maintenues à 4°C et les culots ont été congelés à -80°C avant l'envoi en carboglace [193].

**Préparation du gradient de polysomes** : Les solutions de sucrose utilisées pour séparer les polysomes ont été préparées à partir de sucrose 31%, Tris-acétate pH 7,6 50 mM, NH<sub>4</sub>CL 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 12 mM et DTT 1 mM. Ces solutions ont été congelées/décongelées trois fois pour obtenir un gradient homogène. Le tampon de lyse a été préparé à partir de 10 mM Tris-HCL pH 7,4, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 30 mM et de cycloheximide 50 µg/mL et stocké à -20°C avant une utilisation à 4°C [193].

**Protocole du gradient de polysomes** : Les culots cellulaires stockés à -80°C ont été resuspendus par 200µL de tampon de lyse à 4°C. Ils ont ensuite été homogénéisés par dix passages dans une seringue-aiguille avant d'être centrifugés à 15 000 rpm pendant 10 min en étant maintenus à 4°C. Le surnageant entre la pellicule de gras de surface et le culot a été récupéré et sa DO 260 nm mesurée. Ce surnageant a été déposé délicatement à la surface des gradients de sucroses à 4°C. Les tubes de gradients ont été centrifugés à 30 000 rpm pendant 3h en étant maintenus à 4°C. Les échantillons migrés ont ensuite été lus par une lampe à mercure et les différentes fractions ont été collectées par le collecteur Teledyne Foxy R1. Les résultats sont générés par un détecteur Teledyne Isco UA-6 UV/VIS en version papier. Les différentes fractions ont enfin été congelées à -80°C en l'attente d'une future utilisation [193].

## 2.2.7 Dosage des triglycérides intracellulaires

Après 24 h de traitement avec 500 µM d'hippurate (DMSO pour le contrôle) et/ou 100 nM d'insuline (eau pour le contrôle) ou 600 µM de palmitate, les cellules ont été lavées avec du PBS à température ambiante, puis fixées pendant 30 min avec 4% de formaldéhyde. Les puits ont été lavés à nouveau avec du PBS avant que les cellules ne soient perméabilisées pendant 5 min avec de l'isopropanol à 60%. L'isopropanol a été éliminé et les cellules ont été incubées dans une solution filtrée d'Oil Red O à 60 % pendant 15 min. Les puits ont ensuite été lavés 5 fois avec de l'eau distillée avant d'être replacés dans du PBS pour prendre des photos (Invitrogen™ EVOS™ XL Core Imaging System, 15339661, 10X/0,25). Les cellules ont été lysées pendant 5 min dans de l'isopropanol à 100% avant que l'absorbance des puits ne soit lue à 490 nm avec le Glomax Discoverer de Promega (GM3000) [194]. L'absorbance de chaque puits est ensuite normalisée par rapport au nombre de cellules dans les puits à l'aide du logiciel Image J.

## 2.2.8 Protéomique

**Préparation des échantillons :** Les cellules INS-1E sontensemencées à T=0h à raison de 10<sup>6</sup> cellules/puit dans une plaque 6 puits. A T = 48 h, le milieu complet INS-1E est changé pour du milieu complet INS-1E +/- hippurate 500 µM. A T = 49 h, Les cellules sont lavées au PBS froid (4°C) et resuspendues par grattage. Cette resuspension est centrifugée à 2500 rpm pendant 10 min en étant maintenue à 4°C. Le culot est resuspendu dans du tampon de lyse (RIPA/Anti protéases/anti phosphatases/DTT) 30 min dans la glace puis centrifugé à 14 000 rpm pendant 15 min en étant maintenu à 4°C. Le surnageant est récupéré et la concentration en protéines est mesurée grâce au kit BCA (Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit). La concentration en protéines des échantillons est réglée à 1mg/mL avant d'être stockée à -80°C en l'attente d'envoi au CRCM (Inserm UMR1068) en carboglace. La plateforme

**Profilage du protéome :** L'équipe Protéomique et Spectrométrie de Masse (Inserm UMR1068) dirigée par Stéphane Audebert (stephane.audebert@inserm.fr) et Luc Camoin (luc.camoin@inserm.fr) héberge la plateforme de protéomique Map Protéomique labélisée GIS-IBiSA. C'est par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) grâce au Ultimate 3000RSLCnano chromatography system (Thermo Fisher Scientific, ULTIM3000RSLCNANO) couplé au Orbitrap Fusion Lumos Tribrid Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, IQLAAEGAAPFADBMBHQ) dont le protocole est comme suit dans la publication de 2024 [195], que les lysats cellulaires ont été analysés. Les 5166 protéines ont été identifiées par Data Independant Acquisition (DIA).

## 2.2.9 RT-qPCR

24 h après l'ensemencement, les cellules ont été transfectées avec un siRNA (Smartpool, Dharmacon) dirigé contre Slc16A1, l'ARN codant pour le transporteur de monocarboxylate 1 (MCT1). Les cellules ont été pré-transfectées pendant 48 h avec les siRNAs (ou NTP pour le contrôle) avant d'être traitées avec 500 µM d'hippurate soit pendant 1 h (pour la quantification par métabolomique ciblée) soit pendant 24 h (pour le profilage du métabolome). L'ARN a été extrait à l'aide du kit Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ RNA Stool (Thermo Fischer Scientific, 740130.50). Les cellules ont été lysées directement dans les puits de la plaque et les instructions du kit ont été suivies. Dès que l'ARN a été isolé, sa concentration et sa pureté ont été estimées à l'aide d'un nanodrop (ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies). La rétrotranscription (RT) a été réalisée à l'aide du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific, 4368813) (tampon, mélange de dNTP 100 mM, amorces communes et transcriptase inverse à 50U/µL). 400 ng d'ARN purifiés ont été utilisés avec le kit et incubés comme suit : 25°C/10 min + 37°C/120 min + 85°C/5 sec dans l'instrument GeneAmp™ PCR System 9700. Les résultats de la RT ont été utilisés pour la

qPCR avec le SYBR Green comme colorant de quantification, en utilisant un QuantStudio™ 7 Pro avec 40 cycles comme suit : 50°C/2 min + 95°C/10 s + 60°C/1 min + 95°C/1. Les amorces utilisées sont celles publiées en 2021 [196].

### 2.2.10 Western blot

**Phosphorylation** : A T = 0 h, les cellules ont étéensemencées à raison de 10<sup>6</sup> cellules/puit dans une plaque 6 puits. A T = 48 h, le milieu complet a été changé pour du milieu complet supplémenté par de l'hippurate et/ou du palmitate et ou/de l'insuline. A T = 49 h, les cellules ont été lavées au PBS froid (4°C) et resuspendues par grattage. Cette resuspension a été centrifugée à 2500 rpm pendant 10 min en étant maintenue à 4°C. Le culot a été resuspendu dans du tampon de lyse (RIPA/Anti protéases/anti phosphatases/DTT) 30 min dans la glace puis centrifugé à 14000 rpm pendant 15 min en étant maintenu à 4°C. Une quantité similaire de protéines, déterminée par la méthode BCA (Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit), a été déposée dans les puits d'un gel précoulé (Mini-PROTEAN TGX Gels Bio-Rad) après dénaturation 5 min à 95 °C pour une migration SDS-PAGE. Le contenu du gel a été transféré sur une membrane de nitrocellulose puis bloqué à l'aide d'un tampon de blocage (Tris-glycine 1X, BSA 5%) avant d'être incubé la nuit à 4°C dans du tampon de blocage complétement avec des anticorps primaires dirigés contre eIF4E phosphorylé sérine 209 (44-528G), ERK1 phosphorylé en tyrosine 204/187, ERK2 phosphorylé en thréonine 202/185 [197], et Akt phosphorylé en thréonine 308 (Lapin) [198] et un contre la β-actine (Souris). La membrane a été lavée au TBST avant d'être incubée avec des anticorps secondaires dirigés contre les épitopes de la souris et du lapin, conjugués respectivement à des fluorochromes émettant à 680 et 760 nm. La fluorescence de la membrane a été lue grâce à l'Odyssey.

**Puromycine** : [199] Le protocole a été le même qu'en 2.10. en ajoutant 30 min avant la récolte cellulaire le milieu complet comprenant les traitements auquel est ajouté 1 µM de puromycine dihydrochloride 6 (Sigma, P8833). L'anticorps primaire utilisé lors du Western blot est dirigé contre la puromycine (souris).

## 2.3 Métabolomique

### 2.3.1 Préparation des échantillons pour UHPLC-HRMS

Les cellules IHH ont été traitées avec de l'hippurate (DMSO pour le contrôle) soit pendant 1 h (métabolomique ciblé) soit pendant 24 h (métabolomique non ciblée). Après traitement, le milieu complet a été retiré et les puits ont été lavés 1 fois avec du milieu complet pour la méthode non ciblée ou au dPBS pour la méthode ciblée. Les cellules ont été mises en contact avec du méthanol 100% contenant 40µg/µL d'acide hippurique-d<sub>5</sub> (HAd<sub>5</sub>) et/ou d'acide propanoïque (PAA) et/ou de PAA-d<sub>5</sub> à -20°C puis remises en suspension par grattage afin d'être transférées dans des microtubes de 1,5 mL. Les cellules ont été vortexées deux fois pendant 15 s puis centrifugées à 14 000 g à 4°C pendant 5 min. Le surnageant de l'échantillon contenant les métabolites extraits de la cellule a été transféré dans un nouveau microtube avant d'être évaporé pendant 3 h à 37°C [200–202]. Pour des raisons pratiques, les échantillons secs ont été conservés à -20°C pendant une nuit. Ils ont ensuite été reconstitués avec un tampon de resuspension dépendant de la colonne utilisée : 5% méthanol pour la colonne C18 ou 80% ACN pour la colonne HILIC.

### 2.3.2 Génération des données

#### 2.3.2.1 Séparation des échantillons

La phase de séparation a été réalisée grâce à un système Vanquish DUO UPLC (Thermo Fisher, Bremen, DE) couplée à un spectromètre de masse Orbitrap Exploris 240 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) dont la méthode (C18 ou HILIC) de séparation, d'acquisition et de traitement des données dépendait du solvant de reconstitution utilisé.

Pour la méthode C18, les échantillons ont été injectés sur la colonne Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ (15cm ×2,1 mm ID, 1,9 µm de taille de particules) à 45°C. Les phases mobiles ont été réalisées à l'aide de (A) H<sub>2</sub>O avec 0,1 % d'acide formique et (B) méthanol avec 0,1 % d'acide formique (Table 1). Le volume d'injection était de 5 µl [203].

Pour la méthode HILIC, les échantillons ont été injectés dans la colonne Waters Acquity UPLC BEH amide (150 mm x 2,1 mm ID, 1,7 µm de taille de particule) à 45 °C. Les phases mobiles ont été réalisées à l'aide de (A) H<sub>2</sub>O avec 10 mM de formiate d'ammonium et 0,125 % d'acide formique et (B) ACN : MeOH 95 : 5 v/v avec 10 mM de formiate d'ammonium et 0,125 % d'acide formique (Table 2). Le volume d'injection était de 3 µl [204].

**Tableau 1 :** Récapitulatif des paramètres et gradient de la chromatographie en phase liquide C18

<b>Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™</b>	
<b>Solvant de reconstitution</b>	<b>de</b> H <sub>2</sub> O : 5% MeOH
<b>Température</b>	40°C
<b>Phase liquide A</b>	H <sub>2</sub> O : 0,1% Acide formique
<b>Phase liquide B</b>	MeOH : 0,1% Acide formique
<b>Débit</b>	300 µL/min
<b>Volume injection</b>	5 µL
<b>Time (min)</b>	<b>% B</b>
0	0
6	50
8	98
13	98
13,1	0
15	0
Stop Run	

**Tableau 2 :** Récapitulatif des paramètres et gradient de la chromatographie en phase liquide HILIC

<b>Waters Acquity UPLC BEH amide</b>	
<b>Solvant de reconstitution</b>	H <sub>2</sub> O : 20 % ACN
<b>Température</b>	45°C
<b>Phase liquide A</b>	H <sub>2</sub> O : 0,125% Acide formique + 10 mM formiate d'ammonium
<b>Phase liquide B</b>	ACN : MeOH 95 : 5 + 10 mM formiate d'ammonium
<b>Débit</b>	400 µL/min
<b>Volume injection</b>	3 µL
<b>Time (min)</b>	<b>% B</b>
0	100
2	100
7,7	70
9,5	40
10,25	30
10,75	100
16,75	100
Stop Run	

### 2.3.2.2 Acquisition des données

Une calibration externe est réalisée sur le spectromètre avant chaque analyse avec la solution Pierce™ FlexMix™ Calibration (référence : A39239, lot : XD347205, Thermo Fisher, Bremen, DE, Table 3).

**Tableau 3 :** Composants de la solution Pierce™ Flexmix™ Calibration pour la calibration et leurs masse expérimentale respectives

Composés	Positif	Négatif
	Masse expérimentale (m/z)	Masse expérimentale (m/z)
Acide acétique qualité LC/MS		59,0128
Imidazole	69,0447	
Triéthylamine	102,1277	
Acide trifluoroacétique (TFA)		112,9845
Tétraméthylpipéridine	142,1590	
Acide pentafluoropropionique		163
Caféine	195	
Hexaméthoxyphosphazène	322,0181	
Acide erfluohexanoïque		363
MRFA	524	
2,4,6-Tris(heptafluoropropyl)-1,3,5-triazine		601,9779
Hexakis(2,2-difluoroéthoxy)phosphazène	622,0289	
Hexakis(2,2,3,3-tetrafluoropropoxy)phosphazène	922,0098	1033,9870
Ultramark 1621	1022,0034	1233,9742
	1121,9970	1333,9678
	1221,9906	1433,9614
	1321,9842	1533,9550
	1421,9778	1633,9486
	1521,9714	1733,9422
	1621,9650	1833,9394
	1721,9586	1933,9294
	1821,9522	2033,9230
	1921,9458	2133,9166
2021,9394		
Hexakis(1h,1h,7h-perfluoroheptoxy)phosphazène	2121,9331	2233,9104
Hexakis(1h,1h,9h-perfluorononyloxy)phosphazène	2721,8948	2833,8720

Après séparation par UPHLC, la spectrométrie de masse a été réalisée à l'aide de l'Exploris 240 (Q-Orbitrap, Thermo Fisher, Bremen, DE) avec une source d'ionisation par électrospray (ESI) (Thermo Fisher, Bremen, DE) fonctionnant en modes d'ionisation positive et négative (Table 4)

**Tableau 4** : Récapitulatif des paramètres du spectromètre de masse en fonction de la méthode utilisée

Paramètres	C18	HILIC
Spectromètre	Exploris 240 (Q-Orbitrap, Thermo Fisher, Bremen, DE)	
Source d'ionisation	Electrospray (ESI) (Thermo Fisher, Bremen, DE)	
Ionisation	Positif et négatif	
Tension de pulvérisation	3500 V positif / 3000 V négatif	3600 V positif / 3000 V négatif
Mode gaz	Statique	Statique
Gaz de gaine	40	60
Gaz auxilliare	8	25
Gaz de balayage	1	
Température tube transfert d'ions	275°C	320°C
Température du vaporisateur	320°C	350°C
Résolution de l'orbitrap	60 000	
Lentille RF	70%	
Type de données	Profile / Centroïde	Centroïde
Seuil d'intensité	1,00E+05	5,00E+03
Acquisition m/z	67-1000	
Ethalonnage interne de la masse	Fluoranthène (Thermo Fisher, Bremen, DE)	
Mode acquisition spectre MS/MS	DDA avec 5 balayages dépendants	DDA avec 4 balayages dépendants
Fenêtre d'isolation m/z	2	
Energie de collision	Normalisée	
Energie de collision HCD	30V, 50V, 150V	20V, 30V, 40V
Résolution orbitrap	30 000	15 000
Mode gamme de balayage	Automatique	

**Deepscan** : Les échantillons regroupés ont été analysés à l'aide de la stratégie DeepScan UHPLC-HRMS. Les paramètres expérimentaux utilisés étaient les suivants : facteur d'exclusion de 10, extension de la fenêtre des pics de la liste d'exclusion et d'inclusion de 1 s, seuil de fragmentation des pics de la liste d'inclusion de 50 % et durée d'exclusion de 10 s. En mode positif, l'ion préféré était [M+H]<sup>+</sup>, tandis qu'en mode négatif, l'ion préférentiel était [M-H]<sup>-</sup>. Chaque échantillon groupé a été analysé selon la séquence suivante : 2 blancs d'en-tête et 6 injections d'échantillon. Les deux blancs et la première injection d'échantillon ont été mesurés en mode plein balayage, tandis que les autres échantillons ont été mesurés en mode

DDA. Le deuxième blanc a été utilisé pour créer la première liste d'exclusion, tandis que la première injection d'échantillon a été utilisée pour créer la première liste d'inclusion.

### 2.3.3 Traitement des données UHPLC-HRMS

**Génération de la table de features** : Les données UHPLC-HRMS ont été traitées séparément pour chaque méthode UHPLC-HRMS en utilisant la version 4.9 de MS-DIAL (RRID:SCR\_023076) [205]. Le DeepScan de chaque échantillon regroupé et de chaque méthode UHPLC-HRMS a également été traité séparément avec MS-DIAL. Les tolérances MS1 et MS2 ont été fixées à 0,0015 et 0,05 Da, respectivement, en mode profile/centroïde pour les données C18 et centroïde/centroïde pour les données HILIC. Les pics ont été alignés sur un fichier de référence QC avec une tolérance de temps de rétention (RT) de 0,1 min et une tolérance de masse de 0,0015 Da. L'annotation des features (paires m/z - temps de rétention) a été effectuée avec la base de données spectrales GNPS (base de données spectrales publique (niveau MSI 2)) et IROA (base de données spectrales interne (niveau MSI 1)) avec des tolérances MS1 et MS2 de 0,01 et 0,05 Da, respectivement. Les tableaux des aires des pics résultant du traitement MS-DIAL des données UHPLC-HRMS ont été exportés.

**Nettoyage des données** : Les tableaux de surfaces de pics résultant du prétraitement MS-DIAL des données UHPLC-HRMS décrites ci-dessus ont été affinés comme suit : 1) Les données MS2 et les annotations des échantillons analysés avec l'approche DeepScan ont été transférées aux features UHPLC-HRMS sans MS2 (en utilisant comme critère de correspondance une tolérance de masse de 5 ppm et un temps de rétention moyen entre les limites gauche et droite des features détectées dans les passages DeepScan). 2) les InChIKeys, des formules moléculaires ont été ajoutées pour les pics annotés. 3) Les adduits MS-DIAL ont été corrigés en fonction de ces formules. 4) Pour chaque composé annoté, seul l'adduit présentant la plus grande surface de pic moyenne a été conservé. 5) Ensuite, les données des projets MS-DIAL (positives et négatives) ont été combinées. 6) Enfin, le nom IUPAC et les classes chimiques (ClassyFire) ont été ajoutés.

Avant l'analyse statistique des données, le tableau des aires des pics a été filtré pour n'inclure que les aires des features ayant moins de 30 % de RSD dans les échantillons QC. Les features dont les zones présentent un coefficient de corrélation (dans les échantillons de dilution QC) supérieur à 0,9 ont été conservées. Enfin, les données ont été normalisées par quotient probabiliste (PQN) et mise à l'échelle automatique (auto scaling). Cela a été réalisé grâce à R Statistical Software (v4.1.2; R Core Team 2021).

**Quantification** : Tous les standards chimiques, y compris les standards analytiques authentiques (ASD) et le standard interne SIL (ISD), se présentaient sous forme de poudre granuleuse et ont été conservés à -20 °C lorsqu'ils n'étaient pas utilisés. Les solutions mères des standards individuels ont été préparées en pesant la poudre originale avec une précision

de 0,1 mg sur une balance d'analyse Semi Micro OHAUS (OHAUS Pioneer, OHAUS Europe GmbH, Nänikon, Suisse) et en la dissolvant dans du MeOH pour obtenir une concentration finale de 100 µg/mL ou moins.

Les données «.raw » acquises en mode de balayage complet (full scan) ont été inspectées manuellement dans le navigateur XCalibur Qual version 4.3 (Thermo Fischer Scientific, OPTON-30965). L'intégration automatique des pics par lots a été réalisée grâce au logiciel Tracefinder 5.1 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Des solutions standard d'étalonnage de 10 nmol/L à 2 µmol/L ont été préparées, et une courbe d'étalonnage avec 6 points consécutifs a été générée pour HA, avec le rapport de la surface du pic de l'ion quantique ASD (HA) sur l'ISD (HA-D5) en axe y et le rapport de la quantité ASD sur ISD en axe x. Les résultats de l'auto-intégration de la surface des pics dans TraceFinder ont été contrôlés manuellement dans XCalibur. Les limites de détection (LOD) et d'acquisition (LOQ) ont également été acquises.

## **2.4 Analyses statistiques :**

### **2.4.1 Analyse de la cohorte ABOS**

L'âge et le sexe ont été utilisés comme covariables dans toutes les analyses PreciNASH. Les corrélations de Spearman ajustées ont été calculées avec ppcor (v1.1) sous l'environnement R. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer deux groupes. L'âge et le sexe ont été utilisés comme covariables dans toutes les analyses des données de la cohorte. Les corrélations de Spearman ajustées ont été calculées avec ppcor (v1.1) sous l'environnement R (v4.2.1). Une analyse d'enrichissement de l'ensemble des gènes a été réalisée à l'aide de Metascape [39] sur les gènes significatifs associés négativement à l'hippurate dans les deux tissus (foie ou plasma).

### **2.4.2 Biologie cellulaire et moléculaire**

Les données ont été analysées sur GraphPad Prism (version 5.0.0 for Windows, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA). Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. L'analyse statistique des données entre 2 groupes a été réalisée par un test T de Student non apparié dans le cas où les données uivaient une loi normale, remplacé par un test de Mann Whitney si ce n'était pas le cas. Pour les analyses des données avec 2 variantes (traitement et temps, deux traitements etc), une ANOVA à 2 facteurs avec et sans interaction a été appliquée et si le facteur traitement était significatif, un test de comparaisons par paire (test LSD de Fisher) ou de comparaisons multiples (Bonferroni) a été réalisé. La significativité statistique a été définie comme p.value < 0,05.

### 2.4.3 Métabolomique

Les analyses statistiques en métabolomiques et les figures qui en découlent ont toutes été effectuées sur R Statistical Software (v4.1.2; R Core Team 2021). Seule exception : la quantification de l'hippurate intracellulaire où l'analyse a été faite comme dans la section 2.4.2.

**Visualisation de la répartition des données** : L'analyse en composante principale (PCA), permettant de transformer les variables très corrélées en variables décorréelées les unes des autres afin d'en réduire les dimensions et de les projeter plus simplement sur un plan lisible, était utilisée ici à des fins de lecture de la variabilité et de la connexion entre les différents groupes (traitement, temps etc) [206]. Cependant, la variabilité au sein des groupes était importante et la séparation de ceux-ci assez floue. Pour cela, la régression aux moindres carrés (PLS) a été privilégiée, notamment sa version discriminante (PLS-DA). Au lieu de n'utiliser que la variance des différents groupes, la PLS prend en compte la covariance entre les groupes (variance et corrélation entre eux) et permet ainsi d'appliquer une régression des variables d'un groupe sur l'autre, ce qui améliore indirectement la séparation des groupes. La PLS-DA permet en plus d'associer les variables à des classes prédéfinies (groupes) [207]. Même après cela, si les groupes étaient tout de même superposés, il était approprié de faire une PLS orthogonale (OPLS) [208]. Celle-ci permet de visualiser la séparation des groupes en ne prenant en compte que les variables responsables de cette séparation et en ne montrant que deux dimensions (composantes), une prédictive ( $p_1$ ) et une variation orthogonale à la première composante ( $o_1$ ). Sa version discriminante (OPLS-DA), permettant également d'allouer des classes à ses variables, offrait une vision simple et concise de la séparation des groupes mais surtout de la force de celle-ci par la prédictivité du modèle (notamment avec le CV-AUROC ou le ratio R<sup>2</sup><sub>Y</sub>/Q<sup>2</sup><sub>Y</sub>). Afin d'analyser plus que deux groupes, 4 en l'occurrence, il était pertinent d'utiliser la version symétrique de l'OPLS : l'O<sup>2</sup>PLS [209].

**Visualisation de l'impact des conditions sur le métabolisme** : L'analyse statistique des données entre 2 groupes a été réalisée par un test *t* de Student non apparié dans le cas où les données suivaient une loi normale, remplacé par un test de Mann Whitney si ce n'était pas le cas. Pour les analyses des données avec 2 variantes (traitement et temps, deux traitements etc), un ANOVA à 2 facteurs avec et sans interaction a été appliqué et si le facteur traitement était significatif, alors une correction de Bonferroni était effectuée. Pour calculer l'association entre les métabolites et les groupes, un test de corrélation de Spearman permettant de calculer le coefficient de la monotonie de cette association ( $\rho$ ) et sa probabilité ont été calculés. Le seuil de significativité statistique a été défini comme  $p.value < 0,05$ .

## **3 Association de l'hippurate avec les phénotypes et transcriptome hépatiques dans la MASLD chez l'homme**

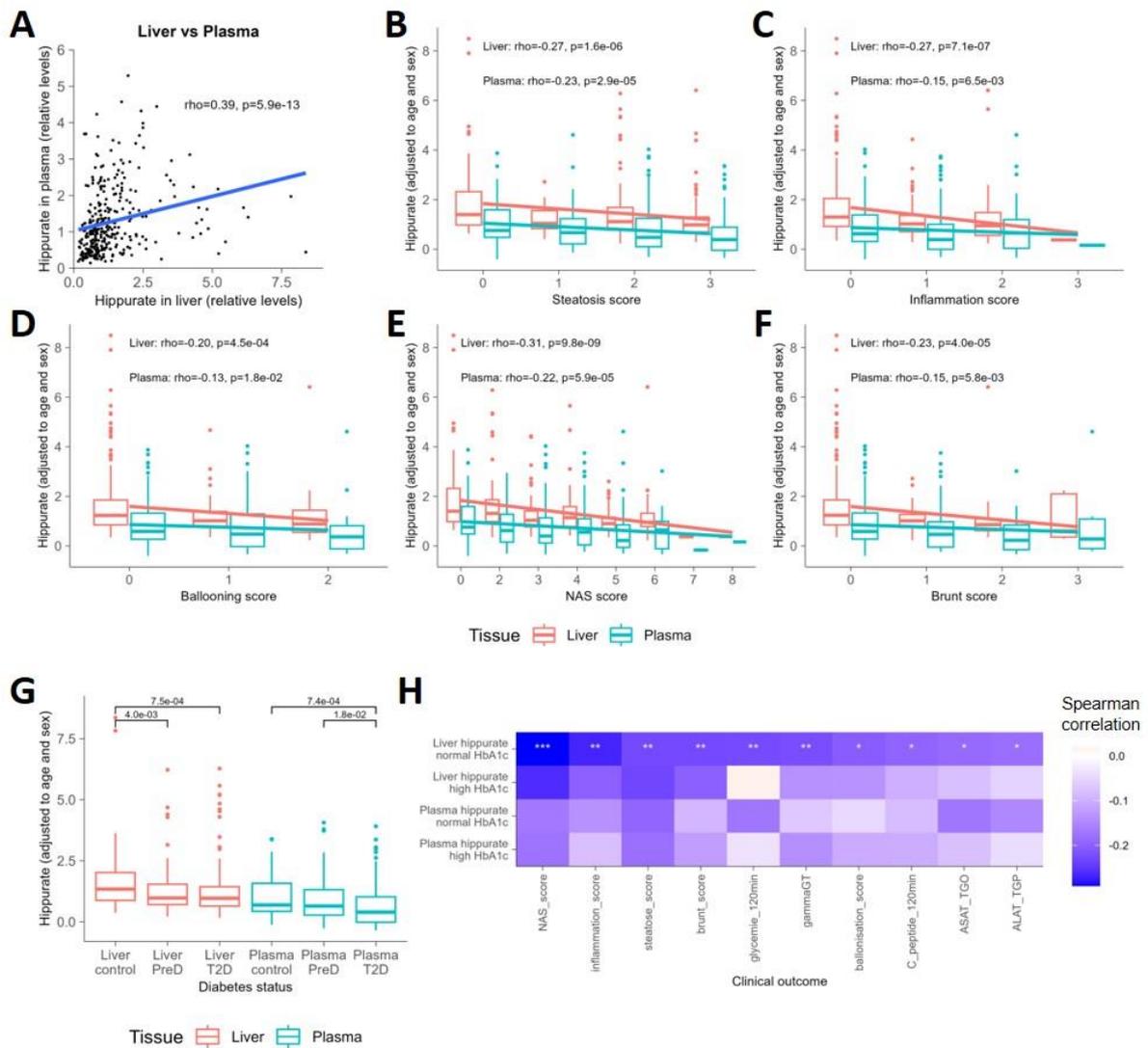
---

### **3.1 Introduction**

Des études antérieures ont montré que l'hippurate pourrait jouer un rôle protecteur contre la stéatose hépatique. En effet, des niveaux élevés d'hippurate circulant et urinaire sont associés à une réduction des risques de MASLD. Afin d'explorer plus en détail les corrélations entre l'hippurate et la MASLD, les données de la cohorte humaine ABOS (Atlas Biologique de l'Obésité Sévère), dans le cadre du projet PreciNASH, ont été utilisées. La cohorte ABOS est une vaste collection de tissus métaboliques (comprenant le foie, les muscles, le tissu adipeux viscéral et sous-cutané, ainsi que l'intestin) et d'échantillons sanguins (plasma, sérum, ADN). Elle a été constituée dans le cadre d'un essai clinique en cours (NCT01129297), visant à mieux comprendre les effets de l'obésité sévère et à identifier des marqueurs biologiques pour des traitements personnalisés. Le projet PreciNASH (ANR-16-RHUS-006) s'appuie sur ces données pour développer des modèles prédictifs permettant d'anticiper la progression de la stéatohépatite associée à un dysfonctionnement métabolique (MASH). Ce projet vise également à évaluer l'impact à long terme des traitements personnalisés, ouvrant ainsi la voie à une médecine de précision pour les patients à risque. L'analyse de ces données dans ce projet de recherche a permis de visualiser de manière systématique les liens entre l'hippurate et divers paramètres biologiques définissant la MASLD et la MASH. En plus de la relation entre l'hippurate circulant et la stéatose, il a été pertinent de mesurer les niveaux hépatiques d'hippurate pour mieux comprendre son impact sur les tissus hépatiques. Cela permet de renforcer l'hypothèse selon laquelle l'hippurate pourrait contribuer à un effet protecteur de l'hôte par l'intermédiaire d'un maintien de l'homéostasie du foie. Grâce aux données génomiques de cette cohorte, il a également été possible d'examiner les liens entre le niveau d'hippurate hépatique et l'expression génétique des individus (via le transcriptome), afin de relier ces résultats aux corrélations phénotypiques observées.

## 3.2 Résultats

L'association de l'hippurate intracellulaire avec les différents phénotypes des composants du NAS, dérivés de la notation histopathologique de référence, ainsi qu'avec les phénotypes métaboliques chez l'homme a été testée. Pour cela, le profil de l'hippurate a été établi dans le foie et le sérum de 318 patients de l'étude ABOS (*Biological Atlas of Obesity*), dans le cadre du projet PreciNASH, en utilisant l'UHPLC-HRMS. [31].

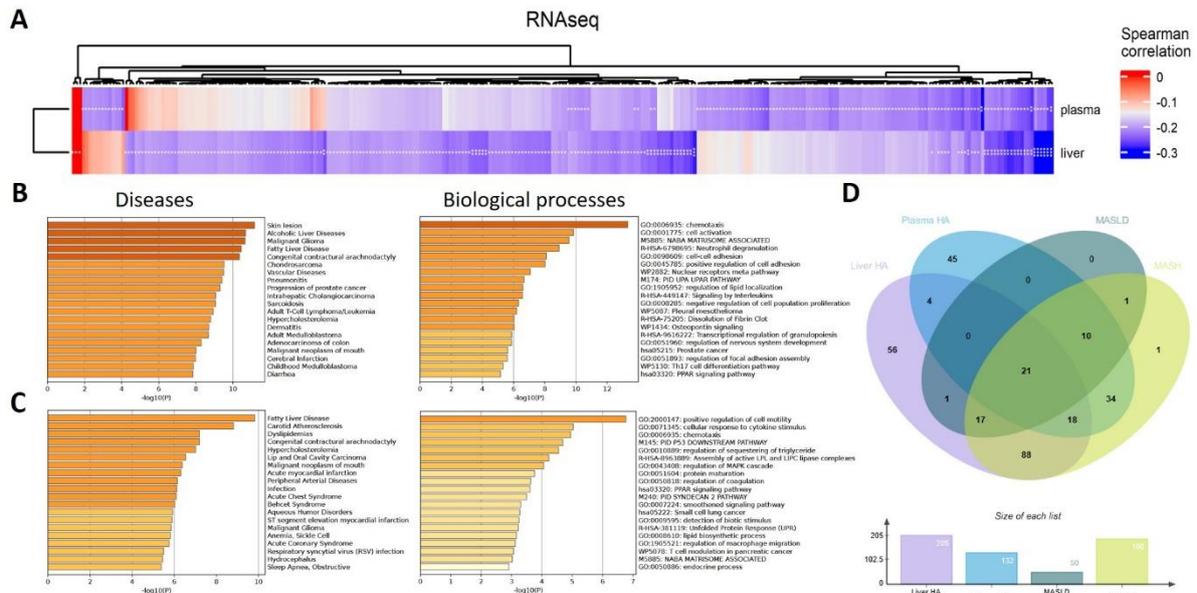


**Figure 3.1 : L'hippurate est négativement associé à la stéatose et aux biomarqueurs de l'inflammation chez 318 patients de l'étude ABOS (projet PreciNASH).** (A) Association entre l'hippurate détecté dans le foie et le plasma. (B-F) Corrélations de Spearman entre l'hippurate plasmatique ou hépatique et les phénotypes MASLD. (G) Comparaison des niveaux d'hippurate dans le plasma et le foie en fonction du statut diabétique. (H) Heatmap des variables MASLD associées à l'hippurate hépatique dans le foie ou le plasma, stratifiée par Hb1Ac (Hb1Ac élevé  $\geq 6,5\%$ ). (B-H) Les niveaux d'hippurate dans le foie et le plasma ont été corrigés par l'âge et le sexe. (n = 318 patients).

Il a été confirmé que l'hippurate hépatique et plasmatique étaient positivement corrélés (Fig. 1A,  $\rho = 0,39$ ,  $p = 5,9 \times 10^{-13}$ ), indiquant que l'hippurate circulant pouvait être utilisé comme proxy de l'hippurate intra-hépatique. L'association entre les phénotypes de la MASLD et l'hippurate circulant ou intra-hépatique a ensuite été examinée, en tenant compte de l'âge et du sexe à l'aide de corrélations partielles de Spearman. Il a été démontré que l'hippurate, qu'il soit hépatique ou plasmatique, est négativement associé de manière significative aux scores de stéatose, d'inflammation, de ballonnement du NAS, et de fibrose (Fig. 1B-F), conformément à la corrélation initialement observée entre ces deux mesures. Il est intéressant de noter que l'association avec l'hippurate intra-hépatique était plus significative pour chacun des phénotypes testés, l'inflammation étant plus significative que la stéatose.

De plus, les niveaux d'hippurate sont plus bas chez les patients atteints de diabète de type 2 par rapport aux patients normoglycémiques ou présentant une intolérance au glucose, indépendamment de l'âge et du sexe (Fig. 1G). En stratifiant les patients selon leurs niveaux d'hémoglobine glyquée (HbA1c), marqueur du contrôle glycémique à moyen terme, il est observé que l'hippurate intra-hépatique reste lié au statut métabolique même chez les patients ayant une HbA1c normale ( $<6,5\%$ , HbA1c-NGSP 48 mmol/mol) (Fig. 1H).

Ces résultats renforcent l'hypothèse d'un rôle protecteur de l'hippurate hépatique contre les phénotypes de la MASLD, avec un impact plus significatif que celui de l'hippurate circulant. Pour approfondir cette analyse et explorer les mécanismes sous-jacents, des analyses transcriptomiques seront réalisées. En effet, l'étude du transcriptome permettra d'examiner en détail les interactions potentielles entre l'hippurate et les processus biologiques du foie. En particulier, il sera possible de corréler l'expression des gènes dans le foie avec les niveaux d'hippurate intra-hépatique, afin de mieux préciser les voies métaboliques et les processus inflammatoires influencés par ce métabolite.



**Figure 3.2 : L'hippurate est négativement associé aux transcrits des gènes impliqués dans la MASLD non-MASH et la MASH sur 318 patients de la cohorte ABOS (projet PreciNASH).** (A) Heatmap avec des associations significatives entre les transcrits ARN et l'hippurate dans le plasma et le foie. Les niveaux d'hippurate dans le foie et le plasma ont été corrigés en fonction de l'âge et du sexe. (B) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) réalisée à l'aide de Metascape sur les gènes significatifs associés négativement à l'hippurate dans le foie. (C) GSEA réalisée à l'aide de Metascape sur les gènes significatifs associés négativement à l'hippurate dans le plasma en utilisant la base de données DisGeNET sur les associations gène-maladie. (D) Diagramme de Venn montrant les transcrits d'ARN négativement corrélés aux niveaux d'hippurate dans le foie (violet), dans le plasma (bleu), et les transcrits d'ARN significativement liés à la MASLD non-MASH (vert) et à la MASH (jaune).

L'analyse transcriptomique, faite via l'exploration de l'expression globale des gènes dans le foie par séquençage de l'ARN (RNA-seq) généré pour ces participants, a révélé 208 et 132 gènes dont l'expression est significativement associée aux niveaux d'hippurate dans le foie et dans le plasma, respectivement (Fig. 2A), 43 d'entre eux étant communs. L'analyse a ensuite vérifié si l'un des 205 gènes associés négativement à l'hippurate hépatique et des 132 gènes associés à l'hippurate plasmatique était impliqué conjointement dans les maladies du foie (Fig. 2D [41]). Il a été découvert que 49 gènes (dont 39 pour l'hippurate hépatique et 31 pour l'hippurate plasmatique) étaient associés à la MASLD non-MASH, tandis que 188 gènes (144 pour l'hippurate hépatique et 83 pour l'hippurate plasmatique) étaient liés à la MASH.

Une analyse d'enrichissement de l'ensemble des gènes (GSEA, Fig. 2B-C [42]) a ensuite été réalisée, montrant que les gènes corrélés négativement avec l'hippurate dans le foie (Fig. 2B) sont impliqués dans les lésions cutanées (UMLS : C0037284,  $\text{Log}_{10}(p) = -11,00$ ), les maladies alcooliques du foie (UMLS : C0023896,  $\text{Log}_{10}(p) = -11,00$ ), les maladies du foie gras (UMLS

: C4529962,  $\text{Log}_{10}(p) = -10,00$ ), les maladies vasculaires (UMLS : C0042373,  $\text{Log}_{10}(p) = -9,30$ ), cholangiocarcinome intrahépatique (UMLS : C0345905,  $\text{Log}_{10}(p) = -8,90$ ) et l'hypercholestérolémie (UMLS : C0020443,  $\text{Log}_{10}(p) = -8,60$ ). Ces gènes sont impliqués dans les processus biologiques de chimiotaxie (GO:0006935,  $\text{Log}_{10}(p) = -13,20$ ), d'activation cellulaire (GO:0001775,  $\text{Log}_{10}(p) = -9,70$ ), de régulation de la localisation des lipides (GO:1905952,  $\text{Log}_{10}(p) = -6,54$ ) et de signalisation des interleukines (GO:R-HSA-449147,  $\text{Log}_{10}(p) = -6,49$ ).

L'hippurate dans le plasma (Fig. 2C) est négativement corrélé avec la maladie du foie gras (UMLS : C4529962,  $\text{Log}_{10}(q) = -5,20$ ), l'athérosclérose (UMLS : C0577631,  $\text{Log}_{10}(q) = -4,60$ ), les dyslipidémies (UMLS : C0242339,  $\text{Log}_{10}(q) = -3,20$ ), hypercholestérolémie (UMLS : C0020443,  $\text{Log}_{10}(q) = -3,20$ ) et les maladies artérielles périphériques (UMLS : C1704436,  $\text{Log}_{10}(q) = -2,70$ ). Ces gènes sont impliqués dans les processus de mobilité cellulaire (GO:2000147,  $\text{Log}_{10}(P) = -6,72$ ), de réponse cellulaire aux cytokines (GO:0071345,  $\text{Log}_{10}(P) = -5,00$ ), de chimiotaxie (GO:0006935,  $\text{Log}_{10}(P) = -4,92$ ), de régulation de la séquestration des triglycérides (GO:0010889,  $\text{Log}_{10}(P) = -4,54$ ), d'assemblage de la LPL active et de la LIPC (Reactome : R-HSA-8963889,  $\text{Log}_{10}(P) = -4,22$ ), régulation de la voie MAPK (GO:0043408,  $\text{Log}_{10}(P) = -4,03$ ), voie de signalisation PPAR (KEGG : hsa03320,  $\text{Log}_{10}(P) = -3,60$ ) et biosynthèse des lipides (GO:0008610,  $\text{Log}_{10}(P) = -3,14$ ).

### 3.3 Conclusion

Les résultats obtenus dans cette étude transversale sur l'obésité sévère, couvrant un large spectre de phénotypes MASLD, montrent sans équivoque une corrélation négative entre l'hippurate et la MASLD, suggérant une potentielle contribution directe de l'hippurate à la pathophysiologie de la MASLD. Bien que ces analyses révèlent des corrélations significatives, elles ne permettent pas de prouver de manière définitive un effet causal de l'hippurate. Il est donc essentiel de poursuivre les recherches pour explorer plus en profondeur les mécanismes cellulaires impliqués et valider expérimentalement cette hypothèse. Dans cette optique, des études expérimentales dans des modèles cellulaires, comme les hépatocytes, seront cruciales pour vérifier si l'hippurate module directement les voies métaboliques et inflammatoires associées à la MASLD. Ces investigations permettraient de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les métabolites dérivés du microbiote influencent la santé métabolique et ouvriraient de nouvelles voies pour des traitements ciblés.

## 4 Impact de l'hippurate sur la physiologie cellulaire et homéostasie métabolique

---

### 4.1 Introduction

Les hépatocytes et les cellules bêta jouent des rôles clés dans la régulation métabolique. Leur dysfonctionnement, comme lors des maladies cardiométaboliques, entraîne des troubles métaboliques généralisés et des répercussions systémiques sur la santé globale [210–212]. La corrélation de l'hippurate avec la MASLD et la MASH a pu être mesurée par l'analyse de la cohorte ABOS, renforçant les données de la littérature sur l'intérêt de l'hippurate dans ce contexte. Ce projet de recherche vise à mesurer l'impact de l'hippurate à l'échelle cellulaire et ceci afin de mieux appréhender et expliquer les effets retrouvés en organismes entiers. En effet, l'administration chronique d'hippurate à des souris soumises à un régime riche en graisses, connu pour induire l'obésité, l'inflammation et la résistance à l'insuline, a permis de préserver leur tolérance au glucose. Cette intervention a également amélioré la sécrétion d'insuline et augmenté la densité des îlots de Langerhans [161]. De plus, des expériences réalisées sur les cellules bêta immortalisées INS-1 ont montré une amélioration significative de la sécrétion d'insuline après traitement par l'hippurate [188].

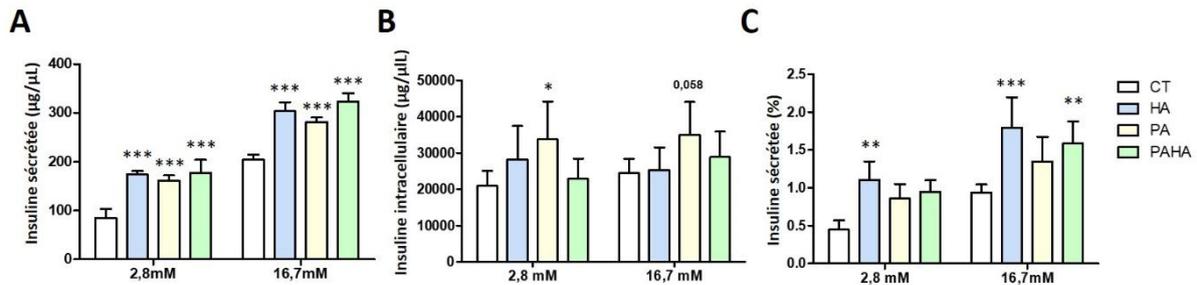
Travaillant sur deux types cellulaires différents mais ayant pour point commun leur importance capitale dans la régulation de l'homéostasie énergétique [210–212], pour tester l'hypothèse de l'effet bénéfique direct de l'hippurate, il convenait de mesurer les fonctions cellulaires respectivement attachées à ce rôle.

Les cellules bêta INS-1E ont donc été soumises à des concentrations basse ou haute de glucose afin de mesurer leur propension à sécréter de l'insuline en réponse de ces concentrations (GSIS). Les hépatocytes IHH, eux, ont vu leur capacité de stockage des acides gras, et donc leur propension à développer la MASLD, et l'internalisation du glucose, mesurés. Ces tests des fonctions physiologiques propres aux types cellulaires ont été menés alors que les cellules étaient en parallèle traitées ou non à l'hippurate, en condition basale ou stressante à l'aide de palmitate ou d'insuline dans le milieu, agissant comme proxy des conditions retrouvées dans le cadre des maladies cardiométaboliques.

## 4.2 Résultats

### 4.2.1 Sécrétion d'insuline

Les cellules bêta INS-1E, prétraitées à l'hippurate et/ou au palmitate pendant 24h, ont été privées de milieu (starvation) par utilisation d'un tampon sans glucose pendant 1h avant d'être stimulées par des concentrations basses (2,8 mM) ou hautes (16,7 mM) en glucose pendant une 1h dans ce même tampon [213].



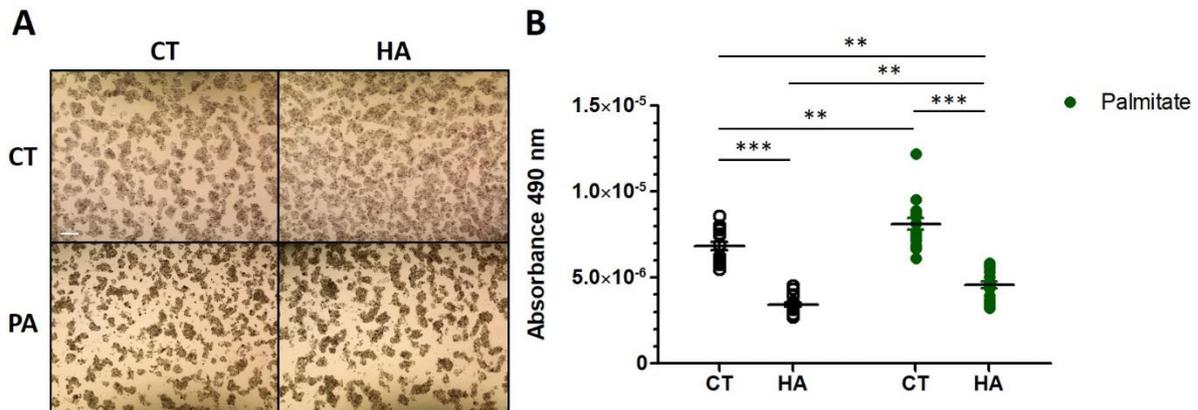
**Figure 4.1 :** L'hippurate stimule la sécrétion d'insuline en condition basale et lipotoxique en INS-1E. Stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose (GSIS) après 24h de traitement à l'hippurate et/ou au palmitate. (A) Insuline sécrétée ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). (B) Insuline intracellulaire ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). (C) Insuline sécrétée normalisée par rapport à l'insuline intracellulaire (%). ( $n=3$  réplicats biologiques). \*  $p$ .value < 0,05 ; \*\*  $p$ .value < 0,01 ; \*\*\*  $p$ .value < 0,001 ; 2 way Anova - post-test Bonferroni. CT = contrôle ; HA = hippurate 500  $\mu\text{M}$  ; PA = palmitate 500  $\mu\text{M}$  ; PAHA = palmitate 500  $\mu\text{M}$  + hippurate 500  $\mu\text{M}$ .

L'hippurate augmente significativement la concentration d'insuline extracellulaire, au même titre que le palmitate, en condition bas et haut glucose (Fig. 1A). En mesurant la concentration d'insuline intracellulaire (Fig. 1B), il est possible de voir que l'hippurate ne l'augmente pas significativement, contrairement au palmitate. Chose notable, l'hippurate semble normaliser la concentration d'insuline intracellulaire en condition palmitate, la rabaisant au niveau du contrôle. C'est en normalisant l'insuline extracellulaire sur l'insuline intracellulaire (Fig. 1C) qu'il est remarquable que seules les cellules traitées à l'hippurate, conjointement ou non avec le palmitate, sécrètent plus d'insuline que le contrôle, en bas et haut glucose. L'hippurate n'augmenterait donc que la capacité des cellules à sécréter l'insuline et non pas la production de celle-ci.

## 4.2.2 Stockage des triglycérides

### 4.2.2.1 Accumulation de lipides après traitement au palmitate

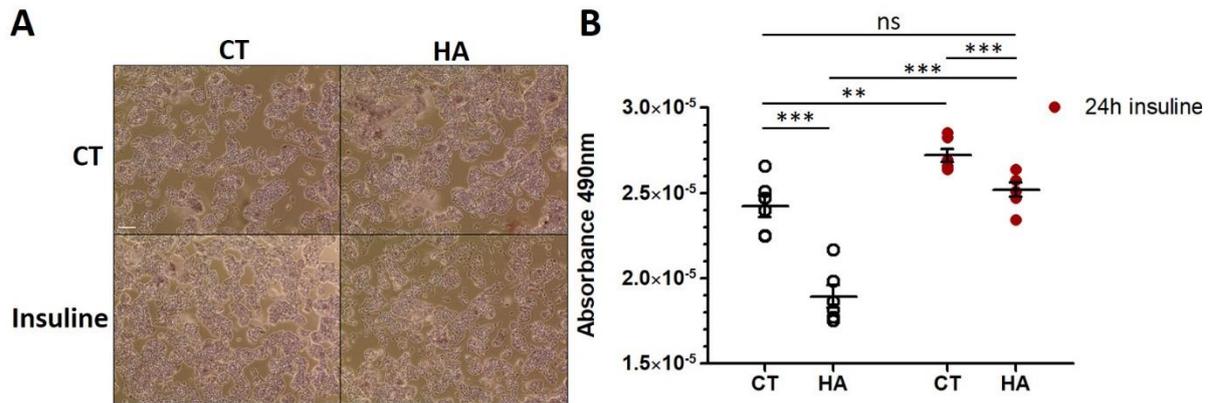
Les hépatocytes IHH sont fixés après 24 h de prétraitement à l'hippurate et/ou au palmitate. Après fixation, ils sont colorés par de l'Oil Red O. Ce colorant liposoluble de type Sudan se fixe au glycérol, permettant de visualiser et de quantifier par spectroscopie la quantité de triglycérides intracellulaires [214].



**Figure 4.2 : L'hippurate inhibe la stéatose des hépatocytes IHH en condition basale et lipotoxique.** Coloration par Oil Red O des cellules IHH traitées 24h à l'hippurate et ou au palmitate. (A) Image représentant les IHH en puits après fixation et coloration à l'Oil Red O. (B) Quantification de la coloration par mesure de l'absorbance 490 nm normalisée par le nombre de cellules par puits. Scale bar = 500 μm. (n=5 réplicats biologiques). \* p.value < 0,05 ; \*\* p.value < 0,01 ; \*\*\* p.value < 0,001 ; 2 way Anova - post-test Bonferroni. CT = contrôle ; HA = hippurate 500 μM ; PA = palmitate 500 μM ; Palmitate = palmitate 500 μM.

L'hippurate inhibe significativement le dosage des triglycérides dans les hépatocytes, en condition basale comme en condition lipotoxique (Fig. 2B). Comme retrouvé pour l'insuline intracellulaire du GSIS des cellules bêta (Fig. 2B), l'hippurate restaure le niveau basal retrouvé sans stress apporté par le palmitate, qui, lui, augmente le stockage des triglycérides en 24h. Au vu du comptage des cellules, l'hippurate semble également réduire la mortalité cellulaire, ou du moins le retard de prolifération des cellules dû au traitement au palmitate.

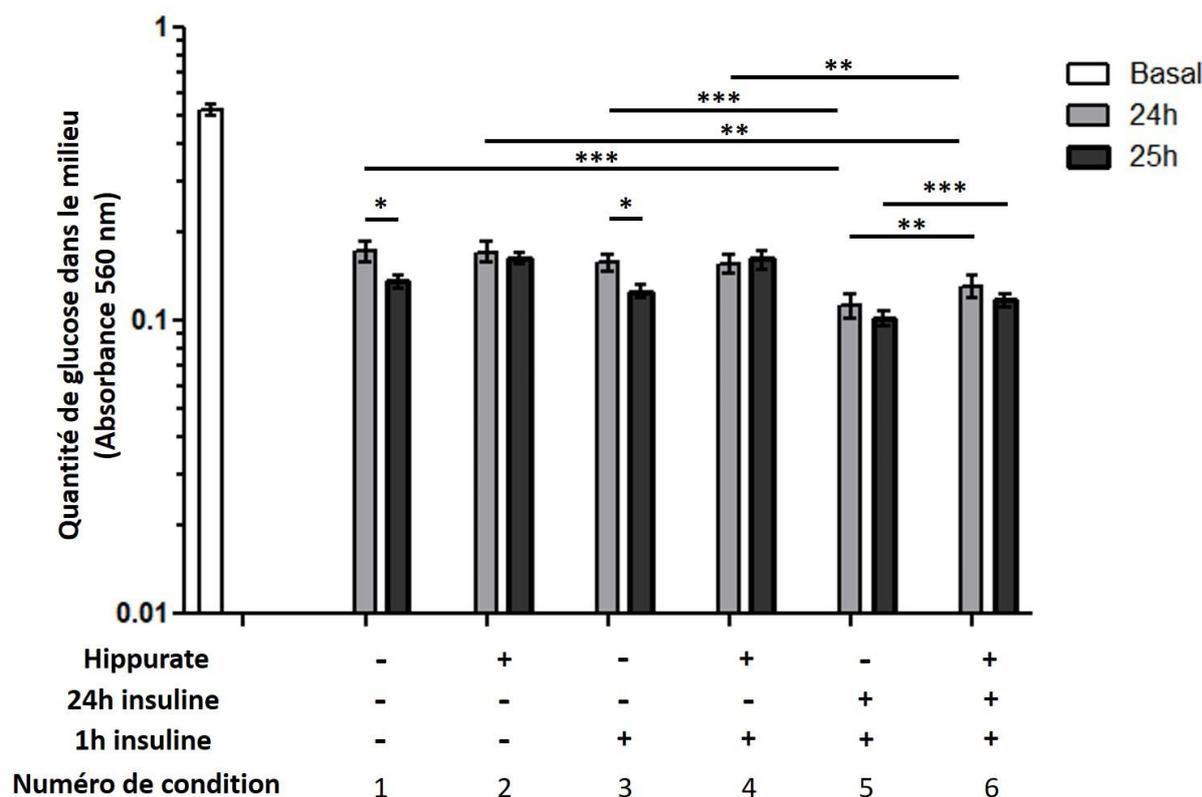
#### 4.2.2.2 Effet de l'hippurate sur l'accumulation de lipides en situation d'insuline chronique



**Figure 4.3 : L'hippurate inhibe la stéatose des hépatocytes IHH en condition basale et insulinémique.** Coloration par Oil Red O des cellules IHH traitées 24h à l'hippurate et ou à l'insuline. (A) Image représentant les IHH en puits après fixation et coloration à l'Oil Red O. (B) Quantification de la coloration par mesure de l'absorbance 490 nm normalisée par le nombre de cellules par puits. Scale bar = 500  $\mu$ m. (n=4 réplicats biologiques). ns = non significatif ; \* p.value < 0,05 ; \*\* p.value < 0,01 ; \*\*\* p.value < 0,001 ; 2 way Anova - post-test Bonferroni. CT = contrôle ; HA = hippurate 500  $\mu$ M ; Insuline = insuline 100 nM.

En condition d'insulino-résistance (Fig. 3), apportée par un traitement chronique à l'insuline, l'hippurate offre le même profil en diminuant le stockage des triglycérides en condition basale mais également en restaurant le niveau basal qui avait augmenté à cause de l'insuline.

### 4.2.3 Internalisation du glucose



**Figure 4.4 : L'hippurate inhibe la captation de glucose dans les hépatocytes IHH.** Glucose absorbé par les cellules IHH, quantifié en mesurant le glucose restant dans le milieu à  $t = 0$  (Basal, identique pour toutes les conditions),  $t = 24h$  et  $t = 25h$ . ( $n = 4$  réplicats biologiques). \*  $p.value < 0,05$  ; \*\*  $p.value < 0,01$  ; \*\*\*  $p.value < 0,001$  ; 2 way Anova - post-test Bonferroni. 24h insuline = insuline 100 nM ; 1h insuline = insuline 200 nM ; Hippurate = hippurate 500  $\mu M$ .

Les hépatocytes ont été prétraités à l'hippurate (2,4 et 6), prétraités à l'insuline (5 et 6) et/ou traités à l'insuline pendant 1h (3,4,5 et 6) après 24h de prétraitement (Fig. 4). Le milieu est récupéré après les 24h de prétraitement (24 h) et 1h après le traitement (25 h). Tout comme pour le dosage des triglycérides, l'insuline chronique permet d'apprécier les effets de l'insulino-résistance et ici, le traitement à l'insuline pendant 1h permet d'observer les effets de l'insuline sur la captation de glucose ou son absence d'effet en cas d'insulino-résistance.

L'hippurate normalise la captation de glucose stimulée par l'insuline par rapport aux conditions contrôles : quelle que soit la condition (avec ou sans shoot d'insuline ou prétraitement), l'hippurate (2, 4 et 6) n'a pas conduit à une diminution de la quantité de glucose dans le milieu entre 24 h et 25 h (après 1 h d'insuline 200 nM), contrairement aux conditions contrôles avec ou sans shoot d'insuline (1 et 3). La condition de résistance à l'insuline (5 et 6) a montré de façon similaire une absence d'internalisation du glucose après le shoot d'insuline mais aussi une internalisation du glucose significativement plus importante après 24 h par rapport aux

cellules non prétraitées (1, 2, 3 et 4), ce qui correspond à ce qui est attendu. L'hippurate a réduit l'internalisation du glucose, même pendant les 24 heures d'exposition à l'insuline (6). Dans l'ensemble, l'hippurate conduit à une normalisation relative de la captation de glucose stimulée par l'insuline, avec un schéma similaire à celui observé pour le stockage des triglycérides.

### **4.3 Conclusion**

Les effets de l'hippurate sur les cellules métaboliques sont bénéfiques. En premier lieu, l'hippurate semble améliorer la sécrétion d'insuline des cellules bêta sans en augmenter la production, ce dernier point étant un des facteurs du défaut de production d'insuline à moyen long terme des cellules bêta en condition haute en glucose (obésité, diabète). Ce point pourrait expliquer. En deuxième lieu, l'hippurate régule à la baisse le stockage des triglycérides par les hépatocytes, en condition basale, et restaure le niveau basal de ce stockage en condition pro-stéatosique par traitement au palmitate ou à l'insuline. Enfin, l'hippurate inhibe l'internalisation du glucose dans les hépatocytes de manière aiguë (1h d'insuline) comme chronique (24h d'insuline). Ces résultats permettent d'observer un effet causal de l'hippurate sur le phénotype des cellules, ce qui interroge quant au mécanisme d'action de celui-ci.

## 5 Impact de l'hippurate sur le métabolome hépatocytaire

---

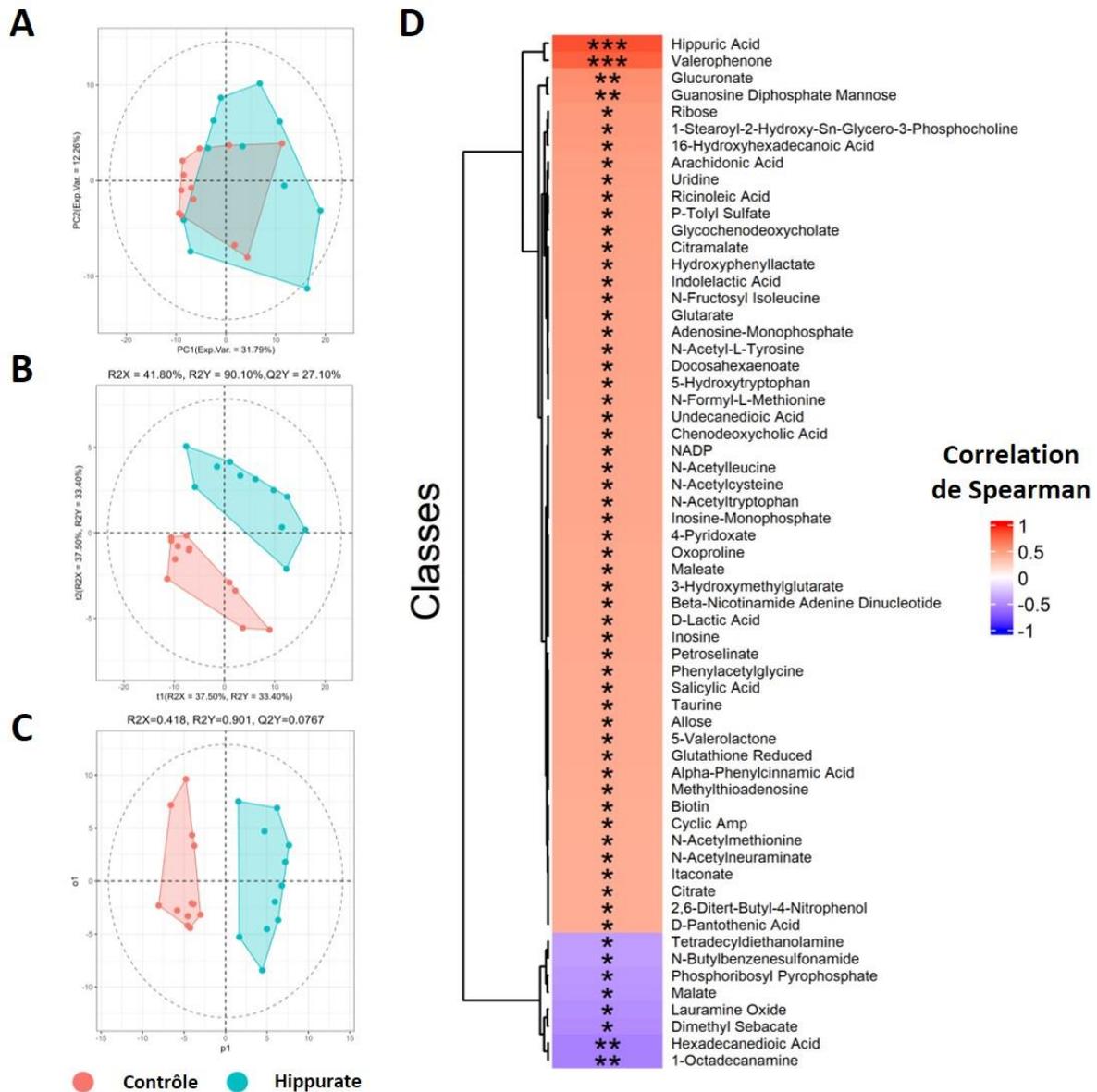
### 5.1 Introduction

L'hypothèse de départ est que l'hippurate permet un maintien de l'homéostasie énergétique et inflammatoire de l'organisme entier et ce par l'intermédiaire de la préservation en condition de stress des organes métaboliques comme le pancréas et le foie. Ce dernier, le foie, pourrait être le plus susceptible de fournir des preuves quant à l'effet de l'hippurate. Outre le fait que l'hippurate circulant et urinaire, est négativement associé à la MASLD et aux troubles métaboliques [184,187], l'hippurate hépatique est également corrélé négativement à tous les marqueurs de la MASLD et la MASH, mais plus profondément encore, l'hippurate est négativement corrélé à plusieurs gènes impliqués dans la MASLD et la MASH (Ch. 4).

Afin d'appréhender le mécanisme d'action directe de l'hippurate sur le métabolisme des hépatocytes et de comparer les différentes approches omiques, le métabolome des hépatocytes a été interrogé en condition basale puis en condition de stress d'insulinémie chronique médié par un traitement chronique d'insuline, mimant ce qui est retrouvé dans la plupart des maladies métaboliques. Pour ce faire un profilage du métabolome a été réalisé par UHPLC-HRMS sur les extraits cellulaires des cellules IHH. Différents modèles d'analyse discriminante (PCA, PLS-DA et O-PLS-DA) ont ensuite été construits pour classer efficacement les échantillons selon les groupes de traitement à l'hippurate, et une carte de corrélation de Spearman a été générée pour visualiser l'impact de l'hippurate sur le métabolome des cellules traitées.

## 5.2 Résultats

### 5.2.1 Influence de l'hippurate sur le métabolome en condition basale



**Figure 5.1 : L'hippurate impacte le métabolome des hépatocytes IHH en condition basale.** (A) PCA, (B) PLS-DA et (C) O-PLS-DA montrant la répartition des différents échantillons : Contrôle (CT) et IHH traité à l'hippurate (HA) (1 composante prédictive et 1 composante orthogonale,  $R^2Y = 0,901$ ,  $Q^2Y = 0,0767$ ). (D) Carte thermique de corrélation de Spearman montrant les métabolites présentant une corrélation significative avec les cellules traitées (HA) ou non traitées (CT). ( $n = 6$  réplicats biologiques). \*  $p$ .value ajustée < 0,05 ; \*\*  $p$ .value ajustée < 0,01 ; \*\*\*  $p$ .value ajustée < 0,001.

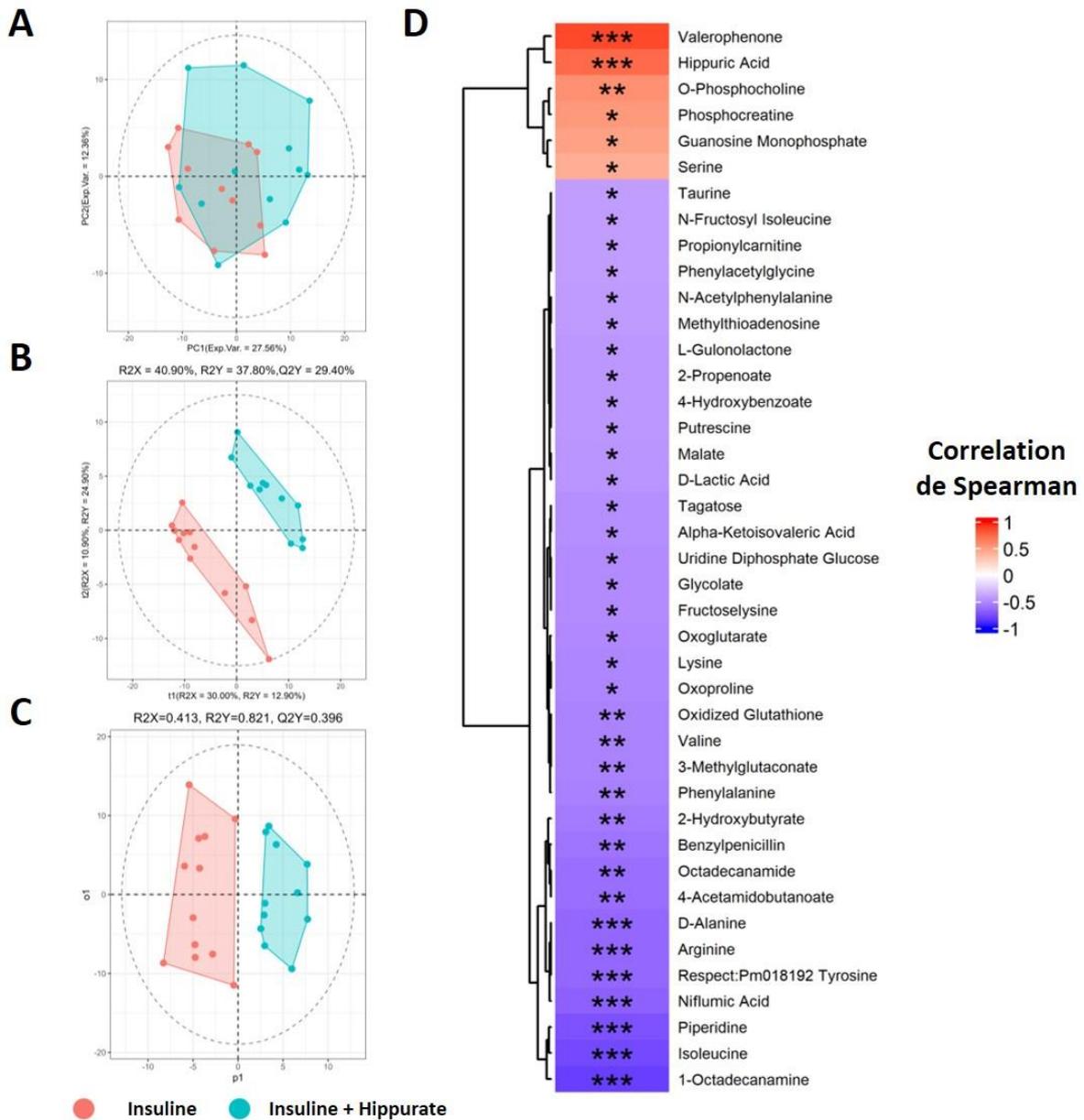
La séparation par PCA (Fig. 1A) montre clairement un chevauchement entre le groupe de la condition contrôle (rouge) et le groupe de la condition hippurate (bleu) avec des composantes principales à haut pourcentage (PC1 = 31,79% et PC2 = 12,9%) reflétant principalement la

variation intra-groupe. La discrimination des groupes devient visible en supervisant leur séparation par PLS-DA (Fig. 1B), cependant le rapport Q2Y/R2Y (27,10%) faible montre encore que l'hippurate n'induit pas de changement assez conséquent sur le métabolome des IHH pour obtenir un modèle robuste. La discrimination par O-PLS-DA (Fig. 1C) confirme la séparation visible entre les deux groupes, confirmant la PLS-DA, et ne permet de calculer qu'une aire sous la courbe (AUROC) de 0,65. Ceci est loin d'un modèle parfait de 1, qui pourrait être intéressant dans le cas où l'hippurate ne perturbe que faiblement la cellule, mais reste néanmoins supérieur à un modèle non informatif (aléatoire) de 0,5. L'hippurate impacte de manière subtile le métabolome des IHH traitées.

Cependant, la méthode de corrélation de Spearman montre que le traitement à l'hippurate est significativement associé avec des métabolites spécifiques (Fig. 1D). Il montre des corrélations négatives avec le phosphoribosyl pyrophosphate impliqué dans la biosynthèse des purines et des pyrimidines (AMP, GMP, IMP, NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>) [215] et l'AMPc, qui a des effets protecteurs contre la MASLD et l'ALD [144], la méthylthioadénosine et l'IMP, qui inhibent la production de TNF-alpha et augmentent la production d'interleukine-10 [216,217]. Le traitement à l'hippurate est également positivement corrélé au glutathion réduit (GSH) qui est un puissant antioxydant limitant la peroxydation lipidique [218,219], à la taurine en tant que médiateur important de l'homéostasie cellulaire [220–223] et au NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup> impliqué dans une pléthore de réactions métaboliques et dont la carence augmente le stress oxydatif [224], à l'indolelactate (ILA) dérivé du tryptophane qui peut inhiber la cytokine pro-inflammatoire IL-8 via le facteur de transcription AHR [147,225], et l'acide salicylique qui inhibe COX1 et COX-2 synthétisant des prostaglandines pro-inflammatoires [226,227]. L'hippurate est également associé positivement avec les métabolites impliqués dans l'homéostasie énergétique, tels que le citrate, le glucose intracellulaire et l'AMPc qui est un messenger secondaire impliqué dans plusieurs processus biochimiques tels que le métabolisme des sucres et des lipides [144]. L'hippurate est également positivement corrélé à la biotine (vitamine b8), qui est un acteur important dans l'anabolisme des lipides et des glucides et dans la synthèse normale des protéines [228,229], à la taurine, qui joue un rôle important dans le métabolisme énergétique, en particulier dans le contexte du syndrome métabolique [220,223], ainsi qu'au NAD/NADP [224]. Le 3-hydroxyméthylglutarate, qui est un agent anti-lipidémique réduisant le cholestérol et les triglycérides [230] et l'inosine-monophosphate (IMP), qui est le précurseur de deux molécules énergétiques, le GMP et l'AMP [217] sont également corrélés à l'hippurate.

Ainsi, les données métabolomiques informent que l'hippurate pourrait être un régulateur bénéfique de l'homéostasie énergétique et du stress oxydatif dans les cellules traitées, et cela, en condition basale. Cependant, ce ne sont pas ces conditions qui sont retrouvés dans le contexte de maladies cardiométaboliques où l'hippurate a un effet significatif [161]. Dans le but d'appréhender ces conditions, il revient de traiter les cellules dans des conditions de stress.

## 5.2.2 Influence de l'hippurate en condition d'insulino-résistance



**Figure 5.2 : L'hippurate semble inhiber les changements métaboliques opérés par l'insuline chronique.** (A) PCA, (B) PLS-DA et (C) O-PLS-DA montrant la répartition des différents échantillons : Cellules traitées à l'insuline (CTins) et cellules traitées à l'hippurate-insuline (HAins) (1 composante prédictive et 1 composante orthogonale,  $R^2Y = 0,821$ ,  $Q^2Y = 0,396$ ). (D) Carte thermique de corrélation de Spearman montrant les métabolites présentant une corrélation significative avec les cellules traitées à l'insuline (CTins) et les cellules traitées à l'hippurate-insuline (HAins). ( $n = 6$  réplicats biologiques). \*  $p$ .value ajustée  $< 0,05$  ; \*\*  $p$ .value ajustée  $< 0,01$  ; \*\*\*  $p$ .value ajustée  $< 0,001$ .

Pour tester l'effet de l'hippurate sur les hépatocytes en insuliniémie chronique, les cellules IHH ont été traitées avec de l'insuline (100 nM) pendant 24h (12h suffisent à induire une résistance

[190]) avec et sans hippurate (500  $\mu$ M) avant de mesurer son impact sur le métabolome par UHPLC-HRMS.

Au même titre qu'en condition basale, l'hippurate ne permet pas une discrimination parfaite des deux groupes par PCA (Fig. 2A, PC1 = 27,56%, PC2 = 12,36%). Cependant, c'est en utilisant les méthodes de PLS-DA (Fig. 2B, R2Y = 37,8%, Q2Y = 29,4%) et OPLS-DA (Fig. 2C, R2Y = 0.821, Q2Y = 0.396) que la distinction entre les conditions de traitement a pu être faite. Ce résultat est supérieur à celui de la condition basale (Fig. 2A-C), ce qui suggère que l'impact de l'hippurate pourrait être plus important en condition d'insulinémie

L'analyse de corrélation a montré une majorité de corrélations négatives significatives avec l'hippurate, suggérant un effet inhibiteur de l'hippurate sur de multiples voies en lien avec l'insuline (Fig. 2D). En commençant par les acides aminés, il est observé des corrélations négatives avec les métabolites BCAA liés à la résistance à l'insuline, comme l'isoleucine, dont les concentrations sont couramment augmentées, où des niveaux plus élevés sont observés dans le sang des souris, des rats et des humains diabétiques, et une privation d'isoleucine pendant un jour a amélioré la sensibilité à l'insuline chez les souris [231–233]. Au même titre, la valine, un autre BCAA, altère la tolérance au glucose dans le cadre d'un régime riche en graisses chez la souris, notamment par sa conversion en 3-hydroxyisobutyrate (3-HIB) [231,233,234], est négativement associée à l'hippurate. De même, l'acide aminé aromatique, la phénylalanine qui pourrait être associée à la résistance à l'insuline par modification du récepteur bêta de l'insuline ( $IR\beta$ ) [235,236], et la tyrosine qui joue un rôle central dans la fonction de nombreuses protéines mais qui pourrait être positivement corrélée à la résistance à l'insuline et qui est élevée dans la cirrhose du foie [235,237] sont négativement corrélées à l'hippurate.

L'hippurate est anticorrélé à des métabolites liés à l'inflammation tels que l'uridine diphosphate glucose (UDG), un précurseur de la synthèse du glycogène, du saccharose et des glycosphingolipides qui peut également agir comme une molécule de signalisation pro-inflammatoire dans des conditions de stress par agonisme du récepteur P2Y14 [238] et de résistance à l'insuline par inhibition de l'AMPc [144]. Le glutathion oxydé pour lequel le ratio glutathion réduit/glutathion oxydé est un indicateur de la santé cellulaire [218] et ici, l'hippurate semble améliorer ce rapport, ce qui indique une amélioration de la santé cellulaire.

L'hippurate agit également comme un régulateur énergétique en étant associé négativement à certains métabolites impliqués dans le cycle TCA de Krebs, comme le malate et l'oxoglutarate, et en étant associé positivement à des métabolites impliqués dans la préservation de l'ATP disponible, comme la phosphocréatine [239–241], ou dans la protection des hépatocytes contre le stress oxydatif induit par un régime riche en graisses, comme la sérine [80-82].

Dans ces conditions insulinémiques, l'hippurate est négativement corrélé à des métabolites réputés toxiques. Par exemple, la putrescine est une molécule clé qui régule la prolifération cellulaire, mais elle est également connue comme une toxine urémique et est positivement corrélée à l'insuffisance rénale. La putrescine pourrait également être un agent protecteur du foie, même si quand elle est accumulée, ce qui pourrait être le cas dans la résistance à l'insuline, peut être toxique [242–244]. En outre, l'oxoproline est également connue pour son accumulation (après notamment la prise chronique de paracétamol ou déficit en glutathion synthétase) étant source d'acidose métabolique (acidose pyroglutamique) et favoriserait l'oxydation des lipides et des protéines [245,246]. De même, l'alpha-cétoisovalérate, dérivé de la valine, dont l'accumulation est présente lors de la leucinose (maladie métabolique rare due à un déficit de l'activité du complexe a-cétoacide déshydrogénase à chaîne ramifiée et dont l'accumulation toxique d'acides aminés ramifiés est associée à l'apparition de symptômes neurologiques permanents) et également liée à la résistance à l'insuline [231,234,247,248]. Un dernier exemple est la phénylacétylglycine, un biomarqueur de la phospholipidose, un trouble lysosomal impliquant le dysfonctionnement du métabolisme des phospholipides qui est souvent asymptomatique mais peut le cas échéant conduire à des dommages cellulaires [249,250].

Cependant, il est intéressant de noter que certains métabolites réputés bénéfiques pour la santé, comme la taurine [220–223], l'acide aminé essentiel responsable du métabolisme normal et du système immunitaire appelé lysine [251] et la molécule anti-inflammatoire méthylthioadénosine [216] sont négativement corrélés à l'hippurate.

### **5.3 Conclusion**

Administré de façon chronique, l'hippurate modifie subtilement le métabolome des hépatocytes en augmentant l'abondance relative des métabolites impliqués dans l'homéostasie énergétique (métabolisme des lipides et des sucres) et en diminuant ceux impliqués dans l'inflammation et la résistance à l'insuline alors que dans des conditions d'insulinémie chronique, distinguée dans l'obésité et le prédiabète, il agit comme un antagoniste aux effets potentiellement délétère de l'insuline sur le moyen-long terme. Ceci semble en adéquation avec les résultats obtenus en organisme entier et sur le phénotype cellulaire.

## 6 Internalisation de l'hippurate

---

### 6.1 Introduction

L'action potentielle de l'hippurate sur la physiologie des hépatocytes, leur métabolome, ainsi que sur celle des cellules bêta, demeure encore mal comprise. Plusieurs questions restent en suspens : la cible de l'hippurate se situe-t-elle à l'intérieur de la cellule ? Si oui, l'hippurate est-il internalisé par la cellule ? Ce processus implique-t-il un transporteur spécifique ?

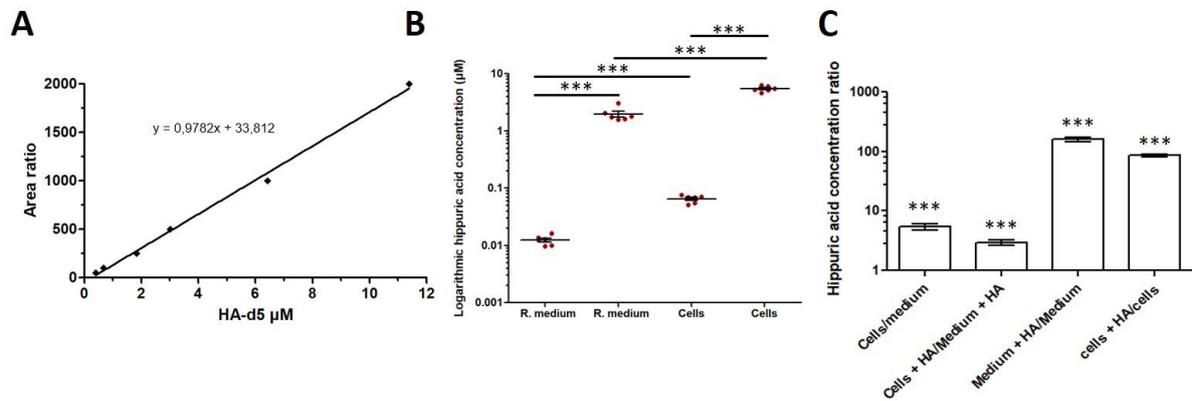
Les hypothèses retrouvées dans la littérature quant à l'internalisation de l'hippurate se tournent toutes autour des transporteurs de monocarboxylate (MCTs) [162,252]. Ceux-ci sont présents dans la plupart des tissus mais essentiellement dans le foie [168] et le rein [169] où, respectivement, l'hippurate est produit et sécrété dans le sang et excrété dans l'urine. Ces transporteurs sont présents dans une moindre mesure dans le pancréas. Les cellules immortalisées comme les Min6 ne présentent pas de MCT [171], ce qui pourrait être une raison pour laquelle, si ce sont bien les transporteurs de l'hippurate et que l'effet est intracellulaire, les Min6 ne réagissent pas à un traitement à l'hippurate. La lignée cellulaire des INS-1E présente, elle, en faible quantité l'isoforme 1 des MCTs (MCT1) ce qui pourrait également expliquer l'intérêt de celle-ci comparativement aux Min6 [171].

Les MCTs servent au transport de différents monocarboxylates comme le pyruvate, le lactate, l'acétate, le  $\beta$ -hydroxybutyrate ou l'acétoacétate [253].

Pour tester ces hypothèses concernant l'effet intracellulaire de l'hippurate, la quantité d'hippurate présente dans la cellule, avec ou sans traitement, a été comparée à celle du milieu pour observer son éventuelle entrée. Ensuite, l'entrée de l'hippurate a été potentiellement bloquée en inhibant ses transporteurs, afin d'évaluer non seulement son entrée mais aussi l'impact de cette inhibition sur le métabolome. Pour cela, un protocole de quantification de l'hippurate intracellulaire par une méthode ciblée de métabolomique a été conçu. Après un traitement des cellules à l'hippurate, les métabolites intracellulaires ont été extraits dans un tampon contenant de l'hippurate marqué par 5 deutériums, l'hippurate-d5 (HAD5). Celui-ci a permis de quantifier et de normaliser la quantité d'hippurate par échantillon et ainsi mesurer la concentration intracellulaire d'hippurate. Par la suite, les cellules ont été traitées conjointement avec un inhibiteur pharmacologique, l'AZD3965, ou transfectées avec un ARNsi dirigé contre l'ARNm du gène Slc16A1 codant pour MCT1. Les cellules utilisées pour cela étaient les IHH, du fait de la forte proportion de transporteurs potentiels et les résultats probants en métabolomique non ciblée (Ch. 3).

## 6.2 Résultats

### 6.2.1 Quantification de l'hippurate intracellulaire

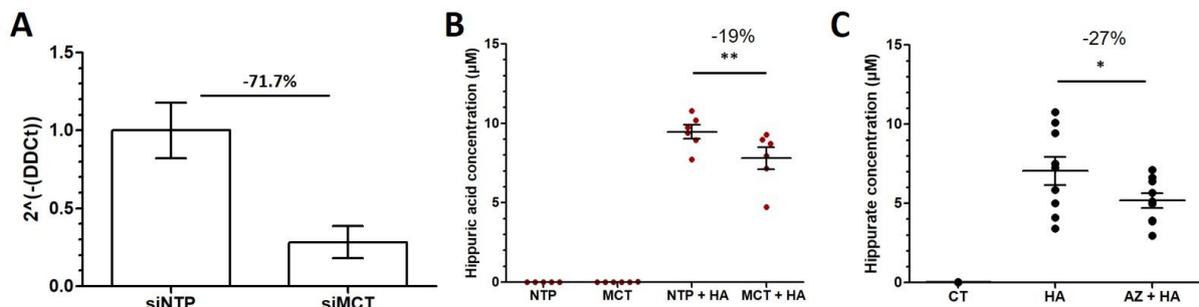


**Figure 6.1 : L'hippurate est internalisé dans les hépatocytes IHH. Quantification de l'hippurate présent dans les échantillons par méthode ciblée d'UHPLC-HRMS à l'aide de standard interne d'hippurate-d5.** (A) Courbe de calibration utilisée pour la quantification de l'hippurate de l'échantillon par le standard isotopique (hippurate-d5). (B) Quantification logarithmique de l'hippurate présent dans le milieu résiduel (milieu restant après aspiration et lavage), dans le milieu résiduel après traitement à 1h l'hippurate 500  $\mu\text{M}$ , dans le lysat cellulaire et dans le lysat cellulaire après traitement 1h à l'hippurate 500  $\mu\text{M}$ . (C) Ratio entre les différentes conditions de (B). ( $n = 6$  réplicats biologiques). \*  $p$ .value < 0,05; \*\*  $p$ .value < 0,01; \*\*\*  $p$ .value < 0,001; 2-way Anova - post-test Bonferroni.

L'hippurate est identifié et quantifié grâce à sa molécule témoin marquée : l'hippurate-d5 ajouté lors de l'extraction des métabolites (Fig. 1A). L'hippurate est retrouvé dans le milieu. En effet, celui-ci contient de l'acide hippurique [12551 - Williams' Medium E] (Fig. 1B). Cependant, il est retrouvé en plus grande quantité (Facteur 10) dans le lysat cellulaire. Cela peut être expliqué par deux choses : l'hippurate est produit au sein des hépatocytes à partir de glycine et de benzoate et il n'est pas directement sécrété mais peut s'accumuler dans les cellules. Quand de l'hippurate est ajouté au milieu, il est naturel d'en retrouver en plus grande quantité (100 fois plus) dans le milieu résiduel. Le même scénario que précédemment est retrouvé, c'est à dire que les lysats cellulaires contiennent significativement plus d'hippurate que le milieu résiduel. Cependant, le delta dans la condition traitée entre le milieu résiduel et le lysat cellulaire est amoindri (x3 au lieu de x10) (Fig. 1C). Cela pourrait s'expliquer par la capacité limitée des cellules à accumuler de l'hippurate (même s'il y a accumulation par rapport au milieu résiduel). Néanmoins ce rapport pourrait être également faussé car le delta observé en condition traité, sûrement dû à la présence endogène d'hippurate intracellulaire est gommé par l'ajout d'une quantité 100 fois supérieur d'hippurate exogène.

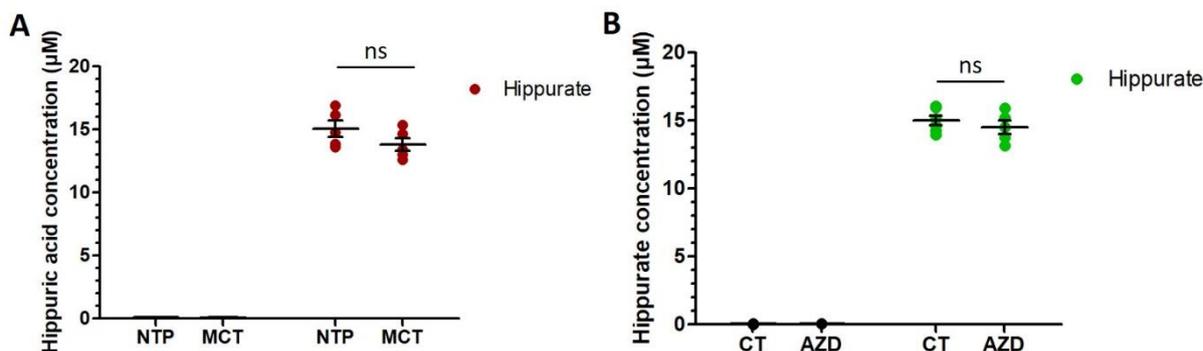
Finalement, l'hippurate est bien capté par les hépatocytes et cette internalisation montrant une accumulation relative par rapport au milieu suggère un transport actif, et donc des transporteurs dédiés.

## 6.2.2 Inhibition de l'internalisation de l'hippurate



**Figure 6.2 : L'hippurate est en partie internalisé par les transporteurs MCTs.** (A) Résultats de RT-qPCR avec changements d'expression génique analysés par la méthode  $2^{-\Delta\Delta CT}$  entre l'ARNsi contrôle (NTP) et siSlc16A contre l'ARNm codant du transporteur MCT1 (MCT) ( $n = 3$ ). (B) Concentration intracellulaire d'hippurate avec ou sans siRNA contre Slc16A1 (MCT) après 1h de traitement à l'hippurate 500  $\mu M$ . (C) Concentration intracellulaire d'hippurate avec ou sans inhibiteur de MCT1 et MCT2 (AZHA) après 1h de traitement à l'hippurate 500  $\mu M$ . ( $n = 6$  réplicats biologiques). \*  $p$ .value < 0,05; \*\*  $p$ .value < 0,01; \*\*\*  $p$ .value < 0,001; 2-way Anova - post-test Bonferroni.

Afin d'interroger cette internalisation potentiellement active de l'hippurate l'interférence ARN et l'inhibition pharmacologique du transporteur présumé de l'hippurate MCT1, codé par le gène Slc16A1, a été utilisé. Une transfection de 48 heures avec un ensemble d'ARNsi contre l'ARNm Slc16A1 a réduit efficacement l'expression du gène de 71,7 % [254] (Fig. 2A). Ce knockdown a entraîné une baisse significative de 19 % des concentrations internes d'hippurate après 1 heure de traitement à l'hippurate (MCT + HA) par rapport au contrôle avec ARNsi non cibleur (NTP + HA) (Fig. 2B). Également, un prétraitement de 30 minutes avec l'inhibiteur chimique AZD suivi d'un traitement d'une heure à l'hippurate a entraîné une réduction de 27 % de l'internalisation de l'hippurate (Fig. 2C). La valeur  $p$  élevée, due à la grande variabilité des échantillons, pourrait être due à l'utilisation d'un scan complet, contrairement à la quantification avec le siRNA, afin d'obtenir les résultats biologiques de cette inhibition sur les mêmes échantillons. Ceci amène à conclure que l'hippurate est internalisé par la cellule et que cette internalisation est en partie réalisée par les transporteurs MCT, en particulier MCT1.



**Figure 6.3 : L'internalisation de l'hippurate n'est plus modifiée par l'absence de transporteurs MCTs après 24h.** (A) Quantification des cellules transfectées 48h avec l'ARNsi contre *Slc16A1* avant 24h de traitement à l'hippurate 500 µM. (B) Quantification des cellules traitées 30min avec AZD9365 avant 24h de traitement à l'hippurate 500 µM. ( $n = 6$  réplicats biologiques)

L'étape suivante était d'observer l'impact biologique et métabolomique que pouvait avoir l'inhibition de l'internalisation de l'hippurate sur les hépatocytes. Dans ce but, le traitement à l'hippurate a été étendu à 24h en présence ou non de l'ARN si ou de l'inhibiteur chimique (Fig. 3). Cependant, la quantification de l'hippurate intracellulaire a révélé que la présence d'ARN interférent (Fig. 3A) ou d'inhibiteur chimique (Fig. 3B) n'avait pas modifié significativement la concentration d'hippurate intracellulaire.

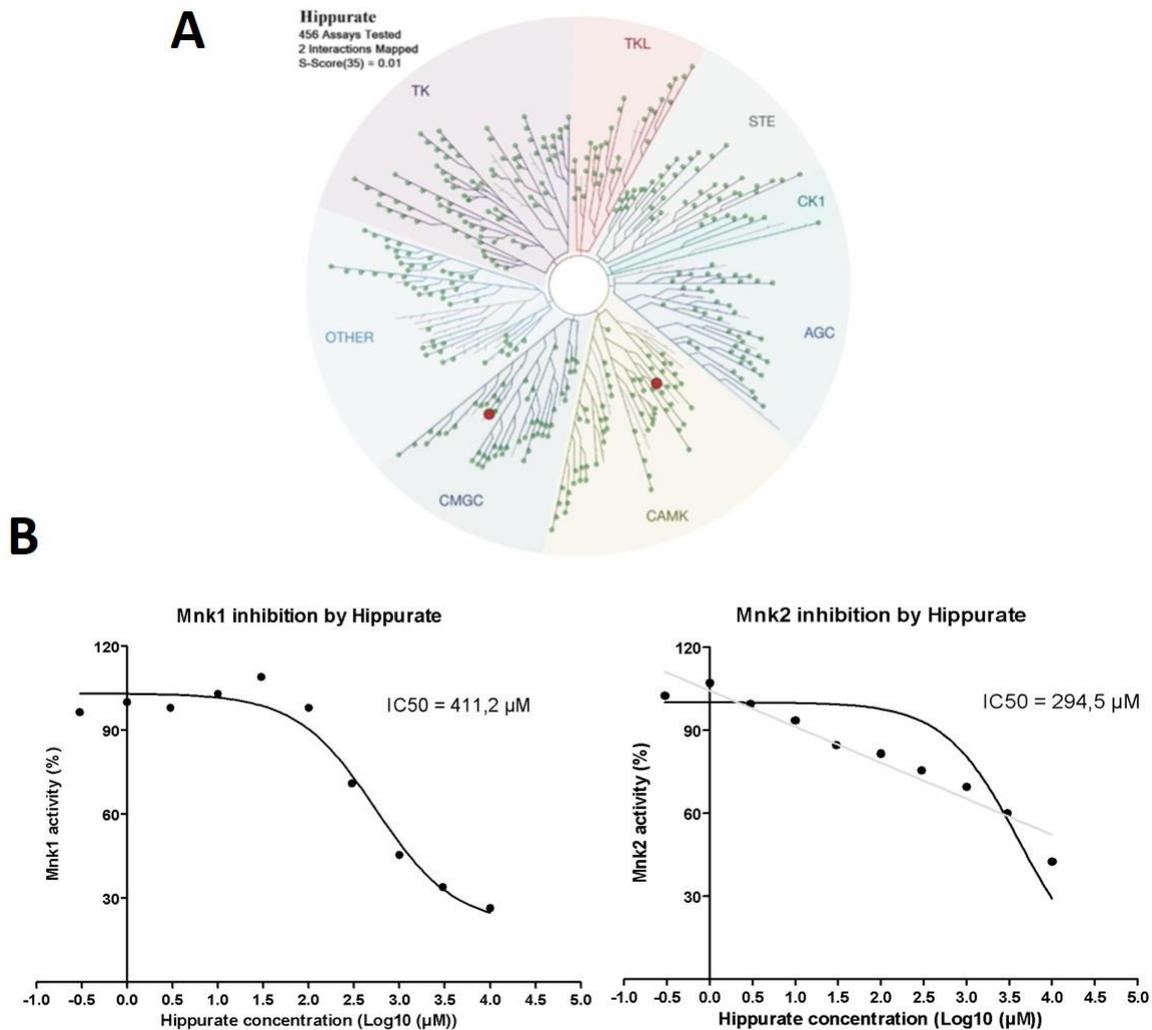
### 6.3 Conclusion

L'hippurate peut être internalisé par l'hépatocyte, ce qui peut sembler logique au vu de sa production dans le foie et de son exportation dans le sang. Les transporteurs de l'hippurate n'étaient qu'hypothétiques [162,252] mais il semblerait que les transporteurs de monocarboxylate, en particulier les isoformes 1 et 2, soient en partie responsables du transport de l'hippurate à travers la membrane plasmique. Cependant, leur knockdown incomplet ou leur inhibition complète ne permet pas de prévenir 100% de l'internalisation d'hippurate après 1h (max 27%). Plus encore, après 24h, leurs effets sont non significatifs. Il est supposable que l'inhibition incomplète de l'entrée de l'hippurate, diminuant également son exportation car les transporteurs resteraient les mêmes, permettrait à celui-ci de s'accumuler dans la cellule avec le temps, gommant ainsi l'effet des inhibiteurs.

# 7 Un nouveau rôle de l'hippurate sur le contrôle traductionnel

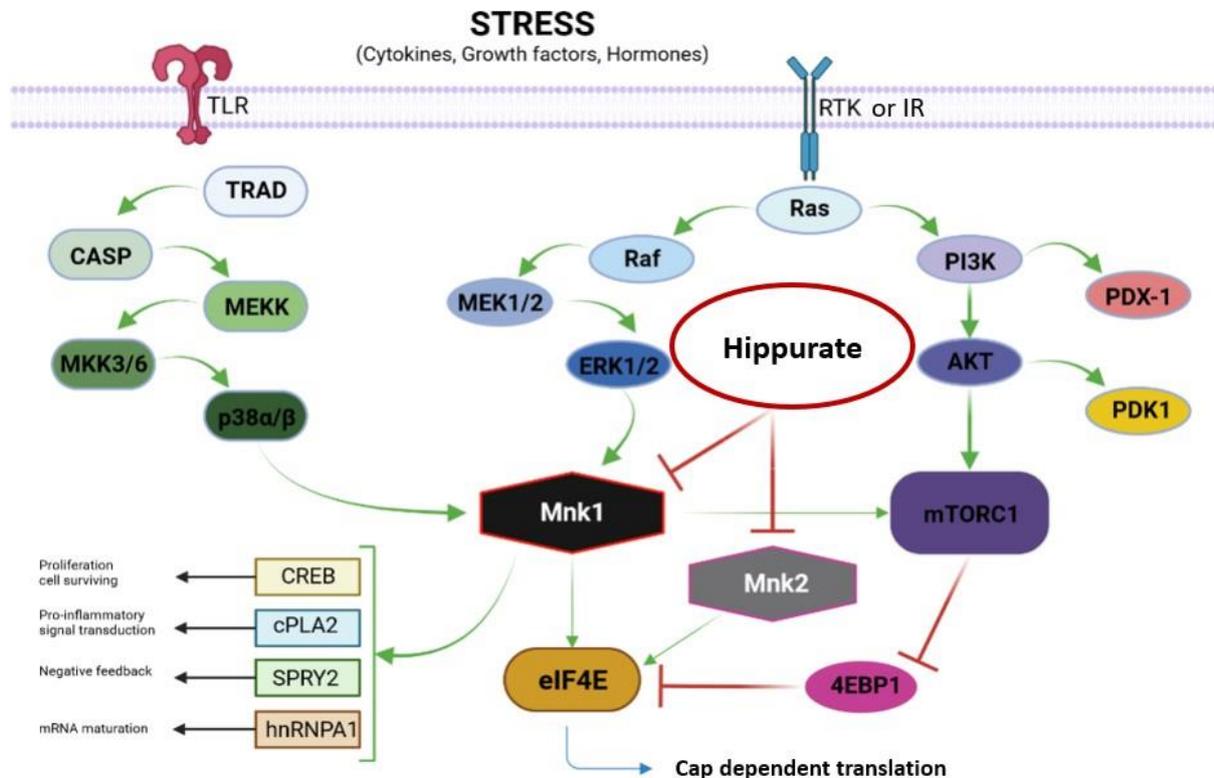
## 7.1 Introduction

La ou les cibles de l'hippurate, certainement intracellulaires au vu de son internalisation, et responsables de son effet bénéfique sur les cellules métaboliques demeurent inconnus. C'est dans l'optique de clarifier ce phénomène que le laboratoire de Marc-Emmanuel Dumas a lancé un criblage des interactions (Fig. 1A) de l'hippurate avec l'ensemble des kinases exprimées dans les cellules, le kinome [255].



**Figure 7.1 : Résultats préliminaires sous-tendant l'hypothèse d'un axe hippurate-Mnk-eI4E: l'hippurate inhibe les kinases Mnk1 et Mnk2 in vitro.** (A) Discrimination des interactions entre l'hippurate et le kinome. (B) Courbe des capacités de phosphorylation de Mnk1 modulée par l'hippurate. (C) Courbe des capacités de phosphorylation de Mnk2 modulée par l'hippurate. (Collaboration avec Mahima Swamy, University of Dundee).

Ceci a révélé que l'hippurate interagissait avec les kinases Mnk1 (MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1) et Mnk2. Les tests d'activités (Fig. 1B) correspondants ont montré la capacité de l'hippurate à inhiber Mnk1 et Mnk2 pour des IC50 de, respectivement, 411,2  $\mu$ M et 294,5  $\mu$ M.



**Figure 2.2 :** Représentation schématique de la voie MAPK amenant à la phosphorylation de eIF4E par Mnk1 et Mnk2 via les récepteurs TLR (Toll-like receptor), RTK (receptor tyrosine kinase) et IR (Insulin Receptor) en condition de stress extracellulaire, potentiellement modulée par l'hippurate.

Ces kinases interviennent à la toute fin de la voie de signalisation MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) (Fig. 2). Cette voie est activée en cas de stress exogène, apporté par l'activation de récepteurs comme RTK [256] et IR mais également par les TLR (Toll-like receptor) [257]. L'activation des Mnk, surtout Mnk1 qui est activée par ERK tandis que Mnk2 est constitutive, sont responsables de la phosphorylation eIF4E en Ser209 [258]. Cette phosphorylation est activatrice en permettant à P-eIF4E de fixer le complexe d'initiation de traduction eIF4F, ce qui favorise le recrutement des ribosomes sur l'ARNm et l'initiation de la traduction [259].

La phosphorylation de eIF4E par Mnk1 régule sélectivement à la hausse la traduction d'un sous ensemble d'ARNm impliqués dans la tumorigénèse [258], la réponse immunitaire [260], l'homéostasie métabolique [259] et l'autisme [261,262] tandis que son inhibition par KO de Mnk1 protège les souris contre l'insulino-résistance et l'inflammation induite par un régime HFD [263].

Dans le contexte de cette thèse de doctorat, l'hypothèse est que les effets bénéfiques de l'hippurate sur la santé métabolique de l'hôte via le tissu pancréatique et hépatique, ainsi que leurs cellules, sont médiés par son inhibition de l'axe Mnk1-eIF4E, régulant ainsi la traduction de l'ARNm, améliorant la survie, la néogenèse et la prolifération mais aussi la production d'insuline des cellules  $\beta$  en condition de stress [161]. La même hypothèse est émise quant au foie et ses hépatocytes. Pour tester cette hypothèse, la capacité de l'hippurate à contrôler la traduction a été examinée de manière progressive. La première étape consistait à vérifier si l'hippurate inhibe la phosphorylation de eIF4E sans affecter les molécules en amont de Mnk1 dans la voie MAPK, afin d'évaluer la spécificité de son action. Ensuite, l'effet de cette inhibition sur la synthèse protéique a été analysé, suivi de l'examen de la manière dont cette modulation de la synthèse pouvait influencer le protéome, pour le mettre perspective des données de corrélations de la cohorte ABOS, de phénotype cellulaire et de métabolomique.

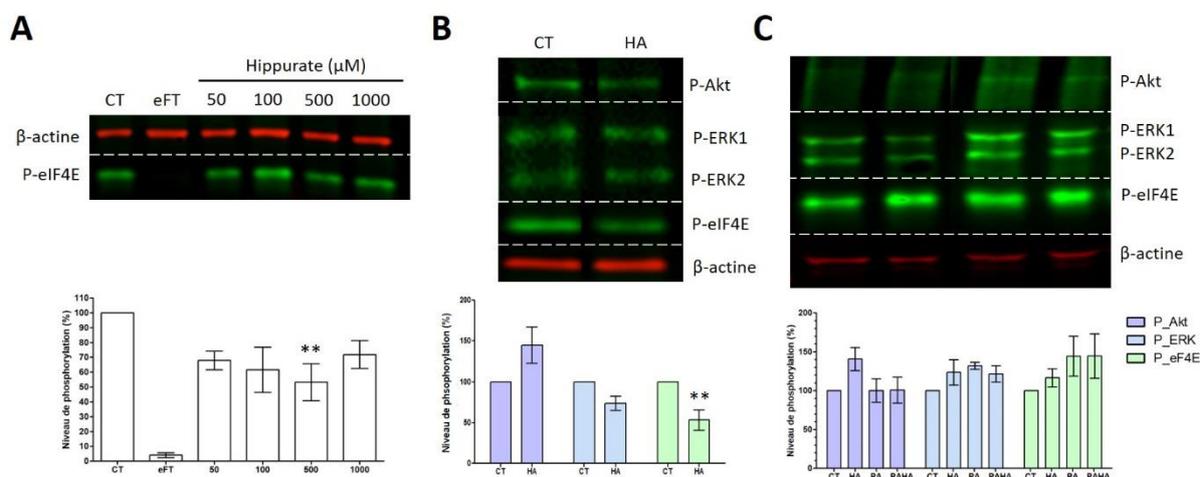
## 7.2 Résultats

### 7.2.1 Phosphorylation de eIF4E et des cibles de la voie MAPK

Mnk1 est la dernière kinase de la voie de signalisation MAPK. Son inhibition *in vitro* par l'hippurate ayant été montrée, il revient de tester notre hypothèse sur modèle cellulaire en vérifiant l'activation de la cible des Mnk, eIF4E, et ainsi l'effet de l'inhibition de l'hippurate. Il revient également de mesurer l'activation de la voie MAPK en amont des Mnk afin d'interroger une potentielle inhibition indirecte de Mnk par inhibition de sa voie activatrice. Parmi ces molécules, ERK1 et ERK2 activent directement Mnk1 [197] et Akt qui, par l'intermédiaire du complexe mTOR (mechanistic/mammalian target of rapamycin) et 4EBP1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1) peut perturber la phosphorylation de eIF4E [198,264].

Pour ce faire, un protocole de mesure semi-quantitative par western blot de la phosphorylation des molécules concernées a été mis en place. Les premières cellules interrogées étaient les Min6 (Ch. 2.1). En effet, au vu des résultats prometteurs du traitement à l'hippurate sur des souris HFD [161], les cellules bêta murines étaient le premier choix pour apporter des preuves de principe.

Les résultats sur Min6 n'étaient pas concluant d'un point de vue mécanistique et physiologique du fait des nombreux problèmes techniques rencontrés sur cette lignée. Une autre lignée de cellules bêta (INS1E) et d'autres types cellules (hépatocytes, HepG2 et IHH) ont été étudiés afin de tester l'hypothèse dans de meilleures conditions en étant aidés d'articles comme celui de F. Bitner et collaborateurs [188] et A. Abderrahmani et collaborateurs [190].

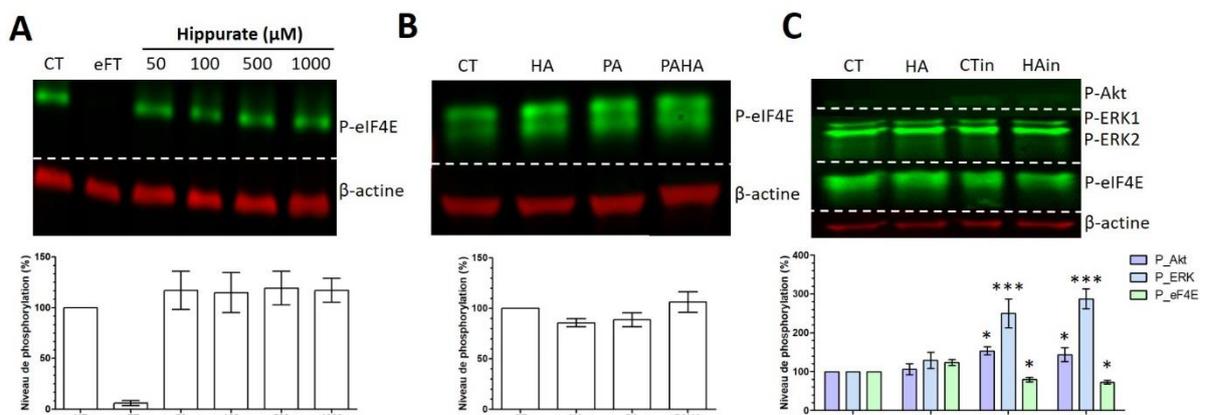


**Figure 7.3 : L'hippurate inhibe en condition basale dans les cellules INS-1E la phosphorylation de eIF4E sans modifier significativement la voie MAPK.** (A) Western blot utilisant des anticorps primaires dirigés contre eIF4E phosphorylé en sérine 209 (Ser209) et la β-actine. Différentes concentrations d'hippurate allant de 50 à 1000 μM. (B) Western blot utilisant des anticorps primaires dirigés contre eIF4E phosphorylé en Ser209, ERK1 phosphorylé en tyrosine 204/187 (Tyr204/187), ERK2 phosphorylé en Thréonine 202/185 (Thr202/185), et Akt phosphorylé en Thréonine 308 (Thr308) et la β-actine. (C) Western blot en condition lipotoxique (palmitate 24h) utilisant des anticorps primaires dirigés contre eIF4E phosphorylé en Ser209, ERK1 phosphorylé en Tyr204/187, ERK2 phosphorylé en Thr202/185, et Akt phosphorylé en Thr308 et la β-actine. Capture par l'odyssey et quantification par image j. (n=4 réplicats biologiques) \* p.valeur < 0,05 ; \*\* p.valeur < 0,01 ; \*\*\* p.valeur < 0,001. CT = Contrôle ; HA = hippurate 500 μM ; PA = palmitate 600 μM ; PAHA = palmitate 600 μM + hippurate 500 μM.

**INS1E.** Après 1h de traitement, les cellules sont récupérées (Fig. 3A). Ce temps est suffisant pour l'eFT508 (tomivosertib), inhibiteur témoin positif, d'inhiber à plus de 90 % le niveau de phosphorylation de eIF4E. Ceci démontre l'importance de Mnk1 et Mnk2 dans la phosphorylation de eIF4E, même en condition basale. Concernant l'hippurate, il est observable jusqu'à 500 μM une inhibition dose dépendante des niveaux de phosphorylation de eIF4E. L'effet maximal observé est atteint à 500μM avec une moyenne d'inhibition de 50 %. Cependant, une résurgence de ce niveau de phosphorylation (70 % du témoin) à 1000 μM est visible, ce qui pourrait être expliquée par une concentration d'hippurate supra physiologique. La capacité de l'hippurate à inhiber Mnk1 et Mnk2 serait prise de pas par le stress qu'il induirait à partir de cette concentration, revenant au niveau de phosphorylation du traitement à 50μM. Malgré cela, l'hypothèse d'impact de l'inhibition des kinases Mnk1 et Mnk2 sur la phosphorylation de eIF4E en cellule semble validée. En parallèle, l'activation de la voie MAPK et de la signalisation de l'insuline, représentées respectivement par ERK1/2 et Akt, ne sont pas significativement différentes du contrôle négatif sans hippurate. L'interaction entre

l'hippurate et ses cibles Mnk1/2 semble donc avoir un impact négatif sur l'activité de eIF4E médiée par ces kinases.

En condition de stress lipotoxique, médié par l'ajout de palmitate dans le milieu modifie les résultats observés (Fig. 3C). En effet, même en condition basale, l'hippurate ne modifie pas significativement le niveau de phosphorylation de eIF4E. La seule différence entre le contrôle de la condition basale et celui de la condition lipotoxique est la présence de BSA 10% qui est utilisé comme solvant pour le palmitate. Le contrôle de la phosphorylation de eIF4E n'est pas exclusif au kinases Mnk1/2. En effet, 4E-BP1 (4E-binding protein 1) a pour rôle de déphosphoryler eIF4E. Or, 4E-BP1 est inhibé par le complexe mTOR. Ce complexe est activé par la BSA [265]. Donc indirectement, la BSA pourrait activer la phosphorylation de eIF4E, gommant l'effet déjà subtil de l'hippurate.



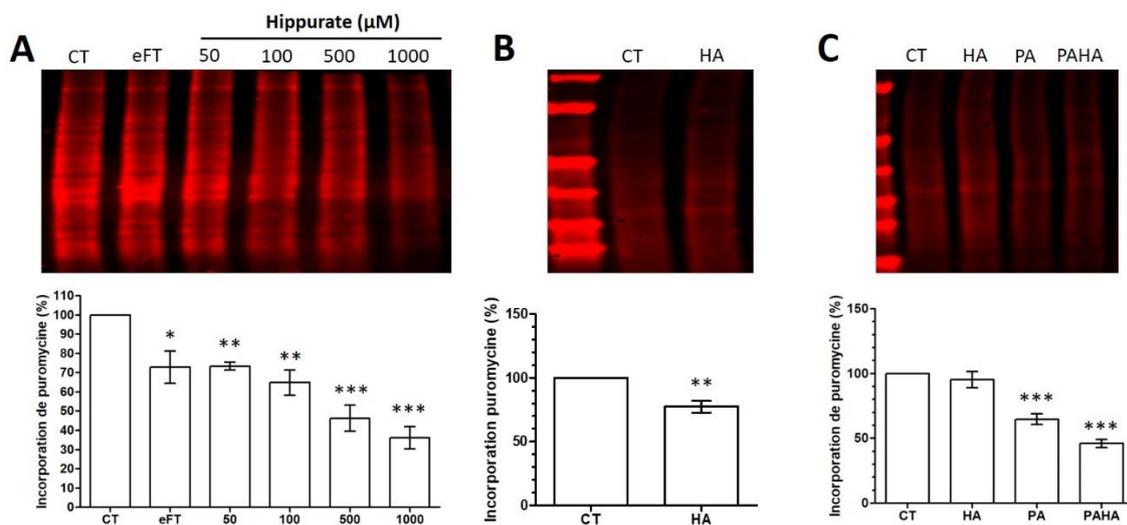
**Figure 7.4 : L'hippurate n'a pas d'effet significatif en en cellule IHH sur la phosphorylation de eIF4E en condition basale, lipotoxique ou insulino-résistante.** (A) Western blot utilisant des anticorps primaires dirigés contre eIF4E phosphorylé en sérine 209 (Ser209) et la  $\beta$ -actine. Différentes concentrations d'hippurate allant de 50 à 1000  $\mu$ M. (B) Western blot en condition lipotoxique (palmitate 24h) utilisant des anticorps primaires dirigés contre eIF4E phosphorylé en Ser209 et la  $\beta$ -actine (C) Western blot en condition d'insulino-résistance (insuline 24h) utilisant des anticorps primaires dirigés contre eIF4E phosphorylé en Ser209, ERK1 phosphorylé en tyrosine 204/187 (Tyr204/187), ERK2 phosphorylé en Thréonine 202/185 (Thr202/185), et Akt phosphorylé en Thréonine 308 (Thr308) et la  $\beta$ -actine. Capture par l'odyssey et quantification par image j. (n=4 réplicats biologiques) \* p.value < 0,05 ; \*\* p.value < 0,01 ; \*\*\* p.value < 0,001. CT = Contrôle ; HA = hippurate 500  $\mu$ M ; PA = palmitate 600  $\mu$ M ; PAHA = palmitate 600  $\mu$ M + hippurate 500  $\mu$ M ; CTins = Contrôle + insuline 100 nM ; HAins = hippurate 500  $\mu$ M + insuline 100 nM.

**IHH.** Le traitement à l'hippurate ne semble induire aucun changement dans les hépatocytes (Fig. 4). Que ce soit en condition basale (Fig. 4A), en condition de stress lipotoxique (Fig. 4B) ou en condition insulinémique (Fig. 4C), médié par l'ajout chronique d'insuline (24h, 100 nM) la phosphorylation des molécules d'intérêt n'est pas différente des contrôles négatifs.

## 7.2.2 Synthèse des protéines (incorporation de puromycine et gradient de polysomes)

### 7.2.2.1 Incorporation de puromycine

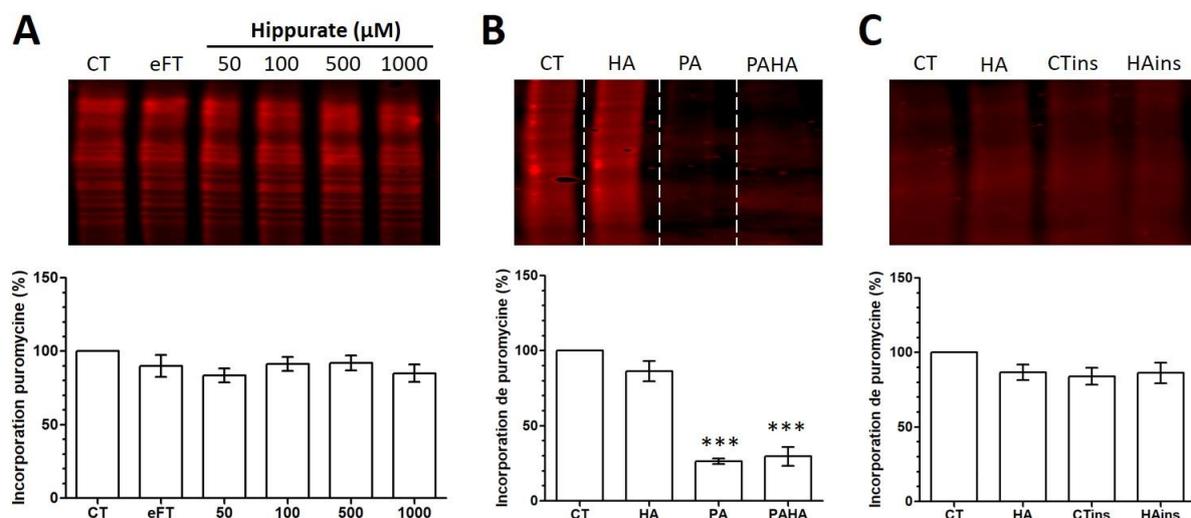
En parallèle, il était pertinent d'interroger l'effet d'une potentielle inhibition de eIF4E sur la synthèse de protéines, notre objectif initial. Même si eIF4E phosphorylé contrôlait une sélection d'ARNm, l'effet de son inhibition pourrait impacter la synthèse globale de protéines dépendants d'ARNm coiffés (Cap-dependent translation). Cette réduction globale de la traduction serait visible par l'incorporation de puromycine, la première étape du protocole SUnSET [199]. Cet aminonucléoside d'origine naturelle, la puromycine dihydrochloride, a la capacité de s'introduire dans le ribosome en cours de traduction en mimant par sa forme l'extrémité 3' d'un aminoacyl-t-ARNt (ARN de transfert couplé à un acide aminé). Cette introduction provoque l'arrêt prématurée de la traduction de l'ARNm et la synthèse d'une protéine avec en son extrémité COOH la puromycine incorporée [266,267]. La synthèse de novo de protéines est visualisable sans pour autant distinguer une potentielle synthèse préférentielle. Cependant, cette technique permet de tester l'hypothèse sur la traduction globale des ARN avant de caractériser par riboseq et protéomique les ARNm et protéines cibles. Au même titre que la phosphorylation des molécules de la voie MAPK, l'incorporation de puromycine, et ainsi la synthèse protéique a été mesurée semi-quantitativement par western blot.



**Figure 7.5** : L'hippurate inhibe en cellule INS-1E significativement la synthèse protéique. (A) Western blot utilisant des anticorps primaires dirigés contre la puromycine. Différentes concentrations d'hippurate allant de 50 à 1000 μM. (B) Western blot utilisant des anticorps primaires dirigés contre la puromycine. (C) Western blot en condition lipotoxique (palmitate 24h) utilisant des anticorps primaires dirigés contre la puromycine. Capture par l'odyssey et quantification par image j. (n=4 réplicats biologiques) \* p.value < 0,05; \*\* p.value < 0,01; \*\*\* p.value < 0,001. CT = Contrôle ; HA = hippurate 500 μM; PA = palmitate 600 μM; PAHA = palmitate 600 μM + hippurate 500 μM.

**INS-1E.** Il est possible d'observer une inhibition significative de la synthèse protéique lors du traitement à l'eFT508 chez les INS-1E (Fig. 5A). Cette inhibition est également significative et dose dépendante lors du traitement à l'hippurate. Les cellules INS-1E traitées à l'hippurate présentent un niveau de synthèse protéique similaire au niveau de phosphorylation de eIF4E, avec une inhibition de 30 % à 50 % pour des concentrations de 50  $\mu$ M à 500  $\mu$ M. Deux choses sont surprenantes ici : la première est le niveau d'inhibition par notre témoin positif qui est 3 fois inférieure à celui de la phosphorylation de eIF4E, et la deuxième est la réduction de la synthèse protéique par l'hippurate de 65 % à 1000  $\mu$ M qui est là aussi décorélée du niveau de phosphorylation de eIF4E.

Après avoir donc testé les concentrations optimales d'hippurate, ici 500  $\mu$ M, la régulation négative de l'hippurate sur la phosphorylation de eIF4E en condition basale se retrouve ici avec une diminution significative de la synthèse protéique par rapport au contrôle sans hippurate (Fig. 5B). Cette inhibition n'est pas retrouvée en condition lipotoxique, même sans palmitate (Fig. 5C). Ceci suggère que l'inhibition de la synthèse de protéines observée en condition basale est liée à l'inhibition de la phosphorylation de eIF4E par l'hippurate.

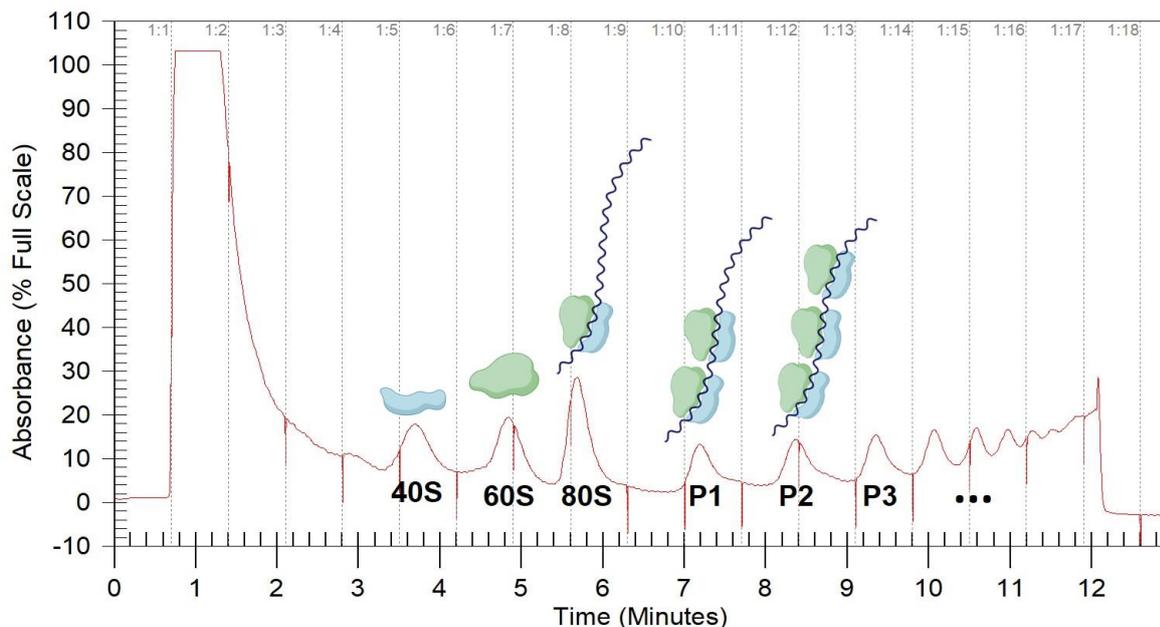


**Figure 7.6 : L'hippurate n'a pas d'effet en cellule IHH sur la synthèse protéique contrairement au palmitate.** (A) Western blot utilisant des anticorps primaires dirigés contre la puromycine. Différentes concentrations d'hippurate allant de 50 à 1000  $\mu$ M. (B) Western blot en condition lipotoxique (palmitate 24h) utilisant des anticorps primaires dirigés contre la puromycine. (C) Western blot en condition d'insulino-résistance (insuline 24h) utilisant des anticorps primaires dirigés contre la puromycine. Capture par l'odyssey et quantification par image j. (n=4 répliquats biologiques) \* p.value < 0,05; \*\* p.value < 0,01; \*\*\* p.value < 0,001. CT = Contrôle ; HA = hippurate 500  $\mu$ M; PA = palmitate 600  $\mu$ M; PAHA = palmitate 600  $\mu$ M + hippurate 500  $\mu$ M; CTins = Contrôle + insuline 100 nM; HAins = hippurate 500  $\mu$ M + insuline 100 nM.

**IHH.** Comme il pouvait être attendu, l'hippurate n'induit pas de changement (Fig. 6A), contrairement au palmitate (Fig. 6B), significatifs sur la synthèse protéique des hépatocytes. L'effet intracellulaire de l'hippurate sur la traduction des ARNm, notamment son inhibition pourrait donc être réservé aux cellules INS-1E.

### 7.2.2.2 Gradients de polysomes.

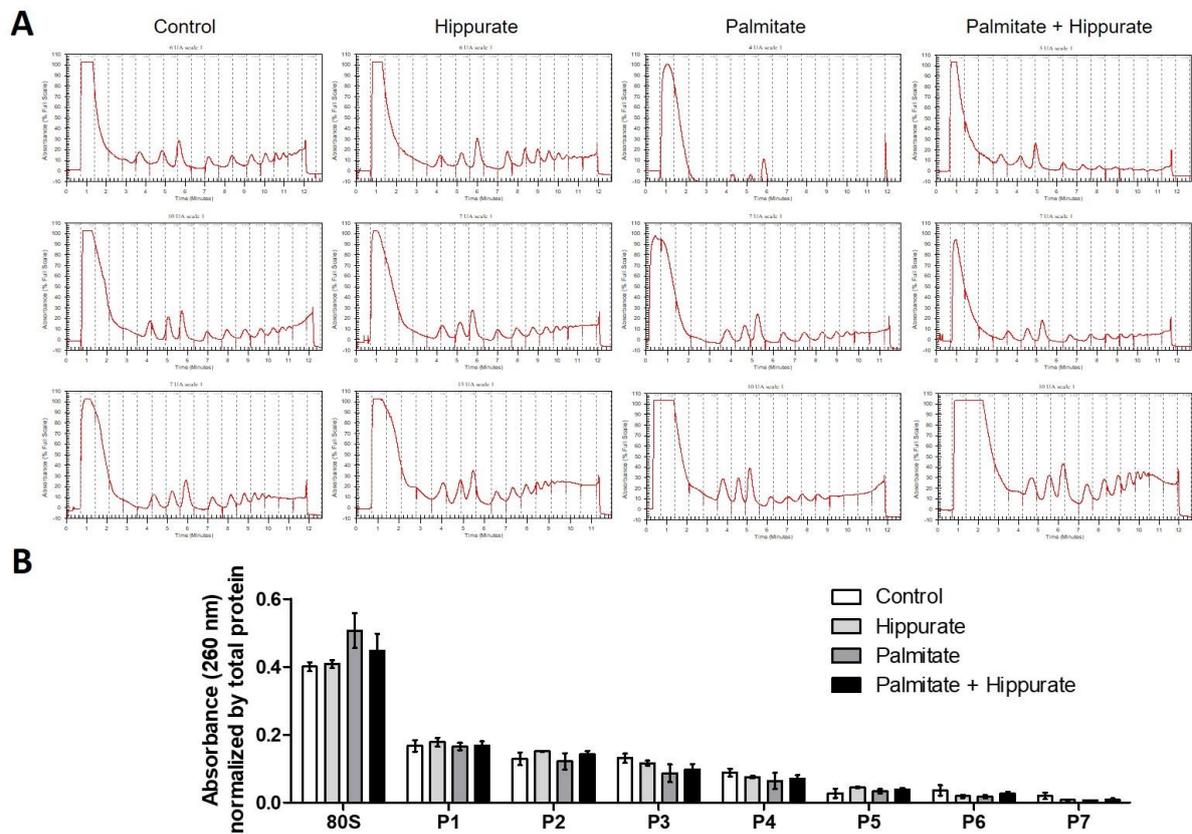
Une autre des nombreuses techniques disponibles pour interroger l'effet de l'hippurate et son inhibition de la traduction est le profilage de polysomes par gradient (polysome profiling) [193]. Lors de la traduction, l'ARNm est lu non pas par un seul ribosome, mais plusieurs, regroupés à la chaîne en polysomes. Plus il y a de ribosomes en cours de traduction sur un même ARNm, plus celui-ci, en théorie, devrait être traduit. Cette technique permet d'interroger cela en visualisant, et en quantifiant, la proportion de polysomes dans la cellule. Cela a pu être réalisé grâce la collaboration avec Olivier Namy et Isabelle Hatin de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellules (I2BC, Paris Saclay) qui ont apporté leur savoir-faire et leurs matériels afin de réaliser des gradients de polysomes sur les cellules IHH.



**Figure 7.7 : Représentation graphique légendée d'un profil de polysome.** (Collaboration avec Olivier Namy et Isabelle Hatin de l'I2BC).

A l'issue de la centrifugation des lysats cellulaires dans un gradient de sucrose, les ribosomes sont séparés en fonction de leur taille (Fig. 7). Lors de la mesure, la petite sous unité 40S et la grande sous unité 60S sortiront en premières, suivies par l'unité 80S. Les sous-unités seules sont celles non attachées à un ARNm et se doivent d'être en minorité, comparativement à l'unité 80S représentant un ribosome complet en cours de traduction, reflétant des cellules actives au moment de leur arrêt par la cycloheximide. Elles seront suivies des polysomes

sortant par ordre croissant de nombres sur l'ARNm (P2, P3, P4 etc) représentant l'intensité de traduction de la cellule. En raison du nombre important de cellules requis pour réaliser le profilage de polysomes, les IHH ont été utilisées pour la mise au point du protocole. Le traitement à l'hippurate est comparé au contrôle en condition dite "basale" et en condition lipotoxique représentée par le palmitate.



**Figure 7.8 : L'hippurate en cellule IHH n'a pas d'effet significatif sur la composition et le nombre de polysomes (A) Profils de l'absorbance au cours du temps obtenu en sortie d'appareil pour chaque condition de traitement, illustrant la composition en ribosome de la fraction passée. (B) Quantification des aires sous la courbe, normalisées par les protéines totales. (n=3) Hippurate = hippurate 500 $\mu$ M ; Palmitate = palmitate 600 $\mu$ M ; Palmitate + hippurate = palmitate 600  $\mu$ M + hippurate 500  $\mu$ M. (n=3 réplicats biologiques).**

Le profil périodique des pics montrant l'absorbance des ribosomes passant devant la lampe indique que les cellules étaient bien en cours de traduction (Fig. 8A). L'unité 80S, correspondant au ribosome attaché à son ARNm, apparaît en plus grande quantité que les sous-unités séparées, ainsi que plusieurs niveaux de polysomes (jusqu'à 9 ribosomes sur le même brin d'ARNm). Ce profil retrouvé, correspondant à une cellule active, dans tous les réplicats de toutes les conditions, qui permet de qualifier l'expérience comme ayant fonctionné. Comme observé précédemment en western blot avec incorporation de puromycine, le palmitate semble bien diminuer la traduction des ARNm des IHH comme en témoigne

l'aplatissement des courbes dans ces conditions comparativement au témoin. Cependant, l'hippurate ne semble pas induire de changement visible, que ce soit sur le nombre de polysomes (toujours 9), leur quantité (absorbance), ou le ratio entre l'unité 80S et les sous-unités 40S et 60S, en accord avec les résultats observés avec la puromycine. En effet, si l'hypothèse s'était vérifiée, l'hippurate, en inhibant eIF4E et donc la fixation de l'ARNm sur la sous-unité 40S, aurait dû entraîner une surreprésentation des sous-unités seules et une diminution de la quantité et du nombre de polysomes. Ce n'est pas le cas ici. Les résultats en condition lipotoxique sont identiques à ceux du contrôle au palmitate. Pour une meilleure représentation des résultats et de possibles analyses statistiques, l'aire sous la courbe de chaque polysome a été calculée et normalisée par l'aire sous la courbe totale, représentant les protéines totales (Fig. 8B). Comme le montrent les courbes, l'histogramme révèle que le palmitate réduit effectivement la traduction des ARNm, avec une augmentation de l'unité 80S au détriment des polysomes par rapport au contrôle. De même, le traitement à l'hippurate n'induit pas de changement significatif sur le profilage de polysomes, que ce soit en condition basale ou en condition lipotoxique. Cependant, une tendance pourrait être observée où l'hippurate semble améliorer l'effet néfaste du palmitate sur l'intensité des polysomes, mais cela reste non significatif de par la technique employée et l'effet subtil de celui-ci.

### **7.2.3 Analyse du protéome**

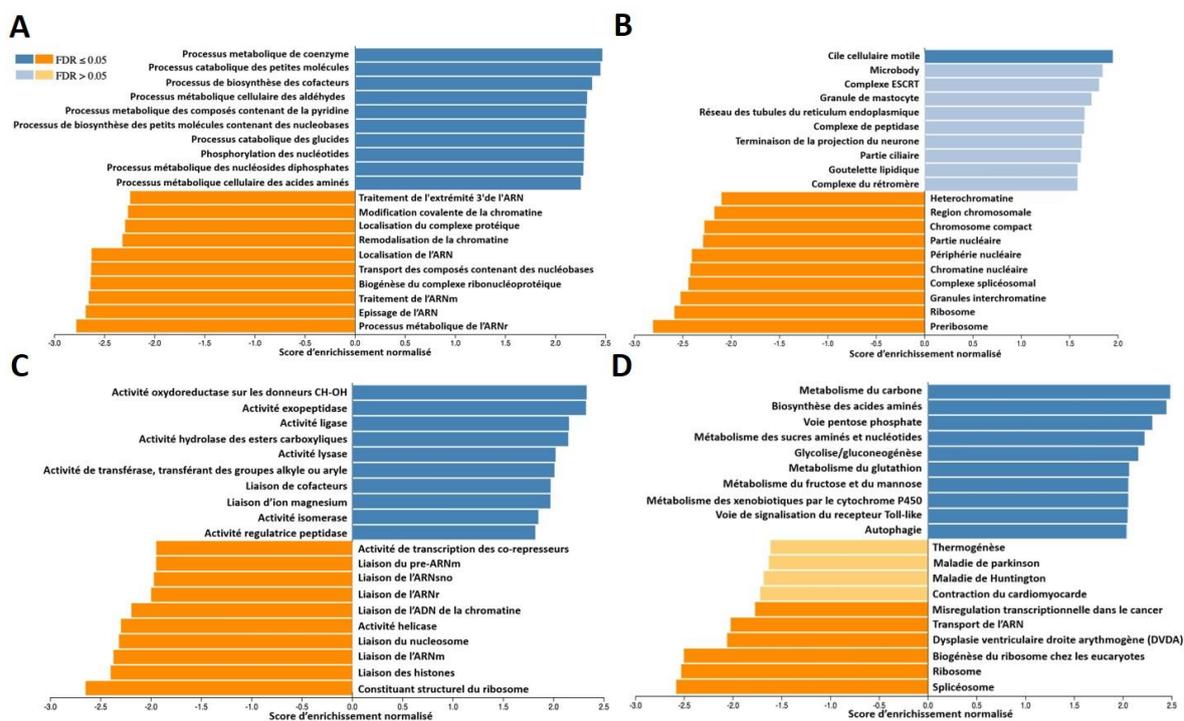
Afin de continuer de tester l'hypothèse d'une modulation de la traduction par l'hippurate, il était pertinent d'interroger plus que la synthèse globale de protéines. Une analyse du protéome permettrait de visualiser un potentiel effet ciblé de l'hippurate sur la traduction des protéines et sur le métabolisme des cellules traitées. Grâce à Luc Camoin et Stéphane Audebert de la plateforme MAP Proteomic de l'équipe protéomique et spectrométrie de Masse au sein du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), le protéome des cellules INS-1E traitées à l'hippurate a pu être mis en évidence.



Ceci est directement visible grâce à la variation d'abondance des 5166 protéines identifiées (4728 après élimination des protéines mal identifiées et quantifiées) et représentées par volcano plot (Fig. 10). Comparativement au contrôle, et après ajustement des p.value par permutation et réglage du FDR à 10% [268], l'hippurate est responsable de la modulation significative de 171 protéines.

### 7.2.3.3 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

Dans les études de génomique et de protéomique, l'analyse d'enrichissement est une méthode largement utilisée pour interpréter de manière plus approfondie l'impact biologique d'un traitement, ici l'hippurate, par rapport à un autre état physiologique, ici le contrôle non traité [269]. Le GSEA (Gene Set Enrichment Analysis), permet de regrouper les gènes, ici les gènes traduits, en ensembles fonctionnels et d'identifier ceux qui sont surreprésentés parmi les gènes exprimés. En se basant sur ces groupes de gènes codants, il devient possible de déduire leur rôle dans divers processus biologiques, d'analyser leurs fonctions moléculaires et de déterminer dans quels compartiments cellulaires leurs protéines sont destinées. De plus, cette méthode permet d'explorer les voies de signalisation spécifiques qui pourraient être influencées par un traitement particulier, facilitant ainsi une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à l'échelle moléculaire.



**Figure 7.11 : L'hippurate impacte significativement le protéome des hépatocytes.** Analyse d'enrichissement de gènes (GSEA) indiquant (A) les processus biologiques, (B) les compartiments cellulaires, (C) les fonctions moléculaires et (D) les voies de signalisation régulées par l'hippurate. (n=3 réplicats biologiques).

**Processus biologiques (Fig. 11A).** Il est observé ici que l'hippurate régule à la baisse la localisation de l'ARN, la biogenèse du complexe ribonucléoprotéique, la maturation [270] et l'épissage de l'ARNm, ainsi que le maturation de l'ARNr (ARN ribosomique). L'hippurate régule à la hausse le catabolisme des glucides, le métabolisme des acides aminés, des coenzymes.

**Compartiments cellulaires (Fig. 11B).** Cette inhibition des processus autour de la traduction par l'hippurate se retrouve avec une régulation à la baisse des protéines constitutives du ribosome, du préribosome, du nucléole (lieu de synthèse du préribosome [271]), du complexe d'épissage (spliceosome) de l'ARNm et ce qui attire à la chromatine.

**Fonctions moléculaires (Fig. 11C).** Au sein de ces structures, d'un point de vue moléculaire, l'hippurate inhibe les protéines impliquées dans l'attache du pre-ARNm, de l'ARNm, du ARNsno (petit ARN nucléaire), de l'ARNr, des histones et la constitution des ribosomes.

**KEGG voie de signalisation (Fig. 11D)** [272]. Les précédents GSEA concordent avec les voies dont les protéines impliquées sont modulées par l'hippurate. Celui-ci inhibe principalement les voies moléculaires des ribosomes et de leur biosynthèse ainsi que celles du spliceosome et du transport de l'ARN. Il y est retrouvé une activation du métabolisme du carbone et de la voie des pentoses phosphates, de la biosynthèse des acides aminés, de la glycolyse/gluconéogenèse et du métabolisme du glutathione.

L'hippurate semble donc inhiber les modifications post-transcriptionnelles apportées à l'ARNm afin qu'il soit traduit, ainsi que les constituants du ribosome nécessaire à la traduction. Ce basculement du protéome après un traitement à l'hippurate, associé à l'effet inhibiteur sur eIF4E et la synthèse globale en western blot, consolide l'hypothèse d'une régulation de la transcription des ARNm en cellule bêta.

De plus, l'hippurate semble pousser la cellule vers la production d'énergie à partir de glucides et la synthèse d'acides aminés, ce qui est critique [273] pour la cellule bêta, mais également vers une meilleure gestion du stress oxydatif à travers l'augmentation des glutathione et du cytochrome p450.

### 7.3 Conclusion

L'hippurate, à travers son inhibition des kinases Mnk1 et Mnk2 semble bien inhiber la traduction des ARNm en cellule bêta. En effet, sa capacité inhibitrice de la traduction observée par ajout de puromycine est concordante avec les changements qu'il opère sur le protéome des cellules bêta, et cela sans régulation de la voie MAPK en amont. L'hippurate, comparativement au contrôle induit un véritable glissement du protéome avec une régulation à la baisse d'un ensemble représentatif de protéines impliquées dans la traduction et la régulation de celle-ci. Cette modification du protéome se fait également en faveur de la production d'énergie et de la régulation de l'inflammation.

Ce n'est pas le cas pour les hépatocytes, où l'hippurate n'induit aucun changement significatif que ce soit sur la voie MAPK et ses cibles ou la traduction des ARNm. Les effets bénéfiques que pourrait avoir l'hippurate sur les cellules du foie ne serait donc pas à mettre sur le compte de sa capacité à inhiber Mnk1 et Mnk2.

## 8 Discussion générale

---

Avec la montée de l'épidémie d'obésité, la prévalence des maladies cardiométaboliques augmente, rendant crucial la compréhension des mécanismes qui déterminent si un individu obèse développera ou non ces pathologies associées [5,29,33,54–56]. Des études ont montré que le microbiome joue un rôle clé dans ce processus, ce qui suggère que les métabolites dérivés du microbiome, ainsi que les postbiotiques, pourraient offrir de nouvelles pistes diagnostiques et thérapeutiques [100,102,103,106,113,129,141]. Parmi ces métabolites, il a été démontré que l'hippurate améliore la santé métabolique dans des modèles murins, et que chez l'homme, il est positivement corrélé à la diversité et à la richesse du microbiome, ainsi qu'à la santé métabolique de l'hôte, en particulier chez les patients obèses [161,162,174,184,186]. Sur cette base, l'hippurate a été proposé comme biomarqueur de la santé métabolique. Cependant, nos résultats indiquent que l'hippurate pourrait être bien plus qu'un simple indicateur : il pourrait jouer un rôle actif en tant qu'acteur direct de l'amélioration de la santé métabolique.

### 8.1 Intérêts et limites de ces travaux de recherche

**PreciNASH.** Au travers de l'analyse de cohorte ABOS [274], ces travaux de recherche vont dans le sens de la littérature et démontrent pour la première fois que l'hippurate hépatique est non seulement en corrélation avec l'hippurate plasmatique, mais qu'il présente également une corrélation négative avec des caractéristiques majeures de la MASLD et le diabète de type 2 [89,92,129]. L'hippurate est inversement corrélé à l'expression de gènes impliqués dans la MASLD et dans la MASH, dont plusieurs sont directement liés à la physiopathologie de la stéatose et à ses conséquences métaboliques. Ces données précliniques renforcent l'hypothèse que l'hippurate pourrait avoir un effet protecteur direct sur la fonction hépatocytaire, voire pancréatique, jouant un rôle actif dans la prévention des effets néfastes des maladies cardiométaboliques. Cela justifie des recherches pour clarifier les mécanismes moléculaires par lesquels l'hippurate agit sur la régulation métabolique au niveau cellulaire, et pour explorer son potentiel en tant que potentiel postbiotique dans la gestion des maladies cardiométaboliques. Cependant, plusieurs limites sont visibles dans cette analyse. Tout d'abord, le dosage de l'hippurate dans le foie n'est que relatif en comparant les niveaux d'hippurate entre les patients non MASLD, MASLD non MASH et MASH, et non absolue ce qui ne permet pas de visualiser précisément les concentrations pertinentes d'hippurate pour la santé humaine. En effet, même si les concentrations d'hippurate entre individu sain et individu présentant une pathologie (notamment rénale) ont été identifiés [162,275,276], ces concentrations varient énormément dépendamment de l'âge, du sexe, de la composition

corporelle et de l'alimentation [162]. Ceci empêche de clairement d'identifier une dose pharmacologique active potentielle pour l'hippurate et limite donc la précision sur les traitements sur les différents modèles à venir pour déterminer son mécanisme d'action. Et même si ces résultats sont sans équivoque et confirment l'intérêt de l'hippurate, ils ne constituent en rien une preuve de la relation de causalité entre l'hippurate et les maladies cardiométaboliques, mais une corrélation, continuant de le situer en tant que biomarqueur. Ils ne sont donc pas suffisants à eux seuls et nécessitent des recherches ultérieures.

**Cellules bêta.** Le mécanisme d'action de l'hippurate sur les cellules est d'autant plus justifié par son interaction avec les kinases Mnk1 et Mnk2 [277]. En inhibant l'activité de ces kinases, l'hippurate semble réduire la traduction des ARNm dans les cellules bêta pancréatiques. Cette inhibition est confirmée par l'incorporation de puromycine [199], qui montre une diminution de la synthèse protéique, en cohérence avec les changements observés dans le protéome. Notamment, cette régulation se fait sans affecter la voie MAPK en amont, affirmant son ciblage direct des kinases Mnk. Comparé au contrôle, l'hippurate provoque un changement notable du protéome, avec une baisse de l'expression de nombreuses protéines impliquées dans la traduction et son contrôle. Ce glissement du protéome favorise l'homéostasie énergétique et la régulation de l'inflammation, donnant un départ d'explication de l'effet protecteur de l'hippurate sur le tissu pancréatique, en particulier contre les agressions liées aux maladies métaboliques [54,89]. Ceci est directement visible en analyse fonctionnelle car il améliore la sécrétion d'insuline des cellules bêta sans augmenter sa production, un point crucial pour éviter l'épuisement de ces cellules en conditions de haute glycémie, comme dans l'obésité ou le diabète, où une surproduction d'insuline peut entraîner un dysfonctionnement à long terme [278]. Cependant, ces résultats demeurent limités et cela en deux choses. Premièrement, les effets de l'hippurate ne sont pas seulement dépendants du type cellulaire (voir Hépatocytes), mais également dépendant de la lignée (voir Min6) cellulaire ce qui complique la visualisation d'un mécanisme par traitement mais amène à la deuxième limite : le modèle. L'utilisation de cellules immortalisées, même si elles sont avantageuses pour les preuves de concept, c'est à dire avantageuses pour une partie de ce projet de thèse, représentent un défi en soi par leurs altérations génétiques et phénotypiques qui peuvent entraîner une perte de la spécificité fonctionnelle. Car même si elles sont immortalisées, leur dégénérescence est révélée par le nombre de passage (représentant le nombre de divisions cellulaires) et, dans le cas des cellules bêta, peut limiter la production de certains composés comme l'insuline et la réponse au stress ou au traitement [279]. Ces résultats seraient donc à valider sur des modèles plus proches de la « réalité » physiologique de manière en commençant par des cellules primaires qui sont moins dégénérées mais plus compliquées à obtenir et plus fragiles [280]. Cependant, c'est ici que le modèle cellulaire s'arrête, par son isolation restrictive, et que d'autres modèles

sont disponibles comme les co-cultures, les organoïdes, organes sur puces (organ-on-a-chip) et les modèles animaux [281–284] qui respectivement sont de plus en plus complexes à mettre en œuvre, à gérer, à interpréter et à reproduire mais qui permettent de plus en plus d'interactions et de compréhension globale afin de mieux appréhender les effets de l'hippurate sur l'Homme.

**Hépatocytes.** Le mécanisme de gestion de la traduction par l'hippurate n'est cependant pas valable pour les hépatocytes, où l'hippurate n'induit aucun changement significatif que ce soit sur la voie MAPK et ses cibles ou la traduction des ARNm. Les résultats sur le métabolisme et la physiologie des hépatocytes sont pourtant sans appel. Administré de façon chronique, l'hippurate modifie subtilement le métabolome des hépatocytes en augmentant l'abondance relative des métabolites impliqués dans l'homéostasie énergétique (métabolisme des lipides et des sucres) et en diminuant ceux impliqués dans l'inflammation et la résistance à l'insuline tandis que dans des conditions d'insulinémie chronique, distinguée dans l'obésité et le prédiabète, il agit comme un antagoniste aux effets potentiellement délétère de l'insuline sur le moyen-long terme [190,285]. Cela est retrouvé au niveau phénotypique car l'hippurate régule à la baisse le stockage des triglycérides dans les hépatocytes en conditions physiologiques, tout en rétablissant les niveaux basaux de ce stockage en conditions pro-stéatosiques, causées par des traitements au palmitate ou à l'insuline. Il inhibe également l'absorption du glucose dans ces cellules, que ce soit de manière aiguë ou chronique, sans affecter négativement la prolifération cellulaire. En modulant à la fois le métabolisme des lipides et des sucres, l'hippurate freine la progression de la stéatose hépatique et améliore la réponse long terme des hépatocytes à l'insuline, même dans des conditions de résistance induite, telles que celles observées dans l'obésité et la MASLD. Les effets bénéfiques que pourrait avoir l'hippurate sur les cellules du foie ne serait donc pas à mettre sur le compte de sa capacité à inhiber les kinases Mnk et interrogent également sur la possibilité de plusieurs cibles de l'hippurate même dans la cellule bêta. Cela ouvre la voie à d'autres mécanismes d'action, et plusieurs études proposent l'hippurate comme ligand du récepteur GPR109A, aussi appelé HCA2, un récepteur activé par la niacine (vitamine B3). Ce récepteur, bien connu pour son rôle dans la régulation du métabolisme lipidique et de l'inflammation, pourrait être une cible clé de l'hippurate dans les hépatocytes et expliquer ses effets bénéfiques [142,286–288]. Cela engendre l'interrogation de la priorité d'action de l'hippurate dépendant de sa concentration efficace médiane (EC50) et du tissu avec lequel il est en contact. En effet, les deux cibles proposées ici sont les kinases Mnk1/2 que l'on sait interagir avec l'hippurate avec une IC50 d'environ 400  $\mu$ M et le GPR109A dont l'interaction est hypothétique et l'EC50 inconnue. De plus, le mécanisme d'action de l'hippurate sur les hépatocytes semble différent de celui sur les cellules bêta. Dépendamment de l'EC50 requise qui serait cellulodépendant,

chacune des cibles pourrait être la cible primaire (si EC50 cible 1 <<< EC50 cible 2) ou secondaire (si EC50 cible 1 >>> cible 2) et dicterait les effets de l'hippurate en plus de la spécificité cellulaire. Les métabolites microbiens comme les SCFA, les acides biliaires secondaires et les indoles et les molécules clés de l'inflammation comme les interleukines [102,115,147,289,289] font partie des nombreux exemples qui pourraient appuyer cette possibilité de pharmacologie secondaire mais démontrent la limite aussi la limite de l'utilisation d'un seul type cellulaire et la focalisation d'un seul mécanisme possible.

**Transport de l'hippurate.** Nos recherches montrent désormais que l'hippurate peut être internalisé par les hépatocytes, ce qui pourrait paraître logique compte tenu de sa production dans le foie et de son exportation dans le sang. Bien que les transporteurs de l'hippurate aient été longtemps hypothétiques [162,169], il semble que les transporteurs de monocarboxylate (MCT), en particulier les isoformes 1 et 2, jouent un rôle partiel dans son passage à travers la membrane plasmique. Cela rentre également en concordance avec le fait que l'effet de l'hippurate sur les cellules Min6 (cellules bêta murines immortalisées) n'était pas quantifiable, celles-ci ne présentant pas ces transporteurs, contrairement aux cellules INS-1E [171]. Cependant, la réduction de leur expression par knockdown ou leur inhibition chimique ne permet pas de bloquer totalement l'internalisation de l'hippurate. Après 1 heure de traitement, au mieux une réduction de 27% est observé, et après 24 heures, leurs effets deviennent non significatifs. Cela suggère que, même en présence d'inhibiteurs, plus de 70% de l'hippurate continue à pénétrer dans les cellules. De plus, il est également probable que ces transporteurs soient impliqués non seulement dans l'importation mais aussi dans l'exportation de l'hippurate, favorisant son accumulation au fil du temps et annulant ainsi l'effet des inhibiteurs sur le moyen et long terme [290]. Enfin, ces transporteurs n'étant pas spécifiques à l'hippurate, mais permettant l'entrée/sortie d'autres composés comme le lactate, le pyruvate ou le butyrate, leur inhibition engendre une modification majeure du métabolisme cellulaire qui pourrait impacter les effets de l'hippurate et cela indépendamment de son entrée mais rend également sa quantification absolue plus ardue à visualiser.

## 8.2 Perspectives

Les résultats obtenus ouvrent la voie à de plus profondes analyses qui viendraient confirmer les résultats précliniques sur la cohorte ABOS, le métabolisme et le contrôle traductionnel des cellules bêta.

**PreciNASH.** Il pourrait être pertinent de pousser les recherches de corrélation entre l'hippurate circulant et hépatiques avec les différents marqueurs de la santé métaboliques et les comparer aux critères définissant le syndrome métabolique comme l'adiposité viscérale, l'hyperglycémie, la dyslipidémie (HDL cholestérol et triglycérides), l'albumine urinaire et l'hypertension. Également, il serait pertinent de confirmer les résultats de Brial et collaborateurs [161] sur cette cohorte et renforcer le lien entre des taux élevés d'hippurate et une meilleure tolérance au glucose ou la sécrétion d'insuline en vérifiant notamment les niveaux de peptide C (concentration moins variable dans le temps et non perturbée par la présence d'anticorps anti-insuline) [291]. Cela permettrait notamment de confirmer l'effet global de ce que la protection des organes clés, comme le foie et le pancréas, par l'hippurate apporte à la santé de l'individu et ouvrir la porte à l'analyse d'autres tissus comme le tissu adipeux jouant un rôle prépondérant dans la santé et la communication inter-organes [292].

**Mécanisme d'action.** Il est pertinent de poursuivre l'analyse du protéome sous des conditions différentes (temps de traitement prolongé et utilisation de témoins positifs comme la puromycine) en raison de l'effet déjà bien visible de l'hippurate sur les cellules bêta. Cela pourrait également s'avérer pertinent pour d'autres types cellulaires, tels que les hépatocytes, afin d'évaluer un niveau de régulation différent de l'hippurate sur ces cellules. L'analyse conjointe du transcriptome, notamment par RNA-seq [293], permettrait de visualiser plus précisément les gènes régulés par l'hippurate et de les mettre en relation avec les protéines restantes [294]. Cela offrirait une meilleure compréhension des cibles secondaires de l'hippurate. Par ailleurs, la voie du récepteur HCA2 à la niacine, dont l'activation produit des effets similaires à ceux de l'hippurate (anti-inflammatoires et anti-stéatosiques) [142,288], représente un axe d'intérêt. L'exploration de son rôle dans le mécanisme d'action de l'hippurate pourrait être menée à travers des approches classiques, telles que l'inhibition compétitive, le knockdown ou le knockout de HCA2, en présence ou non de ce métabolite, suivis d'analyses fonctionnelles.

**Actions de l'hippurate.** L'analyse du profil inflammatoire et apoptotique des cellules, via des techniques telles que la RT-qPCR et le RNA-seq, permettrait de mesurer l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, comme TNF $\alpha$ , CCL2, CXCL8/9/10, IL-6, IL-1 $\beta$ , SOD2,

XBP1 et ATF4 , ainsi que dans l'apoptose, comme CHOP (DDIT3), BAX et les caspases [240,295–297]. Bien qu'une étude métabolomique sur les hépatocytes ait déjà été réalisée, il serait pertinent de reproduire cette analyse sur les cellules bêta, notamment sous stress glucolipotoxique, qui reflète plus fidèlement les conditions observées dans les maladies métaboliques [296,298,299]. En effet, des stress lipotoxique (avec du palmitate) et une insuliniémie chronique ont déjà été testés, mais un stress glucolipotoxique offrirait une meilleure modélisation des mécanismes pathologiques par notamment les effets combinés de ces deux stress. De plus, l'utilisation de cellules moins transformées, telles que les cellules primaires (comme les EndoC- $\beta$ H1/5 [300,301] ou les hépatocytes primaires), et de modèles plus complexes comme les organoïdes [282], serait bénéfique. Ces approches permettraient, d'une part, de limiter les biais liés à l'immortalisation et à la dégénérescence des lignées cellulaires, et d'autre part, de fournir un modèle plus représentatif de l'organisation et des interactions entre différents types cellulaires, notamment dans le cadre de traitements à l'hippurate en condition glucolipotoxique.

**Transport.** Pour approfondir notre compréhension des mécanismes et optimiser nos résultats, plusieurs approches peuvent être envisagées. Tout d'abord, il serait judicieux de varier les durées de traitement à l'hippurate et d'utiliser une molécule témoin, telle que le lactate [171], afin de mieux appréhender la dynamique d'entrée et de sortie de l'hippurate, ainsi que d'évaluer plus précisément l'efficacité des inhibiteurs. De même, une inhibition complète des transporteurs, soit par knockout via la technologie CRISPR/Cas9 [302], soit en utilisant des lignées cellulaires dépourvues de ces transporteurs (comme la lignée knockout Human SLC16A1), serait indispensable pour obtenir des résultats plus probants. En effet, une inhibition partielle laisse encore suffisamment de transporteurs actifs, permettant l'accumulation d'hippurate dans la cellule, ce qui complique l'observation de l'effet d'un traitement chronique. Enfin, il revient de vérifier l'internalisation de l'hippurate dans d'autres types cellulaires, notamment les cellules bêta pancréatiques où son effet médié par les cibles intracellulaires Mnk sur la traduction des ARNm est en bonne voie.

Ces travaux ont apporté de nouvelles preuves au niveau préclinique et cellulaire, permettant de mieux caractériser l'hippurate comme un co-métabolite bénéfique pour l'hôte et son microbiome par un effet pro-actif dans le contexte des maladies cardiométaboliques. En particulier, ils ont pavé la voie à une meilleure compréhension de son mécanisme d'action, bien que de nombreuses questions restent encore à résoudre. L'hippurate pourrait donc représenter à moyen-long terme un candidat postbiotique prometteur pour des études cliniques, notamment dans la prévention de la MASLD et du diabète chez les patients souffrant d'obésité.

## 9 Bibliographie

---

- [1] World Health Organization., 2021. The top 10 causes of death.
- [2] Xu, C., Cao, Z., 2022. Cardiometabolic diseases, total mortality, and benefits of adherence to a healthy lifestyle: a 13-year prospective UK Biobank study. *Journal of Translational Medicine* 20(1): 234, Doi: 10.1186/s12967-022-03439-y.
- [3] Clemente-Suárez, V.J., Beltrán-Velasco, A.I., Redondo-Flórez, L., Martín-Rodríguez, A., Tornero-Aguilera, J.F., 2023. Global Impacts of Western Diet and Its Effects on Metabolism and Health: A Narrative Review. *Nutrients* 15(12): 2749, Doi: 10.3390/nu15122749.
- [4] Sattar, N., Gill, J.M.R., Alazawi, W., 2020. Improving prevention strategies for cardiometabolic disease. *Nature Medicine* 26(3): 320–5, Doi: 10.1038/s41591-020-0786-7.
- [5] Blüher, M., 2019. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews. Endocrinology* 15(5): 288–98, Doi: 10.1038/s41574-019-0176-8.
- [6] World Health Organization., 2022. prevalence-of-obesity-among-adults-bmi- $\geq$ 30-(age-standardized-estimate).
- [7] Mayoral, L.P.-C., Andrade, G.M., Mayoral, E.P.-C., Huerta, T.H., Canseco, S.P., Rodal Canales, F.J., et al., 2020. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *The Indian Journal of Medical Research* 151(1): 11–21, Doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_1768\_17.
- [8] Eknoyan, G., 2008. Adolphe Quetelet (1796–1874)—the average man and indices of obesity. *Nephrology Dialysis Transplantation* 23(1): 47–51, Doi: 10.1093/ndt/gfm517.
- [9] Rothman, K.J., 2008. BMI-related errors in the measurement of obesity. *International Journal of Obesity* 32(3): S56–9, Doi: 10.1038/ijo.2008.87.
- [10] Habbu, A., Lakkis, N.M., Dokainish, H., 2006. The Obesity Paradox: Fact or Fiction? *American Journal of Cardiology* 98(7): 944–8, Doi: 10.1016/j.amjcard.2006.04.039.
- [11] Ellis, K.J., 2000. Human Body Composition: In Vivo Methods. *Physiological Reviews* 80(2): 649–80, Doi: 10.1152/physrev.2000.80.2.649.
- [12] Yang, R., Yu, J., Luo, C., Qi, W., Yang, D., Xue, H., et al., 2024. Correlations and consistency of body composition measurement indicators and BMI: a systematic review. *International Journal of Obesity*, Doi: 10.1038/s41366-024-01638-9.
- [13] World Health Organization., n.d. Obesity and overweight.
- [14] United Nations., n.d. 2019 Revision of World Population Prospects.
- [15] Institute for health metrics and evaluation., n.d. Global Burden of Disease 2021.
- [16] Aleksandrova, K., Egea Rodrigues, C., Floegel, A., Ahrens, W., 2020. Omics Biomarkers in Obesity: Novel Etiological Insights and Targets for Precision Prevention. *Current Obesity Reports* 9(3): 219–30, Doi: 10.1007/s13679-020-00393-y.
- [17] Roach, P.J., Depaoli-Roach, A.A., Hurley, T.D., Tagliabracci, V.S., 2012. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *The Biochemical Journal* 441(3): 763–87, Doi: 10.1042/BJ20111416.
- [18] Murray, B., Rosenbloom, C., 2018. Fundamentals of glycogen metabolism for coaches and athletes. *Nutrition Reviews* 76(4): 243–59, Doi: 10.1093/nutrit/nuy001.
- [19] Fernández-Eliás, V.E., Ortega, J.F., Nelson, R.K., Mora-Rodríguez, R., 2015. Relationship between muscle water and glycogen recovery after prolonged exercise in the heat in humans. *European Journal of Applied Physiology* 115(9): 1919–26, Doi: 10.1007/s00421-015-3175-z.
- [20] Wasserman, D.H., 2009. Four grams of glucose. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 296(1): E11–21, Doi: 10.1152/ajpendo.90563.2008.

- [21] Müller, S., Kulenkampff, E., Wolfrum, C., 2016. Adipose Tissue Stem Cells. In: Herzig, S., editor. *Metabolic Control*, Cham: Springer International Publishing p. 251–63.
- [22] Lu, B., Bridges, D., Yang, Y., Fisher, K., Cheng, A., Chang, L., et al., 2014. Metabolic crosstalk: molecular links between glycogen and lipid metabolism in obesity. *Diabetes* 63(9): 2935–48, Doi: 10.2337/db13-1531.
- [23] Waltsgott, L., Adedeji, A., Buchcik, J., 2024. Ideal body image and socioeconomic factors: exploring the perceptions of Kenyan women. *BMC Women’s Health* 24(1): 501, Doi: 10.1186/s12905-024-03307-5.
- [24] Finkelstein, E.A., Strombotne, K.L., 2010. The economics of obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition* 91(5): 1520S–1524S, Doi: 10.3945/ajcn.2010.28701E.
- [25] Kopp, W., 2019. How Western Diet And Lifestyle Drive The Pandemic Of Obesity And Civilization Diseases. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 12: 2221–36, Doi: 10.2147/DMSO.S216791.
- [26] de Macedo, I.C., de Freitas, J.S., da Silva Torres, I.L., 2016. The Influence of Palatable Diets in Reward System Activation: A Mini Review. *Advances in Pharmacological Sciences* 2016: 7238679, Doi: 10.1155/2016/7238679.
- [27] Hall, K.D., Farooqi, I.S., Friedman, J.M., Klein, S., Loos, R.J.F., Mangelsdorf, D.J., et al., 2022. The energy balance model of obesity: beyond calories in, calories out. *The American Journal of Clinical Nutrition* 115(5): 1243–54, Doi: 10.1093/ajcn/nqac031.
- [28] Ko, S.-H., Jung, Y., 2021. Energy Metabolism Changes and Dysregulated Lipid Metabolism in Postmenopausal Women. *Nutrients* 13(12): 4556, Doi: 10.3390/nu13124556.
- [29] Speakman, J.R., de Jong, J.M.A., Sinha, S., Westerterp, K.R., Yamada, Y., Sagayama, H., et al., 2023. Total daily energy expenditure has declined over the past three decades due to declining basal expenditure, not reduced activity expenditure. *Nature Metabolism* 5(4): 579–88, Doi: 10.1038/s42255-023-00782-2.
- [30] Borodulin, K., Laatikainen, T., Juolevi, A., Jousilahti, P., 2008. Thirty-year trends of physical activity in relation to age, calendar time and birth cohort in Finnish adults. *European Journal of Public Health* 18(3): 339–44, Doi: 10.1093/eurpub/ckm092.
- [31] Goodarzi, M.O., 2018. Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology* 6(3): 223–36, Doi: 10.1016/S2213-8587(17)30200-0.
- [32] Loos, R.J.F., Yeo, G.S.H., 2022. The genetics of obesity: from discovery to biology. *Nature Reviews. Genetics* 23(2): 120–33, Doi: 10.1038/s41576-021-00414-z.
- [33] Wang, K., Li, W.-D., Zhang, C.K., Wang, Z., Glessner, J.T., Grant, S.F.A., et al., 2011. A genome-wide association study on obesity and obesity-related traits. *PloS One* 6(4): e18939, Doi: 10.1371/journal.pone.0018939.
- [34] Kopelman, P., 2007. Health risks associated with overweight and obesity. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* 8 Suppl 1: 13–7, Doi: 10.1111/j.1467-789X.2007.00311.x.
- [35] UniProt., n.d. Q9C0B1 · FTO\_HUMAN.
- [36] Karra, E., O’Daly, O.G., Choudhury, A.I., Yousseif, A., Millership, S., Neary, M.T., et al., 2013. A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsivity. *The Journal of Clinical Investigation* 123(8): 3539–51, Doi: 10.1172/JCI44403.
- [37] Claussnitzer, M., Dankel, S.N., Kim, K.-H., Quon, G., Meuleman, W., Haugen, C., et al., 2015. FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *The New England Journal of Medicine* 373(10): 895–907, Doi: 10.1056/NEJMoa1502214.
- [38] Mizuno, T.M., 2018. Fat Mass and Obesity Associated (FTO) Gene and Hepatic Glucose and Lipid Metabolism. *Nutrients* 10(11): 1600, Doi: 10.3390/nu10111600.

- [39] Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., et al., 1997. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88(1): 131–41, Doi: 10.1016/s0092-8674(00)81865-6.
- [40] Baldini, G., Phelan, K.D., 2019. The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications. *The Journal of Endocrinology* 241(1): R1–33, Doi: 10.1530/JOE-18-0596.
- [41] Shen, W., Yao, T., Kong, X., Williams, K.W., Liu, T., 2017. Melanocortin neurons: Multiple routes to regulation of metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1863(10, Part A): 2477–85, Doi: 10.1016/j.bbadis.2017.05.007.
- [42] Yeo, G.S.H., Chao, D.H.M., Siegert, A.-M., Koerperich, Z.M., Ericson, M.D., Simonds, S.E., et al., 2021. The melanocortin pathway and energy homeostasis: From discovery to obesity therapy. *Molecular Metabolism* 48: 101206, Doi: 10.1016/j.molmet.2021.101206.
- [43] Müller, T.D., Nogueiras, R., Andermann, M.L., Andrews, Z.B., Anker, S.D., Argente, J., et al., 2015. Ghrelin. *Molecular Metabolism* 4(6): 437–60, Doi: 10.1016/j.molmet.2015.03.005.
- [44] Zhang, F., Chen, Y., Heiman, M., Dimarchi, R., 2005. Leptin: structure, function and biology. *Vitamins and Hormones* 71: 345–72, Doi: 10.1016/S0083-6729(05)71012-8.
- [45] Mayer, J.P., Zhang, F., DiMarchi, R.D., 2007. Insulin structure and function. *Biopolymers* 88(5): 687–713, Doi: 10.1002/bip.20734.
- [46] Sweeney, P., Gimenez, L.E., Hernandez, C.C., Cone, R.D., 2023. Targeting the central melanocortin system for the treatment of metabolic disorders. *Nature Reviews Endocrinology* 19(9): 507–19, Doi: 10.1038/s41574-023-00855-y.
- [47] Anderson, E.J.P., Çakir, I., Carrington, S.J., Cone, R.D., Ghamari-Langroudi, M., Gillyard, T., et al., 2016. 60 YEARS OF POMC: Regulation of feeding and energy homeostasis by  $\alpha$ -MSH. *Journal of Molecular Endocrinology* 56(4): T157-174, Doi: 10.1530/JME-16-0014.
- [48] Saeed, S., Bonnefond, A., Manzoor, J., Shabir, F., Ayesha, H., Philippe, J., et al., 2015. Genetic variants in LEP, LEPR, and MC4R explain 30% of severe obesity in children from a consanguineous population. *Obesity* 23(8): 1687–95, Doi: 10.1002/oby.21142.
- [49] Ichimura, A., Hirasawa, A., Poulain-Godefroy, O., Bonnefond, A., Hara, T., Yengo, L., et al., 2012. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* 483(7389): 350–4, Doi: 10.1038/nature10798.
- [50] Falchi, M., Moustafa, J.S.E.-S., Takousis, P., Pesce, F., Bonnefond, A., Andersson-Assarsson, J.C., et al., 2014. Low copy number of the salivary amylase gene predisposes to obesity. *Nature Genetics* 46(5): 492–7, Doi: 10.1038/ng.2939.
- [51] Hutch, C.R., Sandoval, D., 2017. The Role of GLP-1 in the Metabolic Success of Bariatric Surgery. *Endocrinology* 158(12): 4139–51, Doi: 10.1210/en.2017-00564.
- [52] Schauer, P.R., Bhatt, D.L., Kirwan, J.P., Wolski, K., Aminian, A., Brethauer, S.A., et al., 2017. Bariatric Surgery versus Intensive Medical Therapy for Diabetes — 5-Year Outcomes. *New England Journal of Medicine* 376(7): 641–51, Doi: 10.1056/NEJMoa1600869.
- [53] Müller, T.D., Finan, B., Bloom, S.R., D’Alessio, D., Drucker, D.J., Flatt, P.R., et al., 2019. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Molecular Metabolism* 30: 72–130, Doi: 10.1016/j.molmet.2019.09.010.
- [54] Piché, M.-E., Tchernof, A., Després, J.-P., 2020. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circulation Research* 126(11): 1477–500, Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316101.

- [55] Nassir, F., Rector, R.S., Hammoud, G.M., Ibdah, J.A., 2015. Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. *Gastroenterology & Hepatology* 11(3): 167–75.
- [56] Public Health England., 2014. Adult obesity and type 2 diabetes.
- [57] Dirlwanger, M., Klee, P., Schwitzgebel\*, V.M., 2008. La cause du diabète dicte le traitement: 6.
- [58] N.d. Symptômes et diagnostic du diabète. <https://www.ameli.fr/lille-douai/assure/sante/themes/diabete/diabete-symptomes-evolution/diagnostic-diabete>. [accessed December 24, 2021].
- [59] Ong, K.L., Stafford, L.K., McLaughlin, S.A., Boyko, E.J., Vollset, S.E., Smith, A.E., et al., 2023. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet* 402(10397): 203–34, Doi: 10.1016/S0140-6736(23)01301-6.
- [60] Gopalan, C., Kirk, E., 2022. Endocrine pancreas. *Biology of Cardiovascular and Metabolic Diseases*, Elsevier p. 209–22.
- [61] Leung, P.S., 2010. Physiology of the pancreas. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 690: 13–27, Doi: 10.1007/978-90-481-9060-7\_2.
- [62] Leung, P.S., 2010. Overview of the pancreas. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 690: 3–12, Doi: 10.1007/978-90-481-9060-7\_1.
- [63] Utiger, R.D., 2024. pancreas.
- [64] Jiang, G., Zhang, B.B., 2003. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 284(4): E671-678, Doi: 10.1152/ajpendo.00492.2002.
- [65] Gilon, P., 2020. The Role of  $\alpha$ -Cells in Islet Function and Glucose Homeostasis in Health and Type 2 Diabetes. *Journal of Molecular Biology* 432(5): 1367–94, Doi: 10.1016/j.jmb.2020.01.004.
- [66] Drucker, D.J., 2018. Mechanisms of Action and Therapeutic Application of Glucagon-like Peptide-1. *Cell Metabolism* 27(4): 740–56, Doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.001.
- [67] Petersen, M.C., Shulman, G.I., 2018. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological Reviews* 98(4): 2133–223, Doi: 10.1152/physrev.00063.2017.
- [68] Günther, T., Tulipano, G., Dournaud, P., Bousquet, C., Csaba, Z., Kreienkamp, H.-J., et al., 2018. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin Receptors: Structure, Function, Ligands, and New Nomenclature. *Pharmacological Reviews* 70(4): 763–835, Doi: 10.1124/pr.117.015388.
- [69] Batterham, R.L., Le Roux, C.W., Cohen, M.A., Park, A.J., Ellis, S.M., Patterson, M., et al., 2003. Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88(8): 3989–92, Doi: 10.1210/jc.2003-030630.
- [70] Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B.J., et al., 2017. Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews. Disease Primers* 3: 17016, Doi: 10.1038/nrdp.2017.16.
- [71] Giwa, A.M., Ahmed, R., Omidian, Z., Majety, N., Karakus, K.E., Omer, S.M., et al., 2020. Current understandings of the pathogenesis of type 1 diabetes: Genetics to environment. *World Journal of Diabetes* 11(1): 13–25, Doi: 10.4239/wjd.v11.i1.13.
- [72] Khan, M.A.B., Hashim, M.J., King, J.K., Govender, R.D., Mustafa, H., Al Kaabi, J., 2020. Epidemiology of Type 2 Diabetes - Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *Journal of Epidemiology and Global Health* 10(1): 107–11, Doi: 10.2991/jegh.k.191028.001.

- [73] Poitout, V., Robertson, R.P., 2002. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143(2): 339–42, Doi: 10.1210/endo.143.2.8623.
- [74] Robertson, R.P., Harmon, J., Tran, P.O.T., Poitout, V., 2004. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 1: S119–124, Doi: 10.2337/diabetes.53.2007.s119.
- [75] Chen, H., Tan, H., Wan, J., Zeng, Y., Wang, J., Wang, H., et al., 2023. PPAR- $\gamma$  signaling in nonalcoholic fatty liver disease: Pathogenesis and therapeutic targets. *Pharmacology & Therapeutics* 245: 108391, Doi: 10.1016/j.pharmthera.2023.108391.
- [76] Haghvirdizadeh, P., Mohamed, Z., Abdullah, N.A., Haghvirdizadeh, P., Haerian, M.S., Haerian, B.S., 2015. KCNJ11: Genetic Polymorphisms and Risk of Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Research* 2015: 908152, Doi: 10.1155/2015/908152.
- [77] Olmos-Ortiz, A., Flores-Espinosa, P., Díaz, L., Velázquez, P., Ramírez-Isarraraz, C., Zaga-Clavellina, V., 2021. Immunoendocrine Dysregulation during Gestational Diabetes Mellitus: The Central Role of the Placenta. *International Journal of Molecular Sciences* 22(15): 8087, Doi: 10.3390/ijms22158087.
- [78] Anık, A., Çatlı, G., Abacı, A., Böber, E., 2015. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM* 28(3–4): 251–63, Doi: 10.1515/jpem-2014-0384.
- [79] Urakami, T., 2019. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): current perspectives on diagnosis and treatment. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 12: 1047–56, Doi: 10.2147/DMSO.S179793.
- [80] Llewellyn, S.V., Niemeijer, M., Nymark, P., Moné, M.J., Van De Water, B., Conway, G.E., et al., 2021. In Vitro Three-Dimensional Liver Models for Nanomaterial DNA Damage Assessment. *Small* 17(15): 2006055, Doi: 10.1002/sml.202006055.
- [81] Trefts, E., Gannon, M., Wasserman, D.H., 2017. The liver. *Current Biology: CB* 27(21): R1147–51, Doi: 10.1016/j.cub.2017.09.019.
- [82] Vekemans, K., Braet, F., 2005. Structural and functional aspects of the liver and liver sinusoidal cells in relation to colon carcinoma metastasis. *World Journal of Gastroenterology* 11(33): 5095–102, Doi: 10.3748/wjg.v11.i33.5095.
- [83] Vernon, H., Wehrle, C.J., Alia, V.S.K., Kasi, A., 2024. *Anatomy, Abdomen and Pelvis: Liver*. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- [84] Devarbhavi, H., Asrani, S.K., Arab, J.P., Nartey, Y.A., Pose, E., Kamath, P.S., 2023. Global burden of liver disease: 2023 update. *Journal of Hepatology* 79(2): 516–37, Doi: 10.1016/j.jhep.2023.03.017.
- [85] Moon, A.M., Singal, A.G., Tapper, E.B., 2020. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 18(12): 2650–66, Doi: 10.1016/j.cgh.2019.07.060.
- [86] Cheemerla, S., Balakrishnan, M., 2021. Global Epidemiology of Chronic Liver Disease. *Clinical Liver Disease* 17(5): 365–70, Doi: 10.1002/cld.1061.
- [87] Wang, S., Friedman, S.L., 2023. Found in translation-Fibrosis in metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH). *Science Translational Medicine* 15(716): eadi0759, Doi: 10.1126/scitranslmed.adi0759.
- [88] Gofton, C., Upendran, Y., Zheng, M.-H., George, J., 2023. MAFLD: How is it different from NAFLD? *Clinical and Molecular Hepatology* 29(Suppl): S17–31, Doi: 10.3350/cmh.2022.0367.
- [89] Tsochatzis, E.A., 2022. Natural history of NAFLD: knowns and unknowns. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 19(3): 151–2, Doi: 10.1038/s41575-021-00565-8.

- [90] Boursier, J., Mueller, O., Barret, M., Machado, M., Fizanne, L., Araujo-Perez, F., et al., 2016. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 63(3): 764–75, Doi: 10.1002/hep.28356.
- [91] Schuster, S., Cabrera, D., Arrese, M., Feldstein, A.E., 2018. Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 15(6): 349–64, Doi: 10.1038/s41575-018-0009-6.
- [92] Brunt, E.M., Kleiner, D.E., Wilson, L.A., Belt, P., Neuschwander-Tetri, B.A., for the NASH Clinical Research Network (CRN), 2011. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology* 53(3): 810–20, Doi: 10.1002/hep.24127.
- [93] Mueller, S., Sandrin, L., 2010. Liver stiffness: a novel parameter for the diagnosis of liver disease. *Hepatic Medicine: Evidence and Research* 2: 49–67, Doi: 10.2147/hmer.s7394.
- [94] Ginès, P., Krag, A., Abraldes, J.G., Solà, E., Fabrellas, N., Kamath, P.S., 2021. Liver cirrhosis. *Lancet (London, England)* 398(10308): 1359–76, Doi: 10.1016/S0140-6736(21)01374-X.
- [95] Balogh, J., Victor, D., Asham, E.H., Burroughs, S.G., Boktour, M., Saharia, A., et al., 2016. Hepatocellular carcinoma: a review. *Journal of Hepatocellular Carcinoma* 3: 41–53, Doi: 10.2147/JHC.S61146.
- [96] McGlynn, K.A., Petrick, J.L., El-Serag, H.B., 2021. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 73 Suppl 1(Suppl 1): 4–13, Doi: 10.1002/hep.31288.
- [97] Zhang, R., Li, S., Schippers, K., Eimers, B., Niu, J., Hornung, B.V.H., et al., 2024. Unraveling the impact of AXIN1 mutations on HCC development: Insights from CRISPR/Cas9 repaired AXIN1-mutant liver cancer cell lines. *PloS One* 19(6): e0304607, Doi: 10.1371/journal.pone.0304607.
- [98] Zhang, X.-F., Chao, J., Pan, Q.-Z., Pan, K., Weng, D.-S., Wang, Q.-J., et al., 2015. Overexpression of WWP1 promotes tumorigenesis and predicts unfavorable prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 6(38): 40920–33, Doi: 10.18632/oncotarget.5712.
- [99] Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N., 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* 36(3): 131–49, Doi: 10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x.
- [100] Brial, F., Le Lay, A., Dumas, M.-E., Gauguier, D., 2018. Implication of gut microbiota metabolites in cardiovascular and metabolic diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75(21): 3977–90, Doi: 10.1007/s00018-018-2901-1.
- [101] Aron-Wisnewsky, J., Vigiotti, C., Witjes, J., Le, P., Holleboom, A.G., Verheij, J., et al., 2020. Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 17(5): 279–97, Doi: 10.1038/s41575-020-0269-9.
- [102] Boulangé, C.L., Neves, A.L., Chilloux, J., Nicholson, J.K., Dumas, M.-E., 2016. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Medicine* 8: 42, Doi: 10.1186/s13073-016-0303-2.
- [103] Agus, A., Clément, K., Sokol, H., 2021. Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut* 70(6): 1174–82, Doi: 10.1136/gutjnl-2020-323071.
- [104] Liu, B.-N., Liu, X.-T., Liang, Z.-H., Wang, J.-H., 2021. Gut microbiota in obesity. *World Journal of Gastroenterology* 27(25): 3837–50, Doi: 10.3748/wjg.v27.i25.3837.

- [105] Patterson, E., Ryan, P.M., Cryan, J.F., Dinan, T.G., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., et al., 2016. Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgraduate Medical Journal* 92(1087): 286–300, Doi: 10.1136/postgradmedj-2015-133285.
- [106] Fan, Y., Pedersen, O., 2021. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews. Microbiology* 19(1): 55–71, Doi: 10.1038/s41579-020-0433-9.
- [107] LEDERBERG, J., MCCRAY, A., 2001. `Ome Sweet `Omics--A Genealogical Treasury of Words. *Scientist Inc.:* Vol. 15, Issue 7.
- [108] Sender, R., Fuchs, S., Milo, R., 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology* 14(8): e1002533, Doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.
- [109] Grice, E.A., Segre, J.A., 2012. The human microbiome: our second genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 13: 151–70, Doi: 10.1146/annurev-genom-090711-163814.
- [110] Thursby, E., Juge, N., 2017. Introduction to the human gut microbiota. *The Biochemical Journal* 474(11): 1823–36, Doi: 10.1042/BCJ20160510.
- [111] The Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium, 2019. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature* 569(7758): 641–8, Doi: 10.1038/s41586-019-1238-8.
- [112] Hashimoto, K., 2023. Emerging role of the host microbiome in neuropsychiatric disorders: overview and future directions. *Molecular Psychiatry* 28(9): 3625–37, Doi: 10.1038/s41380-023-02287-6.
- [113] Afzaal, M., Saeed, F., Shah, Y.A., Hussain, M., Rabail, R., Socol, C.T., et al., 2022. Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. *Frontiers in Microbiology* 13: 999001, Doi: 10.3389/fmicb.2022.999001.
- [114] Nogal, A., Valdes, A.M., Menni, C., 2021. The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health. *Gut Microbes* 13(1): 1–24, Doi: 10.1080/19490976.2021.1897212.
- [115] Morrison, D.J., Preston, T., 2016. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 7(3): 189–200, Doi: 10.1080/19490976.2015.1134082.
- [116] Fülling, C., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2019. Gut Microbe to Brain Signaling: What Happens in Vagus.... *Neuron* 101(6): 998–1002, Doi: 10.1016/j.neuron.2019.02.008.
- [117] Siopi, E., Galerne, M., Rivagorda, M., Saha, S., Moigneu, C., Moriceau, S., et al., 2023. Gut microbiota changes require vagus nerve integrity to promote depressive-like behaviors in mice. *Molecular Psychiatry* 28(7): 3002–12, Doi: 10.1038/s41380-023-02071-6.
- [118] Chen, Y., Xu, J., Chen, Y., 2021. Regulation of Neurotransmitters by the Gut Microbiota and Effects on Cognition in Neurological Disorders. *Nutrients* 13(6): 2099, Doi: 10.3390/nu13062099.
- [119] Bravo, J.A., Forsythe, P., Chew, M.V., Escaravage, E., Savignac, H.M., Dinan, T.G., et al., 2011. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(38): 16050–5, Doi: 10.1073/pnas.1102999108.
- [120] Stasi, C., Sadalla, S., Milani, S., 2019. The Relationship Between the Serotonin Metabolism, Gut-Microbiota and the Gut-Brain Axis. *Current Drug Metabolism* 20(8): 646–55, Doi: 10.2174/1389200220666190725115503.
- [121] Stilling, R.M., van de Wouw, M., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2016. The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-

- brain axis? *Neurochemistry International* 99: 110–32, Doi: 10.1016/j.neuint.2016.06.011.
- [122] Lee, C., Kim, B.G., Kim, J.H., Chun, J., Im, J.P., Kim, J.S., 2017. Sodium butyrate inhibits the NF-kappa B signaling pathway and histone deacetylation, and attenuates experimental colitis in an IL-10 independent manner. *International Immunopharmacology* 51: 47–56, Doi: 10.1016/j.intimp.2017.07.023.
- [123] Zhang, Q., Yu, K., Li, S., Zhang, X., Zhao, Q., Zhao, X., et al., 2021. gutMEGA: a database of the human gut MEtaGenome Atlas. *Briefings in Bioinformatics* 22(3): bbaa082, Doi: 10.1093/bib/bbaa082.
- [124] Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology* 2(2): 123–40, Doi: 10.1038/nrmicro818.
- [125] Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., et al., 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(44): 15718–23, Doi: 10.1073/pnas.0407076101.
- [126] Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444(7122): 1027–31, Doi: 10.1038/nature05414.
- [127] Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., et al., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473(7346): 174–80, Doi: 10.1038/nature09944.
- [128] Geng, J., Ni, Q., Sun, W., Li, L., Feng, X., 2022. The links between gut microbiota and obesity and obesity related diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 147: 112678, Doi: 10.1016/j.biopha.2022.112678.
- [129] Gurung, M., Li, Z., You, H., Rodrigues, R., Jump, D.B., Morgun, A., et al., 2020. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine* 51: 102590, Doi: 10.1016/j.ebiom.2019.11.051.
- [130] Sadagopan, A., Mahmoud, A., Begg, M., Tarhuni, M., Fotso, M., Gonzalez, N.A., et al., 2023. Understanding the Role of the Gut Microbiome in Diabetes and Therapeutics Targeting Leaky Gut: A Systematic Review. *Cureus* 15(7): e41559, Doi: 10.7759/cureus.41559.
- [131] Iatcu, C.O., Steen, A., Covasa, M., 2021. Gut Microbiota and Complications of Type-2 Diabetes. *Nutrients* 14(1): 166, Doi: 10.3390/nu14010166.
- [132] Campo, L., Eiseler, S., Apfel, T., Pysopoulos, N., 2019. Fatty Liver Disease and Gut Microbiota: A Comprehensive Update. *Journal of Clinical and Translational Hepatology* 7(1): 56–60, Doi: 10.14218/JCTH.2018.00008.
- [133] Mbaye, B., Wasfy, R.M., Alou, M.T., Borentain, P., Andrieu, C., Caputo, A., et al., 2023. *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis* and *Thomasclavelia ramosa* are enriched and *Methanobrevibacter smithii* is depleted in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Microbial Pathogenesis* 180: 106160, Doi: 10.1016/j.micpath.2023.106160.
- [134] Lin, Y.-C., Lin, H.-F., Wu, C.-C., Chen, C.-L., Ni, Y.-H., 2022. Pathogenic effects of *Desulfovibrio* in the gut on fatty liver in diet-induced obese mice and children with obesity. *Journal of Gastroenterology* 57(11): 913–25, Doi: 10.1007/s00535-022-01909-0.
- [135] Zhou, X., Wang, J., Zhou, S., Liao, J., Ye, Z., Mao, L., 2023. Efficacy of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. *Medicine* 102(4): e32734, Doi: 10.1097/MD.00000000000032734.

- [136] Mao, Z.-H., Gao, Z.-X., Liu, D.-W., Liu, Z.-S., Wu, P., 2023. Gut microbiota and its metabolites - molecular mechanisms and management strategies in diabetic kidney disease. *Frontiers in Immunology* 14: 1124704, Doi: 10.3389/fimmu.2023.1124704.
- [137] Staley, C., Weingarden, A.R., Khoruts, A., Sadowsky, M.J., 2017. Interaction of gut microbiota with bile acid metabolism and its influence on disease states. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101(1): 47–64, Doi: 10.1007/s00253-016-8006-6.
- [138] Su, X., Gao, Y., Yang, R., 2022. Gut Microbiota-Derived Tryptophan Metabolites Maintain Gut and Systemic Homeostasis. *Cells* 11(15): 2296, Doi: 10.3390/cells11152296.
- [139] Tofalo, R., Cocchi, S., Suzzi, G., 2019. Polyamines and Gut Microbiota. *Frontiers in Nutrition* 6: 16, Doi: 10.3389/fnut.2019.00016.
- [140] Hu, G., Liu, L., Miao, X., Zhao, Y., Peng, Y., Li, X., 2023. Symbiotic bacteria stabilize the intestinal environment by producing phenylpropanoids. *Microbial Biotechnology* 16(1): 88–98, Doi: 10.1111/1751-7915.14180.
- [141] Yao, Y., Cai, X., Fei, W., Ye, Y., Zhao, M., Zheng, C., 2022. The role of short-chain fatty acids in immunity, inflammation and metabolism. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 62(1): 1–12, Doi: 10.1080/10408398.2020.1854675.
- [142] Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., et al., 2014. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* 40(1): 128–39, Doi: 10.1016/j.immuni.2013.12.007.
- [143] Kimura, I., Ozawa, K., Inoue, D., Imamura, T., Kimura, K., Maeda, T., et al., 2013. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nature Communications* 4: 1829, Doi: 10.1038/ncomms2852.
- [144] Wahlang, B., McClain, C., Barve, S., Gobejishvili, L., 2018. Role of cAMP and phosphodiesterase signaling in liver health and disease. *Cellular Signalling* 49: 105–15, Doi: 10.1016/j.cellsig.2018.06.005.
- [145] Maßberg, D., Jovancevic, N., Offermann, A., Simon, A., Baniahmad, A., Perner, S., et al., 2016. The activation of OR51E1 causes growth suppression of human prostate cancer cells. *Oncotarget* 7(30): 48231–49, Doi: 10.18632/oncotarget.10197.
- [146] Pluznick, J.L., Protzko, R.J., Gevorgyan, H., Peterlin, Z., Sipos, A., Han, J., et al., 2013. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(11): 4410–5, Doi: 10.1073/pnas.1215927110.
- [147] Meng, D., Sommella, E., Salviati, E., Campiglia, P., Ganguli, K., Djebali, K., et al., 2020. Indole-3-lactic acid, a metabolite of tryptophan, secreted by *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis* is anti-inflammatory in the immature intestine. *Pediatric Research* 88(2): 209–17, Doi: 10.1038/s41390-019-0740-x.
- [148] Kaur, H., Bose, C., Mande, S.S., 2019. Tryptophan Metabolism by Gut Microbiome and Gut-Brain-Axis: An in silico Analysis. *Frontiers in Neuroscience* 13: 1365, Doi: 10.3389/fnins.2019.01365.
- [149] Dantzer, R., 2017. Role of the Kynurenine Metabolism Pathway in Inflammation-Induced Depression: Preclinical Approaches. *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 31: 117–38, Doi: 10.1007/7854\_2016\_6.
- [150] Gao, J., Xu, K., Liu, H., Liu, G., Bai, M., Peng, C., et al., 2018. Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8: 13, Doi: 10.3389/fcimb.2018.00013.

- [151] Crost, E.H., Coletto, E., Bell, A., Juge, N., 2023. Ruminococcus gnavus: friend or foe for human health. *FEMS Microbiology Reviews* 47(2): fuad014, Doi: 10.1093/femsre/fuad014.
- [152] Soda, K., 2018. Polyamine Metabolism and Gene Methylation in Conjunction with One-Carbon Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* 19(10): 3106, Doi: 10.3390/ijms19103106.
- [153] Igarashi, K., Kashiwagi, K., 2010. Modulation of cellular function by polyamines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42(1): 39–51, Doi: 10.1016/j.biocel.2009.07.009.
- [154] Niechcial, A., Schwarzfischer, M., Wawrzyniak, M., Atrott, K., Laimbacher, A., Morsy, Y., et al., 2023. Spermidine Ameliorates Colitis via Induction of Anti-Inflammatory Macrophages and Prevention of Intestinal Dysbiosis. *Journal of Crohn's & Colitis* 17(9): 1489–503, Doi: 10.1093/ecco-jcc/jjad058.
- [155] Zhou, S., Gu, J., Liu, R., Wei, S., Wang, Q., Shen, H., et al., 2018. Spermine Alleviates Acute Liver Injury by Inhibiting Liver-Resident Macrophage Pro-Inflammatory Response Through ATG5-Dependent Autophagy. *Frontiers in Immunology* 9: 948, Doi: 10.3389/fimmu.2018.00948.
- [156] Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., et al., 2009. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature Cell Biology* 11(11): 1305–14, Doi: 10.1038/ncb1975.
- [157] Madeo, F., Eisenberg, T., Pietrocola, F., Kroemer, G., 2018. Spermidine in health and disease. *Science (New York, N.Y.)* 359(6374): eaan2788, Doi: 10.1126/science.aan2788.
- [158] Vogt, T., 2010. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant* 3(1): 2–20, Doi: 10.1093/mp/ssp106.
- [159] Hu, J., Chen, J., Xu, X., Hou, Q., Ren, J., Yan, X., 2023. Gut microbiota-derived 3-phenylpropionic acid promotes intestinal epithelial barrier function via AhR signaling. *Microbiome* 11(1): 102, Doi: 10.1186/s40168-023-01551-9.
- [160] Cho, S., Yang, X., Won, K.-J., Leone, V.A., Chang, E.B., Guzman, G., et al., 2023. Phenylpropionic acid produced by gut microbiota alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Gut Microbes* 15(1): 2231590, Doi: 10.1080/19490976.2023.2231590.
- [161] Brial, F., Chilloux, J., Nielsen, T., Vieira-Silva, S., Falony, G., Andrikopoulos, P., et al., 2021. Human and preclinical studies of the host-gut microbiome co-metabolite hippurate as a marker and mediator of metabolic health. *Gut* 70(11): 2105–14, Doi: 10.1136/gutjnl-2020-323314.
- [162] Lees, H.J., Swann, J.R., Wilson, I.D., Nicholson, J.K., Holmes, E., 2013. Hippurate: the natural history of a mammalian-microbial cometabolite. *Journal of Proteome Research* 12(4): 1527–46, Doi: 10.1021/pr300900b.
- [163] Pero, R.W., 2010. Health consequences of catabolic synthesis of hippuric acid in humans. *Current Clinical Pharmacology* 5(1): 67–73, Doi: 10.2174/157488410790410588.
- [164] Gatley, S.J., Sherratt, H.S.A., 1977. The synthesis of hippurate from benzoate and glycine by rat liver mitochondria. Submitochondrial localization and kinetics. *Biochemical Journal* 166(1): 39–47, Doi: 10.1042/bj1660039.
- [165] Yadav, M., Lomash, A., Kapoor, S., Pandey, R., Chauhan, N.S., 2021. Mapping of the benzoate metabolism by human gut microbiome indicates food-derived metagenome evolution. *Scientific Reports* 11(1): 5561, Doi: 10.1038/s41598-021-84964-6.
- [166] Selma, M.V., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., 2009. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(15): 6485–501, Doi: 10.1021/jf902107d.

- [167] Williams, H.R.T., Cox, I.J., Walker, D.G., Cobbold, J.F.L., Taylor-Robinson, S.D., Marshall, S.E., et al., 2010. Differences in gut microbial metabolism are responsible for reduced hippurate synthesis in Crohn's disease. *BMC Gastroenterology* 10: 108, Doi: 10.1186/1471-230X-10-108.
- [168] Fisel, P., Schaeffeler, E., Schwab, M., 2018. Clinical and Functional Relevance of the Monocarboxylate Transporter Family in Disease Pathophysiology and Drug Therapy. *Clinical and Translational Science* 11(4): 352–64, Doi: 10.1111/cts.12551.
- [169] Becker, H.M., Mohebbi, N., Perna, A., Ganapathy, V., Capasso, G., Wagner, C.A., 2010. Localization of members of MCT monocarboxylate transporter family Slc16 in the kidney and regulation during metabolic acidosis. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 299(1): F141-154, Doi: 10.1152/ajprenal.00488.2009.
- [170] Schutkowski, A., Wege, N., Stangl, G.I., König, B., 2014. Tissue-specific expression of monocarboxylate transporters during fasting in mice. *PloS One* 9(11): e112118, Doi: 10.1371/journal.pone.0112118.
- [171] Zhao, C., Wilson, M.C., Schuit, F., Halestrap, A.P., Rutter, G.A., 2001. Expression and distribution of lactate/monocarboxylate transporter isoforms in pancreatic islets and the exocrine pancreas. *Diabetes* 50(2): 361–6, Doi: 10.2337/diabetes.50.2.361.
- [172] Saude, E.J., Adamko, D., Rowe, B.H., Marrie, T., Sykes, B.D., 2007. Variation of metabolites in normal human urine. *Metabolomics* 3(4): 439–51, Doi: 10.1007/s11306-007-0091-1.
- [173] Wijeyesekera, A., Clarke, P.A., Bictash, M., Brown, I.J., Fidock, M., Ryckmans, T., et al., 2012. Quantitative UPLC-MS/MS analysis of the gut microbial co-metabolites phenylacetylglutamine, 4-cresyl sulphate and hippurate in human urine: INTERMAP Study. *Analytical Methods: Advancing Methods and Applications* 4(1): 65–72, Doi: 10.1039/C1AY05427A.
- [174] Deghani, F., Yousefinejad, S., Mobaraki, N., Nekoeinia, M., Hemmateenejad, B., 2024. Rapid determination of hippuric acid as an exposure biomarker of toluene using a colorimetric assay and comparison with high-performance liquid chromatography. *Scientific Reports* 14(1): 9935, Doi: 10.1038/s41598-024-59641-z.
- [175] Löf, A., Wigaeus Hjelm, E., Colmsjö, A., Lundmark, B.O., Norström, A., Sato, A., 1993. Toxicokinetics of toluene and urinary excretion of hippuric acid after human exposure to 2H8-toluene. *British Journal of Industrial Medicine* 50(1): 55–9, Doi: 10.1136/oem.50.1.55.
- [176] Dick, A., Davies, C.E., 1949. Measurement of the Glomerular Filtration Rate and the Effective Renal Plasma Flow Using Sodium Thiosulphate and p-Amino-Hippuric Acid. *Journal of Clinical Pathology* 2(1): 67–72, Doi: 10.1136/jcp.2.1.67.
- [177] Rocchetti, M.T., Cosola, C., Ranieri, E., Gesualdo, L., 2021. Protein-Bound Uremic Toxins and Immunity. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 2325: 215–27, Doi: 10.1007/978-1-0716-1507-2\_15.
- [178] Sarafidis, P.A., Whaley-Connell, A., Sowers, J.R., Bakris, G.L., 2006. Cardiometabolic syndrome and chronic kidney disease: what is the link? *Journal of the Cardiometabolic Syndrome* 1(1): 58–65, Doi: 10.1111/j.0197-3118.2006.05470.x.
- [179] Young, L.Y., Phelps, C.D., 2005. Metabolic biomarkers for monitoring in situ anaerobic hydrocarbon degradation. *Environmental Health Perspectives* 113(1): 62–7, Doi: 10.1289/ehp.6940.
- [180] Decharat, S., 2014. Hippuric Acid levels in paint workers at steel furniture manufacturers in Thailand. *Safety and Health at Work* 5(4): 227–33, Doi: 10.1016/j.shaw.2014.07.006.
- [181] Chiu, C.-H., Chen, C.-T., Cheng, M.-H., Pao, L.-H., Wang, C., Wan, G.-H., 2021. Use of urinary hippuric acid and o-/p-/m-methyl hippuric acid to evaluate surgical smoke

- exposure in operating room healthcare personnel. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 217: 112231, Doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112231.
- [182] Clarke, E.D., Rollo, M.E., Collins, C.E., Wood, L., Callister, R., Philo, M., et al., 2020. The Relationship between Dietary Polyphenol Intakes and Urinary Polyphenol Concentrations in Adults Prescribed a High Vegetable and Fruit Diet. *Nutrients* 12(11): 3431, Doi: 10.3390/nu12113431.
- [183] Ticinesi, A., Guerra, A., Nouvenne, A., Meschi, T., Maggi, S., 2023. Disentangling the Complexity of Nutrition, Frailty and Gut Microbial Pathways during Aging: A Focus on Hippuric Acid. *Nutrients* 15(5): 1138, Doi: 10.3390/nu15051138.
- [184] Pallister, T., Jackson, M.A., Martin, T.C., Zierer, J., Jennings, A., Mohny, R.P., et al., 2017. Hippurate as a metabolomic marker of gut microbiome diversity: Modulation by diet and relationship to metabolic syndrome. *Scientific Reports* 7(1): 13670, Doi: 10.1038/s41598-017-13722-4.
- [185] Calvani, R., Miccheli, A., Capuani, G., Tomassini Miccheli, A., Puccetti, C., Delfini, M., et al., 2010. Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabolite. *International Journal of Obesity (2005)* 34(6): 1095–8, Doi: 10.1038/ijo.2010.44.
- [186] Holmes, E., Loo, R.L., Stamler, J., Bictash, M., Yap, I.K.S., Chan, Q., et al., 2008. Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature* 453(7193): 396–400, Doi: 10.1038/nature06882.
- [187] Hoyles, L., Fernández-Real, J.-M., Federici, M., Serino, M., Abbott, J., Charpentier, J., et al., 2018. Molecular phenomics and metagenomics of hepatic steatosis in non-diabetic obese women. *Nature Medicine* 24(7): 1070–80, Doi: 10.1038/s41591-018-0061-3.
- [188] Bitner, B.F., Ray, J.D., Kener, K.B., Herring, J.A., Tueller, J.A., Johnson, D.K., et al., 2018. Common gut microbial metabolites of dietary flavonoids exert potent protective activities in  $\beta$ -cells and skeletal muscle cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 62: 95–107, Doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.09.004.
- [189] Donato, M.T., Tolosa, L., Gómez-Lechón, M.J., 2015. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. In: Vinken, M., Rogiers, V., editors. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, vol. 1250. New York, NY: Springer New York p. 77–93.
- [190] Abderrahmani, A., Yengo, L., Caiazzo, R., Canouil, M., Cauchi, S., Raverdy, V., et al., 2018. Increased Hepatic PDGF-AA Signaling Mediates Liver Insulin Resistance in Obesity-Associated Type 2 Diabetes. *Diabetes* 67(7): 1310–21, Doi: 10.2337/db17-1539.
- [191] Samanez, C.H., Caron, S., Briand, O., Dehondt, H., Duplan, I., Kuipers, F., et al., 2012. The human hepatocyte cell lines IHH and HepaRG: models to study glucose, lipid and lipoprotein metabolism. *Archives of Physiology and Biochemistry* 118(3): 102–11, Doi: 10.3109/13813455.2012.683442.
- [192] Römer, A., Rawat, D., Linn, T., Petry, S.F., 2022. Preparation of fatty acid solutions exerts significant impact on experimental outcomes in cell culture models of lipotoxicity. *Biology Methods & Protocols* 7(1): bpab023, Doi: 10.1093/biomethods/bpab023.
- [193] Baudin-Baillieu, A., Hatin, I., Legendre, R., Namy, O., 2016. Translation Analysis at the Genome Scale by Ribosome Profiling. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1361: 105–24, Doi: 10.1007/978-1-4939-3079-1\_7.
- [194] Ramírez-Zacarias, J.L., Castro-Muñozledo, F., Kuri-Harcuch, W., 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 97(6): 493–7, Doi: 10.1007/BF00316069.

- [195] Leblanc, R., Ghossoub, R., Goubard, A., Castellano, R., Fares, J., Camoin, L., et al., 2023. Downregulation of stromal syntenin sustains AML development. *EMBO Molecular Medicine* 15(11): e17570, Doi: 10.15252/emmm.202317570.
- [196] Karagiannis, A., Gallopin, T., Lacroix, A., Plaisier, F., Piquet, J., Geoffroy, H., et al., 2021. Lactate is an energy substrate for rodent cortical neurons and enhances their firing activity. *eLife* 10: e71424, Doi: 10.7554/eLife.71424.
- [197] Guo, Y.-J., Pan, W.-W., Liu, S.-B., Shen, Z.-F., Xu, Y., Hu, L.-L., 2020. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Experimental and Therapeutic Medicine* 19(3): 1997–2007, Doi: 10.3892/etm.2020.8454.
- [198] Hart, J.R., Vogt, P.K., 2011. Phosphorylation of AKT: a mutational analysis. *Oncotarget* 2(6): 467–76, Doi: 10.18632/oncotarget.293.
- [199] Schmidt, E.K., Clavarino, G., Ceppi, M., Pierre, P., 2009. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nature Methods* 6(4): 275–7, Doi: 10.1038/nmeth.1314.
- [200] Henne, A., Vigh, A., Märten, A., Nonnenmacher, Y., Ohm, M., Hosseini, S., et al., 2022. SiMeEx, a simplified method for metabolite extraction of adherent mammalian cells. *Frontiers in Molecular Biosciences* 9: 1084060, Doi: 10.3389/fmolb.2022.1084060.
- [201] Olanipekun, M., 2022. Metabolomic characterisation of malignant pleural mesothelioma cell lines and tumours, Doi: 10.25560/98985.
- [202] Ser, Z., Liu, X., Tang, N.N., Locasale, J.W., 2015. Extraction parameters for metabolomics from cultured cells. *Analytical Biochemistry* 475: 22–8, Doi: 10.1016/j.ab.2015.01.003.
- [203] Barupal, D.K., Zhang, Y., Shen, T., Fan, S., Roberts, B.S., Fitzgerald, P., et al., 2019. A Comprehensive Plasma Metabolomics Dataset for a Cohort of Mouse Knockouts within the International Mouse Phenotyping Consortium. *Metabolites* 9(5): 101, Doi: 10.3390/metabo9050101.
- [204] Crawford, E., 2020. An investigative metabolomics study on the Thermo Scientific Orbitrap Exploris 240 Mass spectrometer: new features, optimized methods and results discussion.
- [205] Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., et al., 2015. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature Methods* 12(6): 523–6, Doi: 10.1038/nmeth.3393.
- [206] Abdi, H., Williams, L.J., 2010. Principal component analysis. *WIREs Computational Statistics* 2(4): 433–59, Doi: 10.1002/wics.101.
- [207] Barker, M., Rayens, W., 2003. Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics* 17(3): 166–73, Doi: 10.1002/cem.785.
- [208] Worley, B., Powers, R., 2016. PCA as a Practical Indicator of OPLS-DA Model Reliability. *Current Metabolomics* 4(2): 97–103, Doi: 10.2174/2213235X04666160613122429.
- [209] Trygg, J., Wold, S., 2003. O2-PLS, a two-block (X–Y) latent variable regression (LVR) method with an integral OSC filter. *Journal of Chemometrics* 17(1): 53–64, Doi: 10.1002/cem.775.
- [210] Han, H.-S., Kang, G., Kim, J.S., Choi, B.H., Koo, S.-H., 2016. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Experimental & Molecular Medicine* 48(3): e218, Doi: 10.1038/emm.2015.122.
- [211] López-Bermudo, L., Luque-Sierra, A., Maya-Miles, D., Gallego-Durán, R., Ampuero, J., Romero-Gómez, M., et al., 2022. Contribution of Liver and Pancreatic Islet Crosstalk to  $\beta$ -Cell Function/Dysfunction in the Presence of Fatty Liver. *Frontiers in Endocrinology* 13: 892672, Doi: 10.3389/fendo.2022.892672.

- [212] Röder, P.V., Wu, B., Liu, Y., Han, W., 2016. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine* 48(3): e219, Doi: 10.1038/emm.2016.6.
- [213] F Spiegelman, A., 2019. Static Glucose-stimulated Insulin Secretion (GSIS) Protocol - Human Islets v3, Doi: 10.17504/protocols.io.wztf6n.
- [214] Du, J., Zhao, L., Kang, Q., He, Y., Bi, Y., 2023. An optimized method for Oil Red O staining with the salicylic acid ethanol solution. *Adipocyte* 12(1): 2179334, Doi: 10.1080/21623945.2023.2179334.
- [215] Pelley, J.W., 2007. Purine, Pyrimidine, and Single-Carbon Metabolism. Elsevier's Integrated Biochemistry, Elsevier p. 117–22.
- [216] Avila, M.A., García-Trevijano, E.R., Lu, S.C., Corrales, F.J., Mato, J.M., 2004. Methylthioadenosine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36(11): 2125–30, Doi: 10.1016/j.biocel.2003.11.016.
- [217] Lovászi, M., Németh, Z.H., Gause, W.C., Beesley, J., Pacher, P., Haskó, G., 2021. Inosine monophosphate and inosine differentially regulate endotoxemia and bacterial sepsis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 35(11): e21935, Doi: 10.1096/fj.202100862R.
- [218] Owen, J.B., Butterfield, D.A., 2010. Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 648: 269–77, Doi: 10.1007/978-1-60761-756-3\_18.
- [219] Ruffmann, R., Wendel, A., 1991. GSH rescue by N-acetylcysteine. *Klinische Wochenschrift* 69(18): 857–62, Doi: 10.1007/BF01649460.
- [220] Bae, M., Ahmed, K., Yim, J.-E., 2022. Beneficial Effects of Taurine on Metabolic Parameters in Animals and Humans. *Journal of Obesity & Metabolic Syndrome* 31(2): 134–46, Doi: 10.7570/jomes21088.
- [221] Baliou, S., Adamaki, M., Ioannou, P., Pappa, A., Panayiotidis, M.I., Spandidos, D.A., et al., 2021. Protective role of taurine against oxidative stress (Review). *Molecular Medicine Reports* 24(2): 605, Doi: 10.3892/mmr.2021.12242.
- [222] Qaradakh, T., Gadanec, L.K., McSweeney, K.R., Abraham, J.R., Apostolopoulos, V., Zulli, A., 2020. The Anti-Inflammatory Effect of Taurine on Cardiovascular Disease. *Nutrients* 12(9): 2847, Doi: 10.3390/nu12092847.
- [223] Santulli, G., Kansakar, U., Varzideh, F., Mone, P., Jankauskas, S.S., Lombardi, A., 2023. Functional Role of Taurine in Aging and Cardiovascular Health: An Updated Overview. *Nutrients* 15(19): 4236, Doi: 10.3390/nu15194236.
- [224] Xie, N., Zhang, L., Gao, W., Huang, C., Huber, P.E., Zhou, X., et al., 2020. NAD<sup>+</sup> metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5(1): 227, Doi: 10.1038/s41392-020-00311-7.
- [225] Zhang, Q., Zhao, Q., Li, T., Lu, L., Wang, F., Zhang, H., et al., 2023. Lactobacillus plantarum-derived indole-3-lactic acid ameliorates colorectal tumorigenesis via epigenetic regulation of CD8<sup>+</sup> T cell immunity. *Cell Metabolism* 35(6): 943-960.e9, Doi: 10.1016/j.cmet.2023.04.015.
- [226] Mitchell, J.A., Saunders, M., Barnes, P.J., Newton, R., Belvisi, M.G., 1997. Sodium salicylate inhibits cyclo-oxygenase-2 activity independently of transcription factor (nuclear factor kappaB) activation: role of arachidonic acid. *Molecular Pharmacology* 51(6): 907–12, Doi: 10.1124/mol.51.6.907.
- [227] Yoon, S.-H., Cho, D.-Y., Choi, S.-R., Lee, J.-Y., Choi, D.-K., Kim, E., et al., 2021. Synthesis and Biological Evaluation of Salicylic Acid Analogues of Celecoxib as a New Class of Selective Cyclooxygenase-1 Inhibitor. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 44(9): 1230–8, Doi: 10.1248/bpb.b20-00991.

- [228] Kuroishi, T., Sugawara, S., 2020. Metabolomic Analysis of Liver from Dietary Biotin Deficient Mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 66(1): 82–5, Doi: 10.3177/jnsv.66.82.
- [229] Said, H.M., 2012. Biotin: biochemical, physiological and clinical aspects. *Sub-Cellular Biochemistry* 56: 1–19, Doi: 10.1007/978-94-007-2199-9\_1.
- [230] Francesconi, M., Galzigna, L., Plebani, M., Furlanetto, V., Fabris, R., Deana, R., 1987. Effect of 3-hydroxy-3-methylglutarate treatment on plasma ketone bodies, triglycerides, and HDL-cholesterol in streptozotocin-diabetic rats. *Clinical Biochemistry* 20(3): 201–5, Doi: 10.1016/s0009-9120(87)80121-2.
- [231] Lynch, C.J., Adams, S.H., 2014. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nature Reviews. Endocrinology* 10(12): 723–36, Doi: 10.1038/nrendo.2014.171.
- [232] Wang, T.J., Larson, M.G., Vasan, R.S., Cheng, S., Rhee, E.P., McCabe, E., et al., 2011. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nature Medicine* 17(4): 448–53, Doi: 10.1038/nm.2307.
- [233] Xiao, F., Yu, J., Guo, Y., Deng, J., Li, K., Du, Y., et al., 2014. Effects of individual branched-chain amino acids deprivation on insulin sensitivity and glucose metabolism in mice. *Metabolism: Clinical and Experimental* 63(6): 841–50, Doi: 10.1016/j.metabol.2014.03.006.
- [234] Bishop, C.A., Machate, T., Henning, T., Henkel, J., Püschel, G., Weber, D., et al., 2022. Detrimental effects of branched-chain amino acids in glucose tolerance can be attributed to valine induced glucotoxicity in skeletal muscle. *Nutrition & Diabetes* 12(1): 20, Doi: 10.1038/s41387-022-00200-8.
- [235] Tessari, P., Vettore, M., Millionini, R., Puricelli, L., Orlando, R., 2010. Effect of liver cirrhosis on phenylalanine and tyrosine metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 13(1): 81–6, Doi: 10.1097/MCO.0b013e32833383af.
- [236] Zhou, Q., Sun, W.-W., Chen, J.-C., Zhang, H.-L., Liu, J., Lin, Y., et al., 2022. Phenylalanine impairs insulin signaling and inhibits glucose uptake through modification of IR $\beta$ . *Nature Communications* 13(1): 4291, Doi: 10.1038/s41467-022-32000-0.
- [237] Hellmuth, C., Kirchberg, F.F., Lass, N., Harder, U., Peissner, W., Koletzko, B., et al., 2016. Tyrosine Is Associated with Insulin Resistance in Longitudinal Metabolomic Profiling of Obese Children. *Journal of Diabetes Research* 2016: 2108909, Doi: 10.1155/2016/2108909.
- [238] Zhang, J.-Z., Shi, N.-R., Wu, J.-S., Wang, X., Illes, P., Tang, Y., 2023. UDP-glucose sensing P2Y14R: A novel target for inflammation. *Neuropharmacology* 238: 109655, Doi: 10.1016/j.neuropharm.2023.109655.
- [239] Brosnan, M.J., Chen, L.H., Wheeler, C.E., Van Dyke, T.A., Koretsky, A.P., 1991. Phosphocreatine protects ATP from a fructose load in transgenic mouse liver expressing creatine kinase. *The American Journal of Physiology* 260(6 Pt 1): C1191-1200, Doi: 10.1152/ajpcell.1991.260.6.C1191.
- [240] Jamal, Y., Gamallat, Y., Jaceline Gislaine, P.S., Meyiah, A., Shopit, A., Li, H., et al., 2018. Phosphocreatine attenuates endoplasmic reticulum stress-mediated hepatocellular apoptosis ameliorates insulin resistance in diabetes model. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 506(3): 611–8, Doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.122.
- [241] Miller, K., Halow, J., Koretsky, A.P., 1993. Phosphocreatine protects transgenic mouse liver expressing creatine kinase from hypoxia and ischemia. *The American Journal of Physiology* 265(6 Pt 1): C1544-1551, Doi: 10.1152/ajpcell.1993.265.6.C1544.

- [242] Mladenović, B., Mladenović, N., Brzački, V., Petrović, N., Kamenov, A., Golubović, M., et al., 2018. Exogenous putrescine affects polyamine and arginine metabolism in rat liver following bile duct ligation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 96(12): 1232–7, Doi: 10.1139/cjpp-2018-0332.
- [243] Sakata, K., Kashiwagi, K., Sharmin, S., Ueda, S., Irie, Y., Murotani, N., et al., 2003. Increase in putrescine, amine oxidase, and acrolein in plasma of renal failure patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305(1): 143–9, Doi: 10.1016/s0006-291x(03)00716-2.
- [244] Tome, M.E., Fiser, S.M., Payne, C.M., Gerner, E.W., 1997. Excess putrescine accumulation inhibits the formation of modified eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) and induces apoptosis. *The Biochemical Journal* 328 ( Pt 3)(Pt 3): 847–54, Doi: 10.1042/bj3280847.
- [245] Hunter, R.W., Lawson, C., Galitsiou, E., Gifford, F., Neary, J.J., 2016. Pyroglutamic acidosis in association with therapeutic paracetamol use. *Clinical Medicine (London, England)* 16(6): 524–9, Doi: 10.7861/clinmedicine.16-6-524.
- [246] Pederzolli, C.D., Mescka, C.P., Zandoná, B.R., de Moura Coelho, D., Sgaravatti, A.M., Sgarbi, M.B., et al., 2010. Acute administration of 5-oxoproline induces oxidative damage to lipids and proteins and impairs antioxidant defenses in cerebral cortex and cerebellum of young rats. *Metabolic Brain Disease* 25(2): 145–54, Doi: 10.1007/s11011-010-9190-1.
- [247] Bridi, R., Braun, C.A., Zorzi, G.K., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Lissi, E.G., et al., 2005. alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease stimulate lipid peroxidation and reduce antioxidant defences in cerebral cortex from young rats. *Metabolic Brain Disease* 20(2): 155–67, Doi: 10.1007/s11011-005-4152-8.
- [248] Sgaravatti, A.M., Rosa, R.B., Schuck, P.F., Ribeiro, C.A.J., Wannmacher, C.M.D., Wyse, A.T.S., et al., 2003. Inhibition of brain energy metabolism by the alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1639(3): 232–8, Doi: 10.1016/j.bbadis.2003.09.010.
- [249] Anderson, N., Borlak, J., 2006. Drug-induced phospholipidosis. *FEBS Letters* 580(23): 5533–40, Doi: 10.1016/j.febslet.2006.08.061.
- [250] Delaney, J., Neville, W.A., Swain, A., Miles, A., Leonard, M.S., Waterfield, C.J., 2004. Phenylacetyl glycine, a putative biomarker of phospholipidosis: Its origins and relevance to phospholipid accumulation using amiodarone treated rats as a model. *Biomarkers* 9(3): 271–90, Doi: 10.1080/13547500400018570.
- [251] Matthews, D.E., 2020. Review of Lysine Metabolism with a Focus on Humans. *The Journal of Nutrition* 150(Suppl 1): 2548S-2555S, Doi: 10.1093/jn/nxaa224.
- [252] Yoshimura, T., Schwab, A.J., Tao, L., Barker, F., Pang, K.S., 1998. Hepatic uptake of hippurate: a multiple-indicator dilution, perfused rat liver study. *The American Journal of Physiology* 274(1): G10-20, Doi: 10.1152/ajpgi.1998.274.1.G10.
- [253] Vijay, N., Morris, M.E., 2014. Role of monocarboxylate transporters in drug delivery to the brain. *Current Pharmaceutical Design* 20(10): 1487–98, Doi: 10.2174/13816128113199990462.
- [254] Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25(4): 402–8, Doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [255] Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S., 2002. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 298(5600): 1912–34, Doi: 10.1126/science.1075762.
- [256] Sundaram, M.V., 2006. RTK/Ras/MAPK signaling. *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*: 1–19, Doi: 10.1895/wormbook.1.80.1.

- [257] Zhang, W., Liu, H.T., 2002. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research* 12(1): 9–18, Doi: 10.1038/sj.cr.7290105.
- [258] Prabhu, S.A., Moussa, O., Miller, W.H., Del Rincón, S.V., 2020. The MNK1/2-eIF4E Axis as a Potential Therapeutic Target in Melanoma. *International Journal of Molecular Sciences* 21(11): 4055, Doi: 10.3390/ijms21114055.
- [259] Conn, C.S., Yang, H., Tom, H.J., Ikeda, K., Oses-Prieto, J.A., Vu, H., et al., 2021. The major cap-binding protein eIF4E regulates lipid homeostasis and diet-induced obesity. *Nature Metabolism* 3(2): 244–57, Doi: 10.1038/s42255-021-00349-z.
- [260] Bao, Y., Wu, X., Chen, J., Hu, X., Zeng, F., Cheng, J., et al., 2017. Brd4 modulates the innate immune response through Mnk2-eIF4E pathway-dependent translational control of I $\kappa$ B $\alpha$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(20): E3993–4001, Doi: 10.1073/pnas.1700109114.
- [261] Gkogkas, C.G., Khoutorsky, A., Ran, I., Rampakakis, E., Nevarko, T., Weatherill, D.B., et al., 2013. Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature* 493(7432): 371–7, Doi: 10.1038/nature11628.
- [262] Le Bacquer, O., Petroulakis, E., Paglialunga, S., Poulin, F., Richard, D., Cianflone, K., et al., 2007. Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. *The Journal of Clinical Investigation* 117(2): 387–96, Doi: 10.1172/JCI29528.
- [263] Moore, C.E.J., Pickford, J., Cagampang, F.R., Stead, R.L., Tian, S., Zhao, X., et al., 2016. MNK1 and MNK2 mediate adverse effects of high-fat feeding in distinct ways. *Scientific Reports* 6: 23476, Doi: 10.1038/srep23476.
- [264] Ersahin, T., Tuncbag, N., Cetin-Atalay, R., 2015. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Molecular bioSystems* 11(7): 1946–54, Doi: 10.1039/c5mb00101c.
- [265] Palm, W., Park, Y., Wright, K., Pavlova, N.N., Tuveson, D.A., Thompson, C.B., 2015. The Utilization of Extracellular Proteins as Nutrients Is Suppressed by mTORC1. *Cell* 162(2): 259–70, Doi: 10.1016/j.cell.2015.06.017.
- [266] Aviner, R., 2020. The science of puromycin: From studies of ribosome function to applications in biotechnology. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18: 1074–83, Doi: 10.1016/j.csbj.2020.04.014.
- [267] Pestka, S., 1971. Inhibitors of Ribosome Functions. *Annual Review of Microbiology* 25(1): 487–562, Doi: 10.1146/annurev.mi.25.100171.002415.
- [268] Yekutieli, D., Benjamini, Y., 1999. Resampling-based false discovery rate controlling multiple test procedures for correlated test statistics. *Journal of Statistical Planning and Inference* 82(1–2): 171–96, Doi: 10.1016/S0378-3758(99)00041-5.
- [269] Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., et al., 2005. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(43): 15545–50, Doi: 10.1073/pnas.0506580102.
- [270] Wahle, E., Rügsegger, U., 1999. 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 23(3): 277–95, Doi: 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00400.x.
- [271] Abetov, D.A., Kiyan, V.S., Zhykibayev, A.A., Sarbassova, D.A., Alybayev, S.D., Spooner, E., et al., 2019. Formation of mammalian preribosomes proceeds from intermediate to composed state during ribosome maturation. *Journal of Biological Chemistry* 294(28): 10746–57, Doi: 10.1074/jbc.AC119.008378.
- [272] Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., Kanehisa, M., 1999. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research* 27(1): 29–34, Doi: 10.1093/nar/27.1.29.

- [273] Henquin, J.C., 2000. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49(11): 1751–60, Doi: 10.2337/diabetes.49.11.1751.
- [274] Raverdy, V., Chatelain, E., Lasailly, G., Caiazzo, R., Vandell, J., Verkindt, H., et al., 2023. Combining diabetes, sex, and menopause as meaningful clinical features associated with NASH and liver fibrosis in individuals with class II and III obesity: A retrospective cohort study. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 31(12): 3066–76, Doi: 10.1002/oby.23904.
- [275] Baunack, E., Gärtner, K., 1980. Determination of renal plasma flow by endogenous hippuric acid clearance in the conscious rat. *Contributions to Nephrology* 19: 211–6, Doi: 10.1159/000428780.
- [276] Kumar, R., Adiga, A., Novack, J., Etinger, A., Chinitz, L., Slater, J., et al., 2020. The renal transport of hippurate and protein-bound solutes. *Physiological Reports* 8(4): e14349, Doi: 10.14814/phy2.14349.
- [277] Joshi, S., Plataniias, L.C., 2014. Mnk kinase pathway: Cellular functions and biological outcomes. *World Journal of Biological Chemistry* 5(3): 321–33, Doi: 10.4331/wjbc.v5.i3.321.
- [278] Chen, C., Cohrs, C.M., Stertmann, J., Bozsak, R., Speier, S., 2017. Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Molecular Metabolism* 6(9): 943–57, Doi: 10.1016/j.molmet.2017.06.019.
- [279] Kaur, G., Dufour, J.M., 2012. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* 2(1): 1–5, Doi: 10.4161/spmg.19885.
- [280] Kartsogiannis, V., Ng, K.W., 2004. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Molecular and Cellular Endocrinology* 228(1–2): 79–102, Doi: 10.1016/j.mce.2003.06.002.
- [281] Leung, C.M., De Haan, P., Ronaldson-Bouchard, K., Kim, G.-A., Ko, J., Rho, H.S., et al., 2022. A guide to the organ-on-a-chip. *Nature Reviews Methods Primers* 2(1): 33, Doi: 10.1038/s43586-022-00118-6.
- [282] Rossi, G., Manfrin, A., Lutolf, M.P., 2018. Progress and potential in organoid research. *Nature Reviews. Genetics* 19(11): 671–87, Doi: 10.1038/s41576-018-0051-9.
- [283] Corrà, C., Novellasademunt, L., Li, V.S.W., 2020. A brief history of organoids. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 319(1): C151–65, Doi: 10.1152/ajpcell.00120.2020.
- [284] Goers, L., Freemont, P., Polizzi, K.M., 2014. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *Journal of the Royal Society, Interface* 11(96): 20140065, Doi: 10.1098/rsif.2014.0065.
- [285] Chen, Z., Yu, R., Xiong, Y., Du, F., Zhu, S., 2017. A vicious circle between insulin resistance and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids in Health and Disease* 16(1): 203, Doi: 10.1186/s12944-017-0572-9.
- [286] Bhandari, D., Kachhap, S., Madhukar, G., Adepu, K.K., Anishkin, A., Chen, J.-R., et al., 2022. Exploring GPR109A Receptor Interaction with Hippuric Acid Using MD Simulations and CD Spectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences* 23(23): 14778, Doi: 10.3390/ijms232314778.
- [287] Chen, J.-R., Zhao, H., Wankhade, U.D., Chintapalli, S.V., Li, C., Gai, D., et al., 2021. GPR109A mediates the effects of hippuric acid on regulating osteoclastogenesis and bone resorption in mice. *Communications Biology* 4: 53, Doi: 10.1038/s42003-020-01564-2.
- [288] Wang, N., Guo, D.-Y., Tian, X., Lin, H.-P., Li, Y.-P., Chen, S.-J., et al., 2016. Niacin receptor GPR109A inhibits insulin secretion and is down-regulated in type 2 diabetic

- islet beta-cells. *General and Comparative Endocrinology* 237: 98–108, Doi: 10.1016/j.ygcen.2016.08.011.
- [289] Ridlon, J.M., Kang, D.J., Hylemon, P.B., Bajaj, J.S., 2014. Bile acids and the gut microbiome. *Current Opinion in Gastroenterology* 30(3): 332–8, Doi: 10.1097/MOG.0000000000000057.
- [290] Belouche-Babari, M., Casals Galobart, T., Delgado-Goni, T., Wantuch, S., Parkes, H.G., Tandy, D., et al., 2020. Monocarboxylate transporter 1 blockade with AZD3965 inhibits lipid biosynthesis and increases tumour immune cell infiltration. *British Journal of Cancer* 122(6): 895–903, Doi: 10.1038/s41416-019-0717-x.
- [291] Leighton, E., Sainsbury, C.A., Jones, G.C., 2017. A Practical Review of C-Peptide Testing in Diabetes. *Diabetes Therapy: Research, Treatment and Education of Diabetes and Related Disorders* 8(3): 475–87, Doi: 10.1007/s13300-017-0265-4.
- [292] Sakers, A., De Siqueira, M.K., Seale, P., Villanueva, C.J., 2022. Adipose-tissue plasticity in health and disease. *Cell* 185(3): 419–46, Doi: 10.1016/j.cell.2021.12.016.
- [293] Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews. Genetics* 10(1): 57–63, Doi: 10.1038/nrg2484.
- [294] Hegde, P.S., White, I.R., Debouck, C., 2003. Interplay of transcriptomics and proteomics. *Current Opinion in Biotechnology* 14(6): 647–51, Doi: 10.1016/j.copbio.2003.10.006.
- [295] Gong, J., Tu, W., Liu, J., Tian, D., 2022. Hepatocytes: A key role in liver inflammation. *Frontiers in Immunology* 13: 1083780, Doi: 10.3389/fimmu.2022.1083780.
- [296] Marselli, L., Piron, A., Suleiman, M., Colli, M.L., Yi, X., Khamis, A., et al., 2020. Persistent or Transient Human  $\beta$  Cell Dysfunction Induced by Metabolic Stress: Specific Signatures and Shared Gene Expression with Type 2 Diabetes. *Cell Reports* 33(9): 108466, Doi: 10.1016/j.celrep.2020.108466.
- [297] Van Opdenbosch, N., Lamkanfi, M., 2019. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity* 50(6): 1352–64, Doi: 10.1016/j.immuni.2019.05.020.
- [298] Poitout, V., Robertson, R.P., 2008. Glucolipototoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocrine Reviews* 29(3): 351–66, Doi: 10.1210/er.2007-0023.
- [299] Alnahdi, A., John, A., Raza, H., 2019. Augmentation of Glucotoxicity, Oxidative Stress, Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction in HepG2 Cells by Palmitic Acid. *Nutrients* 11(9): 1979, Doi: 10.3390/nu11091979.
- [300] Bianchi, B., Taurand, M., Colace, C., Thomaidou, S., Audeoud, C., Fantuzzi, F., et al., 2023. EndoC- $\beta$ H5 cells are storable and ready-to-use human pancreatic beta cells with physiological insulin secretion. *Molecular Metabolism* 76: 101772, Doi: 10.1016/j.molmet.2023.101772.
- [301] Grotz, A.K., Abaitua, F., Navarro-Guerrero, E., Hastoy, B., Ebner, D., Gloyn, A.L., 2020. A CRISPR/Cas9 genome editing pipeline in the EndoC- $\beta$ H1 cell line to study genes implicated in beta cell function. *Wellcome Open Research* 4: 150, Doi: 10.12688/wellcomeopenres.15447.2.
- [302] Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)* 337(6096): 816–21, Doi: 10.1126/science.1225829.

