



**HAL**  
open science

# Adaptation postprandiale du métabolisme intestinal des lipides : rôle du CD36 et du PPAR bêta

Thi Thu Trang Tran

► **To cite this version:**

Thi Thu Trang Tran. Adaptation postprandiale du métabolisme intestinal des lipides : rôle du CD36 et du PPAR bêta. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2011. Français. NNT : 2011DIJOS002 . tel-00689160

**HAL Id: tel-00689160**

**<https://theses.hal.science/tel-00689160>**

Submitted on 19 Apr 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Université de Bourgogne  
Ecole Doctorale Environnements-Santé-STIC  
Centre de recherche INSERM U866 Lipides-Nutrition-Cancer  
AgroSup Dijon**

**THESE**

*Discipline : Sciences de la vie*

*Spécialité Physiologie de la Nutrition*

**Adaptation postprandiale du métabolisme intestinal  
des lipides : Rôle du CD36 et du PPAR $\beta$**

présentée par

**Thi Thu Trang TRAN**

*en vue d'obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne*

*Soutenue publiquement le 08 Septembre 2011*

*devant le jury composé de :*

<b>X. COLLET</b>	<b>Directeur de Recherche, INSERM U563, Toulouse</b>	<i>Rapporteur</i>
<b>C. MAGNAN</b>	<b>Professeur, Université Diderot, Paris</b>	<i>Rapporteur</i>
<b>I. DUGAIL</b>	<b>Directeur de Recherche, Centre de Recherches des Cordeliers, Paris</b>	<i>Examineur</i>
<b>N. KHAN</b>	<b>Professeur, Université de Bourgogne</b>	<i>Examineur</i>
<b>I. NIOT</b>	<b>Professeur, Université de Bourgogne/AgroSup Dijon, Dijon</b>	<i>Directrice de thèse</i>
<b>H. POIRIER</b>	<b>Maître de Conférences, AgroSup Dijon, Dijon</b>	<i>Co-encadrante de thèse</i>

# Remerciements

*Quatre années de plaisir et de joie à découvrir de nouveaux résultats.*

*Des soirées si contente car les expériences marchent bien et d'autres soirées pleines de doutes : Et si notre hypothèse n'est pas bonne? Heureusement que « la nuit porte conseil! »...*

*Quatre années passionnantes d'échanges et de moments inoubliables avec mes collègues.*

*Je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à cette thèse.*

Je tiens à remercier Monsieur Philippe BESNARD, Professeur et Directeur du Laboratoire de Physiologie de la Nutrition, de m'avoir accueillie au sein de son équipe, ainsi que son esprit critique et ses conseils.

Toute ma gratitude à Madame Isabelle NIOT, Professeur et Directrice de thèse, de m'avoir accordé sa grande disponibilité, ainsi que pour la confiance qu'elle m'a témoigné et pour ses encouragements sans cesse renouvelés.

Je souhaite également témoigner à Madame Hélène POIRIER, Maître de Conférences et Co-encadrante de thèse, toute ma reconnaissance pour m'avoir communiqué son enthousiasme pour la recherche, pour son soutien permanent et ses remarques constructives tout au long de mon stage de recherche DEA et de ma thèse. Un grand merci à toutes les deux pour votre dévouement, votre rigueur, vos connaissances scientifiques et votre implication dans ce travail, ainsi que pour votre gentillesse et votre énergie qui furent enrichissantes aussi bien dans le travail que dans la vie.

Je tiens à exprimer ma gratitude et mon respect aux membres du jury.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Xavier COLLET, Directeur de recherche à l'INSERM U563, et Monsieur Christophe MAGNAN, Professeur à l'Université Diderot pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également Madame Isabelle DUGAIL, Directeur de Recherche au Centre de Recherches des Cordeliers et Monsieur Naim KHAN, Professeur à Université de Bourgogne qui ont accepté d'examiner ce travail.

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du Laboratoire de physiologie de la Nutrition pour la bonne ambiance au travail.

Mes plus vifs remerciements vont à Madame Marie-Claude MONNOT, Technicienne du Laboratoire. Je la remercie pour sa gentillesse, son dévouement, sa bonne humeur et son implication dans ce travail. Sans elle, on n'aurait jamais réussi les « segments congelés ! »

Je remercie Jean-François MERLIN pour son aide, notamment pour l'étude Echomeri des souris KOCD36 et sa sympathie, ainsi que Madame Patricia DEGRACE pour son encouragement.

Je remercie chaleureusement tous les doctorants : Valérie, Dany, Céline, Michaël, Marjorie, Véronique avec qui j'ai partagé non seulement le bureau pendant ces années de thèse mais également beaucoup de moments difficiles et joyeux (surtout toi Marjo pour la « relecture » de cette thèse !).

Un grand merci à Lorène LEBRUN, stagiaire du Laboratoire pour sa contribution dans le résultat sur les souris KOPPARβ.

Je remercie également mes amis: Chi, Hanh, Thoai, Hue, Quang, Phu, Huong, Truc, Floriane...des tous les moments passés ensembles.

Je voudrais remercier mes parents et ma petite sœur qui m'ont toujours encouragée et m'ont témoignée une confiance absolue.

Je remercie de tout cœur mon mari, An Ninh TA, pour son amour et son soutien permanent. Merci d'être toujours à côté de moi.

# Résumé

L'hypertriglycéridémie postprandiale représente un facteur de risque émergent des maladies cardiovasculaires et est retrouvé en cas de syndrome métabolique, d'obésité et d'insulino-résistance. L'intestin grêle conditionne la triglycéridémie postprandiale puisque la taille et de la quantité des chylomicrons sécrétés modulent l'activité de la Lipoprotéine Lipase (LPL). La synthèse des chylomicrons est un mécanisme complexe dont l'étape de lipidation de l'Apolipoprotéine B48 (ApoB48) par la Microsomal Triglyceride Transfert Protein (MTP) et celle de leur transfert du réticulum vers le Golgi dans laquelle intervient la Liver Fatty Acid binding Protein (L-FABP) sont limitantes. Des expériences menées *in vivo* chez des animaux sauvages et transgéniques et *ex vivo* sur des segments intestinaux, nous ont permis de démontrer qu'il existe une adaptation postprandiale du métabolisme intestinal des lipides. Cette adaptation postprandiale est déclenchée par la glycoprotéine CD36 qui en présence d'acides gras à longue chaîne (AGLC) régule la voie ERK1/2 et conduit à l'induction de l'ApoB48, de la MTP et de la L-FABP. La dégradation rapide du CD36 par la voie ubiquitine-protéasome en présence d'AGLC, qui conduit à la désactivation de la voie ERK1/2, est typique d'un récepteur. Puisque d'une part les souris invalidées pour le Peroxisome Proliferator Activated receptor  $\beta$  (PPAR $\beta$ ) présentent une altération de l'adaptation et une hypertriglycéridémie postprandiale et que d'autre part les lipides alimentaires induisent le PPAR $\beta$  *via* CD36, CD36 et PPAR $\beta$  pourraient faire partie d'un mécanisme commun de régulation. En conclusion, CD36 et PPAR $\beta$  contribuent au sensing entérocytaire des AGLC d'origine alimentaire, responsable de l'adaptation postprandiale du métabolisme des lipides qui favorise la formation de gros chylomicrons efficacement épurés de la circulation sanguine.

**Mots-clés : CD36, PPAR $\beta$ , Récepteur, Chylomicrons, Triglycéridémie postprandiale.**

# Abstract

Postprandial hypertriglyceridemia is an emerging risk factor for cardiovascular diseases and is associated with metabolic syndrome, obesity and insulin resistance. The small intestine participates in the postprandial triglyceridemia since both the size and number of secreted chylomicrons modulate lipoprotein lipase activity (LPL). Chylomicron synthesis is a complex mechanism in which the lipidation of Apolipoprotein B48 (ApoB48) by the Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP) and the transfer between reticulum and Golgi in which the Liver Fatty Acid Binding Protein (L-FABP) is involved are limiting steps. An intestinal fat-mediated adaptation in postprandial period has been demonstrated by *in vivo* (transgenic and wild type mice) and *ex vivo* (intestinal segments) approaches. This postprandial adaptation is triggered by the glycoprotein CD36 in the presence of Long chain Fatty Acids (LCFA) that regulates the ERK1/2 pathway and leads to the induction of ApoB48, MTP and L-FABP. The rapid degradation of CD36 by the ubiquitin-proteasome pathway in the presence of LCFA, which leads to ERK1/2 deactivation, has a feature of a receptor. Since firstly, Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\beta$  (PPAR  $\beta$ ) knockout mice display an alteration of postprandial adaptation associated with a hypertriglyceridemia and secondly, dietary fat-mediated PPAR $\beta$  up-regulation is CD36 dependent, CD36 and PPAR $\beta$  might participate to a common regulation mechanism. In conclusion, CD36 and PPAR $\beta$  contribute to the enterocyte LCFA sensing responsible for postprandial adaptation that promotes the formation of large chylomicrons efficiently cleared into the blood.

**Key words : CD36, PPAR $\beta$ , Receptor, Chylomicrons, Postprandial triglyceridemia.**

# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>1</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>5</b>
<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>12</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>17</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>24</b>
<b>LES LIPIDES ALIMENTAIRES .....</b>	<b>25</b>
1.1 <i>Fonctions structurales et énergétiques .....</i>	27
1.2 <i>Fonctions dans la signalisation cellulaire.....</i>	27
<b>ABSORPTION INTESTINALE DES LIPIDES ALIMENTAIRES .....</b>	<b>28</b>
1 <i>Les spécificités morphologiques et fonctionnelles de l'intestin grêle .....</i>	28
1.1 <i>Anatomie complexe de l'épithélium intestinal.....</i>	28
1.2 <i>Composition cellulaire de l'épithélium intestinal.....</i>	30
1.3 <i>Renouvellement intense de l'épithélium intestinal.....</i>	32
2 <i>Digestion des lipides .....</i>	34
3 <i>Absorption intestinale des lipides .....</i>	35
3.1 <i>Captage transmembranaire des AGLC.....</i>	36
3.1.1 <i>FABPpm.....</i>	38
3.1.2 <i>FATP4 .....</i>	39
3.1.3 <i>CD36 .....</i>	40
3.2 <i>Le transport cytosolique des AGLC.....</i>	48
3.3 <i>La ré-estérification des AGLC en TG .....</i>	51
3.3.1 <i>MGAT - Monoacylglycerol acyltransferase .....</i>	51

3.3.2	DGAT - Diacylglycerol acyltransferase.....	51
3.4	<i>Formation des chylomicrons.....</i>	52
3.4.1	Assemblage des préchylomicrons : caractéristique unique des entérocytes	52
3.4.2	Transport spécifique des préchylomicrons vers le Golgi : une deuxième étape limitante .....	63
3.4.3	Maturation golgienne et sécrétion des chylomicrons.....	65
3.5	<i>Métabolisme post-intestinal des chylomicrons : impact sur la triglycéridémie postprandiale.....</i>	65
3.6	<i>PPARs : régulateur potentiel de la triglycéridémie postprandiale .....</i>	69
<b>PROBLEMATIQUE.....</b>		<b>73</b>
<b>RESULTATS .....</b>		<b>75</b>
<b>EXISTE-T-IL UNE ADAPTATION POSTPRANDIALE DU METABOLISME INTESTINAL DES LIPIDES ? .....</b>		<b>76</b>
1	<i>L'ingestion de lipides alimentaires affecte rapidement le métabolisme intestinal des lipides .....</i>	77
1.1	<i>Cinétique de l'effet des lipides alimentaires sur la teneur en triglycérides de la muqueuse intestinale et la triglycéridémie postprandiale.....</i>	77
1.2	<i>L'ingestion de lipides alimentaires augmente l'expression des gènes clefs impliqués dans l'absorption intestinale des AGLC.....</i>	78
1.2.1	Effet d'une charge en lipides sur le taux d'ARNm jéjunal des LBPs impliquées dans le captage et le trafic intracellulaire des AGLC .....	78
1.2.2	Effet d'une charge en lipides sur le taux d'ARNm jéjunal des protéines impliquées dans la formation et la sécrétion des chylomicrons.....	79
1.2.3	Effet d'une charge en lipides sur le taux d'ARNm jéjunal de l'ApoC-II et de l'ApoC-III.....	81
1.2.4	Effet d'une charge en lipides sur le taux d'ARNm jéjunal de protéines impliquées dans l'absorption du cholestérol .....	82
1.2.5	Effet d'un charge en lipides sur le taux d'ARNm jéjunal des PPARs .....	83
2	<i>L'adaptation intestinale est-elle dépendante du PPAR<math>\beta</math> ? .....</i>	85
2.1	<i>L'invalidation du gène PPAR<math>\beta</math> ne modifie pas la surface d'absorption .....</i>	85



2.2	<i>L'absence du PPAR<math>\beta</math> modifie-elle le taux de TG de la muqueuse intestinale et l'hypertriglycéridémie postprandiale ?</i>	86
2.3	<i>L'absence du PPAR<math>\beta</math> modifie-t-elle la régulation des gènes clefs de la formation des chylomicrons et de leur clairance suite à une charge lipidique ?</i>	87
2.4	<i>L'activation du PPAR<math>\beta</math> est-elle à l'origine de l'adaptation intestinale ?</i>	89
<b>CD36 EST-IL IMPLIQUÉ DANS L'ADAPTATION POSTPRANDIALE DU MÉTABOLISME INTESTINAL DES LIPIDES ?</b>		<b>93</b>
1	<i>Les animaux KOCD36 ont-ils constitutivement la même capacité à synthétiser des chylomicrons ?</i>	94
1.1	<i>L'invalidation du gène CD36 ne modifie pas la balance énergétique en régime standard.</i>	95
1.2	<i>L'invalidation du gène CD36 ne modifie pas la surface d'absorption.</i>	96
1.3	<i>L'invalidation du gène CD36 altère la triglycéridémie des souris à jeun.</i>	97
1.4	<i>Impact de l'invalidation du gène CD36 sur le taux basal des ARNm des protéines impliquées dans le métabolisme intestinal des lipides</i>	97
2	<i>Existe-t-il une adaptation des capacités d'absorption intestinale chez les souris KOCD36 suite à une charge lipidique ?</i>	98
2.1	<i>Impact de l'invalidation du gène CD36 sur la triglycéridémie postprandiale.</i>	99
2.2	<i>Impact de l'invalidation du gène CD36 sur l'expression des protéines clefs impliquées dans la formation des chylomicrons suite à une charge lipidique.</i>	100
2.3	<i>Impact de l'invalidation du gène CD36 sur le taux d'ARNm des PPARs après une charge en lipides</i>	102
<b>QUEL EST L'IMPACT DES LIPIDES ALIMENTAIRES SUR LA RÉGULATION POSTPRANDIALE DU CD36 ?</b>		<b>105</b>
1	<i>Le CD36 intestinal n'est pas un transporteur efficace aux AGLC</i>	106
2	<i>Les lipides alimentaires déclenchent une disparition rapide du CD36 présent au niveau de la membrane apicale des entérocytes</i>	107
3	<i>Les lipides alimentaires diminuent la quantité du CD36 présent dans la muqueuse jéjunale.</i>	109
4	<i>Les lipides alimentaires déclenchent une poly-ubiquitination du CD36</i>	110

5	<i>Le MG132 bloque la dégradation du CD36 chez la souris soumise à une charge lipidique.....</i>	114
<b>LE CD36 DECLENCHE-T-IL UNE SIGNALISATION CELLULAIRE EN PRESENCE DE LIPIDES ALIMENTAIRES ? .....</b>		
<b>116</b>		
1	<i>Le CD36 active les ERK1/2 et induit l'expression protéique de l'ApoB48 et de la MTP en présence d'AGLC sur des segments intestinaux ex vivo .....</i>	117
1.1	<i>Mise au point d'un modèle de culture de segments intestinaux.....</i>	117
1.2	<i>Les acides gras à longue chaîne déclenchent directement la disparition du CD36 intestinal.....</i>	120
1.3	<i>Le CD36 est nécessaire à l'activation des ERK1/2 par les AGLC sur des segments intestinaux ex vivo .....</i>	121
1.4	<i>L'activation des ERK1/2 par les AGLC est CD36 dépendante .....</i>	122
1.5	<i>Le CD36 est nécessaire à l'induction de l'expression protéique de l'ApoB48 et de la MTP par les AGLC.....</i>	124
1.6	<i>L'induction du taux de protéine ApoB48 est dépendante de l'activation des ERK1/2 .....</i>	125
2	<i>Le niveau protéique du CD36 module l'activation des ERK1/2 en faveur de la formation des gros chylomicrons .....</i>	128
2.1	<i>Le niveau protéique du CD36 est corrélé à l'activation des ERK1/2 suite à une charge en lipides .....</i>	128
2.2	<i>Le niveau d'activation des ERK1/2 est négativement corrélé à la teneur en lipides de la muqueuse intestinale .....</i>	129
<b>DISCUSSION.....</b>		
<b>132</b>		
	<i>Il existe une adaptation postprandiale du métabolisme intestinal des lipides.....</i>	133
	<i>Le PPAR<math>\beta</math> est impliqué dans l'adaptation postprandiale du métabolisme intestinal des lipides .....</i>	134
	<i>CD36 intestinal est un lipido-récepteur impliqué dans la formation des chylomicrons....</i>	135
	<i>CD36 et PPAR<math>\beta</math> pourraient être deux éléments du « sensing » entérocytaire des lipides alimentaires.....</i>	140
	<i>Rôle respectif du CD36 et du SR-BI dans le « sensing » entérocytaire des lipides .....</i>	142

<i>Quels sont les paramètres susceptibles d'altérer le «sensing» entérocytaire des lipides ?</i>	145
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>147</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>150</b>
<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b> .....	<b>174</b>

# Abréviations

ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ACBP	Acyl-CoA binding protein
ACS	Acyl-CoA Synthetase
ACF	Apobec1 complementation factor
AGLC	Acides gras à longue chaîne
Apo	Apolipoprotéine
Apobec1	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1
ARNm	Acide ribonucléique messager
BSA	Bovine Serum Albumin
CCK	Cholécystokinine
CD36	Fatty acid transporter
CS	Cholestérol
DG	Diglycéride
DGAT	Diacylglycerol acyltransferase
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
EC	Ester de cholestérol
EGF	Epidermal Growth Factor
FABP	Fatty acid binding protein
FABPpm	Fatty acid binding protein plasma membrane
FATP	Fatty acid transport protein
FoxO1	Forkhead box protein O1
GLP-1	Glucagon like-peptide 1
GLP-2	Glucagon like-peptide 2
GPCR	G protein-coupled receptor
KO	Knock-out
HDL	High-density lipoprotein
HSC70	Heat shock cognate protein 70
I-FABP	Intestinal fatty acid binding protein

IP3K	Inositol-triphosphate kinase
LA	Acide linoléique
LBP <sub>s</sub>	Lipid binding proteins
LDL	Low density lipoprotein
LDLr	Low density lipoprotein receptor
L-FABP	Liver fatty acid binding protein
LPL	Lipoprotéine lipase
LRP	Low-density lipoprotein receptor-related protein
LRT	Lipoprotéines riche en triglycérides
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MG	Monoglycérides
MGAT	Monoacylglycerol acyltransferase
MTP	Microsomal triglyceride transfer protein
NPC1L1	Niemann-pick C1 like 1
PCR	Polymerase chain reaction
PCTV	Prechylomicron transport vesicle
PKC	Protein kinase C
PL	Phospholipides
PPAR <sub>s</sub>	Peroxisome proliferator-activated receptors
PPRE	Peroxisome proliferator-responsive element
RE	Réticulum endoplasmique
RXR	Retinoïd-X-Receptor
SAR1b	Smad Anchor for Receptor Activation 2
SR-BI	Scavenger Receptor class B type I
SSO	Sulfo-N-succinimidyl oleate ester
TG	Triglycérides
TNA	Taurocholate de sodium
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
VAMP7	Vesicle-associated membrane protein 7
VLDL	Very low density lipoprotein
WT	Wild type

# Liste des figures

Figure 1 : Facteurs alimentaires et physiopathologiques affectant la lipémie postprandiale (d'après (Lairon, 2008a)).	20
Figure 2 : Structure et nomenclature des principales familles d'acides gras (d'après (Guesnet <i>et al.</i> , 2005)).	26
Figure 3 : Structure de la paroi intestinale.	29
Figure 4 : Unité fonctionnelle de l'intestin grêle : l'axe crypto – villositaire (d'après (Crosnier <i>et al.</i> , 2006)).	30
Figure 5 : Les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal (d'après (Crosnier <i>et al.</i> , 2006)).	30
Figure 6 : Diagramme de différenciation cellulaire impliquée dans le maintien de l'épithélium intestinal (d'après (Crosnier <i>et al.</i> , 2006)).	33
Figure 7 : Formation des micelles mixtes dans la lumière intestinale (d'après (Shi & Burn, 2004)).	35
Figure 8 : Principales étapes de l'absorption intestinale des acides gras à longue chaîne.	36
Figure 9 : Structure prédictive du CD36 (d'après (Su & Abumrad, 2009)).	41
Figure 10 : Implication du CD36 dans la perception orale des lipides alimentaires.	45
Figure 11 : Cascade de signalisation déclenchée par la liaison du CD36 avec son ligand.	47
Figure 12 : Structure d'un chylomicron.	52
Figure 13 : Mécanisme de l'assemblage des préchylomicrons.	53
Figure 14 : La structure protéique de l'ApoB100 et de l'ApoB48 (d'après (Davidson & Shelness, 2000)).	55
Figure 15 : Schéma de « l'editing » de l'ARNm ApoB (d'après (Davidson & Shelness, 2000)).	55
Figure 16 : Le complexe multi-protéique de l'éditosome de l'ARNm ApoB (d'après (Anant & Davidson, 2002)).	56
Figure 17 : Structure de la large sous-unité de la MTP (d'après (Hussain <i>et al.</i> , 2003)).	58
Figure 18 : Régulation de la sécrétion de l'ApoB100 (adapté d'après (Brodsky & Fisher, 2008)).	59
Figure 19 : Transport spécifique des préchylomicrons vers le Golgi.	64

Figure 20 : Mécanisme de transcription des gènes par les PPARs (adapté d'après (Desvergne <i>et al.</i> , 2006)).	69
Figure 21 : Evolution de la quantité de triglycérides présente dans la muqueuse jéjunale (A) et de la triglycéridémie (B) chez des souris sauvages soumises à une charge lipidique.	77
Figure 22 : Effet d'une charge en lipides sur l'expression jéjunale des LBPs impliquées dans le captage et le trafic intracellulaire des AGLC.	79
Figure 23 : Effet d'une charge en lipides sur le taux d'ARNm jéjunale des protéines impliquées dans la formation et la sécrétion des chylomicrons.	80
Figure 24 : Effet d'une charge lipidique sur le taux d'ARNm de l'ApoC-II et de l'ApoC-III.	81
Figure 25 : Effet d'une charge lipidique sur le taux d'ARNm jéjunale du SRB-I, du NPC1L1 et de l'ABCA1 impliquées dans le métabolisme intestinal du cholestérol.	82
Figure 26 : Effet d'une charge lipidique sur le taux d'ARNm jéjunale des PPARs.	84
Figure 27 : Impact de l'inactivation du gène PPAR $\beta$ sur la morphologie intestinale de souris mâles soumises à un régime standard et mises à jeun 16 heures.	85
Figure 28 : Quantification des TG de la muqueuse jéjunale et de l'hypertriglycéridémie chez les KOPPAR $\beta$ après une charge en lipides.	86
Figure 29 : Impact de l'inactivation du PPAR $\beta$ sur l'expression jéjunale des gènes clés impliqués dans l'absorption intestinale des AGLC 6 heures après une charge lipidique.	88
Figure 30 : Impact de l'inactivation du PPAR $\beta$ sur l'expression jéjunale des PPAR 6 heures après une charge lipidique.	89
Figure 31 : Effet de l'activation de PPAR $\beta$ par le L-165041 sur l'expression jéjunale des protéines impliquées dans l'absorption intestinale des lipides.	90
Figure 32 : La génération de la lignée KOCD36 par recombinaison homologue (adapté de (Febbraio <i>et al.</i> , 1999)).	94
Figure 33 : Impact de l'inactivation du gène CD36 sur la prise alimentaire, la masse et la composition corporelle de souris âgées de 12 semaines et soumises à un régime standard.	95
Figure 34 : Impact de l'inactivation du gène CD36 sur la morphologie intestinale de souris mâles soumises à un régime standard et mises à jeun 16 heures.	96
Figure 35 : Impact de l'inactivation du gène CD36 sur la triglycéridémie chez des souris mâles soumises à un régime standard et mises à jeun 16 heures.	97

Figure 36 : Impact de l'invalidation du gène CD36 sur l'expression jéjunale des gènes clés impliqués dans l'absorption intestinale des lipides. ....	98
Figure 37 : Evolution de la triglycéridémie chez des souris sauvages et KOCD36 soumises à une charge lipidique. ....	99
Figure 38 : Effet d'une charge en lipides sur l'expression des protéines clés impliquées dans la formation des chylomicrons chez des souris sauvages et KOCD36. ....	101
Figure 39 : Effet d'une charge lipidique sur l'expression jéjunale de l'ApoC-II et de l'ApoC-III chez des souris sauvages et KOCD36. ....	102
Figure 40 : Effet d'une charge lipidique sur l'expression jéjunale des PPARs chez des souris sauvages et KOCD36. ....	103
Figure 41 : L'invalidation du gène CD36 n'altère pas le captage de l'acide linoléique au niveau entérocytaire chez la souris. ....	107
Figure 42 : Les lipides alimentaires déclenchent une disparition de la protéine CD36 de la membrane apicale des cellules des villosités chez les rongeurs (souris et rat). ....	108
Figure 43 : Effet de la charge lipidique sur l'expression protéique et génique du CD36. ....	109
Figure 44 : Schéma présentant les principales étapes de la voie de dégradation ubiquitine-protéasome d'une protéine (adapté d'après (Schwartz & Ciechanover, 2009)). ....	110
Figure 45 : Différents types d'ubiquitination (adapté de (Marmor & Yarden, 2004)). ....	111
Figure 46 : L'ingestion de lipides alimentaires déclenche chez la souris une poly-ubiquitination du CD36 intestinal. ....	112
Figure 47 : Identification des produits de digestion des lipides alimentaires à l'origine de la poly-ubiquitination du CD36 humain. ....	113
Figure 48 : Le MG132 bloque la dégradation du CD36 intestinal chez la souris soumise à une charge lipidique. ....	114
Figure 49 : Détection du CD36 dans les clones 15 et TC7 des cellules Caco-2. ....	118
Figure 50 : Description du modèle <i>ex vivo</i> de segments intestinaux. ....	119
Figure 51 : L'acide linoléique émulsifié avec du taurocholate de sodium ou complexé avec de la BSA déclenche une diminution de la protéine CD36 dans des segments intestinaux en culture. ....	120
Figure 52 : Cinétique de l'activation des voies ERK1/2 par l'acide linoléique sur des segments jéjunaux de souris en culture. ....	122



Figure 53 : L'activation des ERK1/2 par l'acide linoléique dans des segments intestinaux en culture est CD36 dépendante.....	123
Figure 54 : <i>Ex vivo</i> , l'induction de l'ApoB48 et de la MTP par l'acide linoléique est dépendante du CD36. ....	124
Figure 55 : L'induction du taux d'ApoB48 par l'acide linoléique sur des segments intestinaux en culture est dépendante de l'activation des ERK1/2 kinases. ....	126
Figure 56 : Effet du traitement MG132 sur l'activation des ERK1/2 de la muqueuse jéjunale chez des souris sauvages et KOCD36. ....	128
Figure 57 : Effet du MG132 sur la teneur en triglycérides de la muqueuse jéjunale chez des souris sauvages et KOCD36 soumises à une charge lipidique.....	130
Figure 58 : Effet du traitement MG132 sur l'expression génique et protéique de la L-FABP et de la MTP chez des souris sauvages et KOCD36 soumises à une charge lipidique. ....	131
Figure 59 : Rôle du CD36 dans l'absorption intestinale des lipides. ....	136
Figure 60 : Schéma hypothétique de l'implication du CD36 et du PPAR $\beta$ dans l'adaptation postprandiale du métabolisme intestinal des lipides. ....	141
Figure 61 : Effet d'une charge en lipides sur l'expression protéique du SR-BI. ....	144
Figure 62 : Mécanisme du « sensing » entéroendocrine et entérocytaire des AGLC. ....	148

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Impact de l'invalidation des LBP sur la triglycémie postprandiale (d'après (Niot <i>et al.</i> , 2009)).....	23
Tableau 2 : Exemple d'hormones sécrétées par les cellules entéroendocrines intestinales (Miyawaki <i>et al.</i> , 2002; Chaudhri <i>et al.</i> , 2008; Rowland & Brubaker, 2008). ....	32
Tableau 3 : Caractéristiques fonctionnelles de la I-FABP et de la L-FABP.....	49
Tableau 4 : Modèles intestinaux de cultures cellulaires et d'explants. ....	117
Tableau 5 : CD36 et PPAR $\beta$ - 2 partenaires impliqués dans l'adaptation du métabolisme intestinal des lipides en période postprandiale.....	140

# **Introduction**

Un certain nombre d'enquêtes indiquent qu'un apport excessif en lipides alimentaires associé à un déséquilibre qualitatif (excès d'acides gras saturés et de cholestérol, rapport des acides gras poly-insaturés en n-6/n-3 trop élevé) contribue à l'augmentation de la prévalence de l'obésité. L'obésité est maintenant considérée comme une épidémie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) avec plus d'un milliard d'adultes en surpoids dans le monde et 300 millions d'obèses. Ce phénomène épidémique évolue rapidement (+ 61% en dix ans) et touche toutes les tranches d'âge (Malecka-Tendera & Mazur, 2006). Cette évolution est d'autant plus préoccupante qu'elle est associée à d'autres perturbations métaboliques telles que la dyslipidémie, l'insulino-résistance, l'intolérance au glucose et l'hypertension qui sont tous des facteurs de risques des maladies cardiovasculaires.

La mortalité cardiovasculaire représente un problème majeur de santé publique. Selon l'OMS, les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. On estime qu'elles sont responsables d'environ 17,1 millions de décès chaque année, soit 29% de la mortalité mondiale totale. En France, d'après l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE), en plus des tumeurs, elles font partie des deux principales causes de mortalité.

Les principaux facteurs de risque des maladies cardiovasculaires sont une mauvaise alimentation, une inactivité physique, le tabagisme et les maladies métaboliques comme l'obésité, le syndrome métabolique et le diabète de type 2. En effet, la complication la plus fréquente de ces maladies est la mortalité cardiovasculaire. Des perturbations des lipides circulants expliquent en grande partie le risque cardiovasculaire. Le principal facteur de risque admis est le cholestérol porté par les Low Density Lipoproteins (LDL). Cependant d'autres paramètres lipidiques sont également impliqués comme l'hypertriglycéridémie, la baisse du cholestérol porté par les High Density Lipoproteins (HDL), l'augmentation du nombre de petites particules de LDL et l'hypertriglycéridémie postprandiale. Cette dernière anomalie représente un facteur de risque émergent d'origine alimentaire, qui est un marqueur commun associé, à l'obésité et à l'insulino-résistance (Alipour *et al.*, 2008). En effet, des données épidémiologiques récentes indiquent que ce paramètre est un prédicteur des maladies cardiovasculaires (O'Keefe & Bell, 2007) telles que l'infarctus du myocarde, l'ischémie cardiaque (Nordestgaard *et al.*, 2007) et le choc ischémique (Freiberg *et al.*, 2008). Ce paramètre n'est encore que très rarement pris en compte puisque la triglycéridémie est systématiquement mesurée à jeun alors que l'Homme est en situation postprandiale la majorité du temps. De plus, le rôle athérogénique des lipoprotéines postprandiales riches en

triglycérides (LRT) n'a été envisagé que depuis les travaux de Zilversmit en 1979 (Zilversmit, 1979).

La triglycémie postprandiale est un état dynamique caractérisé par une augmentation de la concentration plasmatique des lipoprotéines d'origine intestinale, principalement des chylomicrons après un repas en plus de celles d'origine hépatique (les very low density lipoproteins, VLDL). Les lipides alimentaires contiennent principalement des triglycérides (TG) (environ 95%), constitués d'acide gras à longue chaîne (AGLC). Après la prise de repas, en période postprandiale, des TG alimentaires sont absorbés au niveau intestinal, puis transportés vers les tissus périphériques dans des lipoprotéines intestinales, les chylomicrons. Ces lipoprotéines sont riches en TG (95% des lipides) et contiennent de faibles quantités de cholestérol et de phospholipides et chez l'Homme une Apolipoprotéine spécifique l'ApoB48. Au cours de leur catabolisme sanguin par la lipoprotéine lipase (LPL), les chylomicrons sont hydrolysés fournissant des AGLC aux tissus et deviennent les chylomicrons résiduels qui sont captés par le foie.

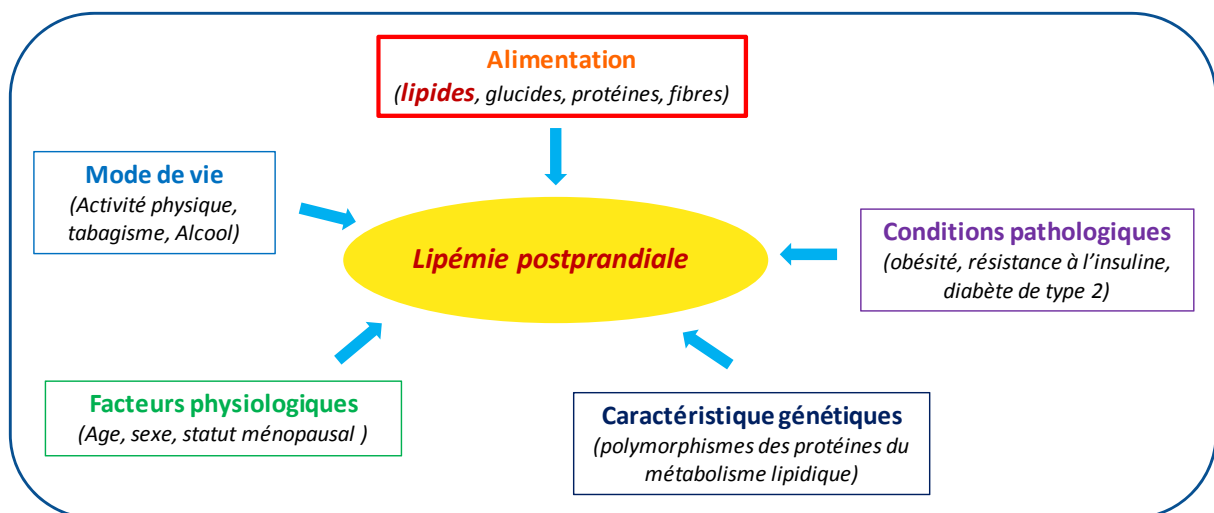
L'origine de la relation entre les LRT et les maladies cardiovasculaires n'est pas encore clairement établie mais plusieurs mécanismes directs ou indirects sont évoqués. Tout d'abord, l'hypertriglycémie postprandiale augmente la durée de résidence des lipoprotéines dans le sang. Plusieurs études cliniques ont démontré qu'un retard dans l'épuration de ces LRT en période postprandiale est associé à l'athérosclérose (Lopez-Miranda *et al.*, 2006). Des études tant cliniques qu'*in vitro*, ont montré que les LRT (VLDL et chylomicrons), sont responsables d'effets délétères au niveau de l'endothélium des artères. En effet, le délai de séjour des particules résiduelles de chylomicrons favorise leur pénétration dans la paroi de l'endothélium vasculaire, ce qui stimule la transformation des monocytes en macrophages puis en cellules spumeuses (Lopez-Miranda *et al.*, 2006). Les chylomicrons résiduels sont donc comme les LDL, des particules pro-inflammatoires et pro-athérogéniques. Il est intéressant de noter que les macrophages possèdent un récepteur spécifique de l'ApoB48 (De Pascale *et al.*, 2006), ce qui confirme le rôle des LRT intestinales dans la constitution des lésions athéromateuses. Soulignons de plus que cette élévation postprandiale des LRT augmente la proportion de LDLs petites et denses et diminue celles des HDL, aboutissant à un profil lipoprotéique pro-athérogénique (Lopez-Miranda *et al.*, 2006). De plus, la lipémie postprandiale a été associée à l'augmentation de facteurs pro-coagulants, à l'activation des plaquettes et à une détérioration de l'intégrité de l'endothélium vasculaire. Enfin, l'hypertriglycémie conduit à l'augmentation de la concentration plasmatique des acides gras libres créant un stress oxydatif

et un état inflammatoire important au niveau des tissus périphériques ce qui pourrait induire le dysfonctionnement endothélial, l'instabilité de la plaque, et les événements cardiaques (Bell *et al.*, 2008).

En dehors de cet effet sur les maladies cardiovasculaires, la triglycéridémie postprandiale participe à l'effet adipogénique des lipides alimentaires. En effet, le remplissage des tissus adipeux par les lipides est un phénomène postprandial (Lopez-Miranda *et al.*, 2006). Certains auteurs rapportent même que les TG durant dans cette période, majoritairement captés par le tissu adipeux viscéral, marqueur de l'obésité associée au syndrome métabolique (Couillard *et al.*, 1998). Cet effet adipogénique est dû à l'augmentation du flux entrant de lipides alimentaires (et endogènes), dans une situation où l'hydrolyse des lipides dans les adipocytes est inhibée sous l'effet de l'augmentation concomitante de l'insulinémie. En effet en période postprandiale, l'insulinémie est stimulée par l'augmentation du glucose provenant de la digestion des glucides accompagnant les lipides dans les repas usuels.

Après trois décennies de recherche, l'intérêt d'étudier et de comprendre les mécanismes régulant la lipémie postprandiale est donc maintenant reconnu puisque, d'une part les lipoprotéines intestinales sont athérogéniques, et d'autre part elles sont plus adipogéniques.

Plusieurs facteurs régulateurs d'origines nutritionnelles ou physiopathologiques peuvent moduler la triglycéridémie postprandiale (Lopez-Miranda *et al.*, 2007; Lairon, 2008a) (Figure 1).



**Figure 1 : Facteurs alimentaires et physiopathologiques affectant la lipémie postprandiale (d'après (Lairon, 2008a)).**

Comme le montre la Figure 1, de nombreux facteurs modulent l'amplitude et la durée de la lipémie postprandiale. Parmi ces facteurs, citons :

- L'âge : la lipémie postprandiale augmente avec l'âge,
- Le sexe : les hommes ayant une lipémie postprandiale plus élevée que les femmes pour un même repas, à cause d'une hydrolyse plus faible dans la circulation,
- Les conditions pathologiques : l'insulino-résistance augmente la triglycéridémie postprandiale et certains polymorphismes de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (Lopez-Miranda *et al.*, 2007; Lairon, 2008a).

Un des facteurs déterminants de la variabilité de la triglycéridémie postprandiale reste l'alimentation et les nutriments qui la composent :

- Les glucides. Il est connu que l'addition de glucose à un repas lipidique augmente la lipémie postprandiale. Cette augmentation est encore plus marquée dans le cas du saccharose et plus encore dans le cas du fructose (Cohen & Berger, 1990).
- Les protéines. Une étude indique que la caséine diminue modérément la lipémie postprandiale (Westphal *et al.*, 2004).
- Les fibres alimentaires. Le son d'avoine peut diminuer sensiblement les chylomicrons sécrétés et la lipémie postprandiale, en perturbant la digestion et la solubilisation micellaire des lipides dans l'intestin (Cara *et al.*, 1992).
- La quantité et la nature des lipides alimentaires. Un repas riche en lipides induit une élévation transitoire du taux de TG plasmatique. Dans les conditions physiologiques, le pic de TG se situe entre 2 et 4 heures après le repas puis diminue aux valeurs de base entre 5 et 7 heures. Les données indiquent que certains acides gras saturés à longue chaîne augmentent la triglycéridémie postprandiale alors que les acides gras de la série n-3 la diminuent. Les acides gras mono-insaturés et poly-insaturés de la série n-6 diminuent également l'hypertriglycéridémie postprandiale mais de façon plus modérée (Lairon, 2008b).

Bien que la triglycéridémie postprandiale résulte en partie de la sécrétion des lipoprotéines intestinales, un des derniers facteurs encore souvent ignoré est l'efficacité du métabolisme intestinal. Peu d'études concernant l'impact de l'intestin dans ce phénomène ont été publiées à ce jour. Ceci s'explique par le fait que l'intestin a toujours été considéré comme une simple barrière passive capable d'absorber de grandes quantités de lipides alimentaires. Etant donné les rôles fondamentaux des AGLC dans la cellule, on conçoit en effet que leur biodisponibilité ne soit pas limitante. Le fait que l'excrétion fécale des lipides soit de l'ordre de 5 % chez

l'homme malgré de grandes variations de l'apport lipidique et que la stéatorrhée soit diagnostiquée dès que la perte excède 7% confirme l'efficacité de l'absorption intestinale des AGLC (Ross, 1993). Des données émergentes obtenues chez la souris indiquent que cette grande capacité d'absorption des lipides en régime hyperlipidique chronique, ne résulte pas uniquement d'une propriété innée de cet organe mais d'une réponse métabolique adaptative en fonction de la richesse en lipides de l'alimentation (Petit *et al.*, 2007). Cette adaptation permet la formation de chylomicrons bien dégradés dans la circulation sanguine. Une telle hypothèse suppose que l'entérocyte soit doté, d'une part d'un système de détection des lipides alimentaires, et d'autre part qu'il possède des protéines impliquées dans la synthèse des chylomicrons dont l'expression est très régulée par les lipides alimentaires.

Contrairement à une idée reçue, les aspects cellulaires et moléculaires de l'absorption intestinale des AGLC ne sont pas encore totalement élucidés. Durant ces 3 dernières décennies, plusieurs protéines présentant une très haute affinité pour les AGLC, les Lipid Binding Proteins (LBPs), ont été découvertes aussi bien au niveau membranaire que cytoplasmique des entérocytes. Bien que leurs fonctions exactes ne soient pas clarifiées l'abondance et la diversité de ces LBPs indiquent que le mécanisme d'absorption des AGLC est plus complexe que ce qui était initialement établi. De plus, des modifications de leur niveau d'expression intestinale sont susceptibles de retentir sur l'efficacité de l'absorption et pourraient donc avoir un impact sur la lipémie postprandiale, et plus généralement sur l'homéostasie des lipides de l'organisme. Cette hypothèse est supportée par le fait que la délétion de plusieurs de ces LBPs chez la souris a des impacts sur la triglycéridémie postprandiale (Tableau 1) (Niot *et al.*, 2009).

Si ces LBPs participent au mécanisme d'absorption et en particulier à la synthèse des chylomicrons, alors des inhibiteurs spécifiques pourraient constituer des pistes thérapeutiques contre les maladies cardiovasculaires et l'obésité. C'est pourquoi nous préciserons dans notre synthèse bibliographique, l'état de l'art concernant le rôle des LBPs dans les différentes étapes de l'absorption intestinale des lipides alimentaires.



**Tableau 1 : Impact de l'inactivation des LBP sur la triglycéridémie postprandiale (d'après (Niot *et al.*, 2009)).**

*CD36: Fatty Acid Transporter; I-FABP: Intestinal Fatty Acid Binding Protein; L-FABP: Liver Fatty Acid Binding Protein; MTP: Microsomal Triglyceride Transfer Protein; ApoB: Apolipoprotein B; SAR1b: Smad Anchor for Receptor Activation 2; KO: Knock-out; TG: Triglycérides;*

<b>Protéines</b>	<b>Triglycéridémie postprandiale</b>
<p><b>CD36</b> Souris KOCD36</p> <p>Patients déficients en CD36</p>	<p>Augmentation des TG et acides gras circulants Petits chylomicrons, mal dégradés au niveau sanguin</p> <p>Augmentation des TG et acides gras circulants Petits chylomicrons</p>
<p><b>I-FABP</b> Souris KOI-FABP</p> <p>Patients ayant un polymorphisme Ala54Thr</p>	<p>Hypertriglycéridémie chez les souris mâles seulement</p> <p>Hypertriglycéridémie postprandiale</p>
<p><b>L-FABP</b> Souris KOL-FABP</p>	<p>Diminution de la sécrétion lymphatique des TG</p>
<p><b>MTP</b> Souris KO MTP conditionnel au niveau intestinal</p> <p>Patients déficients en MTP</p>	<p>Apobétalipoprotéinémie</p> <p>Apobétalipoprotéinémie</p>
<p><b>ApoB</b> Souris ne produisant pas d'ApoB au niveau intestinal</p>	<p>Absence de sécrétion des chylomicrons Pas de modification des TG plasmatiques après 4 heures de jeûne</p>
<p><b>SAR1b</b> Patients ayant une mutation du gène <i>SARA2</i></p>	<p>Incapacité à produire des chylomicrons</p>

# **Synthèse bibliographique**

# Les lipides alimentaires

Une consommation excessive de lipides alimentaires contribue à l'épidémie d'obésité et aux dyslipidémies qui lui sont associées. Ce constat est dû au fait que ces nutriments présentent la plus forte densité énergétique et en même temps le plus faible effet satiétogène (Stubbs *et al.*, 2000). Au moins chez l'animal, la consommation d'un régime riche en lipides conduit rapidement à l'augmentation de la masse grasse (West & York, 1998). De plus, il vient d'être montré chez la souris qu'il existe une corrélation positive entre la quantité de lipides consommés et la masse corporelle (de Wit *et al.*, 2011). Cet effet a été retrouvé chez l'homme où l'augmentation de la quantité de lipides consommés est corrélée avec la prévalence de l'obésité (Bray *et al.*, 2004).

Les lipides sont des éléments essentiels de notre alimentation. Ils contribuent au bon fonctionnement de l'organisme et à son développement. Les lipides consommés sont représentés à 95% par les TG, 4,5% par les phospholipides (PL) et 0,5% par les stérols d'origine animale et végétale. Les AGLC sont les constituants principaux des TG.

Les acides gras constitutifs des TG sont classés en fonction (Figure 2):

- de la longueur de leur chaîne carbonée : les acides gras à chaîne courte (contenant moins de 8 atomes de carbone), les acides gras à chaîne moyenne (nombre d'atomes de carbone compris entre 8 et 14) et les acides gras à longue chaîne (AGLC) (contenant 16 atomes de carbone ou plus).
- de leur degré d'insaturation (nombre de doubles liaisons situées sur la chaîne carbonée). On distingue les acides gras saturés (aucune double liaison), les acides gras monoinsaturés (une double liaison) et les acides gras polyinsaturés (2 doubles liaisons et plus).

Parmi les AGLC, certains sont dit indispensables car ils ne sont pas synthétisés par l'organisme. C'est le cas de l'acide linoléique (C18 :2 n-6) et de l'acide linoléique (C18 :3 n-3). Ils sont respectivement les chefs de files de la série des acides gras (n-6) et (n-3), puisqu'ils sont les substrats des désaturases à l'origine de la synthèse des acides gras dits essentiels et de nombreux médiateurs lipidiques, en particulier les éicosanoïdes (prostaglandines, leucotriènes,...). L'Anses dans son rapport de 2010 a ajouté le (C22 :6 n-3) dans les acides gras indispensables du fait de sa faible conversion à partir de l'acide  $\alpha$ -linoléique.



## **1.1 Fonctions structurales et énergétiques**

Les lipides sont des constituants de toutes les membranes cellulaires. Ils contribuent à leur stabilité et leur fluidité (la membrane étant plus rigide quand la proportion d'acides gras saturés est plus importante).

Les lipides alimentaires constituent une source énergétique importante puisque ils sont les nutriments possédant la plus forte densité énergétique (9 kcal/g). De plus, les lipides constituent une réserve d'énergie, stockée au niveau du tissu adipeux. Le tissu adipeux peut accumuler les TG, soit à partir des glucides par la voie de la lipogenèse, soit à partir des AGLC issus des lipoprotéines riches en TG (chylomicrons, VLDL). Les adipocytes ont la capacité de proliférer et de se différencier tout au long de la vie, cette capacité participant au développement de la masse grasse. Les mécanismes moléculaires responsables de la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures ont été décryptés (Rosen & Spiegelman, 2000). Ces travaux ont permis de montrer que les AGLC exercent un rôle régulateur essentiel dans ce phénomène et, par voie de conséquence, ces travaux démontrent l'existence d'un lien entre le régime alimentaire et le développement de la masse adipeuse.

## **1.2 Fonctions dans la signalisation cellulaire**

Les acides gras sont des éléments essentiels des processus de signalisation cellulaire (Eyster, 2007). Etant que composants des phospholipides membranaires, ils conditionnent selon leur degré d'insaturation la fluidité membranaire et donc l'activité des protéines membranaires comme les récepteurs (aux hormones et autres) et les canaux ioniques. De plus, la nature des acides gras des radeaux lipidiques, appelés « rafts », détermine l'efficacité du recrutement des protéines impliquées dans la signalisation à ce niveau. Les acides gras sont aussi eux-mêmes des précurseurs des hormones et des substrats des voies de signalisation. De plus, ils participent à la régulation transcriptionnelle des gènes par leur capacité de liaison et d'activation des récepteurs nucléaires (*i.e.* les PPARs – Peroxisome-Activated Proliferator Receptors) (Grimaldi, 2001). Pour finir, ils sont également les ligands de certains récepteurs membranaires comme les G-protein-coupled receptors (GPCRs) qui déclenchent une signalisation cellulaire impliquée dans le « sensing » des lipides de l'organisme (Miyauchi *et al.*, 2010).

Les AGLC exercent donc de multiples fonctions cellulaires fondamentales qui indiquent que leur absorption doit être efficace.

# Absorption intestinale des lipides alimentaires

## 1 Les spécificités morphologiques et fonctionnelles de l'intestin grêle

L'intestin grêle possède une organisation morphologique spécifique qui lui confère une très forte capacité d'absorption et une grande plasticité lui permettant de s'adapter au régime alimentaire.

L'épithélium intestinal présente les caractéristiques suivantes :

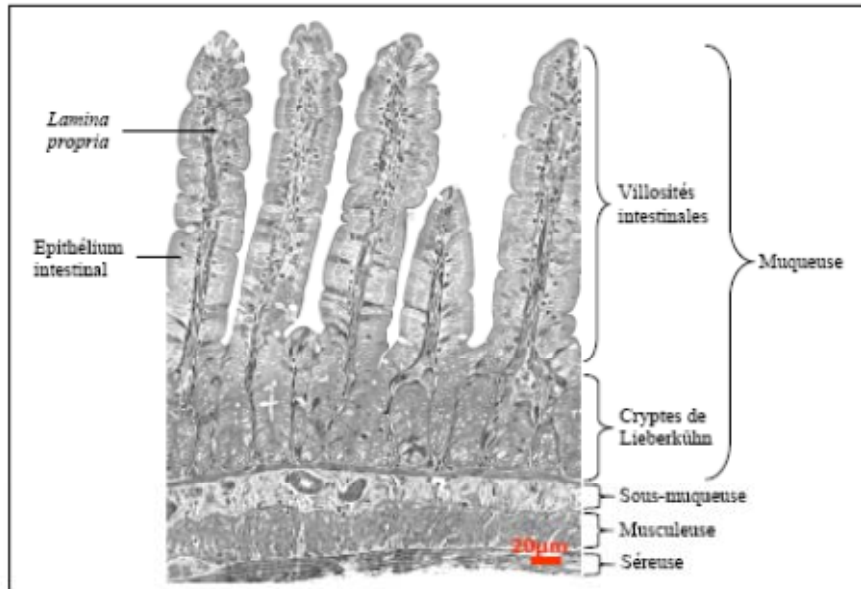
- Une anatomie complexe : une surface d'échange importante avec une organisation selon 2 axes : gastro-colique et crypto-villositaire.
- Plusieurs types cellulaires avec des spécialisations fonctionnelles différentes, en particulier des entérocytes, cellules absorbantes fortement polarisées avec une couche d'eau non agitée au niveau apical.
- Un renouvellement cellulaire intense et rapide.

### 1.1 Anatomie complexe de l'épithélium intestinal

- *Une surface d'échange importante*

L'absorption intestinale est favorisée par l'amplification considérable de la surface d'échange (environ 600 fois) grâce, d'une part à une longueur importante de l'intestin grêle replié en anses intestinales, et d'autre part aux valvules conniventes présentes chez l'Homme, et également aux villosités intestinales et aux microvillosités des entérocytes.

La paroi intestinale, de la lumière vers la séreuse, est constituée de plusieurs couches : la muqueuse, la sous-muqueuse et la musculuse (Figure 3). La muqueuse intestinale, qui est le siège de l'absorption des nutriments, comporte la lamina propria et l'épithélium. L'épithélium est une couche unistratifiée de cellules jointives, qui couvre la surface des villosités et des cryptes et qui est en contact direct avec la lumière intestinale.



**Figure 3 : Structure de la paroi intestinale.**

- **Organisation structurale selon 2 axes**

Tout le long de l'axe gastro-colique, la muqueuse de l'intestin grêle est constituée d'un épithélium simple organisé en 2 compartiments morphologiquement distincts comprenant de grandes évaginations formant des villosités, et des invaginations formant de petites cryptes (cryptes de Lieberkühn) (Figure 4).

Selon l'axe gastro-colique (axe horizontal), de l'estomac au colon, l'intestin grêle est hétérogène et constitué de trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Chaque partie est caractérisée par une expression génotypique particulière qui lui confère une spécialisation régionale de l'absorption des différents nutriments. Le duodénum, où se déversent les sécrétions biliaires et pancréatiques, est le site majeur de l'absorption des glucides. Le jéjunum, où l'expression de nombreuses protéines impliquées dans l'absorption des lipides est la plus élevée, apparaît comme le site préférentiel de leur absorption (Mariadason *et al.*, 2005). En revanche, l'iléon terminal, de par sa richesse en protéines impliquées dans le transport des sels biliaires, est la zone privilégiée de la réabsorption active de ces molécules.

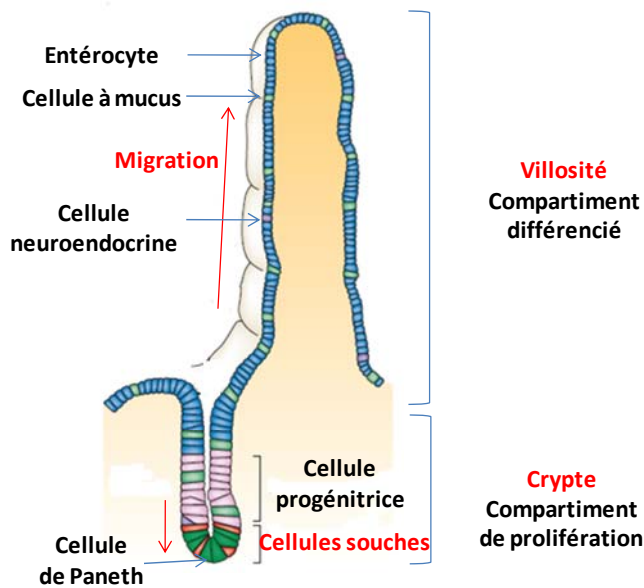


Figure 4 : Unité fonctionnelle de l'intestin grêle : l'axe crypto – villositaire (d'après (Crosnier *et al.*, 2006)).

## 1.2 Composition cellulaire de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est constitué d'une monocouche de différents types de cellules. Quatre types principaux de cellules différenciées sont décrits dans l'intestin : les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines (localisées au niveau des villosités) et les cellules de Paneth (localisées dans les cryptes) (Figure 5).

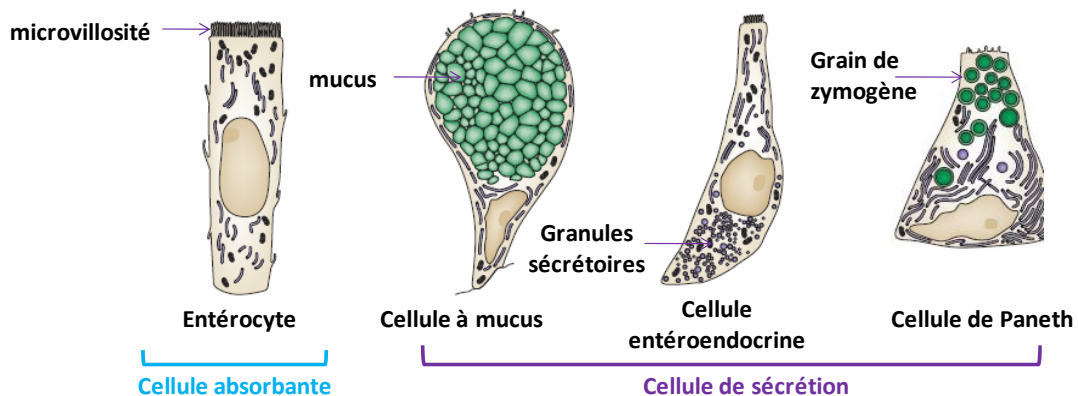


Figure 5 : Les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal (d'après (Crosnier *et al.*, 2006)).

- *Les entérocytes*

Les entérocytes, qui représentent environ 90% de la population cellulaire totale, assurent la fonction d'absorption de l'intestin. Les entérocytes sont hautement polarisés. La membrane



apicale de l'entérocyte se distingue de la membrane basolatérale par l'existence des microvillosités qui augmentent la surface d'échange. De plus, l'existence de ces microvillosités en plus du glycocalix (réseau de glycoprotéines) et du mucus participe à la formation de la couche d'eau non agitée qui, comme nous le verrons plus tard, conditionne le mode de captage des AGLC (Schoeller *et al.*, 1995). Ces différences entre les 2 pôles cellulaires, qui n'existent pas dans les autres types cellulaires caractérisés par un métabolisme important des AGLC (adipocytes, cardiomyocytes, etc.), est une spécificité qui permet à l'intestin de faire face à des quantités élevées, très variables et intermittentes de lipides au cours de la journée.

- ***Les cellules caliciformes***

Les cellules caliciformes ou cellules à mucus qui représentent environ 9% des cellules totales, sécrètent par exocytose du mucus à la surface de l'épithélium. Comme le montre la Figure 5, elles sont caractérisées par la présence de larges granules à mucus dans le cytoplasme (Karam, 1999). Le mucus est nécessaire à la protection de la muqueuse et facilite le transit du chyme le long de l'intestin. De plus, le mucus participe à la formation de la couche d'eau non agitée. La proportion des cellules caliciformes augmente le long de l'axe gastro-colique.

- ***Les cellules entéroendocrines***

Les cellules entéroendocrines sont dispersées dans tout l'épithélium mais sont différentes selon l'axe gastro-colique et produisent des hormones qui régulent la fonction digestive et également le métabolisme énergétique (Tableau 2). Il est intéressant de noter que la sécrétion de ces hormones est stimulée en particulier par les lipides alimentaires *via* des récepteurs aux acides gras de la famille des GPCRs (Ichimura *et al.*, 2009; Miyauchi *et al.*, 2010). Ces hormones jouent un rôle dans les phénomènes de satiété (Cholécystokinine (CCK), Glucagon like peptide 1 (GLP-1), Peptide YY (PYY)) (Chaudhri *et al.*, 2008), de régulation du poids corporel (Gastric Inhibitory Polypeptide, GIP) (Miyawaki *et al.*, 2002), de prolifération cellulaire et de la lipémie postprandiale (Glucagon like peptide 2, GLP-2) (Rowland & Brubaker, 2008; Hsieh *et al.*, 2009). L'inactivation du facteur de transcription neurogenine 3, à l'origine de l'absence de cellules entéroendocrines chez les souris, conduit à une augmentation de la perte fécale en lipides (Mellitzer *et al.*, 2010). Cet article démontre que les cellules entéroendocrines sont capables de réguler les capacités d'absorption intestinale des lipides.

**Tableau 2 : Exemple d'hormones sécrétées par les cellules entéroendocrines intestinales (Miyawaki *et al.*, 2002; Chaudhri *et al.*, 2008; Rowland & Brubaker, 2008).**

Hormones intestinales	Site de sécrétion	Rôles physiologiques
<b>Cholécystokinine (CCK)</b>	Cellule I (intestin proximal)	↑ Satiété Sécrétions digestives
<b>Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP)</b>	Cellule K (intestin proximal)	Incrétine, régulation du poids corporel
<b>Glucagon like peptide 2 (GLP2)</b>	Cellule L (intestin distal)	↑ Prolifération cellulaire Lipémie postprandiale
<b>Glucagon like peptide 1 (GLP1)</b>	Cellule L (intestin distal)	Incrétine, ↑ Satiété ↑ Satiété ↑ Dépense énergétique
<b>Peptide YY</b>	Cellule L (intestin distal)	↑ Satiété, ↑ Satiété ↑ Dépense énergétique

- ***Les cellules de Paneth***

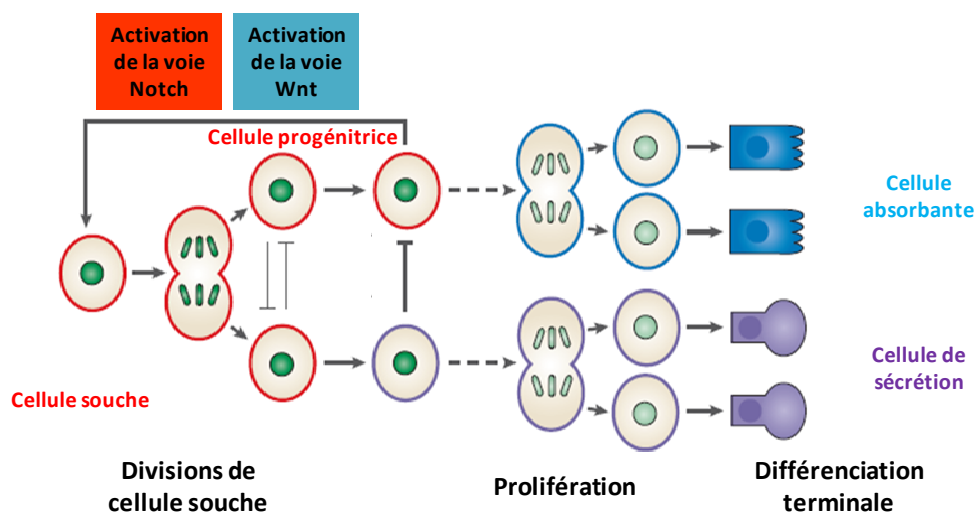
Situées au fond des cryptes, les cellules de Paneth sont impliquées dans la défense vis-à-vis des pathogènes présents dans la lumière intestinale, par la sécrétion des peptides antimicrobiens comme le lysozyme, le tumor necrosis facteur  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (impliqué dans les réponses inflammatoires) et les cryptidines (actions défensives) (Crosnier *et al.*, 2006).

### **1.3 Renouvellement intense de l'épithélium intestinal**

Grâce à son renouvellement cellulaire très rapide, l'intestin grêle, au contraire des autres tissus, se caractérise par une grande plasticité lui permettant une extraordinaire capacité d'adaptation. En effet, le renouvellement total de la muqueuse a lieu tous les 3 jours chez la souris et tous les 5 jours chez l'Homme ce qui correspond au remplacement quotidien d'environ 17 milliards de cellules (Potten *et al.*, 1997).

Les cellules qui composent l'épithélium représentent un système très dynamique en perpétuel renouvellement. Elles sont régénérées tout au long de la vie. Dès la naissance, dans le compartiment cryptique se trouvent les cellules souches, les cellules progénitrices et les cellules prolifératives. Suite à une division asymétrique, une cellule souche donne naissance à une nouvelle cellule souche et à une cellule progénitrice fille destinée à se différencier. Ce processus est contrôlé par la coopération de plusieurs voies de signalisations cellulaires, à savoir l'activation de la voie Wnt et Notch (Figure 6) (Crosnier *et al.*, 2006). Au cours de la différenciation cellulaire, les cellules souches intestinales donnent naissance aux cellules

épithéliales différenciées: les cellules entéroendocrines, les cellules à mucus et les entérocytes, qui se différencient au fur et à mesure qu'elles migrent vers le haut des villosités, et les cellules de Paneth qui migrent vers le fond de la crypte. Ainsi les cellules retrouvées dans les deux tiers inférieurs de la crypte sont indifférenciées et hautement prolifératives. Dans le tiers supérieur de la crypte, les entérocytes cessent de proliférer et entament leur différenciation qui se poursuit le long de la villosité. Ce n'est que dans la partie supérieure des villosités que l'on trouve des entérocytes pleinement différenciés et donc fonctionnels vis-à-vis de l'absorption des nutriments. C'est pour cette raison que l'on considère que l'absorption des lipides alimentaires s'effectue dans les 2/3 supérieurs des villosités caractérisés par la forte expression de plusieurs gènes impliqués dans l'absorption des lipides comme les enzymes de la ré-estérification en TG et les apolipoprotéines (Mariadason *et al.*, 2005). L'homéostasie de l'épithélium intestinal est donc assurée grâce à un équilibre entre la production des cellules différenciées, leur migration le long de la villosité vers la lumière intestinale, et leur élimination par apoptose.



**Figure 6 : Diagramme de différenciation cellulaire impliquée dans le maintien de l'épithélium intestinal (d'après (Crosnier *et al.*, 2006)).**

Il a été montré que les lipides alimentaires sont des agents promoteurs de la prolifération des cellules intestinales (Buts *et al.*, 1990). En effet, après un jeûne prolongé chez le rat, si la réalimentation lipidique conduit en 48 heures à 36 % de restauration de la masse de la muqueuse intestinale, les protéines et les glucides n'induisent respectivement que 26 à 20 % de restauration (Buts *et al.*, 1990). Ces données ont été confirmées par les travaux du Laboratoire, qui ont démontré qu'un régime hyperlipidique conduit à une augmentation de

l'activité proliférative de l'intestin qui se traduit par une plus forte surface d'absorption (Petit *et al.*, 2007). Ce renouvellement cellulaire rapide prédispose donc l'intestin à une grande plasticité et donc à une forte capacité d'adaptation.

## **2 Digestion des lipides**

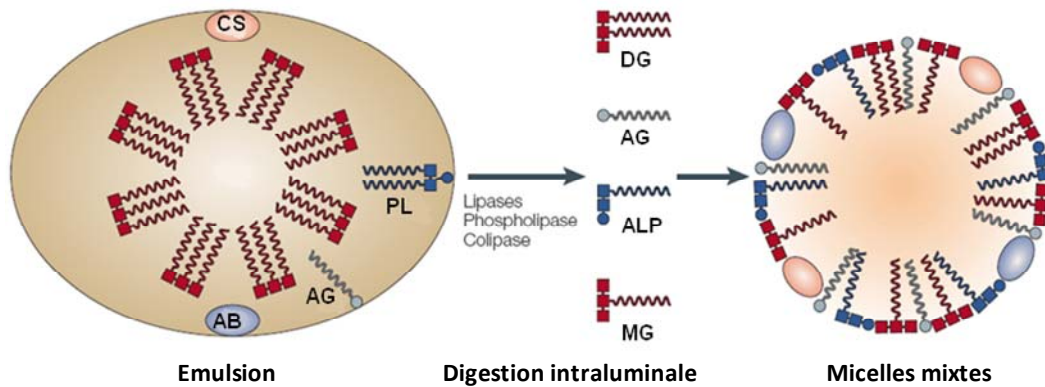
L'alimentation apporte de 30 à 40% de l'énergie sous forme des lipides, principalement des TG. A cause du caractère hydrophobe des TG, leur digestion et leur absorption des lipides est un processus complexe. Il nécessite la digestion intraluminale, le captage des produits de digestion à travers la membrane entérocytaire, la re-synthèse des lipides au sein de l'entérocyte, l'assemblage et la sécrétion des chylomicrons dans le système lymphatique puis dans la circulation sanguine.

Les lipides alimentaires, principalement des TG, subissent plusieurs transformations physicochimiques avant leur arrivée au niveau de la bordure en brosse des entérocytes. Les TG sont hydrolysés en AGLC et en 2-monoglycérides.

Au niveau de l'estomac, la dispersion des lipides commence avec le brassage mécanique, qui aboutit à la formation de gouttelettes lipidiques de 0.5  $\mu\text{m}$  de diamètre. A ce niveau, les TG sont hydrolysés partiellement en sn-1,2-diacylglycérol et en acides gras libres par la lipase gastrique (Moreau *et al.*, 1988) dont l'activité ne représente que 10 % à 30 % de l'activité lipasique chez l'Homme. Cette enzyme agit préférentiellement à pH acide (3 à 6) sur des TG à chaîne moyenne, et en absence de sels biliaires.

Au niveau proximal de l'intestin, les acides gras contenus dans le chyme gastrique stimulent les sécrétions biliaires et pancréatiques *via* l'action de la CCK. Les TG et les produits d'hydrolyse pré-duodénale sont insolubles donc nécessitent une solubilisation par les sels biliaires et les phospholipides issus de la bile pour favoriser les réactions lipolytiques. La suite de l'hydrolyse est accomplie par la lipase pancréatique issue du pancréas exocrine dont la sécrétion est stimulée par la CCK. Cette enzyme catalyse principalement l'hydrolyse des TG en position sn-1 et sn-3 afin de libérer deux acides gras libres et un 2-monoglycéride. Elle fonctionne en présence d'une colipase, elle aussi sécrétée par le pancréas exocrine. La liaison de la colipase au domaine carboxyle terminal de la lipase pancréatique découvre le site actif de l'enzyme. Le complexe colipase-sels biliaires permet l'ancrage de la lipase au niveau de l'interface des micelles, donc l'accès de la lipase à son substrat, les TG. L'ensemble de ce processus conduit, avec les sels biliaires et les produits de la digestion, à la formation de

micelles mixtes de 5 à 25 nm de diamètre (Figure 7). Cette solubilisation micellaire est une étape indispensable dans l'absorption optimale des lipides puisqu'elle facilite le transport des lipides dans la phase aqueuse intraluminaire et au travers de la couche d'eau non agitée jusqu'à la membrane apicale des entérocytes.

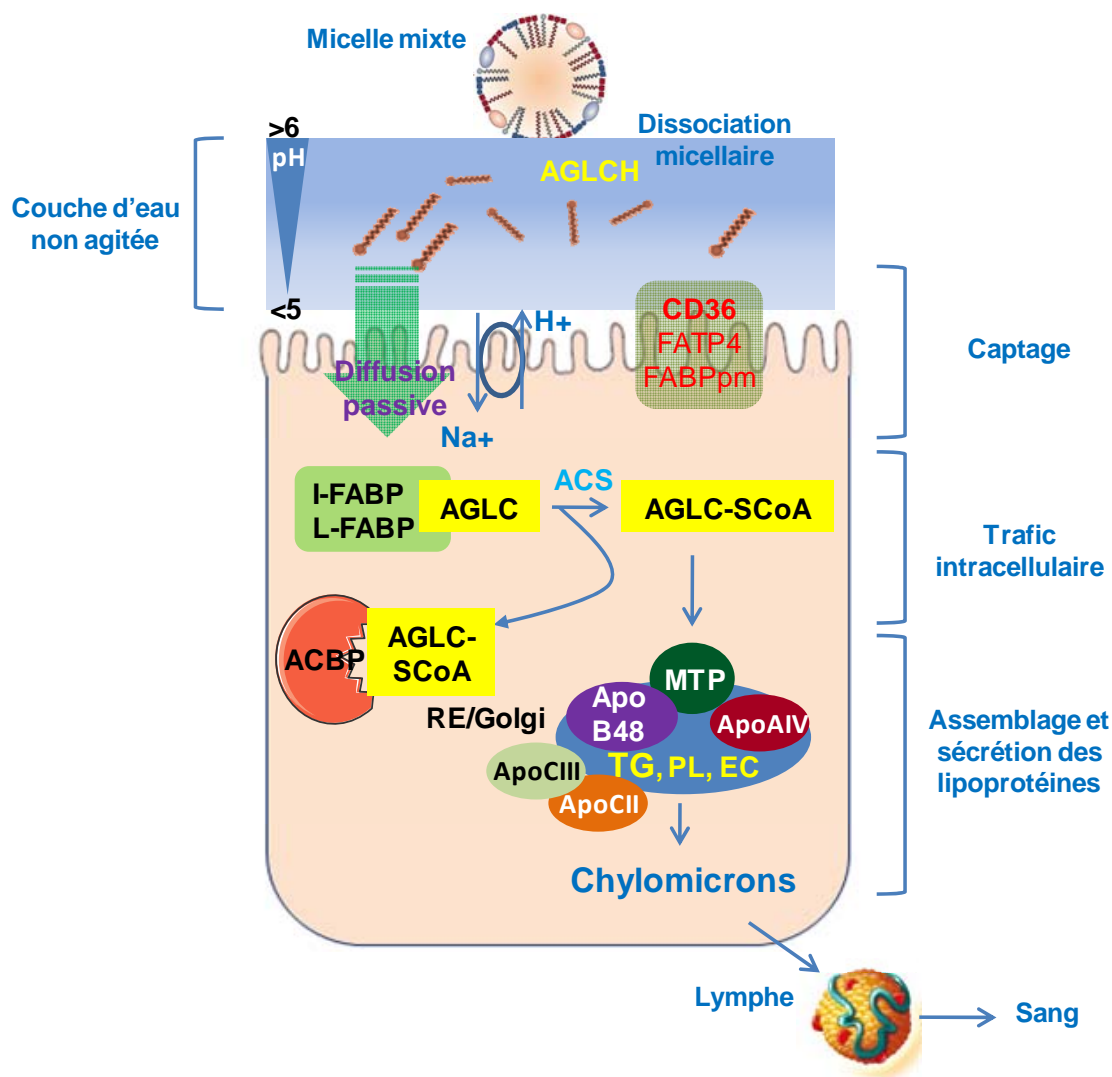


**Figure 7 : Formation des micelles mixtes dans la lumière intestinale (d'après (Shi & Burn, 2004)).**

### 3 Absorption intestinale des lipides

Pour des raisons didactiques, l'absorption des AGLC sera divisée en 3 principales étapes (Figure 8) :

- Le captage transmembranaire
- Le métabolisme intracellulaire : le trafic intracellulaire et la ré-estérification en TG
- L'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines



**Figure 8 : Principales étapes de l'absorption intestinale des acides gras à longue chaîne.**

*AGLCH*: AGLC protoné, *CD36*: Fatty acid transporter ; *FATP4*: fatty acid transport protein 4; *FABPpm*: plasma membrane fatty acid binding protein; *I-FABP*: intestinal fatty acid binding protein; *L-FABP*: liver fatty acid binding protein; *ACS*: AcyCoA synthétase; *AGLC-SCoA*: Acyl CoA; *ACBP*: AcylCoA binding protein ; *MTP* : microsomal triglycerid transfer protein ; *ApoB48* : apolipoprotéine B48 ; *ApoAIV* : apolipoprotéine AIV ; *ApoCII* : apolipoprotéine CII ; *ApoCIII* : apolipoprotéine CIII; *TG* : triglycérides ; *PL* : phospholipides ; *EC* : ester de cholestérol ; *RE* : réticulum endoplasmique.

### 3.1 Captage transmembranaire des AGLC

La première étape de l'absorption des lipides est le passage à travers la membrane apicale des produits de la digestion qui sont majoritairement des AGLC. Brièvement, le mécanisme de captage des AGLC a été décortiqué en utilisant des modèles de membranes artificielles (vésicules de phospholipides). Il comprend 3 étapes : l'adsorption des AGLC à la surface de la couche externe de la membrane, le mouvement de « flip-flop » correspondant au transfert

de l'acide gras du feuillet externe de la bicouche phospholipidique vers le feuillet interne, et enfin la désorption depuis la couche interne de la membrane vers l'intérieur de la vésicule. L'étape la plus controversée est celle du « flip-flop » (Zakim, 2000). En effet, la question posée est la suivante : s'agit-il d'une diffusion passive ou d'un transport facilité nécessitant l'intervention de protéines membranaires ?

Au niveau de l'entérocyte, la synthèse des données de la littérature montre que la diffusion simple est probablement prépondérante pendant la phase postprandiale et qu'une diffusion facilitée pourrait s'avérer efficace en situation interprandiale quand la quantité d'acides gras est faible. Si les données de la littérature font l'objet de nombreuses controverses au niveau de cette étape, c'est en particulier parce que les conclusions obtenues au niveau d'autres types cellulaires ne peuvent pas être transférées directement au niveau de l'entérocyte car celui-ci présente des caractéristiques spécifiques (Bonen *et al.*, 2007; Kampf & Kleinfeld, 2007).

La présence de la couche d'eau non agitée au niveau de la bordure en brosse des entérocytes entraîne une chute progressive du pH qui va conduire à la protonation des AGLC lorsque le pH local devient inférieur au pKa de la molécule ( $< 5$ ). Ce phénomène est à l'origine de la dissociation micellaire qui libère les AGLC protonés à proximité immédiate de la surface de la bordure en brosse des entérocytes (Shiau *et al.*, 1985). En ce qui concerne le transfert au travers de la bicouche lipidique des AGLC, il a été montré que sa durée est de l'ordre de 70 ms à 10 s, selon le type d'acide gras (Kleinfeld *et al.*, 1997). Ces données générales soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'étape de « flip-flop » pourrait constituer une étape limitante de l'absorption intestinale des AGLC. Or les travaux de Kamp et collaborateurs ont démontré qu'en fait la translocation au travers de la bicouche phospholipidique est dépendante de la nature ionisée ou non de l'AGLC (Kamp *et al.*, 1993; Kamp *et al.*, 1995). En effet, la durée du transfert transmembranaire est inférieure à 20 ms quelle que soit la longueur de chaîne de l'acide gras protoné alors que le transfert des acides gras ionisés est au minimum de l'ordre de la seconde (Kamp *et al.*, 1993). Le fait que le blocage des pompes à protons par l'amiloride entraîne une diminution dose dépendante du captage des AGLC par des vésicules constituées par des membranes de la bordure en brosse (Schoeller *et al.*, 1995), confirme l'importance que joue ce microenvironnement acide dans l'absorption intestinale des lipides. Un tel système de transport à forte capacité mais à faible affinité est particulièrement bien adapté à la fonction intestinale. En effet, il reste efficace durant les périodes de fortes charges en lipides qui suivent les repas. Ce système éviterait ainsi que le captage des AGLC ne devienne un facteur limitant dans l'absorption intestinale des lipides après un repas, c'est

d'ailleurs ce qui a été démontré pour des concentrations en AGLC de l'ordre du molaire (Chow & Hollander, 1979). Cependant, pour des concentrations plus faibles de l'ordre du micro-molaire, la diffusion facilitée pourrait s'avérer plus efficace, du fait d'une plus forte affinité, ce qui est le cas en situation interprandiale (acides gras libres et issus de la desquamation des cellules intestinales). En accord avec cette hypothèse, il a été montré sur jéjunum isolé de rat que pour des concentrations d'AGLC faibles, comprises entre 21 et 1260  $\mu\text{M}$ , la diffusion facilitée est prépondérante. De plus, au niveau de la lignée de type entérocytaire Caco-2, un transport saturable et une compétition entre des AGLC radio-marqués supportent également l'existence d'un transport médié par des protéines parallèlement à la simple diffusion (Trotter *et al.*, 1996). Ces dernières observations ont été à l'origine de l'identification progressive de plusieurs transporteurs potentiels au niveau des entérocytes. Ce sont des LBPs, présentant une haute affinité pour les AGLC : la Plasma membrane Fatty Acid Binding Protein (FABPpm), la Fatty Acid Transport Protein 4 (FATP4), et le Fatty acid transporter (CD36).

### **3.1.1 FABPpm**

La FABPpm est une protéine de 43kDa, localisée dans les tissus à fort métabolisme lipidique comme le cœur, le foie et l'intestin grêle. Au niveau intestinal, elle est exprimée aussi bien dans les bordures en brosse que dans les membranes cellulaires latérales, et aussi bien dans les cryptes que les villosités (Stremmel *et al.*, 1985). Cette protéine a été proposée comme un transporteur des AGLC puisqu'elle présente une forte affinité pour les AGLC (constante de dissociation  $K_d = 80 \text{ nM}$ ) (Stremmel, 1988). Le fait que l'utilisation de l'anticorps anti-FABPpm sur des explants jéjunaux réduise le captage des acides gras montre qu'elle pourrait jouer un rôle dans cette étape membranaire (Stremmel, 1988). Il est à noter que cette inhibition n'est obtenue qu'avec de très fortes concentrations d'anticorps. De plus, la FABPpm est aussi présente dans la mitochondrie puisqu'elle est l'homologue de la mitochondrial aspartate-aminotransférase (mASpAT) qui catalyse les réactions de transamination reliant le cycle de l'urée et à celui du cycle de Krebs (Stump *et al.*, 1993). Ces données montrent que des études plus approfondies sont nécessaires pour déterminer si la FABPpm a un rôle physiologique dans l'absorption intestinale des lipides. L'invalidation de ce gène n'a toujours pas été réalisée à ce jour.



### 3.1.2 FATP4

La FATP-4 est une protéine membranaire de 63kDa, appartenant à la famille des FATPs qui comporte 5 FATPs murines et 6 FATPs humaines et dont chaque membre a une expression tissulaire spécifique (Doerge & Stahl, 2006). Au niveau de l'intestin grêle, on trouve principalement la FATP4 (Stahl *et al.*, 1999), qui est également exprimée en moindre quantité dans le cerveau, le rein, le foie et la peau (Doerge & Stahl, 2006). Au niveau intestinal, la FATP4 a été initialement trouvée au niveau des membranes microvillositaires des entérocytes (Stahl *et al.*, 1999), mais des études plus récentes indiquent que la FATP4 serait majoritairement présente dans le réticulum endoplasmique (RE) de ces cellules (Garcia-Martinez *et al.*, 2005; Milger *et al.*, 2006). Il a été montré que son invalidation dans des entérocytes primaires isolés diminue le captage des AGLC (Stahl *et al.*, 1999). Ces données sont retrouvées au niveau des entérocytes isolés de souris présentant une délétion de la FATP4 sur un seul allèle conduisant à une chute de 48% de la protéine, qui est associée à une diminution de 40% du captage d'AGLC (Gimeno *et al.*, 2003).

Ces données démontrent que la FATP4 participe au captage des AGLC au niveau entérocytaire. Cependant l'essentiel de la protéine FATP4 est cytosolique, elle ne comporte qu'un seul domaine transmembranaire et une seule et courte séquence extracellulaire du côté N-terminal qui ne contient pas de domaine de liaison aux acides gras (Stahl *et al.*, 2001; Gertow *et al.*, 2004). La FATP4 présente des homologies de séquences avec les Acyl-CoA Synthétase (ACS), et comme toutes les FATPs, une activité long et very long chaîne ACS (Hall *et al.*, 2005). Cette protéine est maintenant considérée comme une ACS spécifique des membranes entérocytaires (plasmique et réticulum endoplasmique), qui activerait les AGLC en Acyl-CoA créant un gradient favorable à leur entrée (Milger *et al.*, 2006). Bien que favorisant le captage des AGLC, l'ensemble de ces données indique que la FATP4 n'est pas donc un transporteur membranaire des AGLC. Cette donnée est confirmée par l'utilisation d'inhibiteur de la FATP4 qui n'ont pas d'effet *in vivo* sur l'efficacité du captage intestinal des AGLC chez la souris (Blackburn *et al.*, 2006). L'effet de la déficience en FATP4 n'a pu être étudié que récemment au niveau intestinal. En effet, les souris dont le gène codant pour la FATP4 a été invalidé n'étant pas viables du fait d'un défaut périnatal au niveau de la peau, une restauration du transgène FATP4 a dû être réalisée au niveau des kératinocytes à l'aide d'un promoteur spécifique de ces cellules. Ces souris présentent la même efficacité d'absorption intestinale des lipides alimentaires (captage et excrétion fécale) bien que la déficience en FATP4 ne soit pas compensée par la surexpression d'autres LBPs. On note

cependant une accumulation légère de TG au niveau des entérocytes quand ces souris déficientes en FATP4 sont nourries avec un régime hyperlipidique (Shim *et al.*, 2009). Ce résultat souligne son rôle dans le « processing » des TG qui s'effectue principalement au niveau du RE. Le fait que le polymorphisme Gly-209-Ser sur le gène de la FATP4 observé chez l'Homme se traduise par une réduction de l'hypertriglycémie est en accord avec cette hypothèse (Gertow *et al.*, 2004).

### 3.1.3 CD36

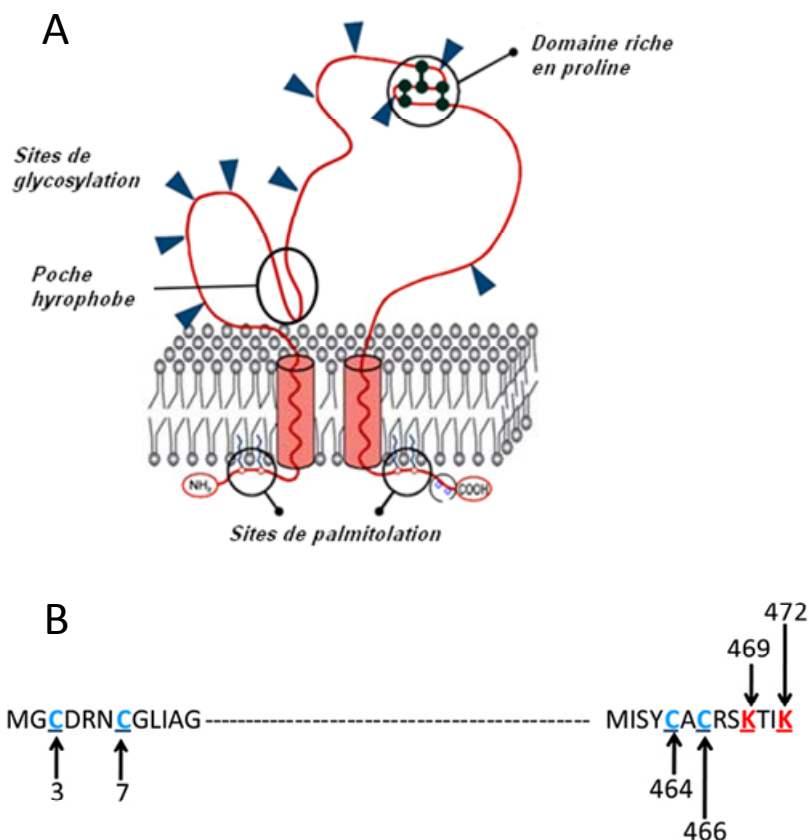
Le CD36, appelé également Fatty Acid Transporter et capable de lier les AGLC, est fortement exprimé au niveau intestinal (Poirier *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2001; Lobo *et al.*, 2001). Elle appartient à la famille des Scavenger Receptor de classe B comme le SR-BI qui lie plus spécifiquement le cholestérol et les micelles mixtes et qui est également exprimé dans cet organe (Labonte *et al.*, 2007; Beaslas *et al.*, 2009). Le CD36 est aussi exprimé dans plusieurs types cellulaires. Il a été identifié à la surface des cellules où le métabolisme des lipides est très intense tels que les adipocytes (Abumrad *et al.*, 1993), les cellules musculaires et cardiaques (Van Nieuwenhoven *et al.*, 1995), les macrophages (Tontonoz & Nagy, 1999), les cellules endothéliales (Rader & Dugi, 2000), les pneumocytes (Guthmann *et al.*, 1999), et les entérocytes (Poirier *et al.*, 1996; Lobo *et al.*, 2001), ainsi que dans des cellules sensorielles de la rétine, des bourgeons du goût (Fukuwatari *et al.*, 1997; Laugerette *et al.*, 2005) et des neurones (Migrenne *et al.*, 2010).

- **CD36, une protéine multifonctionnelle**

Le CD36 est une glycoprotéine de 472 acides aminés. Il a une structure en épingle à cheveux avec un grand domaine extracellulaire et deux courts domaines transmembranaires, situés du côté N-terminal et du côté C-terminal (Figure 9) assurant l'ancrage de la protéine dans la membrane plasmique.

On note également deux extrémités cytoplasmiques, respectivement de 6 acides aminés en N-terminal (acides aminés 1-6) et 9 acides aminés en C-terminal (acides aminés 463-472), contenant plusieurs résidus d'acides aminés susceptibles d'être modifiés de manière post-traductionnelle. Il a été démontré que le CD36 est palmitoylé au niveau des cystéines 3, 7, 464 et 466 (Tao *et al.*, 1996). La palmitoylation du CD36 pourrait être à l'origine de son ciblage dans les micro-domaines particuliers de la membrane, les cavéoles, où il a été co-localisé avec la Cavéoline-1 (Lisanti *et al.*, 1994). En effet, les études réalisées sur des cellules H4IIE

transfectées avec des CD36 mutés au niveau C-terminal ont confirmé un rôle important de cette zone dans sa localisation membranaire, et dans son recrutement au niveau de micro-domaines. Ce phénomène pourrait favoriser son rôle dans le captage des acides gras (Eyre *et al.*, 2007). De plus, il a été démontré que la partie C-terminale du CD36 peut interagir avec les Src kinases, Fyn, Lyn et Yes, ce qui explique son implication dans la signalisation cellulaire (Huang *et al.*, 1991). Pour finir les résidus lysine en position 469 et 472 peuvent être « ubiquitinés » constituant un signal à l'origine de la dégradation par la voie du protéasome de la protéine (Smith *et al.*, 2008). Ces différentes modifications post-transcriptionnelles du CD36 montrent la complexité de la régulation de la fonction de cette protéine.



**Figure 9 : Structure prédictive du CD36 (d'après (Su & Abumrad, 2009)).**

*A : CD36 est une glycoprotéine de 472 acides aminés sous forme d'épingle à cheveux, localisée au niveau de la membrane plasmique. Sa structure prédictive comporte un domaine extracellulaire possédant de multiples sites de glycosylation, un domaine riche en proline et une poche hydrophobe, deux domaines cytoplasmiques courts.*

*B : Site d'ubiquitination (en rouge) dans la partie C-terminale et sites de palmitoylation (en bleu) dans les parties N et C terminales.*

Le domaine extracellulaire (acides aminés 31-439) du CD36 contient 10 sites potentiels de glycosylation. La taille de la protéine dépend du degré de glycosylation (de 53 à 88 kDa) qui est variable selon l'origine tissulaire de la protéine. Ce domaine constitue une poche hydrophobe où le CD36 peut accueillir une large variété de ligands. En effet, le CD36 lie les AGLC au niveau de la poche hydrophobe (acides aminés 127-279). Il est intéressant de souligner qu'il est capable de lier les AGLC saturés ou non, ionisés, avec une affinité de l'ordre du nanomolaire, et une stœchiométrie de 3 mol d'acide gras pour 1 mol de CD36 (Ibrahimi *et al.*, 1996). Mais le CD36 lie également le collagène, les phospholipides anioniques, les LDL oxydées, au niveau des résidus d'acides aminés 155 à 183, le *Plasmodium falciparum* (acides aminés 146-154), la thrombospondine (acides aminés 93 à 120) et la  $\beta$ -amyloïde. La variété des ligands explique les multiples fonctions du CD36 (pour revue voir (Silverstein & Febbraio, 2009; Su & Abumrad, 2009; Martin *et al.*, 2011)).

En effet, dans les cellules endothéliales microvasculaires, en liant la thrombospondine-1, le CD36 joue un rôle de régulateur négatif de l'angiogénèse. Comme récepteur de matrice extracellulaire en liant le collagène, le CD36 agit comme une molécule d'adhésion qui module l'aggrégation plaquettaire. Dans les macrophages et les cellules dendritiques, à travers sa fonction de scavenger récepteur qui reconnaît spécifiquement les phospholipides anioniques et les lipoprotéines oxydées, il participe à l'internalisation des corps apoptotiques, de certaines bactéries et pathogènes fongiques et des LDL oxydées. Ces différentes fonctions expliquent son implication dans des pathologies comme l'athérosclérose, l'inflammation, la maladie d'Alzheimer et la Malaria (Silverstein & Febbraio, 2009).

Dans le contexte de l'absorption intestinale des lipides alimentaires, nous allons nous focaliser sur sa capacité à lier les AGLC qui, selon le tissu considéré, lui confère soit une fonction de transporteur efficace soit de récepteur de ces molécules.

- ***CD36, un transporteur efficace des AGLC au niveau du muscle et du tissu adipeux***

Les données de la littérature s'accordent à démontrer depuis de nombreuses années un rôle significatif du CD36 dans le captage des AGLC au moins au niveau du muscle et du tissu adipeux (Ibrahimi & Abumrad, 2002). Tout d'abord, son rôle de transporteur des AGLC a été prouvé *in vitro* sur des cellules fibroblastiques Ob17PY où sa surexpression s'accompagne d'un captage accru des AGLC et de l'incorporation préférentielle de ces molécules dans les phospholipides (Ibrahimi *et al.*, 1996), mais également dans des pré-adipocytes en culture où le transport des AGLC est diminué suite à l'inactivation du CD36 par la stratégie ARN anti-

sens (Sfeir *et al.*, 1999). L'importance physiologique du CD36 dans le captage cellulaire des AGLC a été éprouvée *in vivo* grâce aux modèles de souris transgéniques. En effet, la surexpression spécifique du CD36 dans le muscle induit une augmentation du captage musculaire des AGLC et de leur oxydation pendant la contraction musculaire ce qui conduit à une diminution du taux des lipides plasmatiques (Ibrahimi *et al.*, 1999). A l'inverse, le captage des AGLC par le cœur, le muscle squelettique et le tissu adipeux, est diminué chez les souris dont le gène codant pour le CD36 a été invalidé (KOCD36) (Coburn *et al.*, 2000). Chez ces souris le défaut global du captage cellulaire des AGLC se traduit au niveau sanguin par une élévation des AGLC mais également par une hypertriglycémie (TG des VLDL).

Des données émergentes indiquent que l'insulino-résistance pourrait être secondaire à une hyper-oxydation des lipides au niveau musculaire à l'origine d'un stress oxydatif (Koonen *et al.*, 2010). Selon cette hypothèse une stimulation du CD36 musculaire, en favorisant le captage, pourrait conditionner la sensibilité à l'insuline. En effet, le défaut de captage musculaire des AGLC conduit à une réduction de la glycémie, de l'insulinémie et à une plus forte sensibilité à l'insuline des souris KOCD36 (Ibrahimi *et al.*, 1999; Hajri *et al.*, 2002). De plus, les modalités de la régulation musculaire du CD36 soutiennent également son implication dans le catabolisme des lipides. En effet, on constate une induction du CD36 dans des conditions s'accompagnant d'une oxydation d'AGLC accrue telles que le diabète (Greenwalt *et al.*, 1995), les régimes hyperlipidiques (Greenwalt *et al.*, 1995) ou la contraction musculaire induite par une stimulation électrique (Bonen *et al.*, 1999). Outre ces régulations d'origine transcriptionnelle à long terme, il existe également une régulation post-transcriptionnelle rapide qui permet au muscle de s'adapter à son environnement. En effet, comme dans le cas du transporteur au glucose Glut4, le recrutement membranaire de la protéine CD36, concomitant à une augmentation du captage des AGLC, a été observé dans le muscle strié squelettique et cardiaque (Luiken *et al.*, 2002) quand le besoin en AGLC est augmenté, par exemple en cas de contraction musculaire. Pour finir, son rôle dans le métabolisme des lipides est également soutenu par le fait qu'il est un gène cible des PPARs, récepteurs nucléaires activés par les AGLC. Le CD36 est régulé de manière tissu-spécifique par les PPARs *via* un des Peroxisome Proliferator-Responsive Elements (PPRE) identifiés sur son promoteur (Sato *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2007).

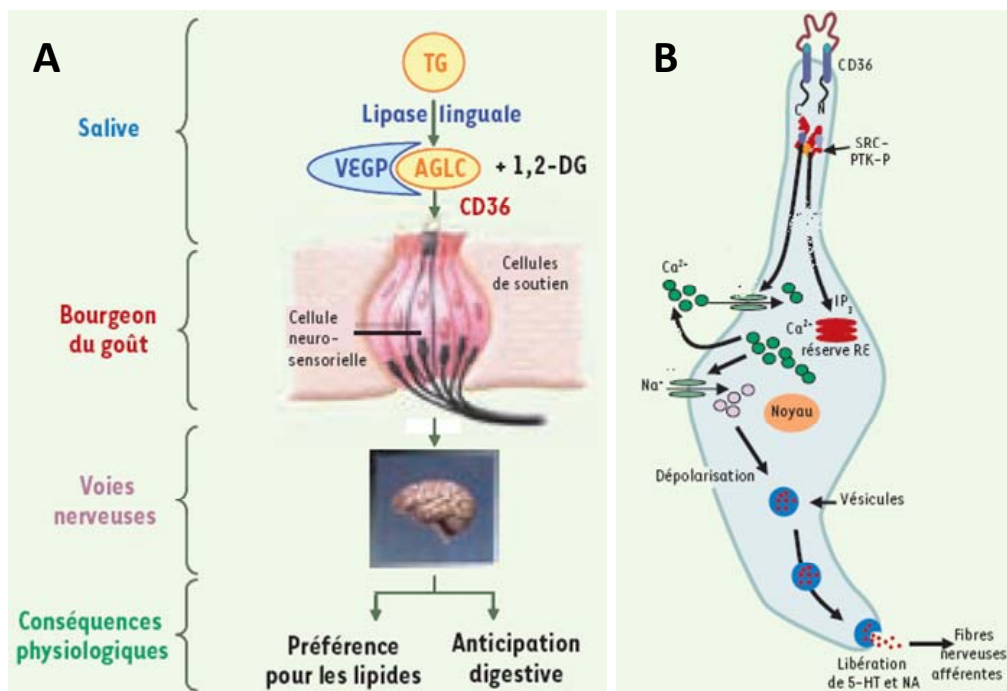
Chez l'Homme, la déficience totale du CD36 concerne 3-6% de la population africaine (Love-Gregory *et al.*, 2008) ou asiatique (Yamashita *et al.*, 2007). Cette déficience s'accompagne comme chez le rongeur d'un défaut de l'utilisation des AGLC puisqu'un grand nombre de ces

sujets présente une hypertrophie cardiaque (Nozaki *et al.*, 1999), une hypertriglycémie (Masuda *et al.*, 2009) et une modification de la sensibilité à l'insuline (Miyaoaka *et al.*, 2001). Il a été également rapporté que certaines mutations rares du gène CD36 sont aussi associées à diverses pathologies telles que l'insulino-résistance (Miyaoaka *et al.*, 2001; Kuwasako *et al.*, 2003), le syndrome métabolique (diminution de la fréquence) (Love-Gregory *et al.*, 2008), des anomalies du métabolisme des lipides et du glucose (Yamashita *et al.*, 2007) et les maladies cardiovasculaires associées au diabète de type 2 (AG libres circulants plus élevés) (Ma *et al.*, 2004). Enfin, les données sont contradictoires en ce qui concerne l'association de la mutation du CD36 avec l'obésité, puisque chez des adolescents européens, il y a une corrélation positive entre plusieurs polymorphismes de CD36 et l'obésité (Bokor *et al.*, 2010) alors que cette corrélation n'est pas retrouvée dans une plus grande population (Choquet *et al.*, 2011). L'ensemble de ces données souligne le rôle crucial du CD36 dans l'utilisation des lipides par l'organisme.

- ***CD36, un lipido-récepteur au niveau lingual***

Au niveau de l'épithélium lingual, le CD36 se trouve principalement au pôle apical de certaines cellules neurosensorielles des bourgeons du goût des papilles gustatives chez le rongeur (Fukuwatari *et al.*, 1997; Laugerette *et al.*, 2005) et l'Homme (Simons *et al.*, 2010). Des études réalisées au Laboratoire sur la souris démontrent que le CD36 joue un rôle de lipido-récepteur qui module la perception orale des lipides (Laugerette *et al.*, 2006) (Figure 10A). En effet des études de comportement de double choix ont démontré que les souris déficientes en CD36 perdent leur préférence spontanée pour les solutions enrichies en AGLC sans pour autant affecter leur attirance vers les solutions sucrées et leur aversion pour les solutions amères (Laugerette *et al.*, 2005). De plus, chez les souris sauvages où l'œsophage a été ligaturé, 5 min après un dépôt oral d'AGLC, on observe une augmentation du flux pancréato-biliaire et du contenu en protéines du suc pancréatique qui favoriseraient la digestion et l'absorption des lipides alimentaires. En revanche, cette anticipation digestive n'existe plus chez les souris KOCD36. Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces effets CD36 dépendants ont été décortiqués chez la souris. Lors de la prise alimentaire contenant des lipides, les TG sont hydrolysés en AGLC au moins chez le rongeur, puisque les glandes de von Ebner, situées à proximité immédiate des papilles gustatives, sécrètent la lipase linguale capable de libérer des AGLC. De plus ces glandes sécrètent également une lipocaline, la von Ebner's gland protein (VEGP) qui permet la liaison et la solubilisation des AGLC dans la

salive. Le CD36 lingual interagit avec les AGLC ce qui déclenche une cascade de signalisation cellulaire *via* les Src kinases (El-Yassimi *et al.*, 2008) (Figure 10B). Cette signalisation conduit à une augmentation massive de la concentration intracellulaire de calcium qui entraîne l'exocytose de la sérotonine et de la noradrénaline, des neurotransmetteurs activant les nerfs gustatifs (nerf VIII et IX) et informant le système nerveux central au niveau du noyau du tractus solitaire. Ces données indiquent qu'il existerait une sixième modalité gustative : le goût du gras et que le CD36 est un senseur oral des AGLC (Laugerette *et al.*, 2007).



**Figure 10 : Implication du CD36 dans la perception orale des lipides alimentaires.**

*A* : La détection orale des AGLC via le CD36 informe le système nerveux central qui module le comportement alimentaire et la sécrétion digestive (Laugerette *et al.*, 2006).

*B* : Le mécanisme d'action du récepteur CD36 au niveau apical des cellules gustative (Khan *et al.*, 2008).

TG : Triglycérides ; VEGP : Von Ebner's Gland Protein ; 1,2 DG : 1,2 Diglycérides ; CD36 : Fatty Acid Transporter ; Src-PTK-P: Src Protein Tyrosine Kinase phosphorylé; IP3: inositol 1, 4,5-triphosphate; 5-HT: Sérotonine; NA: Noradrénaline.

Ce rôle de lipido-récepteur a également été montré au niveau cérébral, où le CD36 joue un rôle important dans le «sensing neuronal» des acides gras ne nécessitant pas leur métabolisme intracellulaire (Migrenne *et al.*, 2010). L'inhibition pharmacologique du CD36

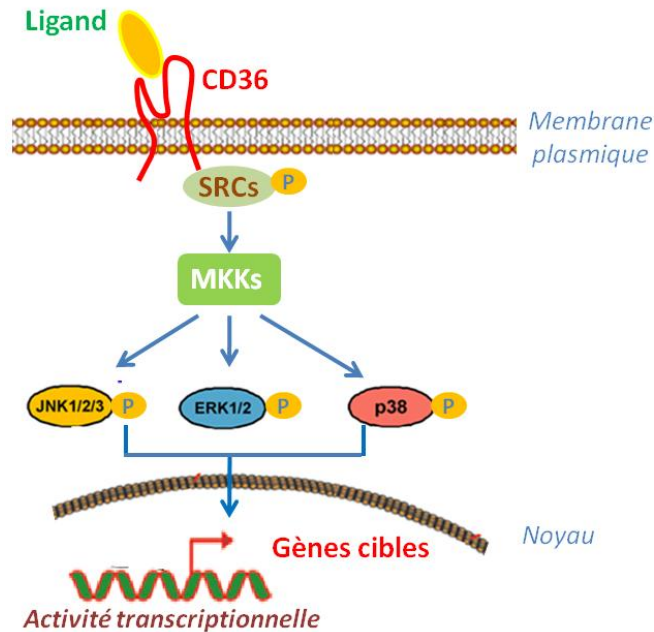
réduit de 45% les effets excitateurs et les effets inhibiteurs de l'acide oléique sur des neurones hypothalamiques ventromédiaux.

- ***La signalisation déclenchée par la protéine CD36***

Ces études au niveau lingual viennent confirmer de nombreuses autres études démontrant que la protéine CD36 joue un rôle de récepteur suite à son interaction avec d'autres ligands spécifiques et déclenche une cascade de signalisation cellulaire. La signalisation CD36 dépendante a été prouvée dans différents contextes cellulaires, en plus des cellules gustatives, comme au niveau des macrophages sous l'effet des LDL oxydés ou au niveau des cellules endothéliales microvasculaires sous l'effet des thrombospondines (Silverstein & Febbraio, 2009). Les détails moléculaires de la signalisation déclenchée par les ligands du CD36, du recrutement et de l'activation des complexes de signalisation à la cible cellulaire, ne sont pas complètement compris. Mais dans tous les cas, les signaux intracellulaires déclenchés par les ligands du CD36 semblent impliquer le recrutement et l'activation des Src kinases et Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) et moduler la réponse cellulaire *via* des facteurs de transcription et leurs gènes cibles (Figure 11).

L'identification des cascades de signalisation CD36 dépendantes est importante dans la compréhension de l'homéostasie lipidique de l'organisme. La décortication précise de ces cascades dans les contextes cellulaires spécifiques avec des ligands spécifiques pourrait ouvrir des pistes de développement de traitements de maladies métaboliques potentiellement CD36-dépendantes.





**Figure 11 : Cascade de signalisation déclenchée par la liaison du CD36 avec son ligand.**

L'interaction entre CD36 et son ligand déclenche une cascade de signalisation cellulaire via l'activation des kinases comme la famille Src kinases puis les MAP kinase kinases (MKK) et les MAPKs (JNK1/2/3, ERK1/2 et p38). Ce signal modulerait la réponse cellulaire via des facteurs de transcription et leurs gènes cibles.

- **Implication du CD36 dans l'absorption intestinale des lipides**

Au niveau intestinal, son rôle n'est pas encore élucidé et fait l'objet de nombreux débats. Le CD36 est localisé principalement au niveau des membranes des bordures en brosse des deux tiers supérieurs des villosités dans la partie proximale de l'intestin grêle, zone préférentielle de l'absorption des lipides (Poirier *et al.*, 1996; Lobo *et al.*, 2001). L'expression intestinale du CD36 est étroitement corrélée avec la teneur en lipides du régime. Alors qu'un régime pauvre en lipides diminue son expression (Sukhotnik *et al.*, 2001), un régime hyperlipidique chronique l'induit fortement (Poirier *et al.*, 1996). Cependant, à la différence de l'adipocyte et du myocyte, la contribution significative de CD36 dans le captage entérocytaire des AGLC est mise en doute par l'existence de la couche d'eau non agitée au niveau apical de l'entérocyte «*in situ*» qui favorise la protonation des AGLC et leur diffusion. En effet, selon les auteurs, la délétion du gène du CD36 diminue le captage des AGLC par les entérocytes isolés (dépourvus de couche d'eau non agitée) (Nassir *et al.*, 2007), ou n'a pas d'effet (Drover *et al.*, 2005). Quoiqu'il en soit, ces altérations potentielles ne se traduisent pas par une diminution de l'absorption nette des lipides puisque les souris KOCD36 n'excrètent pas plus

de lipides dans les fèces en régime normolipidique (Nauli *et al.*, 2006; Nassir *et al.*, 2007; Drover *et al.*, 2008).

Cependant, le CD36 participe au mécanisme d'absorption des lipides alimentaires puisque la déficience en CD36 réduit considérablement la sécrétion lymphatique des chylomicrons en augmentant la production/sécrétion de plus petites lipoprotéines (Nauli *et al.*, 2006). Ce défaut de sécrétions des chylomicrons pourrait expliquer l'hypertriglycéridémie postprandiale observée en cas de déficience en CD36 chez l'Homme (Masuda *et al.*, 2009) et la souris (Drover *et al.*, 2005). Ce résultat, qui peut paraître paradoxal, peut s'expliquer par la dégradation et la clairance moins efficace au niveau sanguin de ce type de chylomicrons par la LPL (Drover *et al.*, 2005; Masuda *et al.*, 2009). De plus, certains auteurs suggèrent que le taux d'acide gras circulant élevé en cas d'inactivation du gène de CD36 (résultant du captage défaillant des acides gras des tissus périphériques) pourrait inhiber l'activité de la LPL (Goudriaan *et al.*, 2005).

Ces données démontrent que le CD36 joue un rôle très important dans le « processing » intestinal des lipides alimentaires mais sa fonction exacte reste à découvrir.

*L'ensemble de ces données, et en particulier celles provenant des animaux transgéniques, démontrent que contrairement à ce qui a été initialement proposé, l'intestin grêle ne nécessite probablement pas de LBPs membranaires pour le captage des AGLC en période d'absorption. Cette spécificité intestinale est probablement liée à l'existence d'un microenvironnement membranaire facilitant un captage non saturable des AGLC. Ce constat conduit à la recherche d'autres fonctions pour ces LBPs.*

### **3.2 Le transport cytosolique des AGLC**

Puisqu'ils sont hydrophobes, les AGLC doivent être pris en charge une fois dans le cytoplasme par des protéines cytosoliques appartenant à la famille des Fatty Acid Binding Proteins (FABPs). Ce sont des polypeptides de 14-15 kDa liant les AGLC avec une forte affinité de manière covalente et réversible. Dans l'intestin grêle, deux FABPs sont exprimées simultanément et en abondance : l'intestinal FABP (I-FABP) et la liver FABP (L-FABP). Des études comparatives de ces deux FABPs suggèrent qu'elles possèdent des spécialités fonctionnelles différentes (

Tableau 3) (Niot *et al.*, 2009).

**Tableau 3 : Caractéristiques fonctionnelles de la I-FABP et de la L-FABP.**

Caractéristiques	I-FABP	L-FABP
<b>Localisation</b>	Intestin grêle	Foie, intestin grêle et rein
<b>Distribution intestinale des ARNm</b> (Poirier <i>et al.</i> , 1997)		
<b>Spécificité de liaison</b>	AGLC	AGLC, hème, acides biliaires, acyl-CoA, éicosanoïdes, carcinogènes, xénobiotiques
<b>Nombre de sites de liaison</b> (Furuhashi & Hotamisligil, 2008)		
<b>Mécanisme de transfert des AGLC</b>	Collisionnel	Diffusion aqueuse
<b>Régulateurs principaux</b>	Fibrates, peptide YY, Epidermal Growth Factor	AGLC, fibrates, acide rétinoïque
<b>Formation des vésicules de transfert des préchylomicrons (PCTV)</b>	–	Bourgeonnement des PCTV à partir du RE
<b>Effet de la délétion totale chez la souris</b>	Gain de poids, hypertriglycéridémie, hyperinsulinémie	Rétention entérocytaire des TG, diminution de la sécrétion des chylomicrons après une charge en lipides

En plus de leur spécificité de localisation le long de l'axe cephalo-caudal, de leur liaison avec les AGLC, et de leur mécanisme de régulation, l'hypothèse de deux fonctions distinctes des deux FABPs est étayée par la mise en évidence de deux mécanismes différents de transfert d'acides gras. En effet pour la I-FABP, le transfert requiert une interaction collisionnelle avec la bicouche phospholipidique, que ce soit pour l'acquisition des AGLC ou leur transfert, alors

que l'échange s'effectue par une diffusion aqueuse pour la L-FABP. Cette donnée suggère que la I-FABP pourrait être impliquée dans un transport vectoriel des AGLC vers leur site de ré-esterification, le RE. De plus, les découvertes génétiques (mutations chez l'Homme et transgénèse ou mutagenèse dirigée chez l'animal) ont permis de confirmer l'existence de 2 fonctions distinctes. En effet, la substitution d'une seule base dans le codon 54 de la I-FABP, une thréonine à la place d'une alanine (A54T), est associée à une hypertriglycémie et une insulino-résistance chez les indiens Pima (Baier *et al.*, 1995). Cette mutation, responsable de l'augmentation de deux fois de l'affinité de la I-FABP pour les AGLC, stimule la synthèse des TG et la sécrétion des chylomicrons dans les cultures organo-typiques humaines (Levy *et al.*, 2001). Ces données indiquent que la modification des propriétés de liaison de la I-FABP peut conduire à des altérations des capacités d'absorption, qui pourraient être liées à des altérations dans le ciblage des AGLC vers le RE, site de réesterification des TG. Paradoxalement, les souris mâles invalidées pour la I-FABP présentent les mêmes caractéristiques que les sujets porteurs du polymorphisme A54T, à savoir le gain de poids, l'hyperinsulinémie et l'hypertriglycémie (Vassileva *et al.*, 2000). De plus, des travaux récents du groupe du Dr. Levy montrent qu'une surexpression de la I-FABP dans les cellules Caco-2 conduit à une diminution de la synthèse et de la sécrétion des lipoprotéines contenant de l'ApoB48 (Levy *et al.*, 2009). Même si ces données ne sont toujours pas expliquées l'ensemble de ces résultats montre que la I-FABP n'est pas indispensable à l'absorption des lipides mais qu'elle est susceptible d'intervenir dans le métabolisme des lipoprotéines intestinales et l'homéostasie énergétique.

En ce qui concerne la L-FABP, son invalidation ne conduit pas à des modifications drastiques de l'absorption intestinale des AGLC en situation de régime normolipidique (Newberry *et al.*, 2003; Newberry *et al.*, 2006). En revanche, chez les souris déficientes en L-FABP soumises à une charge lipidique, on observe une rétention entérocytaire des TG accompagnée d'une diminution de sécrétion des lipoprotéines en comparaison aux souris sauvages (Newberry *et al.*, 2006). Ces données suggèrent que la L-FABP faciliterait la synthèse et la sécrétion des chylomicrons. En accord avec cette idée, il a été récemment démontré que la L-FABP est indispensable à la formation des vésicules de transport de préchylomicrons à partir des membranes du RE vers l'appareil de golgi (Neeli *et al.*, 2007).

L'ensemble des données indiquent que les fonctions physiologiques des deux FABP sont redondantes mais qu'il existe des spécificités qui restent à élucider.

### **3.3 La ré-estérification des AGLC en TG**

Les AGLC une fois transférés vers le RE, sont tout d'abord activés en Acy-CoA par une acyl-CoA synthétase avant d'être re-estérifiés en TG. Dans l'entérocyte, la synthèse des TG peut se faire selon deux voies métaboliques distinctes : la voie du monoacylglycérol spécifique de ce tissu et la voie de l' $\alpha$ -glycérophosphate, également trouvée dans le foie. En période postprandiale, la voie du monoacylglycérol est mise en jeu par l'action successive des enzymes Monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) et Diacylglycerol acyltransferase (DGAT), contribuant à ~80% de TG destinés à la formation des chylomicrons.

#### **3.3.1 MGAT - Monoacylglycerol acyltransferase**

La MGAT catalyse la première étape de la ré-synthèse des TG dans les deux voies biochimiques en agissant préférentiellement sur le sn-2 Monoacylglycérol et en produisant le 1,2 Diacylglycérol (DG). Il existe trois isoformes de MGAT (1, 2, 3) et seules les MGAT2 et 3 sont exprimées dans l'intestin (Cao *et al.*, 2003). La MGAT2 est localisée au niveau du RE et son expression est maximale dans la partie proximale de l'intestin. Son expression et son activité sont induites en régime hyperlipidique (Cao *et al.*, 2004). En revanche, la MGAT3 est exprimée dans la partie distale de l'intestin et n'est pas régulée par les lipides alimentaires.

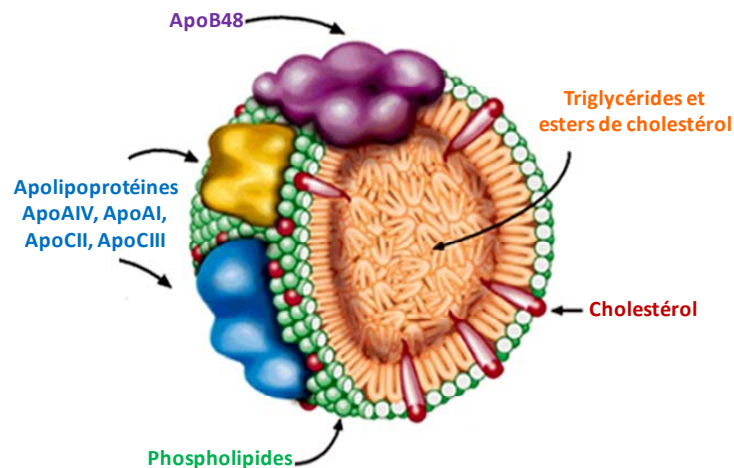
#### **3.3.2 DGAT - Diacylglycerol acyltransferase**

La DGAT catalyse la dernière étape de la synthèse des TG à partir du sn-1,2-DG et d'un acyl-CoA. Il existe deux iso-formes de DGAT (DGAT1, 2) qui ne partagent ni homologie de séquence, ni de structure. Elles sont présentes au niveau intestinal, la DGAT1 étant la plus exprimée. Au niveau de cet organe, l'activité de la DGAT1 est prépondérante puisque les souris déficientes ont une diminution de 85% à 90% de l'activité di-acyltransférase (Smith *et al.*, 2000). L'expression de la DGAT1 est également majoritaire chez l'Homme (Hiramine & Tanabe, 2011). L'inactivation du gène de la DGAT1 chez la souris n'a pas d'effet en régime normolipidique mais conduit à une accumulation de TG au sein des entérocytes et à une plus faible sécrétion de chylomicrons suite à une charge lipidique (Buhman *et al.*, 2002). Ces données montrent que, bien qu'ayant la même activité biochimique, la DGAT2 ne peut pas compenser l'absence de DGAT1 dans le mécanisme d'absorption intestinale des lipides. La différence de localisation cellulaire des deux DGAT peut expliquer ce phénomène. En effet, à la différence de la DGAT1 orientée du côté de la lumière du RE, la majorité de la protéine DGAT2 est retrouvée du côté cytosolique. Ces données suggèrent que ces deux enzymes n'ont probablement pas tout à fait les mêmes fonctions au niveau du métabolisme des TG. En

effet, la DGAT1 serait responsable de la formation de TG dans la lumière du RE et donc destinés immédiatement à la formation des chylomicrons, alors que la DGAT2 synthétiserait des TG dans le cytoplasme qui fourniraient un stockage intracellulaire (Niot *et al.*, 2009). Ces hypothèses pourront être vérifiées *in vivo* quand des souris invalidées en DGAT2 spécifiquement au niveau intestinal seront disponibles puisque son invalidation totale est létale chez la souris (Stone *et al.*, 2004).

### 3.4 Formation des chylomicrons

En période postprandiale, l'intestin utilise les TG ré-estérifiés, le cholestérol, les esters de cholestérol, et les phospholipides pour synthétiser et sécréter des chylomicrons. Les chylomicrons sont des particules légères ( $d < 1.0006$  g/ml), et de taille hétérogène (de diamètre entre 80-1200nm) (Figure 12).



**Figure 12 : Structure d'un chylomicron.**

*Le chylomicron comporte un cœur hydrophobe central composé de plus de 90% de TG et des esters de cholestérol, entouré d'une surface hydrophile constituée de phospholipides, de cholestérol non estérifié et d'une molécule d'Apolipoprotéine B48 (ApoB48) et d'autres apolipoprotéines telles que : ApoAIV, ApoAI, ApoCII, ApoCIII.*

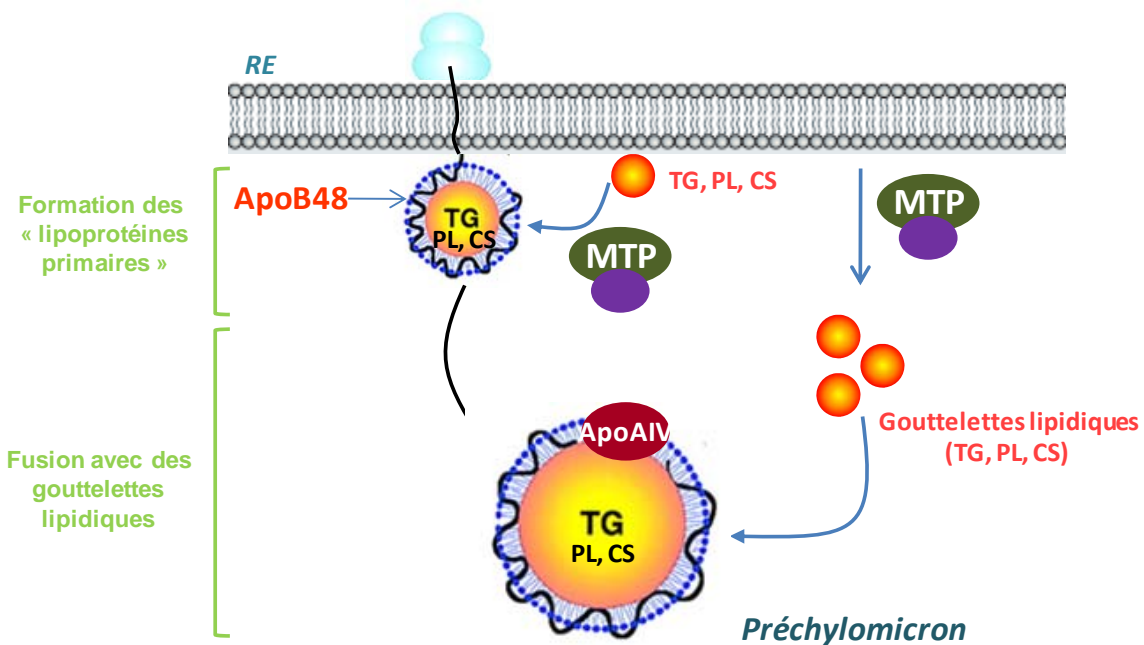
La synthèse des chylomicrons se déroule en plusieurs étapes. Elle débute au niveau RE avec l'assemblage des préchylomicrons, puis ces particules sont transférées vers l'appareil de Golgi pour leur maturation avant d'être sécrétées dans la lymphe.

#### 3.4.1 Assemblage des préchylomicrons : caractéristique unique des entérocytes

Même si les données ont souvent été transposées du foie vers l'intestin, les auteurs s'accordent à dire que les précurseurs des chylomicrons sont formés par un mécanisme en 2

étapes indépendantes au niveau du RE (Cartwright & Higgins, 2001; Hussain *et al.*, 2005; Mansbach & Gorelick, 2007) (Figure 13):

- La première étape est la production des "lipoprotéines primaires" au niveau du RE rugueux. Ce sont des particules de haute densité contenant de l'ApoB48, de l'ApoAIV, des phospholipides, du cholestérol, et une petite quantité de TG transloqués par la Microsomal Transfert Triglyceride Protein (MTP).
- La deuxième étape est la fusion de ces particules avec des gouttelettes riches en TG et en esters de cholestérol dépourvues d'apolipoprotéines synthétisées indépendamment dans le RE lisse. Cette fusion conduit à la formation des préchylomicrons dans la lumière du RE.



**Figure 13 : Mécanisme de l'assemblage des préchylomicrons.**

*L'assemblage des préchylomicrons débute par l'association initiale de l'ApoB48 en cours de traduction avec des phospholipides, du cholestérol et des TG transférés par la MTP dans le RE rugueux en produisant de petites particules très denses. L'expansion du cœur lipidique de ces particules se fait par l'acquisition rapide des gouttelettes lipidiques transloquées dans la lumière RE par la MTP.*

*TG : triglycérides ; PL : phospholipides ; CS: ester de cholestérol ; MTP : microsomal triglyceride transfer protein ; ApoB48 : apolipoprotéine B48 ; ApoAIV : apolipoprotéine AIV ; RE : réticulum endoplasmique.*

Les deux protéines limitantes de ce mécanisme sont l'ApoB48 et la MTP.

### 3.4.1.1 L'Apolipoprotéine B48

L'ApoB48 correspond à la forme tronquée de l'ApoB100, et ces deux isoformes circulent dans le plasma des mammifères. L'ApoB48 est nécessaire à la production de chylomicrons qui est dominante en période postprandiale. Alors que l'ApoB100 est nécessaire à la production des VLDL par le foie, qui sont des LRT prépondérantes en période interprandiale. Ces deux protéines sont codées par le même gène *APOB*.

- **Le gène et la structure de l'ApoB**

Le gène *APOB* est principalement exprimé dans les hépatocytes, les entérocytes et faiblement dans le cœur. Le gène *APOB* est essentiel au développement embryonnaire puisque son invalidation chez la souris est létale au stade embryonnaire (Farese *et al.*, 1995). Les souris hétérozygotes présentent également une forte mortalité intra-utérine avec des anomalies du système nerveux central. Les survivants présentent les caractéristiques d'hypobétalipoprotéïnémie (faible concentration plasmatique en ApoB et en cholestérol). Chez l'Homme le rôle majeur de l'ApoB est illustré par la mutation du gène *APOB* (Di Leo *et al.*, 2008) qui conduit à l'hypobétalipoprotéïnémie familiale à l'état homozygote, caractérisée par le même phénotype que les souris déficientes en *APOB*. Les sujets hétérozygotes possédant une ApoB tronquée même plus courte que l'ApoB48, n'ont pas de modification des capacités d'absorption des lipides ce qui suggère qu'un seul allèle de l'ApoB48 est suffisant pour assurer normalement l'absorption intestinale des lipides.

L'ApoB100, composée de 4536 acides aminés soit une masse moléculaire de 517-550 kDa, possède une structure contenant 5 domaines :  $\beta\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 2$ , et  $\alpha 3$  (Segrest *et al.*, 2001). L'ApoB48, composée de 2152 acides aminés avec environ 250 kDa, correspondant à 48% de la partie N-terminale de l'ApoB100, ne possède que le domaine  $\beta\alpha 1$ ,  $\beta 1$ , et une partie du domaine de l' $\alpha 2$  (Figure 14).

Le domaine  $\beta\alpha 1$  globulaire, riche en ponts disulfures constituerait la zone d'interaction avec la MTP et formerait une poche triangulaire liant les lipides (Segrest *et al.*, 2001). Bien que le mécanisme exact responsable de l'acquisition initiale des lipides sur l'ApoB100 ne soit pas totalement élucidé, la MTP et 25% de la partie N-terminale de l'ApoB100 sont suffisantes pour former une petite particule contenant des lipides neutres (Davidson & Shelness, 2000). A la différence de l'ApoB48, l'ApoB100 possède un domaine de liaison avec le LDL récepteur, localisé dans domaine  $\beta 2$  de la partie C-terminale qui va conditionner la clairance sanguine des lipoprotéines qui les portent.



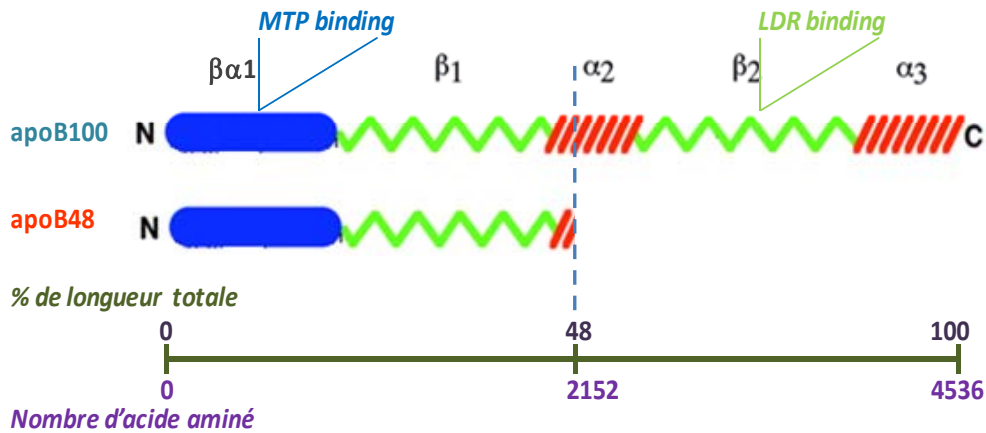


Figure 14 : La structure protéique de l'ApoB100 et de l'ApoB48 (d'après (Davidson & Shelness, 2000)).

MTP : microsomal transfer triglyceride protein; LDR: LDL receptor.

- **L'ARNm ApoB48 : résultat de réaction d'editing de l'ARNm ApoB**

L'ARNm ApoB48 est le résultat d'une modification post-transcriptionnelle de l'ARNm ApoB. Il s'agit d'une désamination spécifique d'une cytidine en uracile (C-en-U) au niveau du nucléotide 6666 de l'ARNm ApoB produisant un codon stop prématuré donc la synthèse de la protéine ApoB48 (Figure 15).

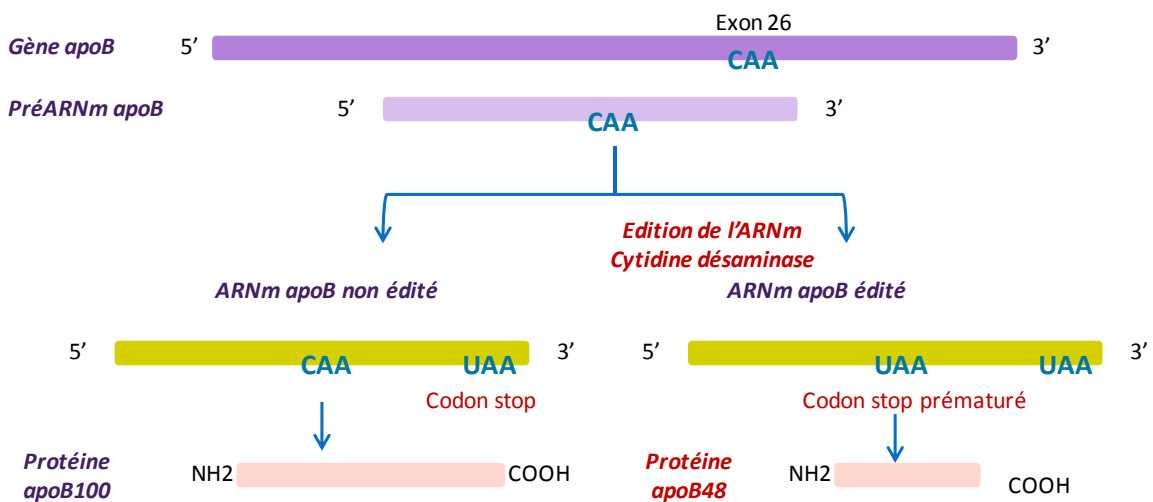
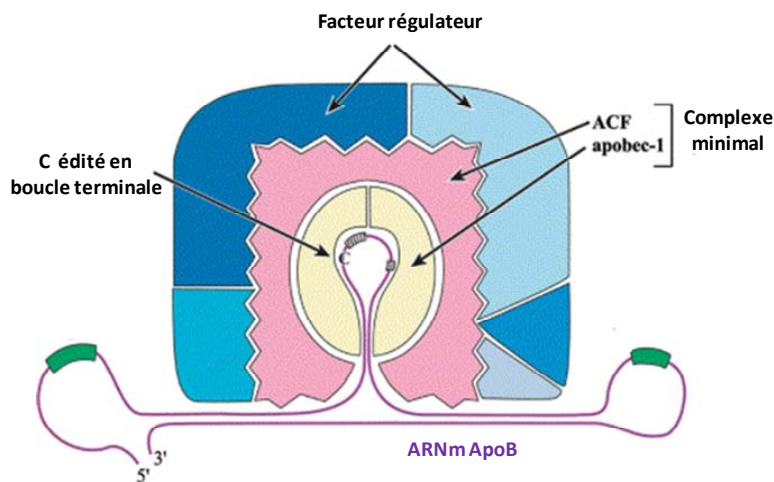


Figure 15 : Schéma de « l'editing » de l'ARNm ApoB (d'après (Davidson & Shelness, 2000)).

Ce processus est modulé par un complexe enzymatique, nommé éditosome. A l'heure actuelle, plusieurs facteurs de cette machinerie d'édition ont été identifiés, à savoir

principalement : l'ApoB mRNA editing catalytic component 1 (Apobec1) et l'Apobec1 Complementation Factor (ACF) (Anant & Davidson, 2002) (Figure 16).



**Figure 16 : Le complexe multi-protéique de l'éditosome de l'ARNm ApoB (d'après (Anant & Davidson, 2002)).**

- *La cytidine désaminase Apobec1 : enzyme de la réaction C-en-U*

La sous-unité catalytique unique de l'éditosome est l'Apobec1, une protéine de 27 kDa. Elle a été clonée pour la première fois chez le rat en 1993 (Teng *et al.*, 1993). Chez l'Homme et le hamster, l'Apobec1 est exprimée exclusivement dans l'intestin, c'est pourquoi le foie humain ne sécrète que l'ApoB100. Par contre, chez le rat et la souris, l'Apobec1 est exprimée à la fois dans l'intestin et dans le foie, ce qui explique la production hépatique des deux formes d'ApoB chez ces rongeurs.

La génération des souris invalidées pour le gène codant pour l'Apobec1 montre qu'elle est essentielle à « l'editing » des ARNm ApoB puisque les souris transgéniques ne produisent pas d'ApoB48 ni au niveau hépatique, ni au niveau intestinal (Hirano *et al.*, 1996). La majorité des travaux concernant le rôle de l'Apobec1 dans la régulation du niveau des deux ApoB a été réalisée au niveau hépatique chez le rat et la souris. La modulation de l'expression de l'Apobec1 est susceptible de faire varier la proportion des deux ApoB. C'est le cas avec l'insuline qui, au niveau des hépatocytes de rat, induit le taux ARNm de l'Apobec1 et de l'ApoB édité (Thorngate *et al.*, 1994; von Wronski *et al.*, 1998). De plus, *in vivo* l'expression génique de l'Apobec1 est modulée par le régime alimentaire. En effet, par exemple chez le rat à jeun puis re-nourri avec un régime riche en sucrose sans lipide, on observe au niveau du foie une augmentation abondante de l'ARNm de l'Apobec1 (Funahashi *et al.*, 1995) et une

augmentation du taux d'ARNm de l'ApoB édité associée à une accumulation de TG (Baum *et al.*, 1990; Harris & Smith, 1992).

- *ACF - Apobec1 Complementation Factor*

L'ACF est une RNA-binding protein de 63 kDa, qui interagit avec l'ARNm ApoB favorisant la réaction « d'editing ». L'ACF se compose de 3 motifs « RNA recognition motifs » situés au niveau N-terminal, indispensables à la reconnaissance du site de liaison de l'ARNm et au recrutement de l'Apobec1 (Lellek *et al.*, 2000; Maris *et al.*, 2005). Son invalidation est létale au stade embryonnaire comme celle du gène *APOB* (Blanc *et al.*, 2005). Les études portant sur le rôle de l'ACF ont été uniquement réalisées sur des cultures primaires d'hépatocytes. Il a été démontré que l'induction de la forme éditée de l'ARNm ApoB par l'éthanol ou l'insuline est associée avec la phosphorylation de l'ACF (Lehmann *et al.*, 2006). Cette donnée suggère que la phosphorylation de l'ACF pourrait favoriser sa rétention nucléaire et faciliterait de ce fait son interaction avec l'Apobec1, et donc augmenterait l'activité du complexe éditosomal. L'activation de la Protein Kinase C (PKC) pourrait être à l'origine de cette phosphorylation (Lehmann *et al.*, 2007).

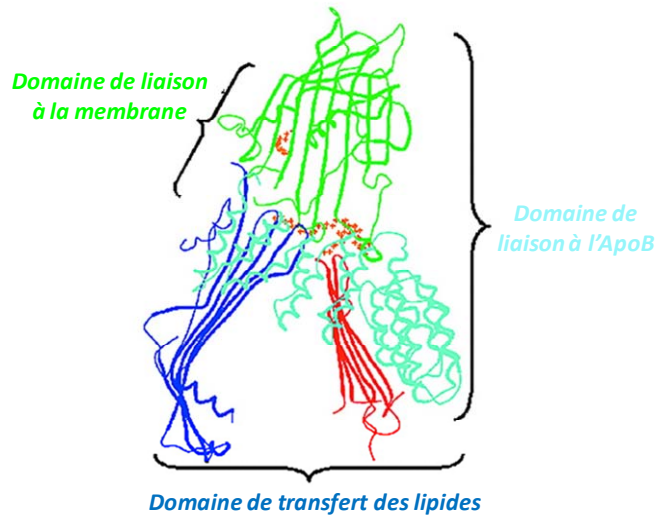
### **3.4.1.2 La MTP – enzyme limitante de l'assemblage des préchylomicrons**

La MTP qui est responsable de l'activité de transfert des lipides (TG et EC), est localisée au niveau de la lumière de RE des cellules capables de sécréter des lipoprotéines : les hépatocytes et les entérocytes.

La protéine MTP est un hétérodimère, composé de deux sous-unités nécessaires à l'activité catalytique :

- une large sous-unité unique (97 kDa) responsable de la liaison et du transfert des lipides.
- une petite sous-unité (55 kDa) qui est une protéine ubiquitaire multifonctionnelle possédant une activité isomérase di-sulfide (PDI) qui maintient la large sous-unité sous une forme soluble et permet l'accrochage de la MTP au niveau de la membranaire du RE (Wetterau *et al.*, 1997).

Cette protéine appartient à la famille des vitellogénines, contenant trois domaines fonctionnels indépendants : un domaine de liaison à la membrane, un domaine de transfert des lipides et un domaine liant l'ApoB (Hussain *et al.*, 2003) (Figure 17).



**Figure 17 : Structure de la large sous-unité de la MTP (d'après (Hussain *et al.*, 2003)).**

L'expression intestinale de la MTP est la plus forte dans les villosités duodéno-jéjunales, zone préférentielle de l'absorption lipidique et est quasiment absente dans l'iléon terminale (Swift *et al.*, 2005). Son expression et son activité enzymatique semblent régulées par l'alimentation et le cycle de lumière (Pan & Hussain, 2007, 2009). En particulier, l'expression protéique ainsi que l'activité de la MTP sont fortement induites chez la souris soumise à un régime hyperlipidique (Swift *et al.*, 2005; Hernandez Vallejo *et al.*, 2009). Les propriétés limitantes de la MTP dans la formation des chylomicrons sont illustrées par la déficience en MTP qui est à l'origine de la maladie abêtalipoprotéïnémie. C'est une maladie génétique héréditaire due à une mutation autosomale récessive de la MTP. Chez ces patients, lors d'une alimentation riche en graisse, on observe une diarrhée importante accompagnée d'une incapacité à produire des lipoprotéines riches en TG et d'une stéatose hépatique (Berriot-Varoqueaux *et al.*, 2000).

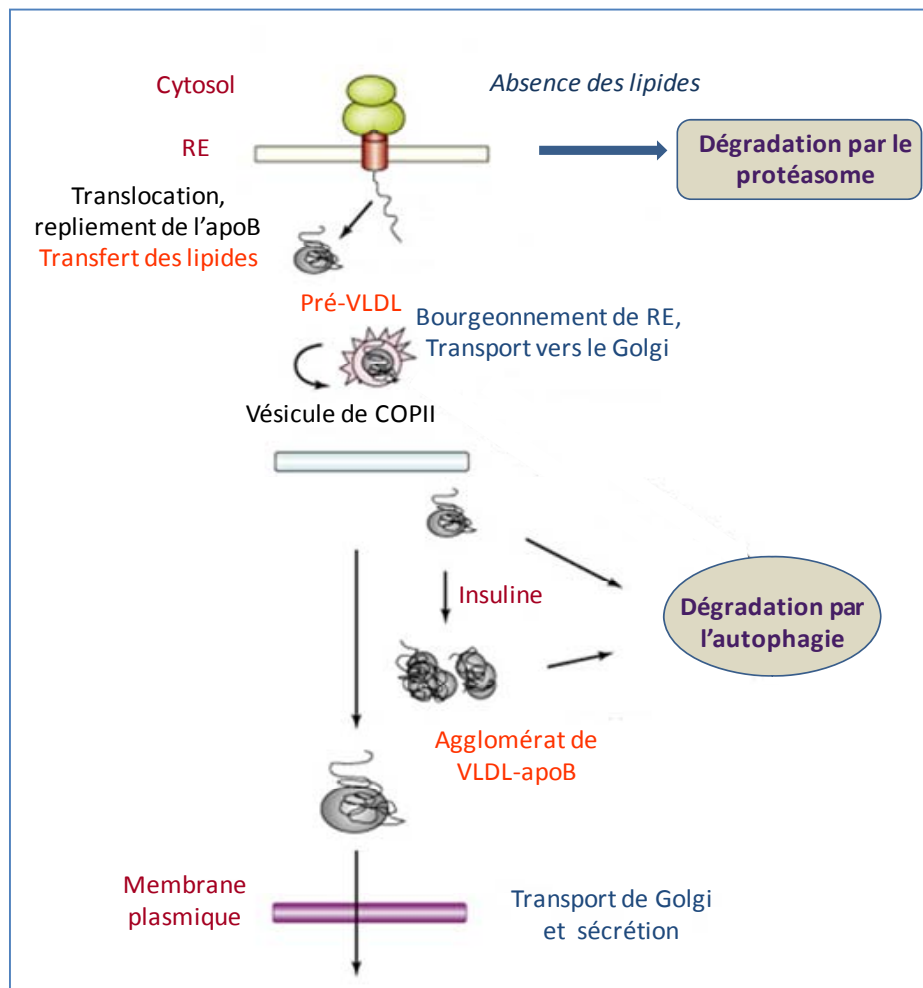
### **3.4.1.3 Régulation de l'assemblage des préchylomicrons**

La formation des préchylomicrons dépend de la synchronisation de trois acteurs principaux : la stabilisation de l'ApoB48, l'activité de la MTP et la mobilisation des lipides intracellulaires.

- **La régulation de l'ApoB48 et la production des chylomicrons**

La régulation de l'ApoB48 elle-même, est particulièrement importante dans la régulation de l'assemblage et de la sécrétion des chylomicrons puisque la quantité d'ApoB48 définit le nombre des particules qui seront formées et sécrétées. Paradoxalement, les données concernant la régulation post-traductionnelle de l'ApoB48 sont très restreintes au niveau

entérocytaire. A l'heure actuelle, les auteurs considèrent généralement que la régulation de l'ApoB100 est transposable à celle de l'ApoB48 (Hussain *et al.*, 2003). L'ApoB100 semble être synthétisée en permanence et sa quantité sécrétée est finement régulée par la dégradation *via* le système ubiquitine-protéasome et l'autophagie en fonction des conditions physiologiques différentes (Brodsky & Fisher, 2008). Grâce à ces deux systèmes, il a été montré que la dégradation de l'ApoB100 au niveau hépatocytaire peut avoir lieu avant, pendant et après l'assemblage des VLDL (Figure 18).



**Figure 18 : Régulation de la sécrétion de l'ApoB100 (adapté d'après (Brodsky & Fisher, 2008)).**

*La synthèse de l'ApoB100 est initiée au niveau de la membrane du RE.*

*En présence de lipides, les ApoB100 sont transloquées dans le RE où elles sont repliées et stabilisées sous une conformation adéquate pour former des pré-VLDL. Ces particules sont transportées vers l'appareil Golgi par un transport vésiculaire. Les VLDL sont ensuite sécrétées par exocytose.*

*En absence de lipides, la translocation des ApoB100 naissantes dans la lumière du RE est inefficace et leurs domaines d'ubiquitination sont exposés au cytosol où elles sont poly-ubiquitinées puis dégradées par le protéasome.*

*L'insuline stimule leur dégradation par un mécanisme post-RE non-protéasomal, l'autophagie.*

La dégradation de l'ApoB100 dépend directement de la disponibilité en lipides neutres intracellulaires (Brodsky & Fisher, 2008). En effet, si la disponibilité en lipides neutres est limitante, la sécrétion d'ApoB100 est réduite puisque une grande proportion d'ApoB100 en cours de traduction est ubiquitinée et dégradée par le protéasome.

L'insuline stimule également la dégradation de l'ApoB100 à la fois par le protéasome et par autophagie. Cet effet inhibiteur de l'insuline sur la sécrétion de l'ApoB100 et la production des VLDL s'exerce *via* des cascades de signalisation impliquant la Phosphoinositide 3- kinase (PIK3) (Phung *et al.*, 1997) et les MAP kinases (Tsai *et al.*, 2007). Ces données expliquent, en partie, pourquoi en cas d'insulino-résistance, il existe une surproduction des VLDL (Avramoglu *et al.*, 2003). L'insuline et/ou la sensibilité à l'insuline semblent également à l'origine de la dérégulation de la sécrétion des chylomicrons au niveau intestinal. En effet, l'incubation de l'insuline avec des cellules intestinales de fœtus humains réduit la sécrétion des chylomicrons (Loirdighi *et al.*, 1992). En accord avec ces résultats, les études réalisées chez les hamsters rendus insulino-résistants par un régime riche en fructose montrent que l'insuline perd son effet inhibiteur sur la sécrétion de l'ApoB48 à cause de sa cascade de signalisation aberrante (Federico *et al.*, 2006). Par ailleurs, en cas d'insulino-résistance, il a été démontré que l'hypertriglycémie postprandiale est due également à la surproduction intestinale de petits chylomicrons contenant de l'ApoB48 (Adeli & Lewis, 2008). Cet effet est donc similaire à celui décrit pour l'ApoB100 contenue dans les VLDL issus du foie.

L'expression protéique de l'ApoB100 est en revanche induite par les lipides au niveau des hépatocytes (Zhang *et al.*, 2004). De la même façon, dans les cultures primaires d'entérocytes de hamster, le traitement avec l'acide oléique complexé avec de l'albumine augmente le taux d'ApoB48 intracellulaire et sécrété (Haidari *et al.*, 2002). Ces données sont confirmées au niveau des cellules Caco-2 où les micelles lipidiques stimulent la sécrétion des lipoprotéines porteuses d'ApoB48 (Chateau *et al.*, 2005). De plus, une induction de la protéine ApoB48 est également trouvée au niveau entérocytaire chez des souris soumises à un régime hyperlipidique (Xie *et al.*, 2003). Cette régulation semble également affecter la sécrétion des chylomicrons. En effet, quand l'intestin est soumis à une quantité importante de lipides, il augmente sa capacité d'absorption par l'augmentation de la taille des chylomicrons sécrétés (Hayashi *et al.*, 1990). De plus, des études sur des entérocytes isolés de lapin traités avec des lipides sous forme micellaire montrent que les lipides alimentaires stimulent la capacité de synthèse et la sécrétion des chylomicrons. Cet effet stimulateur dépend de la teneur et de la composition des lipides dans le régime (Cartwright & Higgins, 1999).

En plus de ces données des arguments récents de la littérature montrent qu'il existerait des mécanismes subtiles de régulation spécifique à chacune des deux ApoB (Williams, 2008).

D'abord, l'ApoB48 serait moins sensible à la dégradation protéasomale, cela pourrait s'expliquer par l'absence de la partie C-terminale où se trouve le site de multi-ubiquitination de l'ApoB100 (Rutledge *et al.*, 2009). Cependant des données obtenues sur des cultures primaires d'entérocytes de hamster montrent que l'ApoB48 est également dégradée par le protéasome puisque son taux intracellulaire est augmenté en présence de MG132, un inhibiteur spécifique du protéasome (Haidari *et al.*, 2002). De plus, des données obtenues chez les souris dont le gène codant pour l'ApoBec1 a été invalidé (KOApobec1) ont montré que la sensibilité à la dégradation serait plus faible pour l'ApoB48 que pour l'ApoB100 dans les mêmes conditions (Xie *et al.*, 2003).

Des données obtenues à partir du modèle de souris KOApobec1 ont permis d'établir le rôle physiologique non interchangeable des deux ApoB dans l'absorption intestinale des lipides. En effet, des travaux de Lo *et al.*, montrent que les souris KOApobec1 peuvent absorber et transporter normalement une quantité modeste de lipides alimentaires aussi bien que les souris sauvages, mais cette capacité devient limitante quand la quantité de lipides apportée est plus importante (Lo *et al.*, 2008). Dans ces dernières conditions, ces souris présentent à la fois une réduction du transport lymphatique des TG associée à une accumulation entérocytaire de ces TG. Cette diminution est bien due à l'absence d'ApoB48 puisque l'activité de transfert des lipides *via* la MTP et la synthèse de l'ApoAIV sont similaires à celles des animaux sauvages. Ces altérations pourraient être dues à une efficacité de lipidation plus importante de l'ApoB48 comparée à l'ApoB100 (Xie *et al.*, 2003).

L'ensemble de ces résultats montre une capacité unique de l'ApoB48 à former et sécréter des chylomicrons assurant de façon optimale le transport des lipides alimentaires de l'entérocyte vers la lymphe.

- ***La régulation de la MTP et la production des chylomicrons***

Au niveau intestinal, malgré des données restreintes, plusieurs auteurs considèrent que la MTP pourrait intervenir dans les deux étapes de l'assemblage des préchylomicrons (Hussain *et al.*, 2005; Black, 2007) comme ce qui est décrit au niveau hépatique (Hussain *et al.*, 2003) (Figure 13).

L'inhibition de l'activité de la MTP a un effet similaire à celui de l'indisponibilité des lipides, elle stimule l'ubiquitination donc la dégradation co-traductionnelle de l'ApoB (Benoist &

Grand-Perret, 1997). Ce rôle médiateur de la MTP dans cette étape pourrait être dû à son interaction physique avec la partie N-terminale de l'ApoB formant une poche hydrophobe accueillant des lipides neutres, conduisant à une lipidation initiale de l'ApoB naissante empêchant sa dégradation protéasomale (Gordon & Jamil, 2000). Par conséquent, le taux d'ApoB48 sécrété, et donc le nombre de chylomicrons sécrétés dépendrait directement de l'activité de la MTP. Cette implication pourrait expliquer l'association entre l'induction du taux d'ARNm et de l'activité de la MTP intestinaux et une surproduction des petites lipoprotéines intestinales en cas de pathologie comme le diabète ou l'insulino-résistance (Haidari *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2002).

De même, des données montrent également la participation de la MTP dans l'étape tardive de l'assemblage, l'expansion du cœur hydrophobe des lipoprotéines intermédiaires, par la translocation des gouttelettes de lipides neutres vers l'intérieur du RE lisse (Gordon & Jamil, 2000) (Figure 13). La MTP serait impliquée dans la formation et la stabilisation des gouttelettes lipidiques intraluminales, donc dans l'accumulation de ces gouttelettes destinées à la lipidation des chylomicrons primaires formés dans le RE rugueux (Bakillah & Hussain, 2001). Par conséquent, l'activité de la MTP serait également un des facteurs déterminants de la taille des chylomicrons.

Le rôle physiologique de la MTP est conforté par des études réalisées sur l'absorption intestinale des lipides chez des souris où le gène codant pour la MTP a été spécifiquement invalidé au niveau intestinal. Cette délétion spécifique de la MTP conduit à l'apparition de grandes gouttelettes lipidiques au niveau du cytoplasme des entérocytes et à une diminution drastique de la sécrétion des chylomicrons (Xie *et al.*, 2006). Les cultures primaires d'entérocytes issus de ces souris transgéniques montrent une baisse de 80% de la sécrétion de l'ApoB48. En régime standard, ces souris déficientes ont une stéatorrhée, un arrêt de croissance et une diminution de l'absorption du cholestérol ce qui correspond aux symptômes associés avec le phénotype d'abêtalipoprotéïnémie chez l'Homme (Xie *et al.*, 2006).

Ces données ont établi fermement que la MTP est un composant essentiel de l'assemblage des lipoprotéines. La question qui reste en suspend est de savoir à quel niveau la contribution de la MTP et de son induction sont prépondérantes au niveau de la formation de la lipoprotéine primaire ou de la fusion des gouttelettes lipidiques.

D'après le groupe de Dr. Higgins (Kendrick *et al.*, 2001), l'étape la plus limitante dépendrait de la quantité de lipides ingérée. Quand la teneur est faible, l'étape limitante serait la translocation de la lipoprotéine primaire dans le RE. Mais quand le repas est riche en lipides,



l'étape limitante serait l'addition de lipides à la gouttelette lipidique avant sa fusion avec la lipoprotéine primaire, cette étape déterminant la taille de la lipoprotéine.

#### **3.4.1.4 L'Apo A-IV et la production des chylomicrons**

L'ApoA-IV est une autre apolipoprotéine de 46 kDa présente à la surface des préchylomicrons. Chez l'Homme, l'ApoA-IV circulante n'est produite que par l'intestin, tandis que chez le rongeur elle est synthétisée dans l'intestin et le foie. Dans l'intestin grêle son expression est majoritairement villositaire et décroît selon l'axe gastro-colique (Sauvaget *et al.*, 2002).

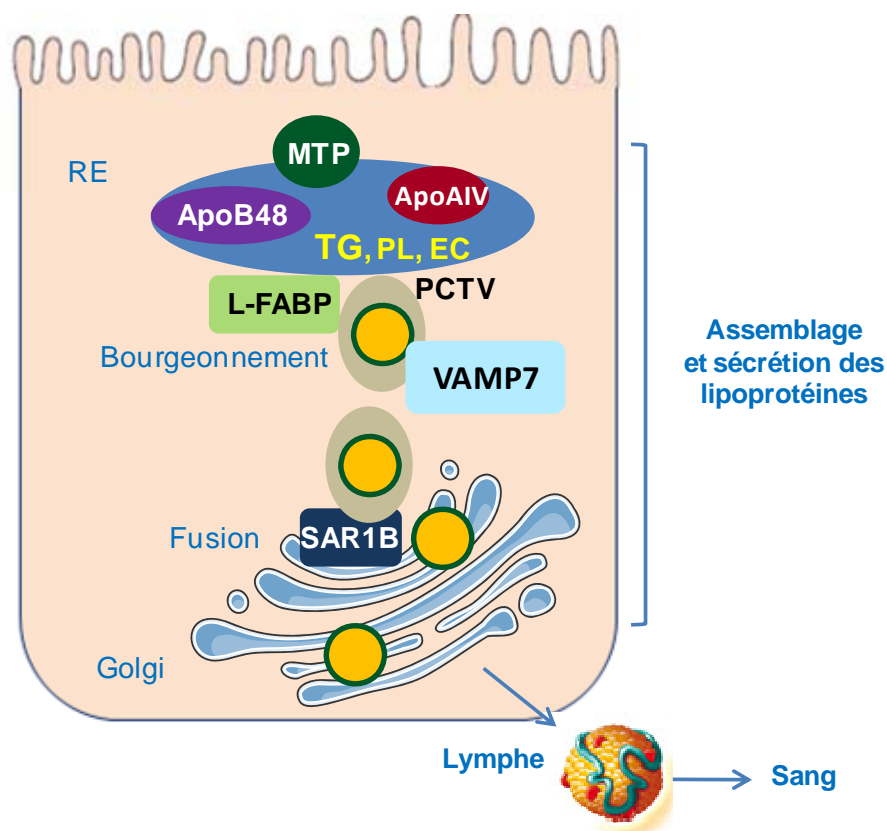
La synthèse et la sécrétion intestinales de l'ApoA-IV sont stimulées par les lipides alimentaires. En effet, son expression intestinale est diminuée à l'état à jeun et restaurée à l'état nourri et d'autant plus suite à un gavage lipidique (Liu *et al.*, 2001). En accord avec ces données, sur le modèle cellulaire Caco-2, son expression est induite par la présence de micelles lipidiques au niveau apical de ces cellules (Carriere *et al.*, 2005).

L'ApoA-IV joue un rôle très important dans la sécrétion des chylomicrons puisqu'elle est impliquée dans la stabilisation des lipoprotéines favorisant la sécrétion de grosses particules (Mansbach & Gorelick, 2007). Des études *in vitro*, ont montré que la surexpression de cette protéine dans des cellules intestinales de porc (IPEC-1) augmente à la fois la sécrétion des chylomicrons et la taille des lipoprotéines sécrétées (Lu *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'ApoA-IV joue également un rôle dans le contrôle de la prise alimentaire. Sécrétée à la surface des chylomicrons, l'ApoA-IV est dissociée sous forme libre dans la circulation sanguine et constituerait un signal de satiété (Tso & Liu, 2004).

#### **3.4.2 Transport spécifique des préchylomicrons vers le Golgi : une deuxième étape limitante**

Les préchylomicrons, sont transportés du RE vers le Golgi pour y subir les étapes de maturation, dans des vésicules particulières, appelées Prechylomicron Transport Vesicle (PCTV) (Figure 19). Ces vésicules assimilables à celles des protéines néoformées sont de plus grande taille comprise entre 200 et 500 nm et sont spécifiques de l'intestin. Leur génération au niveau du RE et leur fusion semble nécessiter des protéines différentes. De manière générale la génération des vésicules de transfert des protéines néoformées requiert le recrutement de complexes cytosoliques ou protéines « manteau », les coatomères COPII (composés de GTPase Sar1, et des complexes protéines Sec23/24 et Sec13/31) (Mansbach & Gorelick, 2007). Mais récemment des travaux réalisés *in vitro* sur système acellulaire par

l'équipe de Mansbach ont permis de démontrer que la composition et le mode de fonctionnement des PCTV est un peu différent (Mansbach & Siddiqi, 2010). Tout d'abord, le bourgeonnement des PCTV nécessite la L-FABP (Neeli *et al.*, 2007) et l'activation ATP-dépendante de la protéine kinase C  $\xi$  (PKC $\xi$ ) (Siddiqi & Mansbach, 2008). De plus, la formation de ces vésicules au niveau RE recrute des complexes cytosoliques composés de VAMP7 (vesicle associated membrane protein 7) (Siddiqi *et al.*, 2006a), Sar1b, Sec23/24, et Sec13/31. Le VAMP7 permet la reconnaissance de la PCTV avec l'appareil de Golgi uniquement dans l'entérocyte (Siddiqi *et al.*, 2006a). Le fait que l'utilisation d'anticorps anti-VAMP7 diminue de 85% le transfert des préchylomicrons du RE vers le Golgi démontre l'importance de cette protéine dans ce processus. Pour finir, pour les PCTV, le complexe COP II serait surtout indispensable dans la fusion avec le complexe golgien (Siddiqi *et al.*, 2003; Siddiqi *et al.*, 2006b).



**Figure 19 : Transport spécifique des préchylomicrons vers le Golgi.**

RE : réticulum endoplasmique ; MTP : microsomal triglyceride transfer protein ; ApoB48 : apolipoprotéine B48 ; ApoAIV : apolipoprotéine AIV ; L-FABP : liver fatty acid binding protein ; VAMP7 : vesicle associated membrane protein 7 ; SAR1b : Smad Anchor for Receptor Activation 2 ; PCTV : prechylomicron transport vesicle ; TG : triglycérides ; PL : phospholipides ; EC : ester de cholestérol.

Même si ce transfert des préchylomicrons entre deux organites n'est pas totalement élucidé, il constitue une étape limitante de l'absorption. En effet, la mutation de SAR1b (constitutive de COPII) est à l'origine de la maladie de rétention des chylomicrons ou maladie d'Anderson (Shoulders *et al.*, 2004). Cette mutation conduit à une accumulation massive des lipides au sein des entérocytes, probablement sous forme de PCTV et à l'absence totale de chylomicron dans le système lymphatique intestinal suite à un repas riche en graisses.

### **3.4.3 Maturation golgienne et sécrétion des chylomicrons**

A la suite de leur fusion avec la membrane golgienne, les PCTV libèrent des préchylomicrons dans la lumière de l'appareil de Golgi où se produit la maturation de ces particules.

Tout d'abord, ces particules acquièrent l'ApoA-I qui n'est pas présente dans les PCTV (Siddiqi *et al.*, 2006b) et également l'ApoC-II et l'ApoC-III (Mansbach & Gorelick, 2007). Ensuite, l'ApoB48, présente à la surface de ces particules, subit une glycosylation (Berriot-Varoqueaux *et al.*, 2001).

Après leur maturation dans le Golgi, les chylomicrons sont acheminés vers la membrane basolatérale où ils sont exocytés dans l'espace intercellulaire. Puis les chylomicrons gagnent le canal chylifère central de la villosité intestinale et sont transportés dans la lymphe avant de rejoindre la circulation sanguine.

*Comme nous l'avons vu, la formation et la sécrétion des chylomicrons est un phénomène particulièrement complexe nécessitant la coordination de plusieurs acteurs intracellulaires. L'assemblage des chylomicrons, en particulier à la fois la stabilisation de l'ApoB48 et l'activité de la MTP, constitue une étape limitante qui est contrôlée par les lipides alimentaires et l'état physiologique de l'organisme. L'efficacité de la lipidation de l'ApoB48, encore mal connue, conditionne le nombre et la taille des chylomicrons sécrétés.*

### **3.5 Métabolisme post-intestinal des chylomicrons : impact sur la triglycéridémie postprandiale.**

L'intestin sécrète des lipoprotéines contenant de l'ApoB48, des VLDL en période interprandiale et des chylomicrons en période postprandiale (et également des particules sans ApoB48, les HDL contenant majoritairement du cholestérol). Dans la circulation sanguine, les chylomicrons sont rapidement métabolisés en deux étapes :

- Les chylomicrons sont hydrolysés de 90% de leur TG par la LPL en libérant des acides gras aux tissus périphériques.
- Les résidus de chylomicrons appelés aussi remnants sont captés par le foie et les macrophages.

La LPL est synthétisée par les cellules parenchymateuses des tissus extra-hépatiques, en particulier le muscle squelettique, le tissu adipeux mais aussi le cœur, les glandes mammaires, la rate, le poumon, les macrophages et le rein. Cette enzyme est localisée à la surface des cellules endothéliales capillaires, liée aux membranes par des protéoglycanes. La réaction d'hydrolyse des TG (libération d'AGLC) réalisée par la LPL est une étape limitante du catabolisme intravasculaire des chylomicrons puisque la déficience en l'activité LPL, due à sa mutation à l'état homozygote ou hétérozygote, conduit à une hyperchylomicronémie (Merkel *et al.*, 2002).

En plus de sa quantité, l'activité de la LPL est contrôlée par la présence d'apolipoprotéines contenues à la surface des chylomicrons. En effet, l'ApoC-II est un activateur puissant de la LPL alors que l'ApoC-III est un inhibiteur de la LPL (Jong *et al.*, 1999). Donc le rapport ApoC-II/ApoC-III détermine l'efficacité de la dégradation des TG des chylomicrons (Olivecrona & Beisiegel, 1997). De plus, l'activité de la LPL est inhibée par la concentration plasmatique élevée des acide gras circulants (Goudriaan *et al.*, 2005).

La clairance des chylomicrons dépend également de leur taille et de leur nombre (Martins *et al.*, 1996). En effet, les chylomicrons de grande taille sont catabolisés plus rapidement que ceux de petites tailles grâce à leur affinité plus grande avec la LPL (Xiang *et al.*, 1999). Le nombre des particules semblerait plus important que leur taille dans l'efficacité de leur catabolisme (Martins *et al.*, 1996).

Il est intéressant de noter que tous ces facteurs régulateurs de la clairance des chylomicrons sont régulés par les lipides alimentaires. En effet, chez la souris un régime riche en AGLC insaturés induit le rapport ApoC-II/ApoC-III associé avec une diminution de la triglycéridémie (Petit *et al.*, 2007). Pour finir, un régime hyperlipidique conduit à une augmentation de la taille des chylomicrons (Cartwright & Higgins, 1999) d'autant plus importante que le régime est riche en acides gras insaturés (Levy *et al.*, 1991; Cartwright & Higgins, 1999).

Parallèlement à l'hydrolyse par la LPL, les chylomicrons perdent également des phospholipides, transfèrent des Apolipoprotéines aux HDL, en acquièrent comme l'apolipoprotéine E (ApoE), et deviennent des remnants. Ces particules sont rapidement

captées par le foie où elles sont catabolisées. Ce captage hépatique fait intervenir plusieurs récepteurs :

- Le low-density lipoprotein receptor (LDLr) qui possède un site de liaison commun à l'ApoB100 et l'ApoE.
- Le LDL-Receptor Related Protein (LRP) qui est exprimé au niveau hépatocyte et qui ne reconnaît que l'ApoE pas l'ApoB100.
- SR-BI qui contrôle plutôt l'épuration sélective des HDL (Out *et al.*, 2005).

Le LDLr et le LRP contribuent majoritairement à l'internalisation des remnants (Hussain *et al.*, 1999).

Ce mécanisme d'épuration est très efficace pour les chylomicrons puisque dans des conditions physiologiques normales, la demi-vie des TG des chylomicrons est très courte, de l'ordre de 20 minutes (contre quelques heures pour les lipoprotéines types VLDL) (Xiang *et al.*, 1999) et l'épuration globale, après un repas, se fait en moins de 6 heures.

En conclusion, en période postprandiale, la triglycémie est majoritairement la résultante de la production intestinale des chylomicrons et de la clairance de ces particules au niveau des tissus périphériques. On considère que les TG sont de 50 à 80% portés par des lipoprotéines intestinales.

Comme précisé dans l'introduction, l'évaluation de la triglycémie postprandiale intéresse de plus en plus la communauté scientifique puisqu'elle favorise la mise en place de l'athérosclérose (Lopez-Miranda *et al.*, 2006). De plus, comme nous l'avons souligné, l'hypertriglycémie postprandiale est également un marqueur de l'insulino-résistance, mais aussi du syndrome métabolique et de l'obésité (Phillips *et al.*, 2000; Mamo *et al.*, 2001; Martins & Redgrave, 2004) et semble être un facteur accélérateur de complications cardiovasculaires de ces maladies chroniques.

L'ensemble de ces constats explique pourquoi la littérature rapporte de plus en plus des données démontrant le rôle actif de l'intestin dans la régulation de ce paramètre et son implication dans l'apparition de ces maladies (Karpe, 1999; Lopez-Miranda *et al.*, 2006). En effet, en période postprandiale, une hyperproduction des chylomicrons contribue à l'hypertriglycémie chez les sujets diabétiques et insulino-résistants (Phillips *et al.*, 2000; Adeli & Lewis, 2008). Cela pourrait s'expliquer par une moins bonne efficacité de dégradation liée à une plus grande production de chylomicrons de petite taille (Hogue *et al.*, 2007) donc à des défauts de lipodation de l'ApoB48.

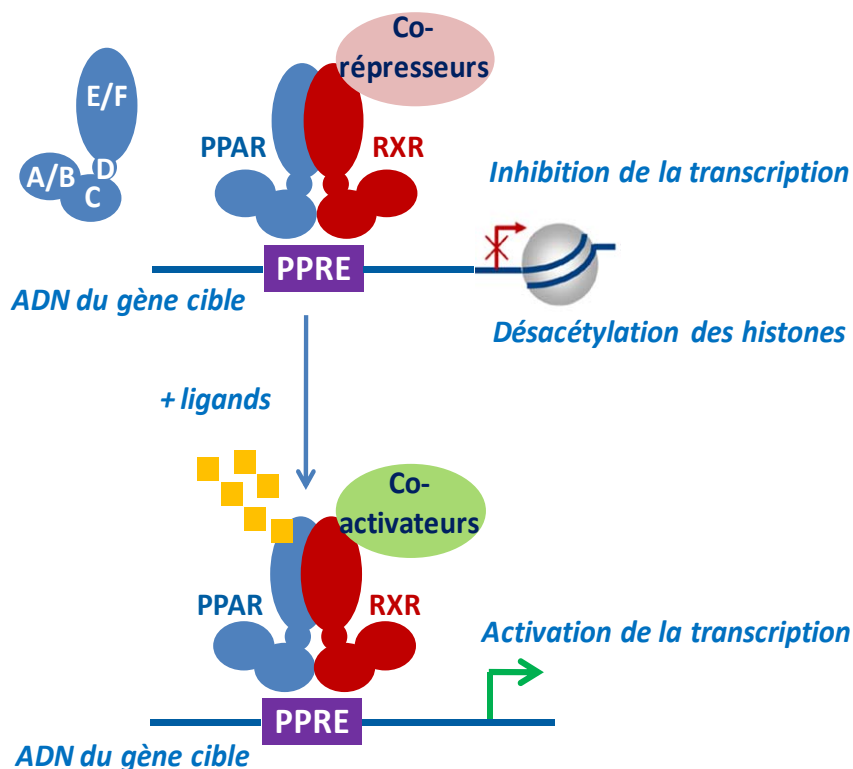
*D'après ces données, il devient évident que l'étude de la relation entre les lipides alimentaires et la santé doit intégrer les paramètres lipidiques postprandiaux, et donc la contribution de l'intestin. Comme nous l'avons vu, plusieurs étapes encore mal connues sont susceptibles d'être à l'origine des altérations du métabolisme entérocytaire des lipides alimentaires qui ne se traduisent pas par des effets sur le captage intestinal mais par des rétentions plus importantes de TG dans l'entérocyte et souvent paradoxalement des hypertriglycémies liées à la formation de particules mal dégradées par la LPL probablement parce qu'elles sont en plus grand nombre et plus petites. Ces constats indiquent donc que l'efficacité de la «lipidation» des particules synthétisées par l'intestin conditionne l'efficacité de leur dégradation sanguine ultérieure et démontre le rôle crucial de cette étape dans la régulation de la triglycémie postprandiale. Par ailleurs, le ralentissement de la dégradation des chylomicrons peut retentir par compétition sur la dégradation des lipoprotéines hépatiques (VLDL) et donc sur la lipémie interprandiale. En conclusion l'ensemble de ces constats montre que la compréhension des mécanismes physiologique et biochimique à l'origine de l'adaptation du métabolisme entérocytaire vers la formation de gros chylomicrons bien dégradés dans la circulation sanguine devrait permettre d'envisager des actions thérapeutiques pour limiter la lipémie postprandiale et de ce fait les maladies cardiovasculaires et le syndrome métabolique.*

Ce rappel bibliographique soulève un besoin grandissant de nouveaux traitements hypolipémiants ciblant le métabolisme intestinal des lipides. Les approches cliniques actuelles ayant pour objectif de réduire l'hypertriglycémie prennent en compte à la fois les interventions nutritionnelles et médicamenteuses. Parmi les traitements pharmacologiques, il y a en particulier les agonistes des PPARs (Bays & Stein, 2003). En effet, ces derniers sont des récepteurs nucléaires considérés comme des régulateurs clés du métabolisme des lipides puisqu'ils sont capables de contrôler des étapes cruciales telles que la libération des acides gras des lipoprotéines, leur captage par les tissus et leur métabolisme cellulaire. Pour le moment les agonistes des PPARs sont utilisés afin de moduler le métabolisme des acides gras au niveau extra-intestinal, mais ils pourraient s'avérer être des modulateurs intéressants de l'absorption intestinale. En effet, ils régulent le CD36 (Nisoli *et al.*, 2000), la L-FABP (Poirier *et al.*, 2001), et la MTP (Ameen *et al.*, 2005), 3 protéines importantes dans la formation des chylomicrons. Si leurs impacts hépatiques sont connus, peu de données sont rapportées

concernant l'intestin bien que certaines isoformes des PPARs soit bien exprimées dans cet organe.

### 3.6 PPARs : régulateur potentiel de la triglycéridémie postprandiale

Les PPARs appartiennent à la superfamille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes, activés par la fixation d'un ligand, qui peut être naturel comme les AGLC ou synthétiques (Escher & Wahli, 2000). En formant un hétérodimère avec le récepteur de l'acide 9 cis-rétinoïque (Retinoid-X-Receptor ou RXR), le complexe PPAR-RXR induit la transcription de gènes cibles par sa fixation sur une séquence spécifique de l'ADN, localisée au niveau du promoteur du gène : le Peroxisome Proliferator-Responsive Element (PPRE) (Figure 20). Actuellement, plusieurs isoformes de PPARs ont été identifiées : PPAR $\alpha$  (NRC1), PPAR $\beta/\delta$  (NR1C2) et PPAR $\gamma$  (NR1C3), dont la distribution tissulaire est spécifique ce qui sous-tend des fonctions physiologiques différentes.



**Figure 20 : Mécanisme de transcription des gènes par les PPARs (adapté d'après (Desvergne et al., 2006)).**

Le PPAR, comme le RXR comporte plusieurs domaines : A/B, C, D, E/F. En absence de ligand, le PPAR interagit avec un complexe de co-répresseurs qui inhibe la transcription du gène par leur activité désacétylase. Suite à la liaison de ligands naturels ou synthétiques, le co-répresseur est libéré, le PPAR s'hétérodimérise avec le RXR. Ce phénomène entraîne le recrutement de co-activateurs présentant une activité acétylase qui induit la transcription du gène cible.

La structure primaire des PPARs, comme celle des autres membres de la superfamille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes, comprend plusieurs domaines (Escher & Wahli, 2000):

- le domaine A/B du côté N-terminal de la protéine, qui est un domaine de transactivation ligand-indépendant, est une région très peu conservée qui contient une séquence AF1 (activation fonction 1) phosphorylable.
- le domaine C qui est le domaine de liaison à l'ADN (DBD pour DNA-binding domain). C'est le domaine le mieux conservé de la protéine. Il permet aux récepteurs nucléaires d'interagir avec le PPRE, localisé au niveau du promoteur des gènes cibles. Le PPRE est une répétition de l'hexonucléotide AGGTCA séparé par un nucléotide (DR1 pour direct repeat 1).
- le domaine D ou région charnière, non conservé, qui est responsable de la flexibilité de la protéine, est indispensable à sa dimérisation et à sa liaison à l'ADN. C'est grâce à ce domaine D que le récepteur interagit avec des co-activateurs et des co-répresseurs.
- le domaine multifonctionnel E/F qui est un domaine carboxyl-terminal responsable de la dimérisation avec le récepteur nucléaire partenaire (RXR) et de la transactivation ligand-dépendante (AF-2). Ce domaine est aussi responsable du recrutement des co-activateurs et des co-represseurs. Le changement de conformation du PPAR, entraîné par la liaison d'un ligand ou par la phosphorylation, permet la libération des co-répresseurs et le recrutement de co-activateurs, permettant ainsi aux PPARs d'activer la transcription.

Le PPAR $\alpha$  est exprimé dans divers tissus, notamment dans le foie, le cœur, les reins, le tissu adipeux et l'intestin grêle (Escher *et al.*, 2001). Il est fortement impliqué dans le catabolisme des acides gras *via* son rôle régulateur des enzymes clefs de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et péroxysomale des acides gras (Desvergne *et al.*, 2006). Les fibrates, des ligands pharmacologiques et activateurs du PPAR $\alpha$ , sont utilisés en clinique pour traiter les dyslipidémies. Les fibrates exercent leur effet hypo-triglycéridémiant, d'une part par la stimulation du catabolisme des acides gras conduisant à une diminution de la production hépatique des VLDL (Staels *et al.*, 1998), d'autre part, en activent l'hydrolyse des lipoprotéines *via* l'induction de la LPL et la diminution de l'ApoC-III hépatique (Staels *et al.*, 1998). Pour finir, un seul article rapporte des effets de ce récepteur nucléaire au niveau de l'intestin grêle. Ce travail a montré, en utilisant à la fois des animaux déficients en PPAR $\alpha$  et



un agoniste spécifique, qu'il induirait uniquement l'expression d'un gène impliqué dans le « processing » intestinal des lipides et surtout inhiberait ceux impliqués dans la prolifération et l'apoptose intestinales (de Vogel-van den Bosch *et al.*, 2008).

Le PPAR $\beta$  est le plus ubiquiste. Il est présent dans de nombreux tissus y compris le muscle, le tissu adipeux, le poumon, le cerveau, et l'intestin où il serait l'isoforme majoritaire (Escher *et al.*, 2001). Il est impliqué dans le mécanisme à l'origine de la prolifération cellulaire, de l'oxydation et du métabolisme des lipides (Karpe & Ehrenborg, 2009). Les agonistes de PPAR $\beta$ , comme le GW501516 ou le L-16041, semblent avoir également des effets hypolipémiants grâce à leurs effets inducteurs du captage musculaire des acides gras et du catabolisme ce qui, secondairement, modulent le métabolisme des lipoprotéines (Karpe & Ehrenborg, 2009). De plus, ces molécules révèlent des intérêts thérapeutiques contre le syndrome métabolique puisque leur utilisation normalise des paramètres métaboliques et réduit l'adiposité (Luquet *et al.*, 2004; Coll *et al.*, 2009). Le PPAR $\beta$  interviendrait également directement dans le métabolisme des lipoprotéines hépatiques car son activation par des ligands spécifiques conduit dans certains modèles animaux à des réductions de la triglycéridémie et/ou du transport réverse du cholestérol (Leibowitz *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2001). De plus, son invalidation conduit à la sécrétion plus importante de VLDL hépatiques (Akiyama *et al.*, 2004).

Le PPAR $\gamma$  est majoritairement exprimé dans le tissu adipeux où il contrôle la différenciation cellulaire et le stockage des lipides et module l'action de l'insuline. PPAR $\gamma$  est aussi exprimé dans la muqueuse intestinale à des taux plus élevés dans le côlon et le caecum que dans l'intestin grêle (Lefebvre *et al.*, 1999). Dans ce dernier organe, son expression est faible et décroît fortement du duodénum au jéjunum (Chen *et al.*, 2006). Les agonistes du PPAR $\gamma$  comme les glitazones sont couramment utilisés pour réduire la résistance à l'insuline ce qui s'accompagne d'une diminution des acides gras circulants et d'une diminution de l'hypertriglycéridémie, améliorant le profil lipidique chez l'Homme (Pourcet *et al.*, 2006). L'activation du PPAR $\gamma$  augmente la sensibilité à l'insuline *via* des effets adipocytaires (pro-adipogène et différenciation), musculaires (augmentation du captage myocytaire du glucose) et hépatiques (réduction de la production du glucose et amélioration du captage du glucose).

Ce rapide rappel de la littérature indique que l'effet des activateurs des PPARs sur l'absorption intestinale des lipides et en particulier la triglycéridémie postprandiale n'est pas beaucoup étudié. A notre connaissance, seules deux études se sont intéressées à ces

paramètres chez des souris présentant une hypertriglycéridémie postprandiale. La première, concernant les souris déficientes en CD36, montre que le fénofibrate (ligand de PPAR $\alpha$  et  $\gamma$ ) semble agir au niveau du métabolisme intestinal des lipides. En effet, 2 semaines de régime standard contenant 0,05% de fénofibrate diminue l'hypertriglycéridémie postprandiale des souris KOCD36 (Sandoval *et al.*, 2010). De même, la deuxième étude montre qu'un gavage de fénofibrate répété pendant 5 jours diminue la triglycéridémie postprandiale induite par un régime hyperlipidique chez la souris (Uchida *et al.*, 2011). Cet effet serait dû à la diminution des TG disponibles pour la sécrétion des lipoprotéines, d'une part par une diminution de l'absorption des lipides alimentaires (augmentation de la perte fécale en lipides) et d'autre part par une augmentation de l'oxydation entérocytaire des acides gras (Uchida *et al.*, 2011).

***L'ensemble de ces données suggère fortement que les PPARs pourraient moduler le métabolisme entérocytaire des lipides alimentaires.***

# Problématique

L'hypertriglycéridémie postprandiale associée à l'obésité, au syndrome métabolique, et à l'insulino-résistance a été identifiée comme étant un facteur de risque des maladies cardiovasculaires. Comme nous venons de le voir, l'intestin contribue activement à la régulation de la triglycéridémie postprandiale en contrôlant le rapport de la quantité d'ApoC-II et d'ApoC-III contenues dans les chylomicrons qui lui-même régule l'activité de la LPL. De plus, l'efficacité de la lipodation de l'ApoB48 est également un paramètre fondamental de l'hypertriglycéridémie postprandiale. En effet, la LPL est plus efficace sur un petit nombre de gros chylomicrons que sur un grand nombre de petits chylomicrons. Plusieurs LBPs sont impliquées dans la lipodation de l'ApoB48, d'une part la quantité d'ApoB48 elle-même dont l'expression est dépendante de l'ApoBec1 et de l'ACF, d'autre part la MTP et l'ApoAIV. La L-FABP et SAR1b quant à eux, sont nécessaires à la sécrétion de gros chylomicrons

La synthèse de la littérature a montré que la consommation de forte quantité de lipides conduit à une augmentation de la taille des chylomicrons et non pas de leur nombre (Cartwright & Higgins, 1999). Est-ce que cet effet est la conséquence d'une modification du métabolisme lipidique en particulier de l'efficacité de la lipodation de l'ApoB48 ?

Une telle hypothèse était soutenue au début de ma thèse par les travaux récents du Laboratoire qui venaient de démontrer que l'intestin grêle était capable de s'adapter à la teneur en lipides du régime alimentaire (Petit *et al.*, 2007), contrairement à ce qui est admis depuis longtemps. En effet, 3 semaines de régime hyperlipidique contenant 40% en masse de lipides et équilibré en acides gras (huile Isio 4 contenant 8,5% d'acides gras saturés, 60,5% d'acides gras mono-insaturés (18:1, n-9), 31% d'acides gras poly-insaturés (25,8% de 18:2, n-6; 5,2% de 18:3, n-3) conduisent à une augmentation des capacités d'absorption des lipides et à une diminution de l'hypertriglycéridémie postprandiale en comparaison avec des animaux en régime normolipidique contenant 3% de lipides en masse et la même distribution d'acides gras. Ces effets sont la résultante de deux phénomènes probablement complémentaires :

- Une augmentation de la surface d'absorption intestinale (augmentation du nombre d'entérocytes),
- Une induction coordonnée de l'expression des gènes clefs de l'absorption intestinale des lipides impliqués dans le captage, le trafic intracellulaire, la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines.

Notre premier objectif était de savoir si cette adaptation résultait d'une augmentation du nombre des cellules entérocytaires ou si elle reflétait une induction de l'expression des gènes impliqués dans l'absorption des lipides par les lipides alimentaires. Pour vérifier si la formation de gros chylomicrons est la conséquence d'une adaptation postprandiale de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, nous avons mesuré leur expression au cours de l'absorption intestinale d'un apport unique en lipides.

L'existence d'une adaptation métabolique suggère la présence d'un système de détection des lipides alimentaires ingérés au niveau des entérocytes capable de conduire à la régulation coordonnée des gènes du métabolisme des lipides. Puisque les PPARs sont capables de réguler la majorité des LBPs, ces récepteurs nucléaires ont été également étudiés au cours de l'absorption des lipides.

La pertinence de ce système de détection, suggère l'existence d'un récepteur aux lipides alimentaires au niveau même de la membrane apicale des entérocytes. La synthèse de la bibliographie a montré que parmi les LBPs membranaires, CD36 est la LBP membranaire qui affecte le plus la formation des chylomicrons conduisant à une hypertriglycémie postprandiale chez la souris (Drover *et al.*, 2005) et chez l'Homme (Masuda *et al.*, 2009). Cependant sa fonction exacte dans ce mécanisme reste à déterminer. Des données récentes du Laboratoire ont ouvert une autre piste quand à la fonction de cette LBP. En effet, il a été démontré comme étant un lipido-récepteur au niveau des papilles gustatives (Laugerette *et al.*, 2005; El-Yassimi *et al.*, 2008; Gaillard *et al.*, 2008). C'est pourquoi nous nous sommes focalisés au cours de cette thèse sur l'étude de cette LBP membranaire.

**Par conséquent au cours de cette thèse, nous avons tenté de répondre aux questions suivantes :**

- **Existe-t-il une adaptation postprandiale du métabolisme intestinal des lipides ?**
- **PPAR $\beta$  joue-t-il un rôle dans cette adaptation ?**
- **CD36 est-il un lipido-récepteur entérocytaire des lipides ?**

# Résultats

**Quel est l'impact des lipides  
alimentaires sur la régulation  
postprandiale du CD36 ?**

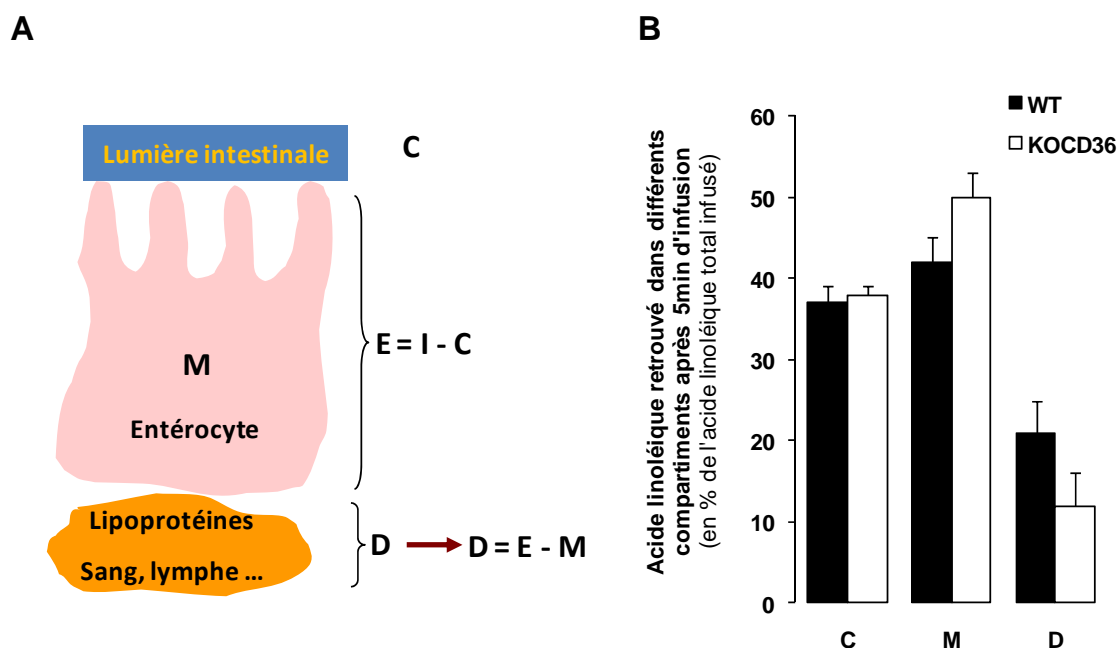
## 1 Le CD36 intestinal n'est pas un transporteur efficace aux AGLC

Il a été précédemment démontré au Laboratoire dans le cadre de la thèse de Lionel Clément, que le CD36 n'était pas nécessaire au transport efficace des lipides au niveau intestinal.

Pour rappel, cette expérience a été réalisée en utilisant le modèle de l'anse jéjunale isolée *in situ* (Figure 41) chez les souris sauvages et KOCD36 (Petit *et al.*, 2007). Rapidement, cette méthode consiste à isoler après le ligament de Treitz un segment jéjunal de 10 cm entre deux ligatures et d'y infuser une émulsion lipidique contenant 2,18 mM d'acide linoléique (dont 10% d'acide linoléique marqué [ $1-^{14}\text{C}$ ]) émulsifié par de l'acide taurocholique (10 mM). Cinq minutes après l'infusion, l'anse jéjunale isolée est récupérée et les lipides contenus dans la lumière intestinale et dans la muqueuse sont extraits par la technique de Delsal (Delsal, 1954). La quantité d'AGLC entrée (E) (ou captée) est estimée en soustrayant la quantité de radioactivité restante dans la lumière intestinale (C) à la quantité de radioactivité infusée (I) :  $E = I - C$ . De plus, la mesure de la radioactivité retrouvée dans la muqueuse (M), retranchée à la radioactivité entrée (E), permet d'évaluer la radioactivité dite disparue (D). Cette valeur D correspond majoritairement à la radioactivité portée par les AGLC intégrés dans les lipoprotéines et sécrétés dans la lymphe (Figure 41-A).

Comme le montre la Figure 41-A, le pourcentage d'AGLC radiomarqués restant dans la lumière intestinale était de l'ordre de 38% quel que soit le groupe d'animaux considéré. Cela indique que l'inactivation du gène codant pour la protéine CD36 n'altère pas le captage intestinal des AGLC. On observe une tendance à la diminution de la quantité de radioactivité sécrétée chez les animaux KOCD36, ce qui soutient l'hypothèse d'une diminution de la sécrétion des chylomicrons.

Ces données indiquent que le CD36 n'est pas indispensable au captage des AGLC alimentaires et que de ce fait CD36 pourrait exercer un autre rôle et en particulier celui d'un récepteur membranaire aux AGLC au niveau intestinal. Nous avons poursuivi nos travaux en étudiant la régulation de la protéine CD36 au cours de l'absorption des lipides, puisque cette protéine est susceptible de subir de nombreuses régulations post-transcriptionnelles.



**Figure 41 : L'inactivation du gène CD36 n'altère pas le captage de l'acide linoléique au niveau entérocytaire chez la souris.**

Des souris sauvages (WT) ou KOCD36 ont été mises à jeun une nuit puis anesthésiées. Une solution contenant 2180  $\mu\text{M}$  d'acide linoléique (donc 10% de  $1\text{-}^{14}\text{C}$  acide linoléique) et 10 mM de taurocholate de sodium a été traitée à l'ultrason pour former des micelles. 0.5mL de chaque solution a été incubé pendant 5 minutes dans une anse intestinale isolées de 10 cm de long. A la fin de l'incubation, l'anse intestinale a été prélevée et rincée de son contenu intestinal (C), et la muqueuse a été grattée (M). Les lipides totaux ont été extraits des 2 fractions par la méthode Delsal.

A : Méthode de calcul. I : radioactivité infusée ; C : radioactivité restante dans le contenu intestinal ; M : radioactivité mesurée dans la muqueuse ; E : radioactivité entrée; D : radioactivité secrétée dans le milieu intérieur « disparue » ;

B : Le pourcentage de l'acide linoléique radio-marqué retrouvé dans différents compartiments (contenus C, M et D) après 5 minutes d'infusion. Les valeurs sont exprimées en % de l'acide linoléique total infusé. Moyenne  $\pm$  sem, n=3.

## 2 Les lipides alimentaires déclenchent une disparition rapide du CD36 présent au niveau de la membrane apicale des entérocytes

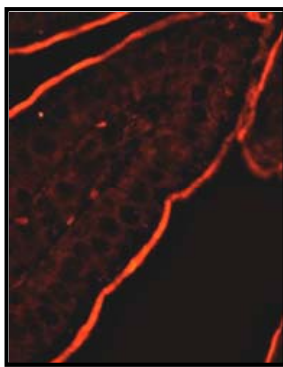
Nous avons réalisé une étude d'immuno-histochimie pour connaître la régulation et la localisation de la protéine CD36 en fonction de l'état nutritionnel de l'animal. Comme le montre la Figure 42-A, nous observons clairement, chez les souris à jeun, un immuno-marquage de CD36 localisé à la périphérie des villosités ce qui correspond aux microvillosités intestinales. Nous avons testé de nombreux anticorps commerciaux, seul celui commercialisé par R&D system est spécifique du CD36 murin.



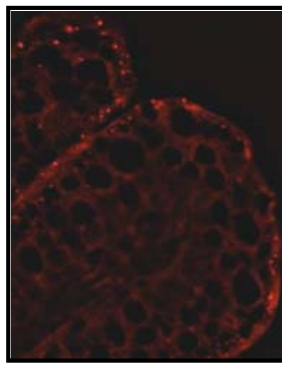
De façon très étonnante, nous constatons une forte disparition de cet immuno-marquage chez les souris soumises à un gavage avec de l'huile et sacrifiées 4 heures après.

Pour vérifier que ce phénomène n'est pas uniquement observé en situation de forte charge en lipides et chez la souris, nous avons également évalué cette régulation chez le rat à jeun re-nourri avec un repas contenant ou pas des lipides. Cette disparition membranaire du CD36 est un phénomène physiologique puisque nous la retrouvons chez le rat re-nourri avec un repas standard contenant seulement 3% de lipides (en masse) (Figure 42-B). De plus, le fait que nous observons un signal semblable à celui des rats témoins à jeun chez les animaux re-nourris avec un régime alipidique montre que cette régulation est dépendante des lipides alimentaires.

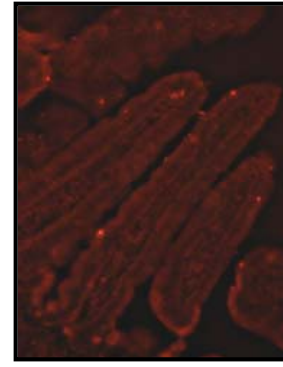
#### A- SOURIS



WT à jeun

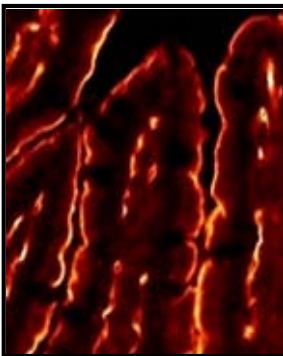


WT gavée huile 4h

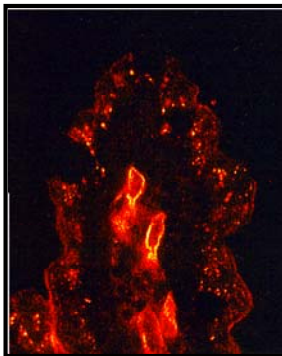


KOCD36 à jeun

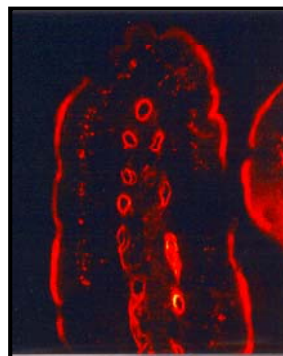
#### B- RAT



A jeun



Re-nourri régime standard 3% lipide



Re-nourri régime alipidique

**Figure 42 : Les lipides alimentaires déclenchent une disparition de la protéine CD36 de la membrane apicale des cellules des villosités chez les rongeurs (souris et rat).**

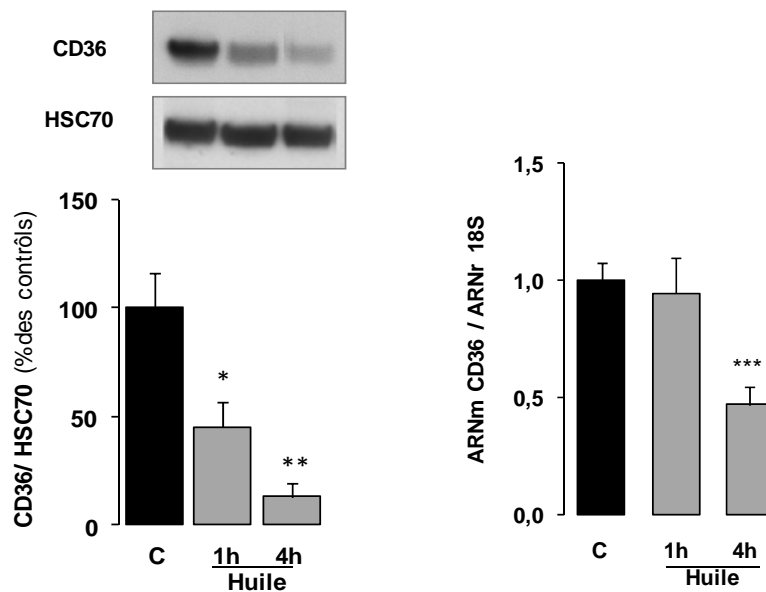
*A : Immuno-localisation du CD36 dans l'épithélium jéjunal de la souris. Les échantillons des souris contrôles à jeun ont été comparés à ceux de souris gavées 4 heures après gavage avec 0,5 mL d'huile Isio 4. L'absence d'immuno-marquage du CD36 sur des coupes de souris KOCD36 démontre la spécificité de l'anticorps anti-CD36 (R&D System).*

*B : Immuno-localisation du CD36 dans l'épithélium jéjunal de rat. Les échantillons des rats contrôles à jeun ont été comparés à ceux des rats re-nourris 6h après un repas standard contenant 3% de lipides (en masse), ou un repas alipidique. L'immuno-marquage du CD36 a été réalisé en utilisant un anticorps CD36 fabriqué chez le lapin (Poirier et al., 1996).*

Cette technique ne permet pas de déterminer si le CD36 est internalisé dans les compartiments intracellulaires ou s'il est dégradé. Pour répondre à cette question, nous avons par la suite estimé par western blotting la quantité du CD36 retrouvée dans la muqueuse jéjunale de souris à jeun et gavées avec de l'huile.

### 3 Les lipides alimentaires diminuent la quantité du CD36 présent dans la muqueuse jéjunale

Comme son taux d'ARNm, la quantité totale de la protéine CD36 dans la muqueuse jéjunale est diminuée par la consommation de lipides alimentaires (-50% à 1 heure et -75% à 4 heures après le gavage). Ces données corroborent les résultats d'immuno-histochimie (Figure 42). Cependant, comme le montre la Figure 43, la diminution de la protéine précède celle de l'ARNm puisqu'elle est déjà significative dès 1 heure après le gavage alors que le taux d'ARNm est encore stable.



**Figure 43 : Effet de la charge lipidique sur l'expression protéique et génique du CD36.**

*L'expression protéique du CD36 dans la muqueuse jéjunale a été analysée par western blotting à partir de 100µg protéine d'homogénat total en utilisant un anticorps anti-CD36 (R&D system) et en utilisant la protéine HSC70 comme contrôle de dépôt. Le signal est représentatif de quatre échantillons indépendants.*

*Le taux d'ARNm de la muqueuse jéjunale a été analysé par PCR en temps réel et rapporté à la quantité d'ARNr 18S. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± SEM et ont été comparés à ceux des souris contrôles par le test t, n=4, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*P<0,001.*

Ce résultat suggère que, premièrement la régulation de la protéine CD36 à 1 heure n'est pas d'origine transcriptionnelle, et que, deuxièmement la disparition membranaire observée en immuno-histochimie n'est pas liée à une internalisation suivie d'une accumulation du CD36 mais probablement à une dégradation. Ces données ont été confirmées par la réalisation d'un fractionnement subcellulaire de muqueuse jéjunale de rats qui a clairement montré que la diminution du CD36 de la muqueuse correspond à la diminution du CD36 contenu dans la fraction purifiée de microvillosités intestinales (Tran *et al.*, 2011).

Ces données obtenues à la fois chez le rat et la souris suggèrent que la régulation du CD36 par les lipides est un phénomène indépendant de l'espèce considérée.

#### 4 Les lipides alimentaires déclenchent une poly-ubiquitination du CD36

Les cellules possèdent plusieurs voies protéolytiques intracellulaires dont la principale est la voie ubiquitine-protéasome. Ce système participe largement à la régulation et la dégradation des protéines transmembranaires (Miranda & Sorkin, 2007). Il fonctionne en deux grandes étapes (Figure 44) :

- Etape 1 : ubiquitination de la protéine cible,
- Etape 2 : dégradation de la protéine ubiquitinée au niveau du protéasome.

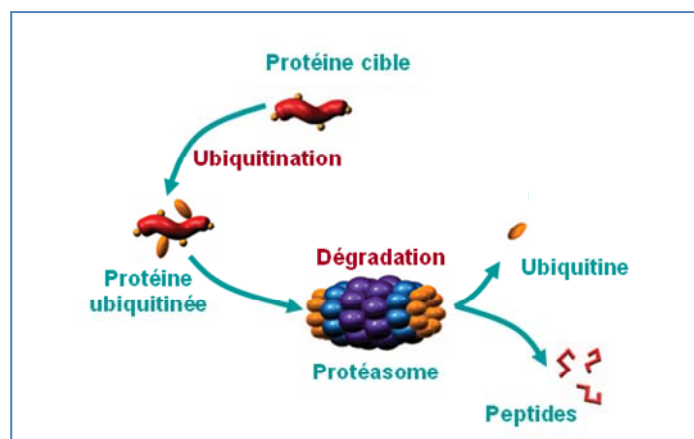
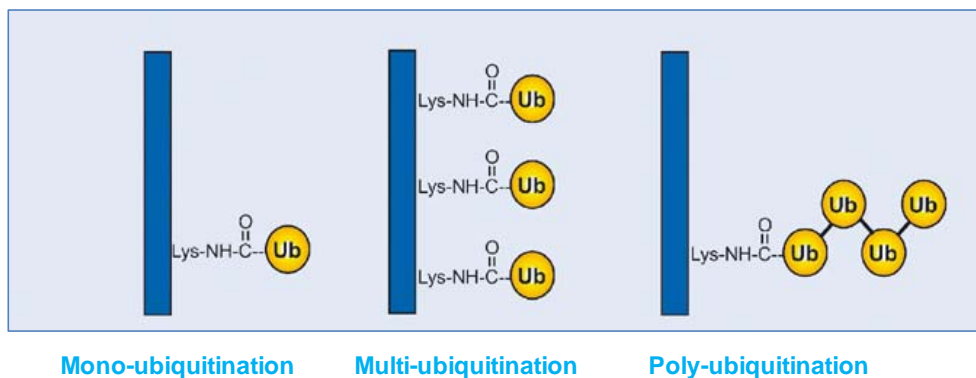


Figure 44 : Schéma présentant les principales étapes de la voie de dégradation ubiquitine-protéasome d'une protéine (adapté d'après (Schwartz & Ciechanover, 2009)).

L'ubiquitination consiste en l'accrochage d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine sur une protéine cible par l'intermédiaire d'une cascade enzymatique (Schwartz & Ciechanover, 2009). L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés qui se lie réversiblement par liaison covalente entre son  $\alpha$ -carboxyle et le  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> d'une lysine située sur la protéine cible.



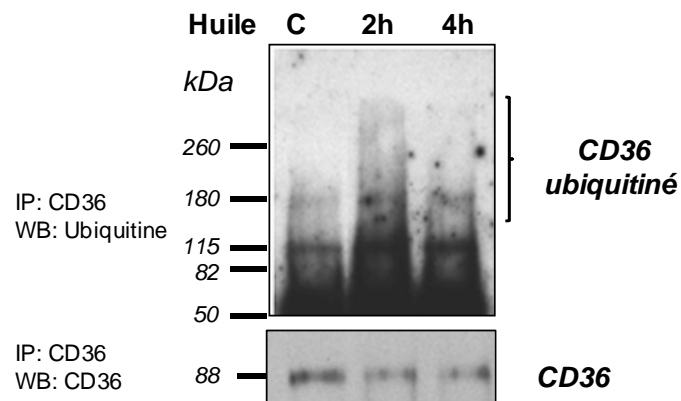
**Figure 45 : Différents types d'ubiquitination (adapté de (Marmor & Yarden, 2004)).**

Il existe plusieurs types d'ubiquitination :

- Formation de chaînes de poly-ubiquitines comportant au minimum quatre molécules d'ubiquitines qui se lient entre elles par l'intermédiaire de leurs lysines. L'ubiquitine possède 7 lysines internes mais la majorité des chaînes de poly-ubiquitination utilisent les lysines 48 ou 63 (plus rarement la 29). La poly-ubiquitination sur la lysine 48 entraîne essentiellement la dégradation de la protéine cible par le protéasome alors que la poly-ubiquitination sur la lysine 63 est plus impliquée dans le recyclage.
- Les protéines substrats peuvent également être mono-ubiquitinées et multi-ubiquitinées (plusieurs ubiquitines sur des sites différents). Dans la majorité des cas les mono et multi ubiquitinations ont des fonctions physiologiques indépendantes de la dégradation par le protéasome et permettent notamment la régulation de la signalisation, du trafic ou de la localisation de certaines protéines (Andermarcher *et al.*, 2005).

L'ubiquitination est par conséquent une voie majeure de la régulation de la localisation cellulaire et de la demi-vie des protéines membranaires (Marmor & Yarden, 2004).

Afin de vérifier si le CD36 est dégradé par le système de l'ubiquitine-protéasome, nous avons dans un premier temps comparé le niveau du CD36 ubiquitiné sur des homogénats de muqueuses provenant d'animaux gavés ou non avec de l'huile. Cette détection a nécessité une immuno-précipitation du CD36 à l'aide de l'anticorps anti-CD36 (R&D system) puis la détection par western blotting de l'ubiquitine sur ces « immuno précipités » (anticorps anti-ubiquitine Zymed Laboratories, Invitrogen).



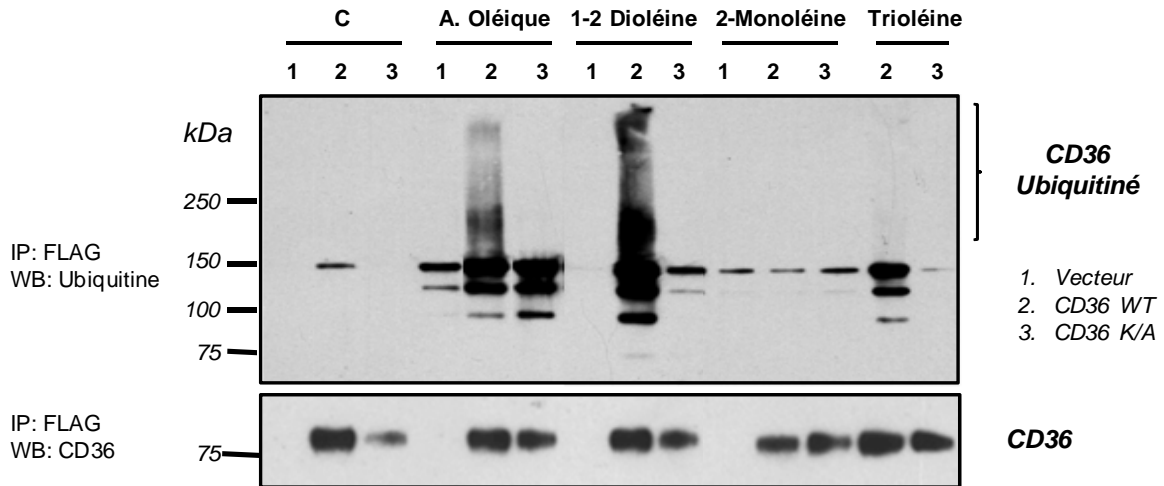
**Figure 46 : L'ingestion de lipides alimentaires déclenche chez la souris une poly-ubiquitination du CD36 intestinal.**

Les souris contrôles à jeûn (C) ont été gavées avec 0,5 ml d'huile de tournesol puis sacrifiées 2h et 4h après le gavage. Les homogénats de la muqueuse jéjunale ont été immunoprécipités (IP) avec des anticorps anti-CD36 (R&D System) et les immuno-complexes ont été analysés par western blotting (WB) avec les anticorps anti-ubiquitine (Invitrogen) ou anti-CD36 (R&D system). Les données sont représentatives de 3 expériences différentes.

Comme le montre la Figure 46, 2 heures et 4 heures après l'ingestion de lipides alimentaires, on observe du CD36 ubiquitiné. En effet, des « smears » correspondant à des tailles différentes du CD36 ubiquitiné ont été détectées par western blotting (Figure 46). L'ubiquitination est maximale à 2 heures, temps auquel le CD36 est déjà dégradé.

Nos résultats démontrent donc que les lipides alimentaires déclenchent *in vivo* une poly-ubiquitination du CD36. Pour identifier quels produits de la digestion des TG alimentaires (1,2-diglycérides, 2-monoglycérides et/ou AGLC libres) sont à l'origine de l'ubiquitination du CD36 intestinal, des expériences *in vitro* ont été réalisées en collaboration par l'équipe du Dr Nada Abumrad (Département de Médecine, Centre de Nutrition humaine, Université de Washington, St Louis, États-Unis).

Pour réaliser ces expériences, des cellules d'ovaires issues de hamster (CHO) ont été transfectées de manière stable avec le vecteur d'expression du CD36 humain. De plus, afin de déterminer quelle lysine participe à l'ubiquitination, les cellules CHO ont également été transfectées avec le vecteur d'expression du CD36 humain dont la Lys-469 et la Lys-472 situées dans la partie C-terminale du CD36 ont été remplacées par deux alanines.



**Figure 47 : Identification des produits de digestion des lipides alimentaires à l'origine de la poly-ubiquitination du CD36 humain.**

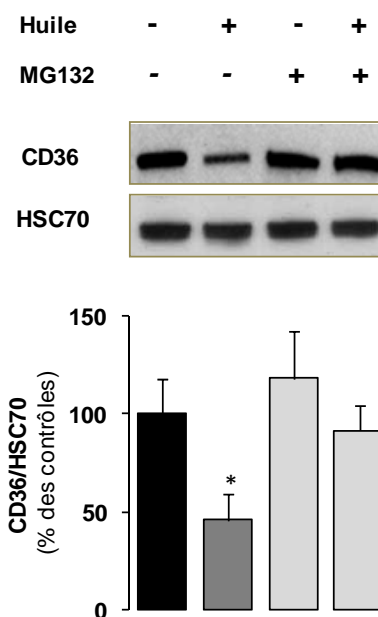
Des cellules CHO ont été transfectées avec un vecteur vide (pistes 1), FLAG-CD36 (pistes 2), ou CD36 double-muté (K469A et K472A) (pistes 3) puis traitées 2 heures avec soit de l'acide oléique, soit de la 1-2 dioléine, soit de la 2-monooléine (100  $\mu$ M) complexés avec de la BSA. Les lysats cellulaires ont été immunoprécipités (IP) à l'aide d'un anticorps anti-FLAG. Les immuno-complexes ont ensuite été analysés par western blotting (WB) en utilisant un anticorps anti-ubiquitine ou un anticorps anti-CD36.

L'incubation des cellules CHO pendant 2 heures en présence de 100  $\mu$ M d'un des produits de la digestion des TG, a montré que seul l'acide oléique et la 1,2-dioléine conduisaient à l'ubiquitination du CD36 (Figure 47-piste 2). En revanche, la 2-monooléine et la trioléine n'induisaient pas son ubiquitination. Soulignons que la 1,2-dioléine est retrouvée en faible quantité dans la lumière intestinale puisqu'elle correspond à l'hydrolyse des TG par la lipase gastrique. Par conséquent, l'ubiquitination est majoritairement déclenchée par les AGLC qui sont des ligands du CD36.

De plus, comme le montre la Figure 47-pistes 3, il n'y a plus de trace d'ubiquitination du CD36 dans les cellules transfectées avec la forme mutée du CD36 et traitées avec les AGLC et la 1,2 dioléine. Ce résultat démontre que les sites de la Lys-469 et de la Lys-472 sont impliqués dans l'ubiquitination du CD36 déclenchée par les produits de digestion des lipides alimentaires.

## 5 Le MG132 bloque la dégradation du CD36 chez la souris soumise à une charge lipidique

Comme décrit précédemment, l'ubiquitination conduit, soit à une dégradation, soit à un recyclage membranaire des récepteurs (Miranda & Sorkin, 2007). Pour vérifier l'implication du protéasome dans la disparition du CD36 en présence de lipides, nous avons traité les animaux avec un inhibiteur du protéasome avant le gavage, le MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al). Le MG132 pénètre facilement dans les cellules et bloque la fonction du protéasome, sans affecter les processus biologiques normaux comme la synthèse des protéines (Alexandrova *et al.*, 2008).



**Figure 48 : Le MG132 bloque la dégradation du CD36 intestinal chez la souris soumise à une charge lipidique.**

Des souris C57B16 mises à jeun la veille, ont été gavées avec 0,5 mL d'huile en ayant été préalablement traitées soit avec du MG132 (14mg/kg de souris dans 100 $\mu$ L) dissout dans du DMS, soit du DMSO seul (100 $\mu$ L), puis sacrifiées 4 heures après leur gavage. L'expression protéique du CD36 dans la muqueuse jéjunale a été analysée par western blotting à partir de 15 $\mu$ g protéines issues d'homogénat total en utilisant un anticorps anti-CD36 (R&D system). La protéine HSC70 a été utilisée comme contrôle de dépôt. Le signal est représentatif de quatre échantillons indépendants. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM et ont été comparés à ceux des souris contrôles par le test *t* de Student,  $n=4$ ,  $*p<0.05$ .

Le résultat présenté dans la Figure 48 confirme que les lipides déclenchent une diminution de la protéine CD36. Cette diminution est abolie en présence du MG132 démontrant l'implication du protéasome dans la dégradation du CD36.

*L'ensemble de nos données montre que les lipides alimentaires déclenchent rapidement une dégradation de la protéine CD36 via le système ubiquitine – protéasome. Cette régulation ressemble à celle des protéines de type récepteur, comme le récepteur à l'Epidermal Growth factor (EGF) (Kirisits et al., 2007). En effet, suite à la liaison avec le ligand, le récepteur est souvent internalisé et dégradé permettant une désensibilisation de la cellule vis-à-vis du ligand. Selon ce scénario, le CD36 pourrait être un récepteur aux AGLC à l'origine d'une signalisation cellulaire comme décrit au niveau des papilles gustatives (El-Yassimi et al., 2008; Gaillard et al., 2008), déclenchant une activation de la formation des chylomicrons.*



**Le CD36 déclenche-t-il une  
signalisation cellulaire en présence de  
lipides alimentaires ?**

Il a été montré que la liaison du CD36 avec certains de ses ligands induit l'activation des kinases de la famille MAPKs, en particulier des ERK1/2 (Baranova *et al.*, 2010; Kuda *et al.*, 2011). Or cette voie de signalisation est impliquée dans la formation et la sécrétion des lipoprotéines hépatiques et intestinales (Federico *et al.*, 2006; Tsai *et al.*, 2007). C'est pourquoi nous nous sommes tout d'abord focalisés sur l'étude du lien entre CD36 et l'activation des ERK1/2.

## 1 Le CD36 active les ERK1/2 et induit l'expression protéique de l'ApoB48 et de la MTP en présence d'AGLC sur des segments intestinaux *ex vivo*

### 1.1 Mise au point d'un modèle de culture de segments intestinaux

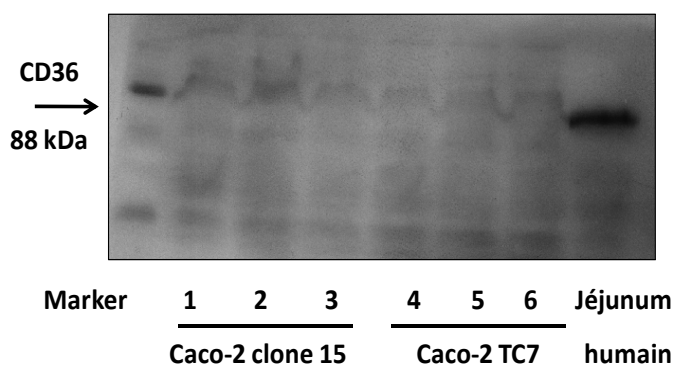
Pour étudier la signalisation cellulaire, nous avons dû choisir un modèle intestinal *in vitro* exprimant le CD36 et dont les caractéristiques morphologiques et biochimiques sont proches des entérocytes et en particulier sont capables de synthétiser des chylomicrons.

A l'heure actuelle différents modèles de cultures cellulaires ou d'explants sont décrits dans la littérature comme le montre le Tableau 4 (Chopra *et al.*, 2010).

**Tableau 4 : Modèles intestinaux de cultures cellulaires et d'explants.**

Cellules / Explants	Origine	Avantages/ Inconvénients
IEC-6	Cellules cryptiques, fœtales, indifférenciées Souris ou Homme	Pas de marqueur de différenciation entérocytaire Pas de formation de chylomicrons (Quaroni & May, 1980)
Caco-2	Cellules issues d'un adénocarcinome Homme	Expression du CD36 dans le clone 15 (Ravid <i>et al.</i> , 2008; Mailhot <i>et al.</i> , 2010) Pas d'expression du CD36 ni de la I-FABP dans le clone TC7 (Beaslas <i>et al.</i> , 2009) Métabolisme lipidique hépatique (Levy <i>et al.</i> , 1995)
Cultures primaires d'entérocytes	Entérocytes isolés par méthode mécanique utilisant des enzymes ou des agents chélateurs	Viabilité faible. Dédifférenciation rapide, perte de polarité et de la couche d'eau non agitée (Weiser, 1973; Fouquet <i>et al.</i> , 2004; Oba <i>et al.</i> , 2004)
Segments intestinaux	Segments intestinaux ouverts longitudinalement	Peu de manipulations, présence de la couche d'eau non agitée et maintien de l'architecture intestinale (Pardo <i>et al.</i> , 2007)

Les cellules Caco-2 sont issues d'un adénocarcinome humain. Elles se différencient et acquièrent les caractéristiques morphologiques des entérocytes (polarité cellulaire, microvillosités ainsi que certaines enzymes caractéristiques des entérocytes comme la sucrase iso-maltase). Même si ces cellules n'expriment pas dans des conditions classiques de culture la I-FABP et qu'elles possèdent un métabolisme des lipides plus proche du foie (estérification des TG essentiellement à partir de la voie de  $\alpha$ -glycérophosphate) que de l'intestin, elles sont capables de sécréter des lipoprotéines riches en TG et contenant de l'ApoB48 (Levy *et al.*, 1995). Parmi les différents clones de Caco2, seul le clone 15 est rapporté comme exprimant le CD36 (Ravid *et al.*, 2008; Mailhot *et al.*, 2010). L'ensemble des caractéristiques du clone 15 répondait par conséquent à nos besoins, c'est pourquoi nous avons tout d'abord utilisé ce clone fourni par le Dr Lévy du Centre de recherche du CHU Ste-Justine, Montréal, Canada. Notre première approche a été de vérifier que des cellules différenciées après 15 jours de confluence expriment bien le CD36. Nous avons ainsi réalisé un western blotting en utilisant l'anticorps anti-CD36 (H300, Santa-Cruz), qui reconnaît, une seule bande à 88 kDa correspondant au CD36 dans la muqueuse de jéjunum humain, comme le montre la Figure 32. En revanche, nous n'avons pas détecté de signal dans les cellules Caco-2 différenciées du clone 15, ni dans les cellules du clone TC7 comme attendu et ce malgré l'utilisation de 3 fois plus de protéines de lysats (Figure 49). Cette absence d'expression a été confirmée par qPCR en temps réel où aucune amplification n'a été observée. Ces résultats contradictoires avec ceux de la littérature pourraient s'expliquer par l'utilisation par ces auteurs d'un anticorps non spécifique à la protéine CD36, l'analyse des ARNm n'ayant pas été réalisée dans ce travail.



**Figure 49 : Détection du CD36 dans les clones 15 et TC7 des cellules Caco-2**

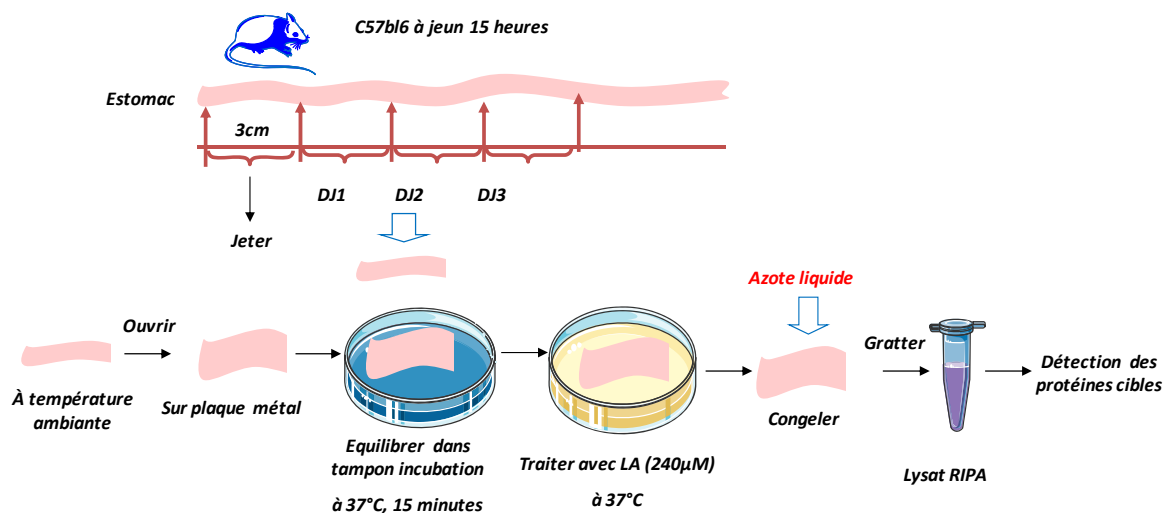
*L'expression protéique du CD36 dans les cellules Caco-2 a été analysée par western blotting à partir de 150 $\mu$ g de protéines issues de lysats cellulaires, en utilisant un anticorps anti-CD36 (SantaCruz, sc-9154). Un dépôt de 50 $\mu$ g de protéines de lysat de jéjunum humain a été déposé comme contrôle positif. Pistes 1, 2, 3 : lysats de Caco-2 clone 15 à 15 jours de différenciation ; Pistes 4, 5, 6 : lysats de Caco-2 TC7 à 15 jours de différenciation.*

A côté des lignées immortalisées, de nombreuses équipes utilisent un modèle de cultures primaires d'entérocytes isolés obtenus par différents traitements :

- mécaniques associés à des gradients d'osmolarité (Weiser, 1973),
- enzymatiques (Oba *et al.*, 2004)
- par des agents chélateurs comme le Matrisperse (Fouquet *et al.*, 2004).

Ces cellules une fois isolées, perdent leur couche d'eau non agitée, leur polarisation et se différencient très rapidement (Storch *et al.*, 2008). Ces inconvénients sont limitants pour nos études.

Pour limiter les manipulations, nous avons finalement réalisé des cultures de segments intestinaux de souris. Cette technique consiste à isoler des segments jéjunaux de 3 cm, ouverts longitudinalement et cultivés dans un milieu adapté (Levy *et al.*, 2006; Pardo *et al.*, 2007). Ce modèle est pertinent puisque la couche d'eau non agitée et l'architecture tissulaire sont conservées. De plus, face aux modèles cellulaires, ce modèle permet d'étudier l'impact de l'inactivation d'un gène en utilisant des segments issus d'animaux transgéniques (Figure 50).



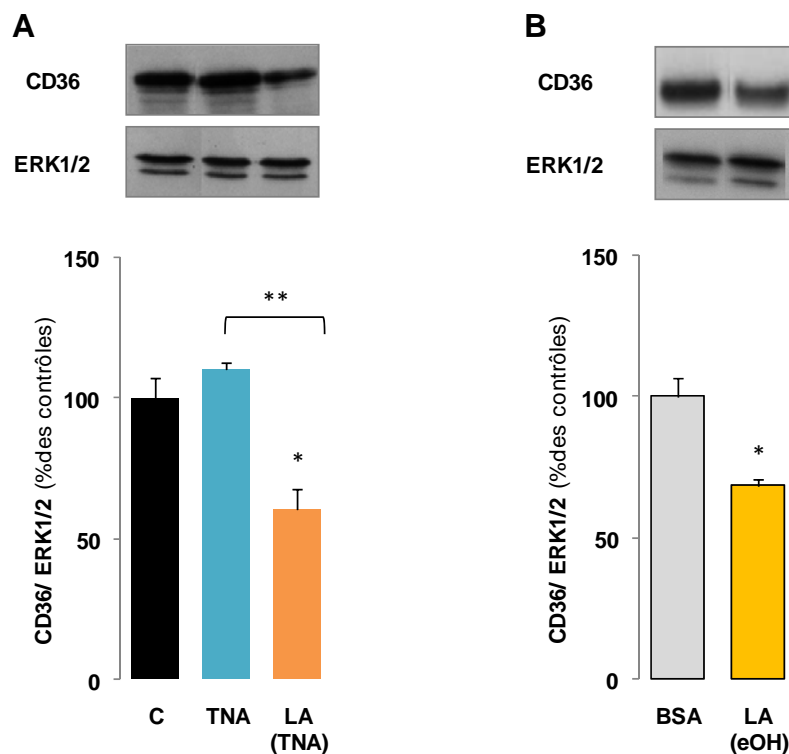
**Figure 50 : Description du modèle *ex vivo* de segments intestinaux.**

Des souris mâles C57Bl6, âgées de 10-12 semaines, mises à jeun la veille, sont anesthésiées à l'isoflurane. La partie proximale de l'intestin grêle est prélevée. Les trois premiers cm sont enlevés et les 9 cm suivants sont divisés en 3 segments de longueur identique. Ces segments sont ouverts longitudinalement sur une plaque de métal (à température ambiante), puis pré-incubés pendant 15 min dans un milieu iso-osmolaire riche en glucose (NaCl 154 mM, KCl 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Na/MOPS 10 mM pH 7.3, Glucose 5.6 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM et 0.2% BSA (fraction V)) à 37°C. Après incubation dans le milieu à tester, les segments sont immergés dans de l'azote liquide. La muqueuse intestinale encore congelée est alors récupérée par grattage et lysée dans un tampon RIPA froid (4°C) contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases.

Des expériences de mises au point du modèle nous ont permis d'établir les conditions optimales de culture qui sont présentées dans la légende de la Figure 50. Ce modèle *ex vivo*, nous a permis d'étudier par la suite le lien entre le CD36 et l'activation des ERK1/2.

## 1.2 Les acides gras à longue chaîne déclenchent directement la disparition du CD36 intestinal

Notre première approche a été de vérifier si, sur ce modèle, nous reproduisons la dégradation-lipides dépendante du CD36 observée *in vivo*. Nous avons choisi d'apporter l'acide linoléique aux cellules soit sous forme émulsifiée avec le taurocholate de sodium (acide biliaire majoritaire chez la souris) qui mime les conditions physiologiques, soit complexé avec de l'albumine bovine délipidée (BSA, Fraction V, rapport AG/BSA= 8:1).



**Figure 51 : L'acide linoléique émulsifié avec du taurocholate de sodium ou complexé avec de la BSA déclenche une diminution de la protéine CD36 dans des segments intestinaux en culture.**

*A : Les segments issus de souris sauvages mises à jeun la veille (contrôle – C), ont été traités avec du taurocholate de sodium (TNA, 2400 $\mu$ M) ou de l'acide linoléique (LA, 800 $\mu$ M) émulsifié avec du TNA (2400 $\mu$ M) pendant 10 minutes.*

*B : Les segments issus des souris sauvages mises à jeun la veille, ont été traités avec de l'acide linoléique (LA, 240 $\mu$ M) complexé avec de la BSA (Fraction V, 30 $\mu$ M) pendant 20 minutes.*

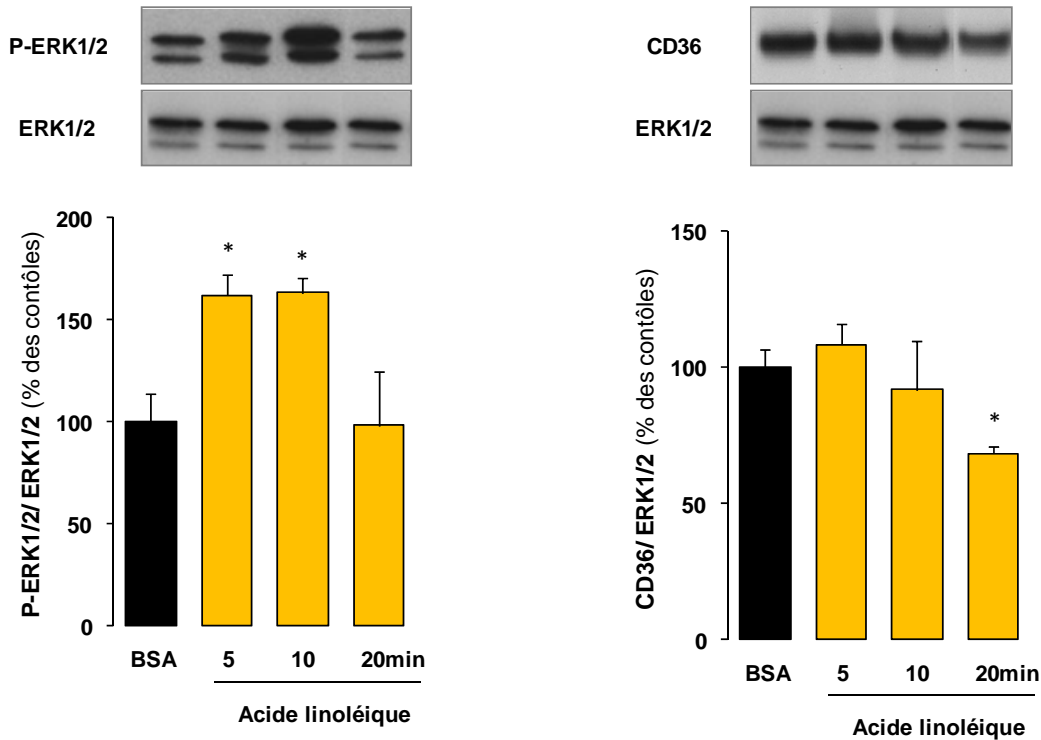
*L'expression protéique du CD36 dans la muqueuse jéjunale a été analysée par western blotting à partir de 15 $\mu$ g de protéines d'homogénat total en utilisant l'anticorps anti-CD36 (R&D system) et rapportée à la protéine ERK1/2 totales comme contrôle de dépôt. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM et ont été comparés à ceux des segments contrôles par le test t de Student, (n=4, \*p<0.05, p\*\*<0.01).*

Comme le montre la Figure 51, le taux du CD36 diminue significativement en présence de l'acide linoléique et ceci quelque soit le mode d'apport de l'acide gras. Ce résultat confirme nos données obtenues *in vivo* et démontre que les AGLC induisent directement la diminution du CD36.

Il a été démontré au niveau des Cacao-2 TC7 qui n'expriment pas CD36 que les micelles postprandiales qui contiennent en particulier des acides biliaries, du cholestérol et des 2-monoglycérides en plus des AGLC sont capables d'activer les ERK1/2 *via* SR-BI qui lie le cholestérol et les micelles mixtes (Beaslas *et al.*, 2009). C'est pourquoi, pour s'affranchir de la contribution de SRB-I, nous avons choisi pour la suite de cette étude de complexer les acides gras avec la BSA.

### **1.3 Le CD36 est nécessaire à l'activation des ERK1/2 par les AGLC sur des segments intestinaux *ex vivo***

Puisque la chute du CD36 est observée après 20 minutes d'incubation avec l'acide linoléique complexé avec de la BSA, pour savoir si CD36 est à l'origine de l'activation des voies ERK1/2, nous avons du travailler à des temps plus courts (5, 10, 20 minutes). Comme démontré précédemment, l'acide linoléique conduit à une diminution de la protéine CD36 (-30%) seulement après 20 minutes de traitement (Figure 52) qui est précédée par une augmentation de l'activation des ERK1/2 dès 5min de traitement (+60% des ERK1/2 phosphorylées) qui ne persiste pas après 10 minutes (Figure 52).



**Figure 52 : Cinétique de l'activation des voies ERK1/2 par l'acide linoléique sur des segments jéjunaux de souris en culture.**

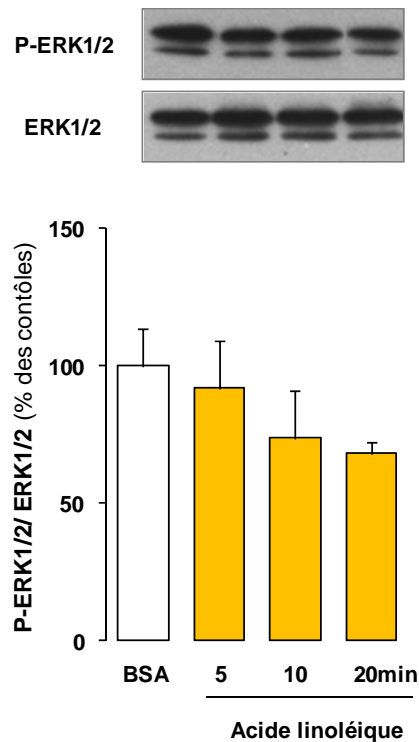
Les segments issus des souris sauvages mises à jeun la veille, ont été traités avec de l'acide linoléique (LA, 240 $\mu$ M) complexé avec de BSA (fraction V, 30 $\mu$ M) pendant 5,10, 20minutes.

L'expression protéique du CD36, des ERK1/2 phosphorylées et totales dans la muqueuse jéjunale ont été analysées par western blotting à partir de 15 $\mu$ g de protéines d'homogénat total en utilisant un anticorps anti-CD36 (R&D system), un anti-Phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204, Cell Signaling Technology) et un anti-ERK totales (Cell Signaling). Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM et ont été comparés à ceux des segments contrôles à jeun en présence de BSA par le test t de Student, (n=4, \*p<0.05).

#### 1.4 L'activation des ERK1/2 par les AGLC est CD36 dépendante

Afin de vérifier si l'activation des ERK1/2 est dépendante du CD36, nous avons étudié l'effet de l'acide linoléique sur l'activation des ERK1/2 sur des segments jéjunaux issus des souris KOCD36.

Comme le montre la Figure 53, quelque soit le durée du traitement, le niveau de phosphorylation des ERK1/2 est identique. Ce résultat démontre que le CD36 est nécessaire pour qu'il y ait une activation de cette voie de signalisation par les acides gras.



**Figure 53 : L'activation des ERK1/2 par l'acide linoléique dans des segments intestinaux en culture est CD36 dépendante.**

*Les segments issus de souris KOCD36 mises à jeun la veille, ont été traités avec l'acide linoléique (LA, 240 $\mu$ M) complexé avec de la BSA (fraction V, 30 $\mu$ M) pendant 5,10, 20 minutes.*

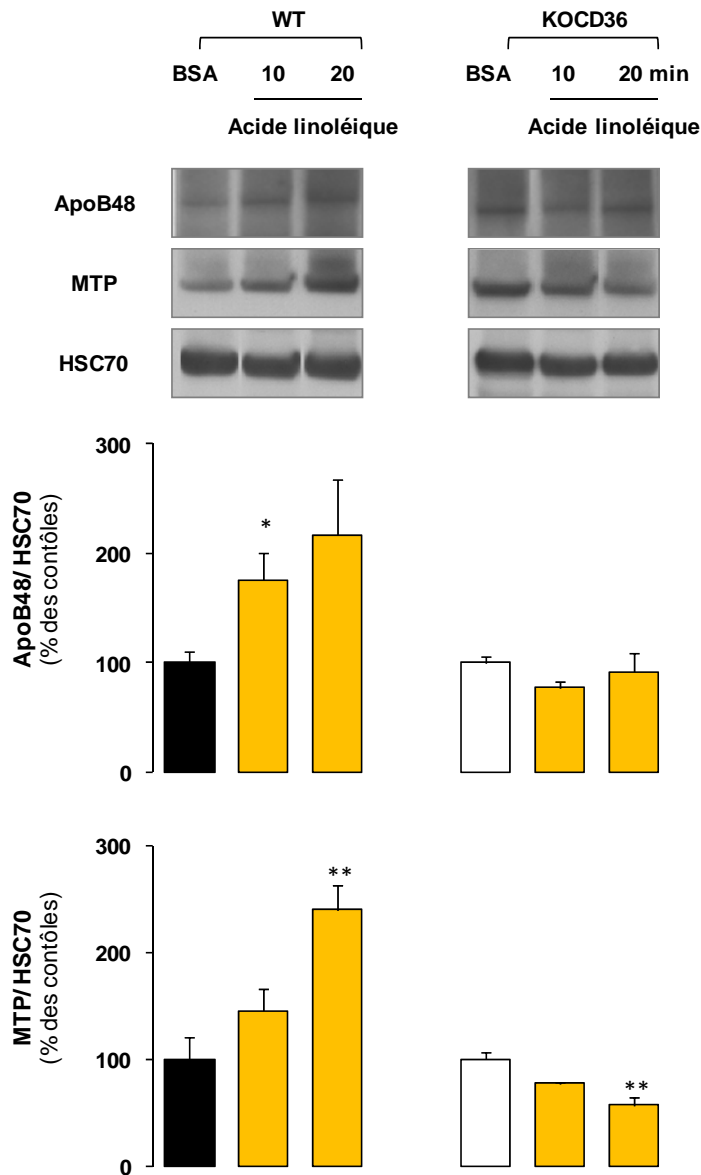
*L'expression protéique des ERK1/2 phosphorylées et des ERK totales dans la muqueuse jéjunale ont été analysées par Western blotting à partir de 15 $\mu$ g de protéines d'homogénat total en utilisant un anticorps anti-Phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204, Cell Signaling Technology) et anti-ERK1/2 (Cell Signaling Technology). Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM et ont été comparés à ceux des segments contrôles à jeun cultivés en présence de BSA par le test t de Student (n=4, \*p<0.05).*

L'ensemble de ces données démontre que l'activation des ERK1/2 déclenchée par l'acide linoléique est dépendante du niveau de CD36. En effet, la diminution du CD36 semble associée à la diminution de l'activation des ERK1/2.

Comme nous l'avons rapporté précédemment, il est démontré que le niveau d'activation des ERK1/2 participe à la formation des lipoprotéines en régulant la MTP et l'ApoB48 (Au *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2007). C'est pourquoi, nous avons étudié dans les mêmes expériences le niveau d'expression de ces deux protéines.



## 1.5 Le CD36 est nécessaire à l'induction de l'expression protéique de l'ApoB48 et de la MTP par les AGLC



**Figure 54 : Ex vivo, l'induction de l'ApoB48 et de la MTP par l'acide linoléique est dépendante du CD36.**

Les segments issus des souris sauvages et KOCD36 mises à jeun la veille, ont été traités avec de l'acide linoléique (LA, 240 $\mu$ M) complexé avec de la BSA (fraction V, 30 $\mu$ M) pendant 0, 10, 20minutes.

L'expression protéique de l'ApoB48 et de la MTP dans la muqueuse jéjunale ont été analysées par western blotting à partir de 100 $\mu$ g de protéines d'homogénat total en utilisant un anticorps anti-ApoB (Santa Cruz), et anti-MTP (BD Sciences). Les valeurs ont été rapportées à la protéine HSC70 (Santa Cruz Biotechnology) considérée comme un contrôle de dépôt. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM et ont été comparés à ceux des segments contrôles à jeun en présence de BSA par le test t de Student (n=4), \*p<0.05, \*\*p<0.01.

La Figure 54 montre que l'acide linoléique induit l'expression protéique de l'ApoB48 dès 10 minutes de traitement qui persiste au temps 20 minutes. En revanche, nous n'observons aucune modification de l'expression protéique de l'ApoB48 sur des segments intestinaux provenant des souris KOCD36 et ceci quel que soit le temps d'incubation. Ces données démontrent que le CD36 est indispensable à l'induction de l'ApoB48 par les AGLC.

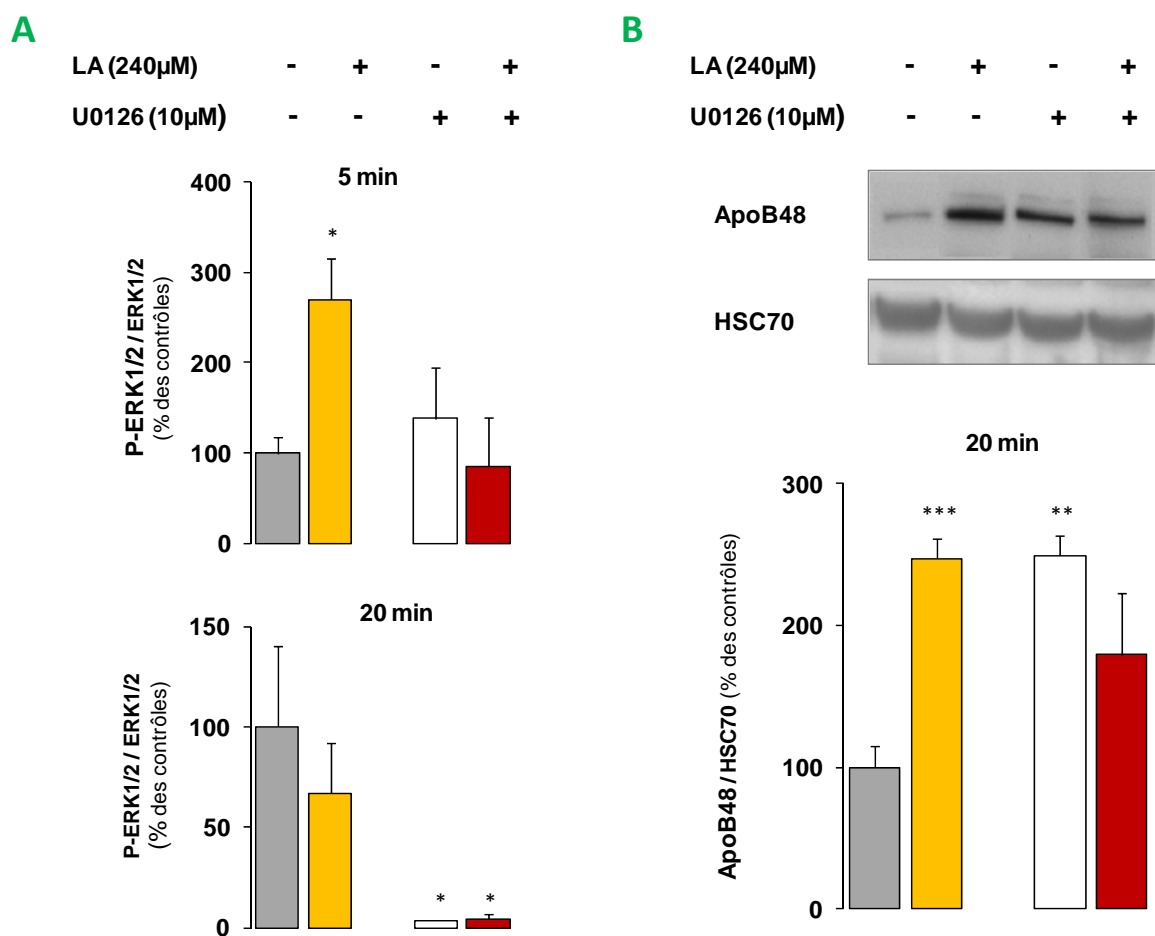
Ces données corroborent en partie les données obtenues *in vivo* où le niveau de l'ApoB48 est plus faible chez les KOCD36 1 heure après le gavage (Figure 38). Comme la montre la Figure 54, l'acide linoléique induit également l'expression protéique de la MTP après 20 minutes de traitement sur des segments intestinaux de souris sauvages. En revanche, l'expression de la MTP n'est pas induite sur des segments provenant des souris transgéniques, et même diminue légèrement. Par conséquent, comme l'ApoB48, l'induction du taux protéique de la MTP par les AGLC est dépendante du CD36 à la fois *in vivo* et *ex vivo*.

*En résumé, nos données étayées par la littérature, nous permettent d'émettre l'hypothèse suivante : la liaison CD36 - AGLC déclencherait une sur-activation rapide et transitoire des ERK1/2 (5 et 10 minutes). Cette sur-activation conduirait à une augmentation du taux d'ApoB48 (10 minutes) comme démontré par Federico et al. (Federico et al., 2006). Puis la diminution du CD36 associée à la diminution des ERK1/2, conduiraient à une augmentation du taux de MTP. Il a été en effet démontré que la transcription du gène de la MTP est inhibée par l'activation des ERK1/2 (Au et al., 2003).*

## **1.6 L'induction du taux de protéine ApoB48 est dépendante de l'activation des ERK1/2**

Afin de vérifier si la phosphorylation des ERK1/2 par les AGLC est à l'origine de l'induction de l'ApoB48, nous avons utilisé un inhibiteur de l'activation des MEK1/2, qui sont responsables de l'activation des ERK1/2 : le U0126 (1, 4-diamino-2, 3-dicyano-1, 4-bis [2-aminophenylthio] butadiène). En effet, les MEK1/2 activent les ERK1/2 kinases en phosphorylant la thréonine et la tyrosine situées dans la boucle d'activation de la kinase.

Comme rapporté dans la partie précédente, l'activation des ERK1/2 est transitoire puisqu'elle n'existe qu'à 5 et 10 minutes après le traitement de l'acide linoléique (Figure 52) et l'effet sur les protéines cibles est plus tardif (Figure 54-A). C'est pourquoi nous avons testé l'effet du U0126 aux temps 5 et 20 minutes.



**Figure 55 : L'induction du taux d'ApoB48 par l'acide linoléique sur des segments intestinaux en culture est dépendante de l'activation des ERK1/2 kinases.**

*Les segments issus de souris sauvages mises à jeun la veille, ont été traités en présence ou non de U0126 (10µM) au cours des 15 minutes de pré-incubation et pendant le traitement avec de l'acide linoléique (LA, 240µM) complexé avec de la BSA (fraction V, 30µM) pendant 5 ou 20 minutes.*

*A : Effet du U0126 sur l'activation des ERK1/2 après 5 et 20 minutes de traitement avec de l'acide linoléique.*

*B : Effet du U0126 sur le taux protéique de l'ApoB48 après 20 minutes de traitement avec de l'acide linoléique.*

*L'expression protéique dans la muqueuse jéjunale de l'ApoB48, des ERK1/2 phosphorylées et totales et de l'HSC70 utilisé comme contrôle des dépôts, ont été analysées par western blotting à partir de 100µg de protéines d'homogénat total de muqueuse en utilisant un anticorps anti-ApoB (Santa Cruz Biotechnology), anti-Phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204, Cell Signaling Technology) et anti-ERK1/2 (Cell Signaling Technology) et anti-HSC70 (Santa-Cruz). Les résultats sont exprimés par la moyenne ± SEM et ont été comparés à ceux des segments contrôles à jeun en présence de BSA par le test t de Student (n=4, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001). LA : Acide linoléique*

Nous avons choisi d'utiliser 10µM de U0126, concentration efficace et non toxique sur des cultures de cellules HepG2 (Tsai *et al.*, 2007). Pour optimiser son efficacité, nous avons ajouté le U0126 dans les milieux de pré-incubation et de traitement. Comme l'indique la

Figure 55-A, à 5 minutes le U0126 abolit la sur-activation des ERK1/2 induite par l'acide linoléique sans modifier leur niveau de phosphorylation basale démontrant ainsi que le U0126 a été efficace. De plus, comme précédemment montré dans la Figure 52, l'activation des ERK1/2 est transitoire, puisque elle ne persiste pas après 20 minutes d'incubation en présence d'acide linoléique (Figure 55-A).

En ce qui concerne le taux de protéine de l'ApoB48 retrouvée dans la muqueuse, on observe que l'augmentation de l'ApoB48 par l'acide linoléique est abolie en présence de U0126 après 20 minutes de traitement (Figure 55-B). Il est intéressant de noter que le U0126 a un effet propre sur l'expression de la protéine ApoB48 puisqu'il l'induit également de 2,5 fois. Ce résultat pourrait s'expliquer par la participation des ERK1/2 à la dégradation post-RE de l'ApoB (Fisher *et al.*, 2011). Le U0126 qui conduit à une chute du niveau de phosphorylation des ERK1/2 après 20 minutes de traitement (Figure 55-B) pourrait ainsi conduire à une accumulation de l'ApoB intracellulaire (Fisher *et al.*, 2011).

Quant à la MTP, nous n'avons pas observé d'effet du U0126 sur son niveau protéique (données non présentées). Ce résultat était attendu puisque, comme nous l'avons montré précédemment dans la Figure 52, c'est la diminution de la phosphorylation des ERK qui est à l'origine de son induction par les AGLC (Au *et al.*, 2003).

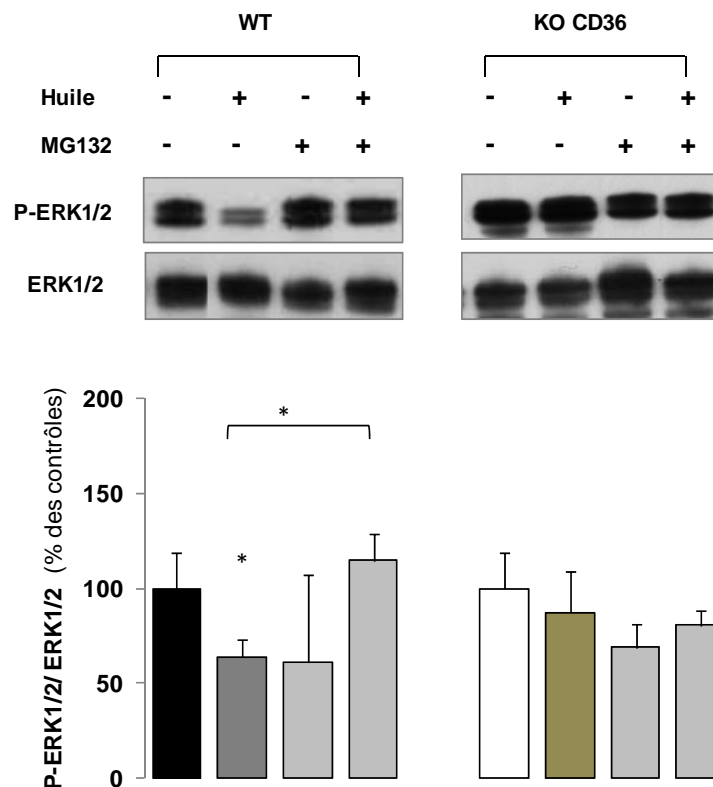
Ce résultat démontre que l'induction du taux d'ApoB48 par les AGLC est dépendante de l'activation des ERK1/2, bien qu'il reste nécessaire cependant de s'assurer que les différences observées ne sont pas liées à des modifications de l'activité de sécrétion des lipoprotéines portant l'ApoB48.

***L'ensemble de ces données démontre que le CD36 est indispensable à l'activation des ERK1/2 induite par les AGLC. L'activation de cette voie de signalisation est à l'origine de l'induction de l'ApoB48 et sa « désactivation » est probablement à l'origine de l'induction de la MTP. Ensemble, ces modifications pourraient expliquer pourquoi les animaux et les patients déficients en CD36 sécrètent de petits chylomicrons. Pour valider l'existence de cette régulation in vivo, nous avons cherché à savoir si la régulation de l'activation des ERK1/2 s'exerçait de manière CD36 dépendante au cours de l'absorption des lipides.***

## 2 Le niveau protéique du CD36 module l'activation des ERK1/2 en faveur de la formation des gros chylomicrons

### 2.1 Le niveau protéique du CD36 est corrélé à l'activation des ERK1/2 suite à une charge en lipides

Afin de confirmer *in vivo* que l'activation des ERK1/2 en présence d'AGLC d'origine alimentaire est dépendante de la quantité de CD36, nous avons mesuré la phosphorylation de ces MAPK chez les souris 4 heures après un gavage avec de l'huile quand CD36 est fortement dégradé et également après le traitement avec du MG132 où la dégradation du CD36 est abolie.



**Figure 56 : Effet du traitement MG132 sur l'activation des ERK1/2 de la muqueuse jéjunale chez des souris sauvages et KOCD36.**

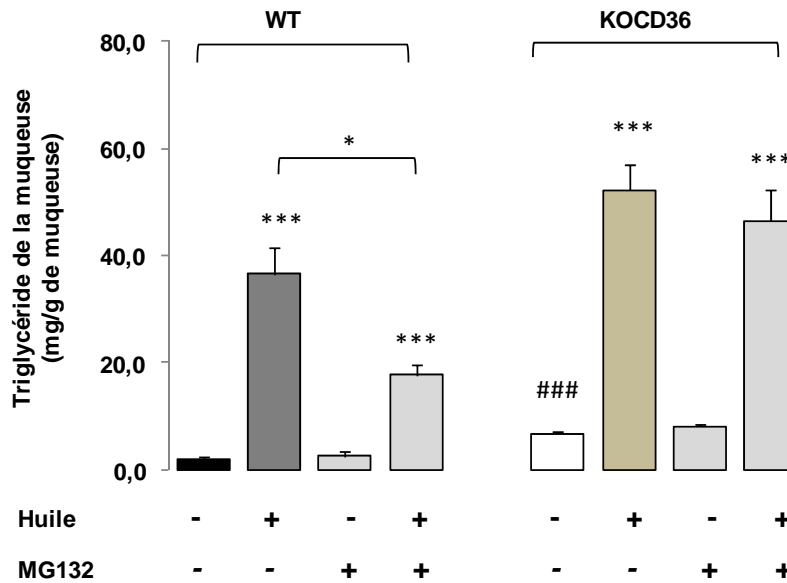
Des souris sauvages et KOCD36 mises à jeun la veille, ont été gavées avec 0,5 ml huile de tournesol en ayant été préalablement traitées soit avec du MG132 (14mg/kg) dissout dans 100  $\mu$ L de DMSO soit 100  $\mu$ L de DMSO seul (injection intra-péritonéale), sacrifiées 4 heures après leur gavage. La quantité protéique des ERK1/2 phosphorylées (P-ERK) et des ERK1/2 totales ont été analysées par western blotting à partir de 15 $\mu$ g de protéines d'homogénat total jéjunale en utilisant un anticorps anti-Phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204, Cell Signaling Technology) et anti-ERK1/2 (Cell Signaling Technology). Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM et ont été comparés à ceux des souris contrôles correspondantes par le test t de Student, n=4, \*p<0.05.

En accord avec notre hypothèse, nous observons une diminution de l'activation des ERK1/2 4 heures après la charge en lipides, quand la protéine CD36 est diminuée de 50% (Figure 56 et Figure 48). De plus, lorsque la dégradation du CD36 est bloquée par le traitement avec le MG132, l'activation des ERK1/2 n'est plus diminuée (Figure 56). Cet effet est bien CD36 dépendant car le MG132 n'a pas d'impact chez les souris KOCD36. Ce résultat conforte notre résultat *ex vivo* indiquant que l'activation des ERK1/2 est dépendante du niveau protéique du CD36.

## **2.2 Le niveau d'activation des ERK1/2 est négativement corrélé à la teneur en lipides de la muqueuse intestinale**

Comme nous l'avons indiqué précédemment, la disponibilité intracellulaire des lipides est un facteur limitant de la formation des lipoprotéines riche en TG. De plus, il a été démontré que l'activation des ERK1/2 module la mobilisation intracellulaire des lipides (Tsai *et al.*, 2007). C'est pourquoi, nous avons vérifié si la modulation de l'activation des ERK1/2 par le CD36 suite à une charge en lipides a des conséquences sur ce paramètre. Pour cela, nous avons mesuré la teneur en TG de la muqueuse jéjunale chez les souris sauvages, traitées ou non avec le MG132, 4 heures après la charge lipidique, temps auquel le pic de sécrétion des gros chylomicrons est observé dans la lymphe (Lo *et al.*, 2008).

Comme le montre la Figure 57, nous avons observé une augmentation de la teneur en TG dans la muqueuse intestinale (x20) après la charge lipidique. Cette augmentation est significativement plus faible en présence du MG132 (x6). Ces valeurs sont donc négativement corrélées à l'activation des ERK1/2 dans les mêmes conditions et sont concordantes avec ce qui a été montré au niveau des cellules HepG2 où l'activation plus faible des ERK1/2 favorise la mobilisation des lipides intracellulaires pour la formation des lipoprotéines (Tsai *et al.*, 2007). Cela suggère qu'après la charge en lipides, la dégradation du CD36 conduirait à une « désactivation » des ERK1/2 et favoriserait de ce fait l'augmentation des TG contenus dans la muqueuse, créant les conditions favorables pour la formation de gros chylomicrons. Il est intéressant de noter qu'avec les KOCD36, on observe une augmentation plus modérée de la quantité de TG dans la muqueuse (x 7) (équivalente à celle en présence de MG132) et que le MG132 n'a pas d'effet chez ces souris. Ainsi, la forte augmentation du taux de TG dans la muqueuse est bien dépendante de la présence du CD36 et de sa dégradation.

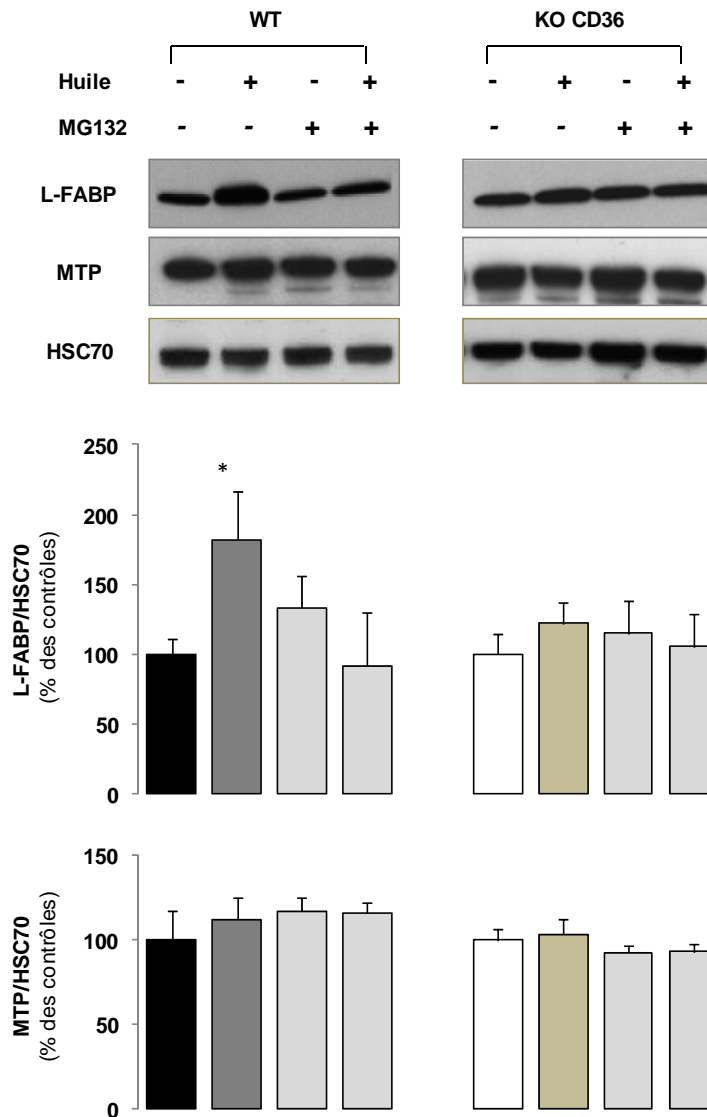


**Figure 57 : Effet du MG132 sur la teneur en triglycérides de la muqueuse jéjunale chez des souris sauvages et KOCD36 soumises à une charge lipidique.**

Des souris sauvages et KOCD36 mises à jeun la veille, ont été gavées avec 0,5 ml huile en ayant été préalablement traitées soit avec du MG132 (14mg/kg) dissout dans 100µl de DMSO soit 100µl de DMSO seul (injection intra-péritonéale), sacrifiées 4 heures après leur gavage. Les TG de la muqueuse ont été extraits par la méthode de Delsal puis dosés à l'aide de kits commerciaux (DiaSys). Les valeurs sont exprimées par la moyenne  $\pm$  SEM et ont été comparées à celles des souris contrôles correspondantes par le test t de Student,  $n=4$ , \* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.001$ ; ### $p<0.001$  pour la comparaison entre les valeurs des souris sauvages et KOCD36.

Pour étayer ce résultat, nous avons étudié la régulation des protéines impliquées dans la synthèse des chylomicrons : la MTP et la L-FABP. Comme nous l'avons montré dans les expériences précédentes, alors que le taux de MTP n'est pas modifié après 4 heures de gavage, celui de la L-FABP est augmenté (Figure 38). Cette régulation est CD36 dépendante puisqu'elle n'est pas retrouvée chez les souris KOCD36. De plus l'induction de la L-FABP est abolie en présence du MG132.

Par conséquent, l'induction du taux de protéine L-FABP suite à une charge lipidique est dépendante de la dégradation du CD36. La L-FABP étant impliquée dans la formation des PCTV, ce résultat conforte le rôle du CD36 et de sa signalisation dans la formation de gros chylomicrons. Pour être validées, ces données doivent être complétées par la localisation de ces TG dans le compartiment sécrétoire (RE ou Golgi).



**Figure 58 : Effet du traitement MG132 sur l'expression génique et protéique de la L-FABP et de la MTP chez des souris sauvages et KOCD36 soumises à une charge lipidique.**

L'expression protéique de la L-FABP et de la MTP ont été analysées par western blotting à partir de 15µg de protéines d'homogénat total jéjunal en utilisant un anticorps anti-LFABP fabriqué au Laboratoire (Guilmeau et al., 2007) et un anti-MTP (BD Sciences). La protéine HSC70 a été utilisée comme contrôle de dépôt. Le signal est représentatif de quatre échantillons indépendants. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM et ont été comparés à ceux des souris contrôles correspondantes par le test t,  $n=4$ ,  $*p<0.05$ .

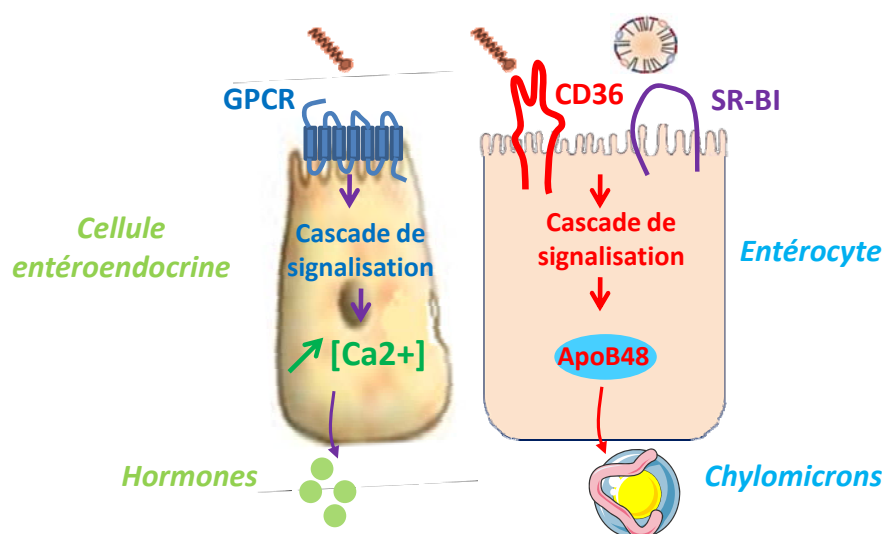
*En résumé, l'ensemble de nos résultats suggère que le niveau d'activation des ERK1/2 est dépendant de la quantité de CD36 et est à l'origine de la synthèse de chylomicrons de grandes taille bien dégradés dans la circulation sanguine via une induction précoce et transitoire de l'ApoB48 qui est suivie d'une induction de la MTP et de la L-FABP. Le CD36 est sans doute un récepteur aux AGLC impliqué dans le mécanisme à l'origine de l'adaptation intestinale observée en période postprandiale.*



# Discussion

L'ensemble de ces travaux démontre que l'entérocyte est capable de détecter les produits de digestion des lipides alimentaires au niveau de la lumière intestinale par l'intermédiaire de la glycoprotéine CD36. La liaison des AGLC avec le CD36 déclenche une signalisation ERK1/2 dépendante conduisant à l'induction de protéines clés du métabolisme des lipides telles que l'ApoB48 ou la MTP. Ce mécanisme de « sensing » semble être également dépendant d'un récepteur nucléaire aux AGLC, le PPAR $\beta$ . Le CD36 est donc la première étape d'un mécanisme qui conduit à une adaptation postprandiale du métabolisme entérocytaire des lipides à l'origine de la formation de chylomicrons de grande taille bien dégradés dans la circulation sanguine.

Jusqu'à présent, le « sensing » intestinal des AGLC était uniquement rapporté pour les cellules entéroendocrines mais pas pour l'entérocyte considéré comme une cellule passive. En effet, il est connu depuis longtemps que les lipides alimentaires sont des stimuli de ces cellules. On sait aujourd'hui que ces cellules entéro-endocrines détectent les acides gras présents dans la lumière intestinale par l'intermédiaire de récepteurs plus « classiques » appartenant à la famille des GPCRs, localisés au niveau de leurs membranes apicales (Ichimura *et al.*, 2009; Miyauchi *et al.*, 2010). Par exemple, la liaison des AGLC avec le GRP40 ou le GRP120 conduit à la sécrétion respectivement de CCK par les cellules I (Liou *et al.*, 2011) et de GLP1 par les cellules L (Hirasawa *et al.*, 2005). Ces molécules, en agissant par voie paracrine, par voie humorale et/ou par voie nerveuse, régulent les fonctions digestives (vidange gastrique, mobilité intestinal), la sécrétion de l'insuline et la prise alimentaire *via* le système nerveux central (Lam, 2010; Breen *et al.*, 2011) (Figure 62).



**Figure 62 : Mécanisme du « sensing » entéroendocrine et entérocytaire des AGLC.**

GPCR : G-protein-coupled receptor ; SR-BI : Scavenger Receptor class B type I ; AGLC: Acide gras à longue chaîne.

Il est intéressant de noter que ces cellules ne semblent pas exprimer le CD36 (données du Laboratoire, lignée STC-1).

L'intestin est donc doté de deux types cellulaires capables de détecter par deux systèmes différents les lipides contenus dans la lumière intestinale. L'existence de ce « sensing » entérocytaire pourrait avoir des conséquences physiologiques sur la biodisponibilité des lipides à l'organisme, la régulation de la prise alimentaire *via* la teneur en ApoAIV des chylomicrons (Tso & Liu, 2004) et sur la mise en place de l'athérosclérose. Ce système de « sensing » entérocytaire des lipides pourrait constituer une cible thérapeutique permettant de lutter contre l'hypertriglycémie postprandiale et les maladies associées.

D'un point de vue général, l'existence de ces deux « sensing » et de leurs conséquences physiologiques respectives, souligne le rôle majeur que joue l'intestin grêle dans l'homéostasie énergétique de l'organisme.

# Bibliographie

- Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E & Grimaldi PA. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem* **268**, 17665-17668.
- Adeli K & Lewis GF. (2008). Intestinal lipoprotein overproduction in insulin-resistant states. *Curr Opin Lipidol* **19**, 221-228.
- Akiyama TE, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Peters JM, Brewer HB, Jr. & Gonzalez FJ. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta regulates very low density lipoprotein production and catabolism in mice on a Western diet. *J Biol Chem* **279**, 20874-20881.
- Alexandrova A, Petrov L, Georgieva A, Kirkova M & Kukan M. (2008). Effects of proteasome inhibitor, MG132, on proteasome activity and oxidative status of rat liver. *Cell Biochem Funct* **26**, 392-398.
- Alipour A, Elte JW, van Zaanen HC, Rietveld AP & Castro Cabezas M. (2008). Novel aspects of postprandial lipemia in relation to atherosclerosis. *Atheroscler Suppl* **9**, 39-44.
- Ameen C, Edvardsson U, Ljungberg A, Asp L, Akerblad P, Tuneld A, Olofsson SO, Linden D & Oscarsson J. (2005). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha increases the expression and activity of microsomal triglyceride transfer protein in the liver. *J Biol Chem* **280**, 1224-1229.
- Amri EZ, Bonino F, Ailhaud G, Abumrad NA & Grimaldi PA. (1995). Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem* **270**, 2367-2371.
- Anant S & Davidson NO. (2002). Identification and regulation of protein components of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme. A complex event. *Trends Cardiovasc Med* **12**, 311-317.
- Andermarcher E, Bossis G, Farras R, Jariel-Encontre I & Piechaczyk M. (2005). [Proteasomal degradation: from addressing of substrates to therapeutical perspectives]. *Med Sci (Paris)* **21**, 141-149.
- Asada S, Daitoku H, Matsuzaki H, Saito T, Sudo T, Mukai H, Iwashita S, Kako K, Kishi T, Kasuya Y & Fukamizu A. (2007). Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1. *Cell Signal* **19**, 519-527.
- Au WS, Kung HF & Lin MC. (2003). Regulation of microsomal triglyceride transfer protein gene by insulin in HepG2 cells: roles of MAPKerk and MAPKp38. *Diabetes* **52**, 1073-1080.

- Avramoglu RK, Qiu W & Adeli K. (2003). Mechanisms of metabolic dyslipidemia in insulin resistant states: deregulation of hepatic and intestinal lipoprotein secretion. *Front Biosci* **8**, d464-476.
- Baier LJ, Sacchettini JC, Knowler WC, Eads J, Paolisso G, Tataranni PA, Mochizuki H, Bennett PH, Bogardus C & Prochazka M. (1995). An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *J Clin Invest* **95**, 1281-1287.
- Bakillah A & Hussain MM. (2001). Binding of microsomal triglyceride transfer protein to lipids results in increased affinity for apolipoprotein B: evidence for stable microsomal MTP-lipid complexes. *J Biol Chem* **276**, 31466-31473.
- Baranova IN, Bocharov AV, Vishnyakova TG, Kurlander R, Chen Z, Fu D, Arias IM, Csako G, Patterson AP & Eggerman TL. (2010). CD36 is a novel serum amyloid A (SAA) receptor mediating SAA binding and SAA-induced signaling in human and rodent cells. *J Biol Chem* **285**, 8492-8506.
- Baum CL, Teng BB & Davidson NO. (1990). Apolipoprotein B messenger RNA editing in the rat liver. Modulation by fasting and refeeding a high carbohydrate diet. *J Biol Chem* **265**, 19263-19270.
- Bays H & Stein EA. (2003). Pharmacotherapy for dyslipidaemia--current therapies and future agents. *Expert Opin Pharmacother* **4**, 1901-1938.
- Beaslas O, Cueille C, Delers F, Chateau D, Chambaz J, Rousset M & Carriere V. (2009). Sensing of dietary lipids by enterocytes: a new role for SR-BI/CLA-1. *PLoS ONE* **4**, e4278.
- Bell DS, O'Keefe JH & Jellinger P. (2008). Postprandial dysmetabolism: the missing link between diabetes and cardiovascular events? *Endocr Pract* **14**, 112-124.
- Benoist F & Grand-Perret T. (1997). Co-translational degradation of apolipoprotein B100 by the proteasome is prevented by microsomal triglyceride transfer protein. Synchronized translation studies on HepG2 cells treated with an inhibitor of microsomal triglyceride transfer protein. *J Biol Chem* **272**, 20435-20442.
- Berriot-Varoqueaux N, Aggerbeck LP & Samson-Bouma M. (2000). [Microsomal triglyceride transfer protein and abetalipoproteinemia]. *Ann Endocrinol (Paris)* **61**, 125-129.
- Berriot-Varoqueaux N, Dannoura AH, Moreau A, Verthier N, Sassolas A, Cadiot G, Lachaux A, Munck A, Schmitz J, Aggerbeck LP & Samson-Bouma ME. (2001). Apolipoprotein B48 glycosylation in abetalipoproteinemia and Anderson's disease. *Gastroenterology* **121**, 1101-1108.
- Bietrix F, Yan D, Nauze M, Rolland C, Bertrand-Michel J, Comera C, Schaak S, Barbaras R, Groen AK, Perret B, Terce F & Collet X. (2006). Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *J Biol Chem* **281**, 7214-7219.

- Bishop-Bailey D & Bystrom J. (2009). Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in inflammation. *Pharmacol Ther* **124**, 141-150.
- Black DD. (2007). Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G519-524.
- Blackburn C, Guan B, Brown J, Cullis C, Condon SM, Jenkins TJ, Peluso S, Ye Y, Gimeno RE, Punreddy S, Sun Y, Wu H, Hubbard B, Kaushik V, Tummino P, Sanchetti P, Yu Sun D, Daniels T, Tozzo E, Balani SK & Raman P. (2006). Identification and characterization of 4-aryl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones as inhibitors of the fatty acid transporter FATP4. *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 3504-3509.
- Blanc V, Henderson JO, Newberry EP, Kennedy S, Luo J & Davidson NO. (2005). Targeted deletion of the murine apobec-1 complementation factor (acf) gene results in embryonic lethality. *Mol Cell Biol* **25**, 7260-7269.
- Bokor S, Legry V, Meirhaeghe A, Ruiz JR, Mauro B, Widhalm K, Manios Y, Amouyel P, Moreno LA, Molnar D & Dallongeville J. (2010). Single-nucleotide polymorphism of CD36 locus and obesity in European adolescents. *Obesity (Silver Spring)* **18**, 1398-1403.
- Bonen A, Chabowski A, Luiken JJ & Glatz JF. (2007). Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence. *Physiology (Bethesda)* **22**, 15-29.
- Bonen A, Dyck DJ, Ibrahimi A & Abumrad NA. (1999). Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36. *Am J Physiol* **276**, E642-649.
- Bray GA, Paeratakul S & Popkin BM. (2004). Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies. *Physiol Behav* **83**, 549-555.
- Breen DM, Yang CS & Lam TK. (2011). Gut-brain signalling: how lipids can trigger the gut. *Diabetes Metab Res Rev* **27**, 113-119.
- Brodsky JL & Fisher EA. (2008). The many intersecting pathways underlying apolipoprotein B secretion and degradation. *Trends Endocrinol Metab* **19**, 254-259.
- Buhman KK, Smith SJ, Stone SJ, Repa JJ, Wong JS, Knapp FF, Jr., Burri BJ, Hamilton RL, Abumrad NA & Farese RV, Jr. (2002). DGAT1 is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis. *J Biol Chem* **277**, 25474-25479.
- Burns KA & Vanden Heuvel JP. (2007). Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 952-960.
- Buts JP, Vijverman V, Barudi C, De Keyser N, Maldague P & Dive C. (1990). Refeeding after starvation in the rat: comparative effects of lipids, proteins and carbohydrates on jejunal and ileal mucosal adaptation. *Eur J Clin Invest* **20**, 441-452.

- Cai SF, Kirby RJ, Howles PN & Hui DY. (2001). Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine. *Journal of lipid research* **42**, 902-909.
- Cao J, Hawkins E, Brozinick J, Liu X, Zhang H, Burn P & Shi Y. (2004). A predominant role of acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase-2 in dietary fat absorption implicated by tissue distribution, subcellular localization, and up-regulation by high fat diet. *J Biol Chem* **279**, 18878-18886.
- Cao J, Lockwood J, Burn P & Shi Y. (2003). Cloning and functional characterization of a mouse intestinal acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase, MGAT2. *J Biol Chem* **278**, 13860-13866.
- Cara L, Dubois C, Borel P, Armand M, Senft M, Portugal H, Pauli AM, Bernard PM & Lairon D. (1992). Effects of oat bran, rice bran, wheat fiber, and wheat germ on postprandial lipemia in healthy adults. *Am J Clin Nutr* **55**, 81-88.
- Carriere V, Vidal R, Lazou K, Lacasa M, Delers F, Ribeiro A, Rousset M, Chambaz J & Lacorte JM. (2005). HNF-4-dependent induction of apolipoprotein A-IV gene transcription by an apical supply of lipid micelles in intestinal cells. *J Biol Chem* **280**, 5406-5413.
- Cartwright IJ & Higgins JA. (1999). Increased dietary triacylglycerol markedly enhances the ability of isolated rabbit enterocytes to secrete chylomicrons: an effect related to dietary fatty acid composition. *Journal of lipid research* **40**, 1858-1866.
- Cartwright IJ & Higgins JA. (2001). Direct evidence for a two-step assembly of ApoB48-containing lipoproteins in the lumen of the smooth endoplasmic reticulum of rabbit enterocytes. *J Biol Chem* **276**, 48048-48057.
- Chateau D, Pauquai T, Delers F, Rousset M, Chambaz J & Demignot S. (2005). Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells. *J Cell Physiol* **202**, 767-776.
- Chaudhri OB, Salem V, Murphy KG & Bloom SR. (2008). Gastrointestinal satiety signals. *Annu Rev Physiol* **70**, 239-255.
- Chen L, Bush CR, Necela BM, Su W, Yanagisawa M, Anastasiadis PZ, Fields AP & Thompson EA. (2006). RS5444, a novel PPARgamma agonist, regulates aspects of the differentiated phenotype in nontransformed intestinal epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol* **251**, 17-32.
- Chen M, Yang Y, Braunstein E, Georgeson KE & Harmon CM. (2001). Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**, E916-923.
- Chopra DP, Dombkowski AA, Stemmer PM & Parker GC. (2010). Intestinal epithelial cells in vitro. *Stem Cells Dev* **19**, 131-142.

- Choquet H, Labrune Y, De Graeve F, Hinney A, Hebebrand J, Scherag A, Lecoecur C, Tauber M, Balkau B, Elliot P, Jarvelin MR, Walley AJ, Besnard P, Froguel P & Meyre D. (2011). Lack of Association of CD36 SNPs With Early Onset Obesity: A Meta-Analysis in 9,973 European Subjects. *Obesity (Silver Spring)* **19**, 833-839.
- Chow SL & Hollander D. (1979). Linoleic acid absorption in the unanesthetized rat: mechanism of transport and influence of luminal factors on absorption. *Lipids* **14**, 378-385.
- Coburn CT, Hajri T, Ibrahim A & Abumrad NA. (2001). Role of CD36 in membrane transport and utilization of long-chain fatty acids by different tissues. *J Mol Neurosci* **16**, 117-121; discussion 151-117.
- Coburn CT, Knapp FF, Jr., Febbraio M, Beets AL, Silverstein RL & Abumrad NA. (2000). Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem* **275**, 32523-32529.
- Cohen JC & Berger GM. (1990). Effects of glucose ingestion on postprandial lipemia and triglyceride clearance in humans. *Journal of lipid research* **31**, 597-602.
- Coll T, Rodriguez-Calvo R, Barroso E, Serrano L, Eyre E, Palomer X & Vazquez-Carrera M. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta/delta: a new potential therapeutic target for the treatment of metabolic syndrome. *Curr Mol Pharmacol* **2**, 46-55.
- Couillard C, Bergeron N, Prud'homme D, Bergeron J, Tremblay A, Bouchard C, Mauriege P & Despres JP. (1998). Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men. *Diabetes* **47**, 953-960.
- Crosnier C, Stamatakis D & Lewis J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* **7**, 349-359.
- Davidson NO & Shelness GS. (2000). APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu Rev Nutr* **20**, 169-193.
- De Pascale C, Avella M, Perona JS, Ruiz-Gutierrez V, Wheeler-Jones CP & Botham KM. (2006). Fatty acid composition of chylomicron remnant-like particles influences their uptake and induction of lipid accumulation in macrophages. *Febs J* **273**, 5632-5640.
- de Vogel-van den Bosch HM, Bunger M, de Groot PJ, Bosch-Vermeulen H, Hooiveld GJ & Muller M. (2008). PPARalpha-mediated effects of dietary lipids on intestinal barrier gene expression. *BMC Genomics* **9**, 231.
- de Wit NJ, Boekschoten MV, Bachmair EM, Hooiveld GJ, de Groot PJ, Rubio-Aliaga I, Daniel H & Muller M. (2011). Dose-Dependent Effects of Dietary Fat on Development of Obesity in Relation to Intestinal Differential Gene Expression in C57BL/6J Mice. *PLoS ONE* **6**, e19145.
- Delsal JL. (1954). [Fraction of serum lipids by organic solvents.]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* **36**, 1329-1334.



- Desvergne B, Michalik L & Wahli W. (2006). Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev* **86**, 465-514.
- Di Leo E, Magnolo L, Bertolotti M, Bourbon M, Carmo Pereira S, Pirisi M, Calandra S & Tarugi P. (2008). Variable phenotypic expression of homozygous familial hypobetalipoproteinaemia due to novel APOB gene mutations. *Clin Genet* **74**, 267-273.
- Doerge H & Stahl A. (2006). Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda)* **21**, 259-268.
- Drover VA, Ajmal M, Nassir F, Davidson NO, Nauli AM, Sahoo D, Tso P & Abumrad NA. (2005). CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J Clin Invest* **115**, 1290-1297.
- Drover VA, Nguyen DV, Bastie CC, Darlington YF, Abumrad NA, Pessin JE, London E, Sahoo D & Phillips MC. (2008). CD36 mediates both cellular uptake of very long chain fatty acids and their intestinal absorption in mice. *J Biol Chem* **283**, 13108-13115.
- El-Yassimi A, Hichami A, Besnard P & Khan NA. (2008). Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells. *J Biol Chem* **283**, 12949-12959.
- Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W & Desvergne B. (2001). Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology* **142**, 4195-4202.
- Escher P & Wahli W. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res* **448**, 121-138.
- Eyre NS, Cleland LG, Tandon NN & Mayrhofer G. (2007). Importance of the carboxyl terminus of FAT/CD36 for plasma membrane localization and function in long-chain fatty acid uptake. *Journal of lipid research* **48**, 528-542.
- Eyster KM. (2007). The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv Physiol Educ* **31**, 5-16.
- Farese RV, Jr., Ruland SL, Flynn LM, Stokowski RP & Young SG. (1995). Knockout of the mouse apolipoprotein B gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1774-1778.
- Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, Pearce SF & Silverstein RL. (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* **274**, 19055-19062.
- Federico LM, Naples M, Taylor D & Adeli K. (2006). Intestinal insulin resistance and aberrant production of apolipoprotein B48 lipoproteins in an animal model of insulin

- resistance and metabolic dyslipidemia: evidence for activation of protein tyrosine phosphatase-1B, extracellular signal-related kinase, and sterol regulatory element-binding protein-1c in the fructose-fed hamster intestine. *Diabetes* **55**, 1316-1326.
- Fisher EA, Khanna NA & McLeod RS. (2011). Ubiquitination regulates the assembly of very low density lipoprotein in HepG2 cells and is the committing step of the apoB100 ERAD pathway. *Journal of lipid research*.
- Fouquet S, Lugo-Martinez VH, Faussat AM, Renaud F, Cardot P, Chambaz J, Pincon-Raymond M & Thenet S. (2004). Early loss of E-cadherin from cell-cell contacts is involved in the onset of Anoikis in enterocytes. *J Biol Chem* **279**, 43061-43069.
- Freiberg JJ, Tybjaerg-Hansen A, Jensen JS & Nordestgaard BG. (2008). Nonfasting triglycerides and risk of ischemic stroke in the general population. *Jama* **300**, 2142-2152.
- Fukuwatari T, Kawada T, Tsuruta M, Hiraoka T, Iwanaga T, Sugimoto E & Fushiki T. (1997). Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett* **414**, 461-464.
- Funahashi T, Giannoni F, DePaoli AM, Skarosi SF & Davidson NO. (1995). Tissue-specific, developmental and nutritional regulation of the gene encoding the catalytic subunit of the rat apolipoprotein B mRNA editing enzyme: functional role in the modulation of apoB mRNA editing. *Journal of lipid research* **36**, 414-428.
- Furuhashi M & Hotamisligil GS. (2008). Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 489-503.
- Gaillard D, Laugerette F, Darcel N, El-Yassimi A, Passilly-Degrace P, Hichami A, Khan NA, Montmayeur JP & Besnard P. (2008). The gustatory pathway is involved in CD36-mediated olfactory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *Faseb J* **22**, 1458-1468.
- Garcia-Martinez C, Marotta M, Moore-Carrasco R, Guitart M, Camps M, Busquets S, Montell E & Gomez-Foix AM. (2005). Impact on fatty acid metabolism and differential localization of FATP1 and FAT/CD36 proteins delivered in cultured human muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C1264-1272.
- Gertow K, Bellanda M, Eriksson P, Boquist S, Hamsten A, Sunnerhagen M & Fisher RM. (2004). Genetic and structural evaluation of fatty acid transport protein-4 in relation to markers of the insulin resistance syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 392-399.
- Gimeno RE, Hirsch DJ, Punreddy S, Sun Y, Ortegon AM, Wu H, Daniels T, Stricker-Krongrad A, Lodish HF & Stahl A. (2003). Targeted deletion of fatty acid transport protein-4 results in early embryonic lethality. *J Biol Chem* **278**, 49512-49516.
- Gordon DA & Jamil H. (2000). Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly. *Biochim Biophys Acta* **1486**, 72-83.

- Goudriaan JR, den Boer MA, Rensen PC, Febbraio M, Kuipers F, Romijn JA, Havekes LM & Voshol PJ. (2005). CD36 deficiency in mice impairs lipoprotein lipase-mediated triglyceride clearance. *Journal of lipid research* **46**, 2175-2181.
- Greenwalt DE, Scheck SH & Rhinehart-Jones T. (1995). Heart CD36 expression is increased in murine models of diabetes and in mice fed a high fat diet. *J Clin Invest* **96**, 1382-1388.
- Grimaldi PA. (2001). Fatty acid regulation of gene expression. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **4**, 433-437.
- Guesnet P, Alessandri J, Astorg P, Plfferi F & Lavalie M. (2005). Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *OCL Oléagineux, corps gras, lipides* **12**, 333-343.
- Guilmeau S, Niot I, Laigneau JP, Devaud H, Petit V, Brousse N, Bouvier R, Ferkdadjji L, Besmond C, Aggerbeck LP, Bado A & Samson-Bouma ME. (2007). Decreased expression of Intestinal I- and L-FABP levels in rare human genetic lipid malabsorption syndromes. *Histochem Cell Biol* **128**, 115-123.
- Guthmann F, Haupt R, Looman AC, Spener F & Rustow B. (1999). Fatty acid translocase/CD36 mediates the uptake of palmitate by type II pneumocytes. *Am J Physiol* **277**, L191-196.
- Haidari M, Leung N, Mahbub F, Uffelman KD, Kohen-Avramoglu R, Lewis GF & Adeli K. (2002). Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and ApoB48-containing lipoprotein overproduction. *J Biol Chem* **277**, 31646-31655.
- Hajri T, Hall AM, Jensen DR, Pietka TA, Drover VA, Tao H, Eckel R & Abumrad NA. (2007). CD36-facilitated fatty acid uptake inhibits leptin production and signaling in adipose tissue. *Diabetes* **56**, 1872-1880.
- Hajri T, Han XX, Bonen A & Abumrad NA. (2002). Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice. *J Clin Invest* **109**, 1381-1389.
- Hall AM, Wiczler BM, Herrmann T, Stremmel W & Bernlohr DA. (2005). Enzymatic properties of purified murine fatty acid transport protein 4 and analysis of acyl-CoA synthetase activities in tissues from FATP4 null mice. *J Biol Chem* **280**, 11948-11954.
- Harmon CM & Abumrad NA. (1993). Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids. *J Membr Biol* **133**, 43-49.
- Harris SG & Smith HC. (1992). In vitro apolipoprotein B mRNA editing activity can be modulated by fasting and refeeding rats with a high carbohydrate diet. *Biochem Biophys Res Commun* **183**, 899-903.

- Hayashi AA, Webb J, Choi J, Baker C, Lino M, Trigatti B, Trajcevski KE, Hawke TJ & Adeli K. (2011). Intestinal SR-BI is upregulated in insulin resistant states and is associated with overproduction of intestinal apoB48-containing lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.
- Hayashi H, Fujimoto K, Cardelli JA, Nutting DF, Bergstedt S & Tso P. (1990). Fat feeding increases size, but not number, of chylomicrons produced by small intestine. *Am J Physiol* **259**, G709-719.
- Hellemans K, Michalik L, Dittie A, Knorr A, Rombouts K, De Jong J, Heirman C, Quartier E, Schuit F, Wahli W & Geerts A. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-beta signaling contributes to enhanced proliferation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **124**, 184-201.
- Hernandez Vallejo SJ, Alqub M, Luquet S, Cruciani-Guglielmacci C, Delerive P, Lobaccaro JM, Kalopissis AD, Chambaz J, Rousset M & Lacorte JM. (2009). Short-term adaptation of postprandial lipoprotein secretion and intestinal gene expression to a high-fat diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**, G782-792.
- Hiramine Y & Tanabe T. (2011). Characterization of acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) enzyme of human small intestine. *J Physiol Biochem*.
- Hirano K, Young SG, Farese RV, Jr., Ng J, Sande E, Warburton C, Powell-Braxton LM & Davidson NO. (1996). Targeted disruption of the mouse apobec-1 gene abolishes apolipoprotein B mRNA editing and eliminates apolipoprotein B48. *J Biol Chem* **271**, 9887-9890.
- Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S & Tsujimoto G. (2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* **11**, 90-94.
- Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zahringer U & Beutler B. (2005). CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* **433**, 523-527.
- Hogue JC, Lamarche B, Tremblay AJ, Bergeron J, Gagne C & Couture P. (2007). Evidence of increased secretion of apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in subjects with type 2 diabetes. *J Lipid Res* **48**, 1336-1342.
- Hsieh J, Longuet C, Maida A, Bahrami J, Xu E, Baker CL, Brubaker PL, Drucker DJ & Adeli K. (2009). Glucagon-like peptide-2 increases intestinal lipid absorption and chylomicron production via CD36. *Gastroenterology* **137**, 997-1005, 1005 e1001-1004.
- Huang F, Kirkpatrick D, Jiang X, Gygi S & Sorkin A. (2006). Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol Cell* **21**, 737-748.

- Huang MM, Bolen JB, Barnwell JW, Shattil SJ & Brugge JS. (1991). Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7844-7848.
- Hussain MM, Fatma S, Pan X & Iqbal J. (2005). Intestinal lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol* **16**, 281-285.
- Hussain MM, Shi J & Dreizen P. (2003). Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *Journal of lipid research* **44**, 22-32.
- Hussain MM, Strickland DK & Bakillah A. (1999). The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr* **19**, 141-172.
- Ibrahimi A & Abumrad NA. (2002). Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **5**, 139-145.
- Ibrahimi A, Bonen A, Blinn WD, Hajri T, Li X, Zhong K, Cameron R & Abumrad NA. (1999). Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. *J Biol Chem* **274**, 26761-26766.
- Ibrahimi A, Sfeir Z, Magharaie H, Amri EZ, Grimaldi P & Abumrad NA. (1996). Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2646-2651.
- Ichimura A, Hirasawa A, Hara T & Tsujimoto G. (2009). Free fatty acid receptors act as nutrient sensors to regulate energy homeostasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **89**, 82-88.
- Jackson TK, Salhanick AI, Elovson J, Deichman ML & Amatruda JM. (1990). Insulin regulates apolipoprotein B turnover and phosphorylation in rat hepatocytes. *J Clin Invest* **86**, 1746-1751.
- Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL & Bouck N. (2000). Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* **6**, 41-48.
- Jong MC, Hofker MH & Havekes LM. (1999). Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 472-484.
- Kamagate A & Dong HH. (2008). FoxO1 integrates insulin signaling to VLDL production. *Cell Cycle* **7**, 3162-3170.
- Kamagate A, Qu S, Perdomo G, Su D, Kim DH, Slusher S, Meseck M & Dong HH. (2008). FoxO1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic VLDL production in mice. *J Clin Invest* **118**, 2347-2364.

- Kamp F, Hamilton JA, Kamp F, Westerhoff HV & Hamilton JA. (1993). Movement of fatty acids, fatty acid analogues, and bile acids across phospholipid bilayers. *Biochemistry* **32**, 11074-11086.
- Kamp F, Zakim D, Zhang F, Noy N & Hamilton JA. (1995). Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. *Biochemistry* **34**, 11928-11937.
- Kampf JP & Kleinfeld AM. (2007). Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? An unknown protein mediates free fatty acid transport across the adipocyte plasma membrane. *Physiology (Bethesda)* **22**, 7-14.
- Karam SM. (1999). Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci* **4**, D286-298.
- Karpe F. (1999). Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J Intern Med* **246**, 341-355.
- Karpe F & Ehrenborg EE. (2009). PPARdelta in humans: genetic and pharmacological evidence for a significant metabolic function. *Curr Opin Lipidol* **20**, 333-336.
- Kendrick JS, Chan L & Higgins JA. (2001). Superior role of apolipoprotein B48 over apolipoprotein B100 in chylomicron assembly and fat absorption: an investigation of apobec-1 knock-out and wild-type mice. *The Biochemical journal* **356**, 821-827.
- Khan NA, Gaillard D, El-Yassimi A, Passilly-Degrace P, Hichami A & Besnard P. (2008). [Unraveling the downstream signalling of gustatory perception of lipids]. *Med Sci (Paris)* **24**, 692-693.
- Kirisits A, Pils D & Krainer M. (2007). Epidermal growth factor receptor degradation: an alternative view of oncogenic pathways. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 2173-2182.
- Kleinfeld AM, Chu P & Romero C. (1997). Transport of long-chain native fatty acids across lipid bilayer membranes indicates that transbilayer flip-flop is rate limiting. *Biochemistry* **36**, 14146-14158.
- Kondo H, Minegishi Y, Komine Y, Mori T, Matsumoto I, Abe K, Tokimitsu I, Hase T & Murase T. (2006). Differential regulation of intestinal lipid metabolism-related genes in obesity-resistant A/J vs. obesity-prone C57BL/6J mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, E1092-1099.
- Koonen DP, Sung MM, Kao CK, Dolinsky VW, Koves TR, Ilkayeva O, Jacobs RL, Vance DE, Light PE, Muoio DM, Febbraio M & Dyck JR. (2010). Alterations in skeletal muscle fatty acid handling predisposes middle-aged mice to diet-induced insulin resistance. *Diabetes* **59**, 1366-1375.
- Kuda O, Jenkins CM, Skinner JR, Moon SH, Su X, Gross RW & Abumrad NA. (2011). CD36 Protein Is Involved in Store-operated Calcium Flux, Phospholipase A2 Activation, and Production of Prostaglandin E2. *J Biol Chem* **286**, 17785-17795.

- Kuwasako T, Hirano K, Sakai N, Ishigami M, Hiraoka H, Yakub MJ, Yamauchi-Takahara K, Yamashita S & Matsuzawa Y. (2003). Lipoprotein abnormalities in human genetic CD36 deficiency associated with insulin resistance and abnormal fatty acid metabolism. *Diabetes Care* **26**, 1647-1648.
- Labonte ED, Howles PN, Granholm NA, Rojas JC, Davies JP, Ioannou YA & Hui DY. (2007). Class B type I scavenger receptor is responsible for the high affinity cholesterol binding activity of intestinal brush border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 1132-1139.
- Lairon D. (2008a). Lipémie postprandiale: Réponses aux nutriments et conséquences physiopathologiques. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* **43**, 186-190.
- Lairon D. (2008b). Macronutrient intake and modulation on chylomicron production and clearance. *Atheroscler Suppl* **9**, 45-48.
- Lam TK. (2010). Neuronal regulation of homeostasis by nutrient sensing. *Nat Med* **16**, 392-395.
- Laugerette F, Gaillard D, Passilly-Degrace P, Niot I & Besnard P. (2007). Do we taste fat? *Biochimie* **89**, 265-269.
- Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, Montmayeur JP & Besnard P. (2005). CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest* **115**, 3177-3184.
- Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Montmayeur JP & Besnard P. (2006). [CD36, a major landmark on the trail of the taste of fat]. *Med Sci (Paris)* **22**, 357-359.
- Lefebvre M, Paulweber B, Fajas L, Woods J, McCrary C, Colombel JF, Najib J, Fruchart JC, Datz C, Vidal H, Desreumaux P & Auwerx J. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *J Endocrinol* **162**, 331-340.
- Lehmann DM, Galloway CA, MacElrevey C, Sowden MP, Wedekind JE & Smith HC. (2007). Functional characterization of APOBEC-1 complementation factor phosphorylation sites. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 408-418.
- Lehmann DM, Galloway CA, Sowden MP & Smith HC. (2006). Metabolic regulation of apoB mRNA editing is associated with phosphorylation of APOBEC-1 complementation factor. *Nucleic Acids Res* **34**, 3299-3308.
- Leibowitz MD, Fievet C, Hennuyer N, Peinado-Onsurbe J, Duez H, Bergera J, Cullinan CA, Sparrow CP, Baffic J, Berger GD, Santini C, Marquis RW, Tolman RL, Smith RG, Moller DE & Auwerx J. (2000). Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett* **473**, 333-336.
- Lellek H, Kirsten R, Diehl I, Apostel F, Buck F & Greeve J. (2000). Purification and molecular cloning of a novel essential component of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme-complex. *J Biol Chem* **275**, 19848-19856.

- Levy E, Mehran M & Seidman E. (1995). Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *Faseb J* **9**, 626-635.
- Levy E, Menard D, Delvin E, Montoudis A, Beaulieu JF, Mailhot G, Dube N, Sinnott D, Seidman E & Bendayan M. (2009). Localization, function and regulation of the two intestinal fatty acid-binding protein types. *Histochem Cell Biol* **132**, 351-367.
- Levy E, Menard D, Delvin E, Stan S, Mitchell G, Lambert M, Ziv E, Feoli-Fonseca JC & Seidman E. (2001). The polymorphism at codon 54 of the FABP2 gene increases fat absorption in human intestinal explants. *J Biol Chem* **276**, 39679-39684.
- Levy E, Roy CC, Goldstein R, Bar-On H & Ziv E. (1991). Metabolic fate of chylomicrons obtained from rats maintained on diets varying in fatty acid composition. *J Am Coll Nutr* **10**, 69-78.
- Levy E, Spahis S, Ziv E, Marette A, Elchebly M, Lambert M & Delvin E. (2006). Overproduction of intestinal lipoprotein containing apolipoprotein B-48 in Psammomys obesus: impact of dietary n-3 fatty acids. *Diabetologia* **49**, 1937-1945.
- Liou AP, Lu X, Sei Y, Zhao X, Pechhold S, Carrero RJ, Raybould HE & Wank S. (2011). The G-protein-coupled receptor GPR40 directly mediates long-chain fatty acid-induced secretion of cholecystokinin. *Gastroenterology* **140**, 903-912.
- Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF & Sargiacomo M. (1994). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* **126**, 111-126.
- Liu M, Doi T, Shen L, Woods SC, Seeley RJ, Zheng S, Jackman A & Tso P. (2001). Intestinal satiety protein apolipoprotein AIV is synthesized and regulated in rat hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**, R1382-1387.
- Lo CM, Nordskog BK, Nauli AM, Zheng S, Vonlehmden SB, Yang Q, Lee D, Swift LL, Davidson NO & Tso P. (2008). Why does the gut choose apolipoprotein B48 but not B100 for chylomicron formation? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**, G344-352.
- Lobo MV, Huerta L, Ruiz-Velasco N, Teixeira E, de la Cueva P, Celdran A, Martin-Hidalgo A, Vega MA & Bragado R. (2001). Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids. *J Histochem Cytochem* **49**, 1253-1260.
- Loirdighi N, Menard D & Levy E. (1992). Insulin decreases chylomicron production in human fetal small intestine. *Biochim Biophys Acta* **1175**, 100-106.
- Lopez-Miranda J, Perez-Martinez P, Marin C, Moreno JA, Gomez P & Perez-Jimenez F. (2006). Postprandial lipoprotein metabolism, genes and risk of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* **17**, 132-138.



- Lopez-Miranda J, Williams C & Lairon D. (2007). Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism. *Br J Nutr* **98**, 458-473.
- Love-Gregory L, Sherva R, Sun L, Wasson J, Schappe T, Doria A, Rao DC, Hunt SC, Klein S, Neuman RJ, Permutt MA & Abumrad NA. (2008). Variants in the CD36 gene associate with the metabolic syndrome and high-density lipoprotein cholesterol. *Hum Mol Genet* **17**, 1695-1704.
- Lu S, Yao Y, Cheng X, Mitchell S, Leng S, Meng S, Gallagher JW, Shelness GS, Morris GS, Mahan J, Frase S, Mansbach CM, Weinberg RB & Black DD. (2006). Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid secretion in IPEC-1 cells by increasing chylomicron size. *J Biol Chem* **281**, 3473-3483.
- Lu S, Yao Y, Meng S, Cheng X & Black DD. (2002). Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid transport in newborn swine intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* **277**, 31929-31937.
- Luiken JJ, Dyck DJ, Han XX, Tandon NN, Arumugam Y, Glatz JF & Bonen A. (2002). Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E491-495.
- Luquet S, Gaudel C, Holst D, Lopez-Soriano J, Jehl-Pietri C, Fredenrich A & Grimaldi PA. (2005). Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* **1740**, 313-317.
- Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, Gaudel C, Jehl-Pietri C, Fredenrich A & Grimaldi PA. (2004). Roles of peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) in the control of fatty acid catabolism. A new target for the treatment of metabolic syndrome. *Biochimie* **86**, 833-837.
- Ma X, Bacci S, Mlynarski W, Gottardo L, Soccio T, Menzaghi C, Iori E, Lager RA, Shroff AR, Gervino EV, Nesto RW, Johnstone MT, Abumrad NA, Avogaro A, Trischitta V & Doria A. (2004). A common haplotype at the CD36 locus is associated with high free fatty acid levels and increased cardiovascular risk in Caucasians. *Hum Mol Genet* **13**, 2197-2205.
- Mailhot G, Rabasa-Lhoret R, Moreau A, Berthiaume Y & Levy E. (2010). CFTR depletion results in changes in fatty acid composition and promotes lipogenesis in intestinal Caco 2/15 cells. *PLoS ONE* **5**, e10446.
- Malecka-Tendera E & Mazur A. (2006). Childhood obesity: a pandemic of the twenty-first century. *Int J Obes (Lond)* **30 Suppl 2**, S1-3.
- Mamo JC, Watts GF, Barrett PH, Smith D, James AP & Pal S. (2001). Postprandial dyslipidemia in men with visceral obesity: an effect of reduced LDL receptor expression? *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**, E626-632.
- Mansbach CM, 2nd & Gorelick F. (2007). Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and

- the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G645-650.
- Mansbach CM & Siddiqi SA. (2010). The biogenesis of chylomicrons. *Annu Rev Physiol* **72**, 315-333.
- Mardones P, Quinones V, Amigo L, Moreno M, Miquel JF, Schwarz M, Miettinen HE, Trigatti B, Krieger M, VanPatten S, Cohen DE & Rigotti A. (2001). Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *Journal of lipid research* **42**, 170-180.
- Mariadason JM, Nicholas C, L'Italien KE, Zhuang M, Smartt HJ, Heerdt BG, Yang W, Corner GA, Wilson AJ, Klampfer L, Arango D & Augenlicht LH. (2005). Gene expression profiling of intestinal epithelial cell maturation along the crypt-villus axis. *Gastroenterology* **128**, 1081-1088.
- Maris C, Masse J, Chester A, Navaratnam N & Allain FH. (2005). NMR structure of the apoB mRNA stem-loop and its interaction with the C to U editing APOBEC1 complementary factor. *Rna* **11**, 173-186.
- Marmor MD & Yarden Y. (2004). Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Oncogene* **23**, 2057-2070.
- Martin C, Chevrot M, Poirier H, Passilly-Degrace P, Niot I & Besnard P. (2011). CD36 as a lipid sensor. *Physiol Behav.*
- Martins IJ, Mortimer BC, Miller J & Redgrave TG. (1996). Effects of particle size and number on the plasma clearance of chylomicrons and remnants. *Journal of lipid research* **37**, 2696-2705.
- Martins IJ & Redgrave TG. (2004). Obesity and post-prandial lipid metabolism. Feast or famine? *J Nutr Biochem* **15**, 130-141.
- Masuda D, Hirano K, Oku H, Sandoval JC, Kawase R, Yuasa-Kawase M, Yamashita Y, Takada M, Tsubakio-Yamamoto K, Tochino Y, Koseki M, Matsuura F, Nishida M, Kawamoto T, Ishigami M, Hori M, Shimomura I & Yamashita S. (2009). Chylomicron remnants are increased in the postprandial state in CD36 deficiency. *Journal of lipid research* **50**, 999-1011.
- Mellitzer G, Beucher A, Lobstein V, Michel P, Robine S, Kedinger M & Gradwohl G. (2010). Loss of enteroendocrine cells in mice alters lipid absorption and glucose homeostasis and impairs postnatal survival. *J Clin Invest* **120**, 1708-1721.
- Merkel M, Eckel RH & Goldberg IJ. (2002). Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *Journal of lipid research* **43**, 1997-2006.
- Meunier-Durmort C, Poirier H, Niot I, Forest C & Besnard P. (1996). Up-regulation of the expression of the gene for liver fatty acid-binding protein by long-chain fatty acids. *The Biochemical journal* **319 ( Pt 2)**, 483-487.

- Migrenne S, Le Foll C, Levin BE & Magnan C. (2010). Brain lipid sensing and nervous control of energy balance. *Diabetes Metab.*
- Milger K, Herrmann T, Becker C, Gotthardt D, Zickwolf J, Eehalt R, Watkins PA, Stremmel W & Fullekrug J. (2006). Cellular uptake of fatty acids driven by the ER-localized acyl-CoA synthetase FATP4. *J Cell Sci* **119**, 4678-4688.
- Miranda M & Sorkin A. (2007). Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. *Mol Interv* **7**, 157-167.
- Miyaoka K, Kuwasako T, Hirano K, Nozaki S, Yamashita S & Matsuzawa Y. (2001). CD36 deficiency associated with insulin resistance. *Lancet* **357**, 686-687.
- Miyauchi S, Hirasawa A, Ichimura A, Hara T & Tsujimoto G. (2010). New frontiers in gut nutrient sensor research: free fatty acid sensing in the gastrointestinal tract. *J Pharmacol Sci* **112**, 19-24.
- Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, Fujimoto S, Oku A, Tsuda K, Toyokuni S, Hiai H, Mizunoya W, Fushiki T, Holst JJ, Makino M, Tashita A, Kobara Y, Tsubamoto Y, Jinnouchi T, Jomori T & Seino Y. (2002). Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat Med* **8**, 738-742.
- Moreau H, Gargouri Y, Lecat D, Junien JL & Verger R. (1988). Screening of preduodenal lipases in several mammals. *Biochim Biophys Acta* **959**, 247-252.
- Nahle Z, Hsieh M, Pietka T, Coburn CT, Grimaldi PA, Zhang MQ, Das D & Abumrad NA. (2008). CD36-dependent regulation of muscle FoxO1 and PDK4 in the PPAR delta/beta-mediated adaptation to metabolic stress. *J Biol Chem* **283**, 14317-14326.
- Nassir F, Wilson B, Han X, Gross RW & Abumrad NA. (2007). CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J Biol Chem* **282**, 19493-19501.
- Nauli AM, Nassir F, Zheng S, Yang Q, Lo CM, Vonlehmden SB, Lee D, Jandacek RJ, Abumrad NA & Tso P. (2006). CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology* **131**, 1197-1207.
- Neeli I, Siddiqi SA, Siddiqi S, Mahan J, Lagakos WS, Binas B, Gheyi T, Storch J & Mansbach CM, 2nd. (2007). Liver fatty acid-binding protein initiates budding of pre-chylomicron transport vesicles from intestinal endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **282**, 17974-17984.
- Newberry EP, Xie Y, Kennedy S, Han X, Buhman KK, Luo J, Gross RW & Davidson NO. (2003). Decreased hepatic triglyceride accumulation and altered fatty acid uptake in mice with deletion of the liver fatty acid-binding protein gene. *J Biol Chem* **278**, 51664-51672.

- Newberry EP, Xie Y, Kennedy SM, Luo J & Davidson NO. (2006). Protection against Western diet-induced obesity and hepatic steatosis in liver fatty acid-binding protein knockout mice. *Hepatology* **44**, 1191-1205.
- Nian M, Gu J, Irwin DM & Drucker DJ. (2002). Human glucagon gene promoter sequences regulating tissue-specific versus nutrient-regulated gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**, R173-183.
- Niot I, Poirier H, Tran TT & Besnard P. (2009). Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Prog Lipid Res* **48**, 101-115.
- Nisoli E, Carruba MO, Tonello C, Macor C, Federspil G & Vettor R. (2000). Induction of fatty acid translocase/CD36, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2, leptin, uncoupling proteins 2 and 3, and tumor necrosis factor-alpha gene expression in human subcutaneous fat by lipid infusion. *Diabetes* **49**, 319-324.
- Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P & Tybjaerg-Hansen A. (2007). Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *Jama* **298**, 299-308.
- Nozaki S, Tanaka T, Yamashita S, Sohmiya K, Yoshizumi T, Okamoto F, Kitaura Y, Kotake C, Nishida H, Nakata A, Nakagawa T, Matsumoto K, Kameda-Takemura K, Tadokoro S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kawamura K & Matsuzawa Y. (1999). CD36 mediates long-chain fatty acid transport in human myocardium: complete myocardial accumulation defect of radiolabeled long-chain fatty acid analog in subjects with CD36 deficiency. *Mol Cell Biochem* **192**, 129-135.
- O'Keefe JH & Bell DS. (2007). Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* **100**, 899-904.
- Oba M, Baldwin RL & Bequette BJ. (2004). Oxidation of glucose, glutamate, and glutamine by isolated ovine enterocytes in vitro is decreased by the presence of other metabolic fuels. *J Anim Sci* **82**, 479-486.
- Olivecrona G & Beisiegel U. (1997). Lipid binding of apolipoprotein CII is required for stimulation of lipoprotein lipase activity against apolipoprotein CII-deficient chylomicrons. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 1545-1549.
- Oliver WR, Jr., Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznaidman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Kliewer SA, Hansen BC & Willson TM. (2001). A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5306-5311.
- Out R, Hoekstra M, de Jager SC, de Vos P, van der Westhuyzen DR, Webb NR, Van Eck M, Biessen EA & Van Berkel TJ. (2005). Adenovirus-mediated hepatic overexpression of scavenger receptor class B type I accelerates chylomicron metabolism in C57BL/6J mice. *Journal of lipid research* **46**, 1172-1181.

- Pan X & Hussain MM. (2007). Diurnal regulation of microsomal triglyceride transfer protein and plasma lipid levels. *J Biol Chem* **282**, 24707-24719.
- Pan X & Hussain MM. (2009). Clock is important for food and circadian regulation of macronutrient absorption in mice. *Journal of lipid research*.
- Pardo VG, Facchinetti MM, Curino A, Boland R & de Boland AR. (2007). Age-related alteration of 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$ -dependent activation of p38 MAPK in rat intestinal cells. *Biogerontology* **8**, 13-24.
- Pavlic M, Xiao C, Szeto L, Patterson BW & Lewis GF. (2010). Insulin acutely inhibits intestinal lipoprotein secretion in humans in part by suppressing plasma free fatty acids. *Diabetes* **59**, 580-587.
- Petit V, Arnould L, Martin P, Monnot MC, Pineau T, Besnard P & Niot I. (2007). Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. *Journal of lipid research* **48**, 278-287.
- Phillips C, Bennett A, Anderton K, Owens D, Collins P, White D & Tomkin GH. (2002). Intestinal rather than hepatic microsomal triglyceride transfer protein as a cause of postprandial dyslipidemia in diabetes. *Metabolism* **51**, 847-852.
- Phillips C, Murugasu G, Owens D, Collins P, Johnson A & Tomkin GH. (2000). Improved metabolic control reduces the number of postprandial apolipoprotein B-48-containing particles in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* **148**, 283-291.
- Phung TL, Roncone A, Jensen KL, Sparks CE & Sparks JD. (1997). Phosphoinositide 3-kinase activity is necessary for insulin-dependent inhibition of apolipoprotein B secretion by rat hepatocytes and localizes to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **272**, 30693-30702.
- Poirier H, Degrace P, Niot I, Bernard A & Besnard P. (1996). Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP). *Eur J Biochem* **238**, 368-373.
- Poirier H, Niot I, Degrace P, Monnot MC, Bernard A & Besnard P. (1997). Fatty acid regulation of fatty acid-binding protein expression in the small intestine. *Am J Physiol* **273**, G289-295.
- Poirier H, Niot I, Monnot MC, Braissant O, Meunier-Durmort C, Costet P, Pineau T, Wahli W, Willson TM & Besnard P. (2001). Differential involvement of peroxisome-proliferator-activated receptors alpha and delta in fibrate and fatty-acid-mediated inductions of the gene encoding liver fatty-acid-binding protein in the liver and the small intestine. *The Biochemical journal* **355**, 481-488.
- Potten CS, Booth C & Pritchard DM. (1997). The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol* **78**, 219-243.

- Pourcet B, Fruchart JC, Staels B & Glineur C. (2006). Selective PPAR modulators, dual and pan PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Expert Opin Emerg Drugs* **11**, 379-401.
- Quaroni A & May RJ. (1980). Establishment and characterization of intestinal epithelial cell cultures. *Methods Cell Biol* **21B**, 403-427.
- Rader DJ & Dugi KA. (2000). The endothelium and lipoproteins: insights from recent cell biology and animal studies. *Semin Thromb Hemost* **26**, 521-528.
- Rahaman SO, Lennon DJ, Febbraio M, Podrez EA, Hazen SL & Silverstein RL. (2006). A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab* **4**, 211-221.
- Ravid Z, Bendayan M, Delvin E, Sane AT, Elchebly M, Lafond J, Lambert M, Mailhot G & Levy E. (2008). Modulation of intestinal cholesterol absorption by high glucose levels: impact on cholesterol transporters, regulatory enzymes, and transcription factors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**, G873-885.
- Rosen ED & Spiegelman BM. (2000). Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 145-171.
- Ross AC. (1993). Overview of retinoid metabolism. *J Nutr* **123**, 346-350.
- Rowland KJ & Brubaker PL. (2008). Life in the crypt: a role for glucagon-like peptide-2? *Mol Cell Endocrinol* **288**, 63-70.
- Rutledge AC, Qiu W, Zhang R, Kohen-Avramoglu R, Nemat-Gorgani N & Adeli K. (2009). Mechanisms targeting apolipoprotein B100 to proteasomal degradation: evidence that degradation is initiated by BiP binding at the N terminus and the formation of a p97 complex at the C terminus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 579-585.
- Sandoval JC, Nakagawa-Toyama Y, Masuda D, Tochino Y, Nakaoka H, Kawase R, Yuasa-Kawase M, Nakatani K, Inagaki M, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Nishida M, Ishigami M, Komuro I & Yamashita S. (2010). Fenofibrate reduces postprandial hypertriglyceridemia in CD36 knockout mice. *J Atheroscler Thromb* **17**, 610-618.
- Sasase T, Morinaga H, Yamamoto H, Ogawa N, Matsui K, Miyajima K, Kawai T, Mera Y, Masuyama T, Shinohara M, Ohta T & Matsushita M. (2007). Increased fat absorption and impaired fat clearance cause postprandial hypertriglyceridemia in Spontaneously Diabetic Torii rat. *Diabetes Res Clin Pract* **78**, 8-15.
- Sato O, Kuriki C, Fukui Y & Motojima K. (2002). Dual promoter structure of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes and unique transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands. *J Biol Chem* **277**, 15703-15711.
- Sato O, Takanashi N & Motojima K. (2007). Third promoter and differential regulation of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes. *Mol Cell Biochem* **299**, 37-43.

- Sauvaget D, Chauffeton V, Citadelle D, Chatelet FP, Cywiner-Golenzer C, Chambaz J, Pincon-Raymond M, Cardot P, Le Beyec J & Ribeiro A. (2002). Restriction of apolipoprotein A-IV gene expression to the intestine villus depends on a hormone-responsive element and parallels differential expression of the hepatic nuclear factor 4alpha and gamma isoforms. *J Biol Chem* **277**, 34540-34548.
- Schoeller C, Keelan M, Mulvey G, Stremmel W & Thomson AB. (1995). Oleic acid uptake into rat and rabbit jejunal brush border membrane. *Biochim Biophys Acta* **1236**, 51-64.
- Schwartz AL & Ciechanover A. (2009). Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**, 73-96.
- Segrest JP, Jones MK, De Loof H & Dashti N. (2001). Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *Journal of lipid research* **42**, 1346-1367.
- Sfeir Z, Ibrahim A, Amri E, Grimaldi P & Abumrad N. (1999). CD36 antisense expression in 3T3-F442A preadipocytes. *Mol Cell Biochem* **192**, 3-8.
- Shi Y & Burn P. (2004). Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 695-710.
- Shiau YF, Fernandez P, Jackson MJ & McMonagle S. (1985). Mechanisms maintaining a low-pH microclimate in the intestine. *Am J Physiol* **248**, G608-617.
- Shim J, Moulson CL, Newberry EP, Lin MH, Xie Y, Kennedy SM, Miner JH & Davidson NO. (2009). Fatty acid transport protein 4 is dispensable for intestinal lipid absorption in mice. *Journal of lipid research* **50**, 491-500.
- Shoulders CC, Stephens DJ & Jones B. (2004). The intracellular transport of chylomicrons requires the small GTPase, Sar1b. *Curr Opin Lipidol* **15**, 191-197.
- Siddiqi SA, Gorelick FS, Mahan JT & Mansbach CM, 2nd. (2003). COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci* **116**, 415-427.
- Siddiqi SA, Mahan J, Siddiqi S, Gorelick FS & Mansbach CM, 2nd. (2006a). Vesicle-associated membrane protein 7 is expressed in intestinal ER. *J Cell Sci* **119**, 943-950.
- Siddiqi SA & Mansbach CM, 2nd. (2008). PKC zeta-mediated phosphorylation controls budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci* **121**, 2327-2338.
- Siddiqi SA, Siddiqi S, Mahan J, Peggs K, Gorelick FS & Mansbach CM, 2nd. (2006b). The identification of a novel endoplasmic reticulum to Golgi SNARE complex used by the prechylomicron transport vesicle. *J Biol Chem* **281**, 20974-20982.
- Silverstein RL & Febbraio M. (2009). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal* **2**, re3.

- Simons PJ, Kummer JA, Luiken JJ & Boon L. (2010). Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae. *Acta Histochem.*
- Smith J, Su X, El-Maghrabi R, Stahl PD & Abumrad NA. (2008). Opposite regulation of CD36 ubiquitination by fatty acids and insulin: effects on fatty acid uptake. *J Biol Chem* **283**, 13578-13585.
- Smith SJ, Cases S, Jensen DR, Chen HC, Sande E, Tow B, Sanan DA, Raber J, Eckel RH & Farese RV, Jr. (2000). Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nat Genet* **25**, 87-90.
- Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E & Fruchart JC. (1998). Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* **98**, 2088-2093.
- Stahl A, Gimeno RE, Tartaglia LA & Lodish HF. (2001). Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends Endocrinol Metab* **12**, 266-273.
- Stahl A, Hirsch DJ, Gimeno RE, Punreddy S, Ge P, Watson N, Patel S, Kotler M, Raimondi A, Tartaglia LA & Lodish HF. (1999). Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol Cell* **4**, 299-308.
- Stone SJ, Myers HM, Watkins SM, Brown BE, Feingold KR, Elias PM & Farese RV, Jr. (2004). Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem* **279**, 11767-11776.
- Storch J, Zhou YX & Lagakos WS. (2008). Metabolism of apical versus basolateral sn-2-monoacylglycerol and fatty acids in rodent small intestine. *Journal of lipid research* **49**, 1762-1769.
- Stremmel W. (1988). Uptake of fatty acids by jejunal mucosal cells is mediated by a fatty acid binding membrane protein. *J Clin Invest* **82**, 2001-2010.
- Stremmel W, Lotz G, Strohmeyer G & Berk PD. (1985). Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. *J Clin Invest* **75**, 1068-1076.
- Stubbs J, Ferres S & Horgan G. (2000). Energy density of foods: effects on energy intake. *Crit Rev Food Sci Nutr* **40**, 481-515.
- Stump DD, Zhou SL & Berk PD. (1993). Comparison of plasma membrane FABP and mitochondrial isoform of aspartate aminotransferase from rat liver. *Am J Physiol* **265**, G894-902.
- Su X & Abumrad NA. (2009). Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. *Trends Endocrinol Metab* **20**, 72-77.
- Sukhotnik I, Gork AS, Chen M, Drongowski RA, Coran AG & Harmon CM. (2001). Effect of low fat diet on lipid absorption and fatty-acid transport following bowel resection. *Pediatr Surg Int* **17**, 259-264.



- Swift LL, Jovanovska A, Kakkad B & Ong DE. (2005). Microsomal triglyceride transfer protein expression in mouse intestine. *Histochem Cell Biol* **123**, 475-482.
- Tao N, Wagner SJ & Lublin DM. (1996). CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. *J Biol Chem* **271**, 22315-22320.
- Teng B, Burant CF & Davidson NO. (1993). Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science* **260**, 1816-1819.
- Thorngate FE, Raghow R, Wilcox HG, Werner CS, Heimberg M & Elam MB. (1994). Insulin promotes the biosynthesis and secretion of apolipoprotein B-48 by altering apolipoprotein B mRNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5392-5396.
- Tontonoz P & Nagy L. (1999). Regulation of macrophage gene expression by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma: implications for cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* **10**, 485-490.
- Tran TT, Poirier H, Clement L, Nassir F, Pelsers MM, Petit V, Degrace P, Monnot MC, Glatz JF, Abumrad NA, Besnard P & Niot I. (2011). Luminal lipid regulates CD36 levels and downstream signaling to stimulate chylomicron synthesis. *J Biol Chem*.
- Trotter PJ, Ho SY & Storch J. (1996). Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. *Journal of lipid research* **37**, 336-346.
- Tsai J, Qiu W, Kohen-Avramoglu R & Adeli K. (2007). MEK-ERK inhibition corrects the defect in VLDL assembly in HepG2 cells: potential role of ERK in VLDL-ApoB100 particle assembly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 211-218.
- Tso P & Liu M. (2004). Apolipoprotein A-IV, food intake, and obesity. *Physiol Behav* **83**, 631-643.
- Uchida A, Slipchenko MN, Cheng JX & Buhman KK. (2011). Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, alters triglyceride metabolism in enterocytes of mice. *Biochim Biophys Acta* **1811**, 170-176.
- van der Veen JN, Kruit JK, Havinga R, Baller JF, Chimini G, Lestavel S, Staels B, Groot PH, Groen AK & Kuipers F. (2005). Reduced cholesterol absorption upon PPARdelta activation coincides with decreased intestinal expression of NPC1L1. *Journal of lipid research* **46**, 526-534.
- Van Eck M, Pennings M, Hoekstra M, Out R & Van Berkel TJ. (2005). Scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter A1 in reverse cholesterol transport and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **16**, 307-315.
- Van Nieuwenhoven FA, Verstijnen CP, Abumrad NA, Willemsen PH, Van Eys GJ, Van der Vusse GJ & Glatz JF. (1995). Putative membrane fatty acid translocase and cytoplasmic fatty acid-binding protein are co-expressed in rat heart and skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun* **207**, 747-752.

- Varnat F, Heggeler BB, Grisel P, Boucard N, Corthesy-Theulaz I, Wahli W & Desvergne B. (2006). PPARbeta/delta regulates paneth cell differentiation via controlling the hedgehog signaling pathway. *Gastroenterology* **131**, 538-553.
- Vassileva G, Huwyler L, Poirier K, Agellon LB & Toth MJ. (2000). The intestinal fatty acid binding protein is not essential for dietary fat absorption in mice. *Faseb J* **14**, 2040-2046.
- von Wronski MA, Hirano KI, Cagen LM, Wilcox HG, Raghov R, Thorngate FE, Heimberg M, Davidson NO & Elam MB. (1998). Insulin increases expression of apobec-1, the catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing complex in rat hepatocytes. *Metabolism* **47**, 869-873.
- Weiser MM. (1973). Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. I. An indicator of cellular differentiation. *J Biol Chem* **248**, 2536-2541.
- West DB & York B. (1998). Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. *Am J Clin Nutr* **67**, 505S-512S.
- Westphal S, Kastner S, Taneva E, Leodolter A, Dierkes J & Luley C. (2004). Postprandial lipid and carbohydrate responses after the ingestion of a casein-enriched mixed meal. *Am J Clin Nutr* **80**, 284-290.
- Wetterau JR, Lin MC & Jamil H. (1997). Microsomal triglyceride transfer protein. *Biochim Biophys Acta* **1345**, 136-150.
- Williams KJ. (2008). Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids. *J Clin Invest* **118**, 3247-3259.
- Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD & Henke BR. (2000). The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* **43**, 527-550.
- Xiang SQ, Cianflone K, Kalant D & Sniderman AD. (1999). Differential binding of triglyceride-rich lipoproteins to lipoprotein lipase. *Journal of lipid research* **40**, 1655-1663.
- Xie Y, Nassir F, Luo J, Buhman K & Davidson NO. (2003). Intestinal lipoprotein assembly in apobec-1<sup>-/-</sup> mice reveals subtle alterations in triglyceride secretion coupled with a shift to larger lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G735-746.
- Xie Y, Newberry EP, Young SG, Robine S, Hamilton RL, Wong JS, Luo J, Kennedy S & Davidson NO. (2006). Compensatory increase in hepatic lipogenesis in mice with conditional intestine-specific Mttp deficiency. *J Biol Chem* **281**, 4075-4086.
- Yamashita S, Hirano K, Kuwasako T, Janabi M, Toyama Y, Ishigami M & Sakai N. (2007). Physiological and pathological roles of a multi-ligand receptor CD36 in atherogenesis; insights from CD36-deficient patients. *Mol Cell Biochem* **299**, 19-22.
- Zakim D. (2000). Thermodynamics of fatty acid transfer. *J Membr Biol* **176**, 101-109.

Zhang YL, Hernandez-Ono A, Ko C, Yasunaga K, Huang LS & Ginsberg HN. (2004). Regulation of hepatic apolipoprotein B-lipoprotein assembly and secretion by the availability of fatty acids. I. Differential response to the delivery of fatty acids via albumin or remnant-like emulsion particles. *J Biol Chem* **279**, 19362-19374.

Zilversmit DB. (1979). Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* **60**, 473-485.

# **Publications et communications**

- **Publications**

1. **Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties.** Niot I, Poirier H, [Tran TT](#) & Besnard P *Prog Lipid Res* 2009 48, 101-115.
2. **Luminal lipid regulates CD36 levels and downstream signaling to stimulate chylomicron synthesis.** [Tran TT](#), Poirier H, Clement L, Nassir F, Pelsers MM, Petit V, Degrace P, Monnot MC, Glatz JF, Abumrad NA, Besnard P & Niot I. *J Biol Chem*, 2011 sous press.

- **Communications orales**

1. **Le CD36 intestinal est-il un transporteur ou un récepteur aux lipides ?** Clément L, [Tran T T](#), Petit V, Pelsers M, Poirier H, Glatz J, Besnard P, Niot I\*. *7<sup>ème</sup> Journée Francophone de Nutrition, Novembre 2008, Brest, France.*
2. **Le CD36 intestinal est-il un transporteur ou un récepteur aux lipides ?** [Tran T T](#), Clément L, Petit V, Pelsers M, Poirier H, Glatz J, Besnard P, Niot I\*. *Forum des Jeunes chercheurs Besançon – Dijon Juin 2009, Dijon, France.*
3. **Le CD36 intestinal pourrait être un senseur aux lipides impliqué dans la formation des chylomicrons.** [Tran T T](#), Poirier H, Clément L, Petit V, Pelsers M, Glatz J, Besnard P, Niot I\*. *Forum des Jeunes chercheurs Besançon – Dijon Juin 2010, Besançon, France.*
4. **Intestinal CD36 displays features of a lipid sensor involved in the processing of chylomicrons.** [Thi Thu Trang Tran](#), Hélène Poirier, Lionel Clément, Valérie Petit, Maurice Pelsers, Jan Glatz, Philippe Besnard et Isabelle Niot. *International Symposium on Chylomicrons in Disease-2, Juin 2010, Rotterdam, Pays Bas.* (Cette conférence a été présentée par Mme I. NIOT)

- **Posters**

1. **What is the function of FAT/CD36 in the small intestine: a fatty acid transporter or fatty acid sensor?** Lionel Clement, [Thi Thu Trang Tran](#), Valerie Petit, Maurice Pelsers, Helene Poirier, Jan Glatz, Philippe Besnard and Isabelle Niot. *3<sup>ème</sup> Congrès International Vitagora «GOUT, NUTRITION, SANTE », Avril 2008, Dijon, France.*
2. **What is the function of FAT/CD36 in the small intestine: a fatty acid transporter or fatty acid sensor?** Lionel Clement, [Thi Thu Trang Tran](#), Valerie Petit, Maurice Pelsers, Helene Poirier, Jan Glatz, Philippe Besnard and Isabelle Niot. *Blankenese 28<sup>th</sup> Conference: “Minerva-Gentner Symposium: Sensory Signaling and Information Processing” Mai – 2008, Hambourg, Allemagne.*
3. **What is the function of FAT/CD36 in the small intestine: a fatty acid transporter or fatty acid sensor?** Lionel Clement, [Thi Thu Trang Tran](#), Valerie Petit, Maurice

*Pelters, Helene Poirier, Jan Glatz, Philippe Besnard and Isabelle Niot. **Forum des Jeunes chercheurs Besançon – Dijon Juin 2008, Besançon, France.***

4. ***Le CD36 intestinal est-il un transporteur ou un récepteur aux lipides ?** Clément L, [Tran T T](#), Petit V, Pelters M, Poirier H, Glatz J, Besnard P, Niot I\*. **4ème Congrès International Vitagora «GOUT, NUTRITION, SANTE »**, Avril 2009, Dijon, France.*
  
5. ***Intestinal CD36 displays features of a lipid sensor involved in the processing of chylomicrons.** [Thi Thu Trang Tran](#), Hélène Poirier, Lionel Clément, Valérie Petit, Maurice Pelters, Jan Glatz, Philippe Besnard et Isabelle Niot. **International Symposium on Chylomicrons in Disease-2, Juin 2010, Rotterdam, Pay Bas.***

# Annexes

## 1 Extraction des ARNs totaux

Les ARN totaux des entérocytes isolés et des tissus ont été extraits respectivement à l'aide du kit RNeasy (Qiagen) et du Trizol (Invitrogen).

## 2 RT-PCR en temps réel

Toute trace éventuelle d'ADN génomique a été éliminée en incubant 1 µg d'ARN totaux précédemment extraits en présence de DNase I (Amp Grade, Invitrogen). Ensuite l'étape de Transcriptase reverse a été réalisée à l'aide du kit Omniscript commercialisé par Qiagen.

L'expression des gènes étudiés a été analysée par la technique de Sybergreen ou de Taqman. Les séquences d'amorces et sondes de chaque gène étudié sont décrites dans Tableau A. Les PCR ont été réalisées avec 25 ng d'ADNc mis en présence de 200 ou 300 µM d'amorces et 100 µM de sonde. Les conditions de la PCR étaient les suivantes: 2 min à 50°C, 10 min à 95 °C, puis 15 sec à 95°C, 1 min ou 30s à 60°C ou 56°C répétées 45 fois, et enfin à 20°C.

## 3 Western blotting

100µg de protéines issus d'un homogénat total de muqueuse intestinale ont été déposés et séparés sur un gel **Bis-Tris 4-12% (Invitrogen)** puis transférés sur une membrane polyvinylidene difluoride (PerkinElmer Life Sciences). Après avoir bloqué les sites non spécifiques, la membrane a été incubée pendant 3 heures ou la nuit en présence de l'anticorps primaire ; lavée avec du tampon TBS contenant 0,1% de Tween 20, puis incubée avec un second anticorps pendant une heure à température ambiante (Tableau B). Les protéines d'intérêts ont alors été détectées à l'aide du kit de Western **lightning Chemiluminescence (PerKinElmer LAS)**.

## 4 Analyses statistiques

Les moyennes ont été calculées ainsi que les écarts standards à la moyenne. Les différences significatives entre les groupes d'animaux ont été déterminées par le test de Student.

**Tableau A: Séquences des amorces et des sondes des gènes clefs de l'absorption intestinale des lipides de la souris étudiés par RT-PCR**

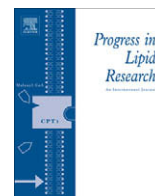
<b>Gène cible</b>	<b>Numéro pubmed</b>	<b>Amorce sens (5'-3')</b>	<b>Amorce anti-sens (5'-3')</b>	<b>Sondes</b>
<b>CD36</b>	NM_007643	GGCCAAGCTATTGCGACATG	CCGAACACAGCGTAGATAGACC	5'6FAMCACAGACGCAGCCTCCTTTCCA CCT-BHQ1-3'
<b>FATP4</b>	NM_011989	CCGGTTCTGGGATGATTGTA	GTGGCTGGTTCAGGAGGTAG	
<b>L-FABP</b>	NM_017399	CTCATTGCCACCATGAACTTCTC	AGCCTTGTCTAAATTCTCTTGCTGACT	
<b>I-FABP</b>	NM_007980.2	GAAAGTAGACCGGAACGAGA	TTCCATCCTGTGTGATTGTC	
<b>ApoB</b>	NM_009693	AAAGGGGATTGAAACTAGCC	GGCAGTTGTTCTCACTGATG	
<b>Apobec1</b>	NM_031159	GATGCTCCATTACCTGGTTC	TGATCCGTGTGGTGATAAAG	
<b>ACF</b>	NM_001081074	CTCAAGGATTCCCAAATCAC	TGAGTATGGACAAGCCAGAA	
<b>MTP</b>	NM_008642	TCTGATGTGGACGTTGTGTTACTG	CTTAGGTGTACTTTTGCCCTGGAA	
<b>Apo A-IV</b>	NM_007468.2	CGTCTGGGTTACTTTGTTGGCAT	AAGGAAACTGAGAGGGTGAAGGAA	5'6FAMCATCATGCGGTCACGTAGGTCC TCCAGC-BHQ13'
<b>Sar1b</b>	NM_025535	GCCATCAGTGAAGAGAGGTT	GCACATGAACACTTCCAGAG	
<b>Apo C-II</b>	NM_009695.3	ACT GGA GTG AGC CAG GAT AG	ACATCAGGATGACCAGGAAT	
<b>ApoC-III</b>	NM_023114	TCAGATCCCTGAAAGGCTAC	ATAGCTGGAGTTGGTTGGTC	



<b>SR-BI</b>	NM_016741.2	CTACAGGGAGTTCAGACAAAAGG	GAGGCTGCGGTTCTCCAC	5'6FAMATCACCTTCAATGACAACGACA CCG-BHQ1-3'
<b>NPC1L1</b>	NM_207242	TGGACTGGAAGGACCATTTC	GACAGGTGCCCCGTAGTCA	
<b>ABCA1</b>	NM_013454	CGT TTC CGG GAA GTG TCC TA	CTA GAG ATG ACA AGG AGG ATG GA	
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	NM_011144	AACGGCGTCGAAGACAAAGAG	CAAAGCCTGGGATAGCCTTGG	5'6FAMAGAGGTCCGATTCTTCCACTGC TGCCA-BHQ1-3'
<b>PPAR<math>\beta</math></b>	NM_011145	CCCTACAACGAGATCAGTGTGC	CATTGAGGAAGAGGCTGCTGAAG	5'6FAMTGTCTACCGCTGCCAGTCCACC ACAG-BHQ1-3'
<b>PPAR<math>\gamma</math>1</b>	U01841	GACCGAGTGTGACGACAAGG	GTTGGTCTCACAGGCTCCTG	5'6FAMAGTGTGACTTCTCCTCAGCCCGT CCC-BHQ1-3'
<b>PPAR<math>\gamma</math>2</b>	NM_011146	TGCTGTTATGGGTGAAACTCTGG	TGAAGTGCTCATAGGCAGTGC	5'6FAMTCTCCTGTTGACCCAGAGCATG GTGCC-BHQ1-3'
<b>18S</b>	X00686	TAAGTCCCTGCCCTTTGTACACA	GATCCGAGGGCCTCACTAAAC	

**Tableau B: Les anticorps utilisés dans l'analyse par Western blotting.**

<b>Antigène</b>	<b>Hôte</b>	<b>Référence</b>	<b>Dilution</b>
<b>CD36</b>	Chèvre	R&D system AF2519	1 :1000
<b>L-FABP</b>	Lapin	Guilmeau <i>et al.</i> , 2007	1 :5000
<b>I-FABP</b>	Lapin	Guilmeau <i>et al.</i> , 2007	1 :1000
<b>MTP</b>	Souris	BD science 612022	1 :2500
<b>Apo B</b>	Chèvre	Santacruz sc-11795	1 :100
<b>Phospho-ERK1/2</b>	Lapin	Cell Signaling #9101	1 :1000
<b>ERK1/2</b>	Lapin	Cell Signaling #9102	1 :1000
<b>HSC70</b>	Souris	Santacruz sc-7298	1 :10000



## Review

## Intestinal absorption of long-chain fatty acids: Evidence and uncertainties

Isabelle Niot \*, Hélène Poirier, Thi Thu Trang Tran, Philippe Besnard \*

Physiologie de la Nutrition, UMR Inserm U866, Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation (ENSBANA),  
Université de Bourgogne, 1, Esplanade Erasme, F-21000 Dijon, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 4 December 2008

Received in revised form 19 December 2008

Accepted 6 January 2009

## Keywords:

Small intestine  
Long-chain fatty acid  
Lipid-binding protein  
Chylomicron  
Health

## ABSTRACT

Over the two last decades, cloning of proteins responsible for trafficking and metabolic fate of long-chain fatty acids (LCFA) in gut has provided new insights on cellular and molecular mechanisms involved in fat absorption. To this systematic cloning period, functional genomics has succeeded in providing a new set of surprises. Disruption of several genes, thought to play a crucial role in LCFA absorption, did not lead to clear phenotypes. This observation raises the question of the real physiological role of lipid-binding proteins and lipid-metabolizing enzymes expressed in enterocytes. The goal of this review is to analyze present knowledge concerning the main steps of intestinal fat absorption from LCFA uptake to lipoprotein release and to assess their impact on health.

  2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Contents

1. Introduction . . . . .	102
2. Cellular LCFA uptake: diffusion and/or protein-mediated transfer? . . . . .	102
2.1. From the physicochemical standpoint . . . . .	103
2.2. From the biochemical standpoint . . . . .	103
2.3. From the physiological standpoint . . . . .	103
2.4. What functions for the plasma membrane lipid-binding proteins? . . . . .	104
2.4.1. FABPpm . . . . .	104
2.4.2. FATP4 . . . . .	104
2.4.3. CD36 . . . . .	104
3. Intracellular trafficking of LCFA . . . . .	105
3.1. Why two different FABPs? . . . . .	105
3.2. Acyl-CoA-binding protein: an housekeeping protein . . . . .	107
4. Chylomicron assembly and trafficking . . . . .	107
4.1. Re-esterification step . . . . .	107
4.2. TAG transfer in the endoplasmic reticulum . . . . .	108
4.3. Pre-chylomicron synthesis . . . . .	109
4.4. Transfer of prechylomicrons to the Golgi . . . . .	109
4.5. Generation of intestinal lipid droplets . . . . .	109
5. Lessons learned from genomics . . . . .	110
6. Do dietary lipids affect the intestinal function? . . . . .	110

**Abbreviations:** ACBP, acyl-CoA-binding protein; ACS, acyl-CoA synthetase; BBM, brush border membrane; CM, chylomicron; DGAT, acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase; ER, endoplasmic reticulum; FABPpm, plasma membrane fatty acid-binding protein; FAcCoA, long-chain-acyl-CoA esters; FAT/CD36, fatty acid transporter; FATP, fatty acid transport protein; FFA, free (non-esterified) fatty acids; I-FABP, intestinal fatty acid-binding protein; LBP, lipid-binding proteins; LCFA, long-chain fatty acids; L-FABP, liver fatty acid-binding protein; LPL, lipoprotein lipase; mAspAT, mitochondrial aspartate amino-transferase; MTP, microsomal triacylglycerol (triglyceride) transfer protein; PCTV, pre-chylomicron transfer vesicles; TAG, triacylglycerols.

\* Corresponding authors. Tel.: +33 (0) 3 80 39 91 24; fax: +33 (0) 3 80 39 66 91.

E-mail addresses: [niot@u-bourgogne.fr](mailto:niot@u-bourgogne.fr) (I. Niot), [pbesnard@u-bourgogne.fr](mailto:pbesnard@u-bourgogne.fr) (P. Besnard).

7. Intestinal contribution to dyslipidemia ..... 111  
 8. Conclusions and future directions ..... 111  
 Acknowledgments ..... 111  
 References ..... 111

**1. Introduction**

Lipids account for about 40% of the calories ingested in Western countries, whereas nutritional recommendations are 5–10% lower. This excessive lipid intake, associated with a qualitative imbalance (excess of saturated fatty acids and cholesterol, too high *n-6/n-3* ratio) strongly favours the development of obesity and associated diseases (atherosclerosis, non insulin-dependent diabetes, hypertension, cancer). From organs involved in lipid homeostasis, small intestine remains the most poorly known likely because it has been only considered for a long time as a selective barrier between outside and inside body environment.

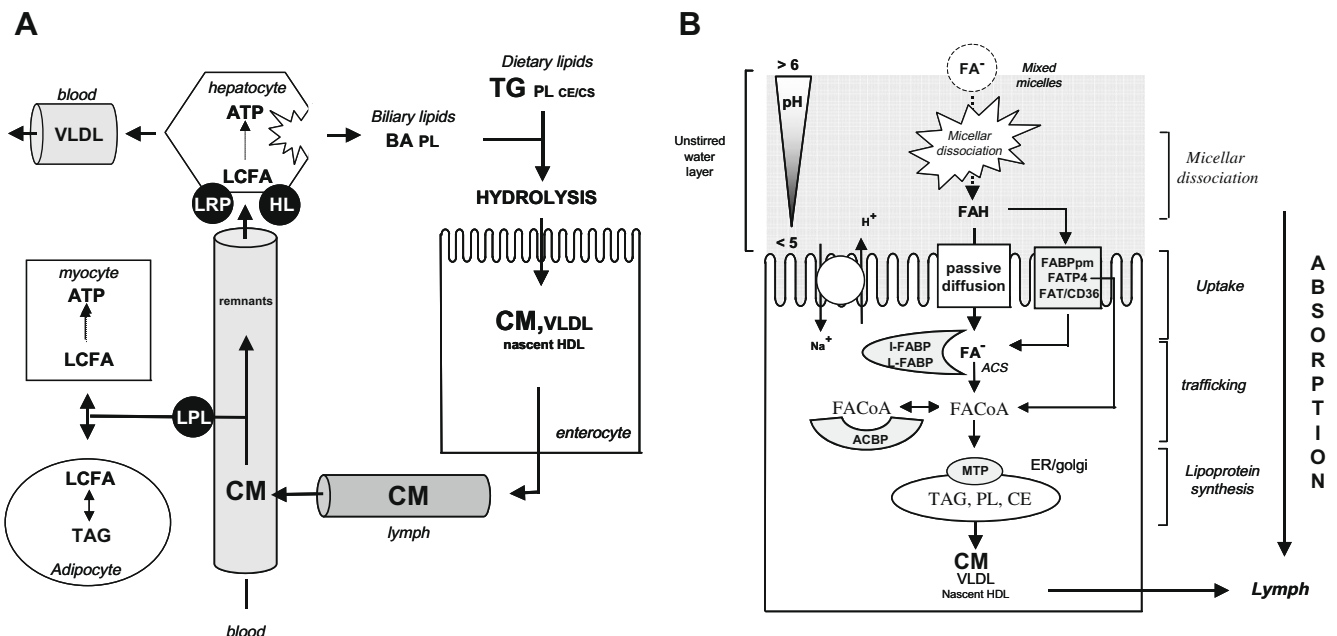
In human diet, around 95% of dietary lipids are triacylglycerols (TAG), mainly composed of long-chain fatty acids (LCFA, number of carbons ≥ 16), the remaining being phospholipids (4.5%) and sterols. Because TAG cannot cross cellular membranes, they must be hydrolyzed before their subsequent metabolic use. Acid-stable gastric lipase partially digests TAG to form diacylglycerols and free fatty acids (FFA) in the stomach. This low lipase activity is essential for an efficient lipid emulsification [1]. Digestion of TAG continues in the small intestine mainly through the action of a colipase-dependent pancreatic lipase and leads to the release of 2-monoacylglycerols and LCFA (for a review, see [2]). In contrast to other energetic nutrients, LCFA are poorly soluble in aqueous solution. Moreover, they exhibit detergent properties potentially harmful for cellular integrity. To overcome these limitations, LCFA are successively dispersed into mixed micelles in intestinal lumen, bound to soluble lipid-binding proteins (LBP) in intestinal absorptive cells and, after re-esterification, are secreted into lymph as TAG-rich

lipoproteins (Fig. 1A). During the post-prandial period, the small intestine produces and secretes chylomicrons (CM), whereas very low density lipoproteins (VLDL) are mainly synthesized during the interprandial periods. Once in the blood, TAG-rich lipoproteins are progressively hydrolyzed by the endothelial lipoprotein lipase (LPL) providing LCFA to peripheral tissues (muscles and adipose tissue). The TAG remaining in resulting small lipoproteins (remnants) are further hydrolyzed by the hepatic lipase; then remnants are cleared from blood by liver mainly via the LDL receptor-related peptide (Fig. 1A).

LCFA exert basic functions in the cell as membrane components, metabolic fuel, precursors of lipid mediators, regulators of ion-channels and modulators of gene expression [3]. They are also involved in various post-translational modifications of proteins (e.g. palmitoylation) affecting their cellular functions [4]. Therefore, digestion and absorption of dietary fat must be highly efficient to ensure a correct LCFA supply to the body. Nevertheless, LCFA being hydrophobic nutrients, their intestinal absorption remains complex. For didactic reason, it is classically depicted in three successive steps: cellular uptake, intracellular trafficking and lipoprotein synthesis/release (Fig. 1B).

**2. Cellular LCFA uptake: diffusion and/or protein-mediated transfer?**

LCFA transfer through the plasma membrane is a highly controversial question at the origin of several reviews [5–11]. By reason of their physicochemical properties, it was thought for a long time that LCFA uptake by cells only took place by diffusion. However,



**Fig. 1.** The metabolic fate of dietary lipid in the body. (A) Circulation and metabolic fate of dietary lipid in the body. (B) The main steps and players involved in intestinal LCFA absorption are depicted: (1) micellar dissociation due to LCFA protonation mediated by the acidic microclimate lining the brush border membrane of enterocytes. (2) LCFA cellular uptake, (3) intracellular trafficking involving soluble lipid-binding proteins and (4) triacylglycerol-rich lipoprotein synthesis and exocytosis into the lymph. ACBP, acyl-CoA-binding protein; ACS, acyl-CoA synthetases; CS, cholesterol; ER, endoplasmic reticulum; FA<sup>-</sup>, ionized long-chain fatty acids; FABPpm, plasma membrane fatty acid-binding protein; FAH, protonated long-chain fatty acids; FATP4, fatty acid transport protein 4; HDL, high density lipoprotein; I-FABP, intestinal fatty acid-binding protein; L-FABP, liver fatty acid-binding protein; HL, hepatic lipase; LPL, lipoprotein lipase; LRP, LDL-related peptide; MTP, microsomal triacylglycerol transfer protein; TAG, triacylglycerol (triglycerides); PL, phospholipids; CE, cholesterol esters; VLDL, very low density lipoproteins.

this concept has been challenged over the two last decades by biochemical approaches suggesting an involvement of a protein-mediated transfer. It is likely that an efficient LCFA uptake by cells requires both spontaneous and facilitated transfer. However, the relative importance of these two mechanisms appears to be highly dependent from the microenvironment and phenotype of lipid-utilizing tissues. Thus, a direct extrapolation of a lipid-transfer model from one to another tissue may constitute physiological nonsense.

### 2.1. From the physicochemical standpoint

Simple models, as phospholipid vesicles, have been largely used to study the transbilayer movement of native or modified fatty acids *in vitro*, with or without albumin used as a donor molecule. This transfer can be viewed as three successive steps: adsorption of LCFA upon the membrane surface, “flip–flop” movement from external hemi-leaflet of bilayer to internal hemi-leaflet and desorption from internal bilayer into the inner of vesicle. By reason of their lipophilicity, LCFA adsorption is thought to be thermodynamically favourable and extremely fast [8,12]. Data on flip–flop step and, in a lesser extent, desorption are more controversial. Using the pH-sensitive fluorophore pyranin trapped into liposomes, Kamp and co-workers report a fast movement of free fatty acids (FFA) across phospholipid bilayer. A flip–flop rate shorter than 20 ms, independent of fatty acid chain length, was found. Interestingly, the transmembrane movement of anionic form of FFA was several orders of magnitude slower than that of protonated ones [13,14]. Altogether these data strongly suggest that FFA can spontaneously cross the cell surface especially when they are protonated. In this model, flip–flop is faster than desorption [13]. Conversely, other studies indicate that the flip–flop, but not the desorption step, is rate-limiting (for review see [11]). Indeed, half times found for FFA transbilayer transfer were within a 70 ms to 10 s range in function of the fatty acid type, vesicle size and temperature. It was concluded that the time course of native FFA through the phospholipid bilayer might be insufficient to support the metabolic activity in cells known to have high requirements in LCFA, as cardiomyocytes. According to these observations, a model for LCFA transfer across a phospholipid bilayer has been recently proposed [15]. Since the pKa of LCFA is lower than 5, more than 99% of LCFA are ionized at physiological pH [6]. Therefore, LCFA insert their hydrophobic carbon backbone first inside the external hemi-leaflet of membrane, the ionized carboxyl head remaining in contact with the lipid/water interface. To cross the membrane, LCFA must undergo a rotation of 180° to reorient its carboxyl group toward the aqueous phase lining the internal hemi-leaflet. In this model, LCFA rotation is a rate-limiting step since it is dependent on both formation of a free volume inside the phospholipid bilayer and LCFA folding. These steric limitations might explain why the efficiency of flip–flop appears to be tightly dependent of membrane curvature. Indeed, flip–flop half times are inversely correlated with the vesicle size, LCFA crossing small vesicles more rapidly than larger ones [15–17]. This size dependence can be accounted for by a larger free volume inside the phospholipid bilayer when the radius of curvature is small [15]. Efficiency of the flip–flop is also dependent of the LCFA itself, unsaturated fatty acids being transferred faster than saturated ones. It has been suggested that the folded conformation of unsaturated fatty acids facilitates their rotation inside to the membrane [15]. Altogether these data indicate that protonated LCFA can easily cross phospholipid bilayers.

### 2.2. From the biochemical standpoint

Liposomes are useful models to dissect FFA fluxes through phospholipid bilayers in a controlled environment. However, the

simplicity of this model and the lack of subsequent LCFA metabolic use constitute major limitations of this technical approach. In isolated enterocytes, as well as in the enterocyte-like Caco-2 cell line, transport of LCFA in both apical and basolateral membranes appears to be saturable, when low LCFA concentrations are used [18,19]. A competitive inhibition by structurally related LCFA has also been reported in Caco-2 cells [20,21]. These data are consistent with an involvement of a protein-facilitated process in intestinal LCFA permeation (Fig. 1B). Identification of proteins exhibiting a high affinity for LCFA in the brush border membrane (BBM) of enterocyte is in agreement with this assumption. Therefore, it has been concluded that the intestinal LCFA uptake is likely a protein-mediated event as reported for cardiac and skeletal muscles [22].

### 2.3. From the physiological standpoint

In contrast to other lipid-utilizing cells (i.e. adipocytes, myocytes and hepatocytes), intestinal absorptive cells (enterocytes) are daily subjected to dramatic changes in fat supply. Adequate luminal environment and morphological adaptations explain why the intestinal fat absorption remains efficient despite of this challenge. Firstly, the unstirred water layer lining BBM constitutes a unique microclimate which promotes the LCFA permeation (Fig. 1B). It is produced by the trapping of water molecules into a complex glycoprotein network formed by mucus and glycocalyx. With a thickness from 50 to 500  $\mu\text{m}$  [23], this weak renewal compartment is characterized by a low pH gradient generated by an efficient  $\text{H}^+/\text{Na}^+$  antiport exchange system located in the BBM [24,25]. By reason of their hydrophobicity, LCFA begin to cross this aqueous diffusion barrier into mixed micelles which increase 100–1000 fold their aqueous concentration [26]. Since LCFA are ionized at physiological pH in aqueous solution, the low pH microclimate found near BBM induces their massive protonation as soon as local pH becomes lower than LCFA pKa. This event is essential for an efficient fat absorption. Indeed, by reducing the LCFA solubility into mixed micelles, protonation induces the release of LCFA near the microvilli of absorptive cells [27]. Moreover, protonation facilitates their subsequent cellular uptake mainly by diffusion since protonated LCFA are known to have a greater membrane permeation capacity than their corresponding ionized species [13,28]. The fact that pharmacological inhibition of the  $\text{H}^+/\text{Na}^+$  antiporter by the diuretic amiloride decreases in dose-dependent manner LCFA uptake in rat jejunal sheets is consistent with this assumption [29]. It is noteworthy that this acidic microclimate is not found in other lipid-utilizing tissues. Secondly, the presence of microvilli in the apical side of enterocytes dramatically enhances their uptake capacity. Moreover, the small membrane curvature found in the top of microvilli is favourable to a fast LCFA flip–flop in the phospholipid bilayer [15–17]. Altogether these specificities explain why intestinal LCFA uptake is not limited during a lipid load (e.g. during the post-prandial period). Therefore, extrapolation of uptake data found in the muscles, adipose tissue or liver to the small intestine is physiologically irrelevant. The same limitation also exists for intestinal cell lines or isolated enterocytes which do not fully reproduce this complex extracellular microclimate and only display a weak density of small microvilli.

In brief, passive diffusion seems to play a significant role in LCFA uptake in the small intestine. This high capacity and low affinity system appears especially well adapted to intestinal challenges since it remains efficient during the post-prandial period. Indeed, lipid fecal loss remains below 5% (w/w) even in situation of high fat supply in healthy humans. [30]. Therefore, lipid uptake does not appear to be a rate-limiting step for the intestinal fat absorption, in contrast to what it is reported for other lipid-utilizing tissues. This conclusion raises the question of the physiological

role played by the plasma membrane lipid-binding proteins found in enterocytes.

#### 2.4. What functions for the plasma membrane lipid-binding proteins?

Three proteins displaying a high affinity for LCFA have been isolated in the BBM of enterocytes: the plasma membrane-associated fatty acid-binding protein (FABPpm) [31], the fatty acid transport protein 4 (FATP4) [32] and the fatty acid transporter (CD36) [33].

##### 2.4.1. FABPpm

FABPpm is a 43 kDa peripheral-associated membrane protein expressed in organs with high lipid requirements [34]. It is thought to adhere to the membrane through a specific N-terminal peptide [35]. A body of evidence supports a role of FABPpm in cellular LCFA uptake. FABPpm can bind LCFA with an apparent dissociation constant (kd) of 80 nM [36]. *In vitro* use of polyclonal antibodies raise against FABPpm leads to a drop in LCFA uptake in hepatocytes [37], adipocytes [38], cardiac myocytes [39] and heart giant vesicles [40]. Targeted-overexpression of FABPpm in rat soleus muscle by using electroporation of the FABPpm expression vector leads to an increase in palmitate uptake [41].

In the small intestine, FABPpm expression is found in jejunum and, in a lesser extent, in ileum. Albeit plausible, implication of FABPpm in intestinal lipid absorption remains questionable. Preincubation of jejunal explants with a mono-specific FABPpm antibody only results in a partial, but significant, inhibition of [3H]-oleate uptake [18]. Nevertheless, large amounts of antiserum were required to achieve such an inhibition. Moreover, the fact that FABPpm is also found in cryptic cells not involved in the fat absorption raises a doubt about a physiological role of this protein in the intestinal LCFA uptake [42,43]. A specific involvement in cellular LCFA transfer is also challenged because the peptidic sequence of FABPpm is identical to the mitochondrial aspartate amino-transferase (mAspAT). This enzyme, found in inner mitochondrial membrane, catalyzes the reaction of transamination linking the ureogenesis pathway to the Krebs cycle [44]. Even if results obtained during (i) fasting in red skeletal muscles [45], (ii) diabetes in adipocytes from Zucker rats [46] or (iii) ethanol load in human hepatoma HepG2 cells [47] are consistent with an involvement of FABPpm/mAspAT in the FA metabolism, its precise physiological role in intestinal fat absorption remains elusive. Generation of FABPpm null mice might provide new insights on the physiological role played by this plasma membrane LBP in intestinal lipid absorption.

##### 2.4.2. FATP4

Fatty acid transport proteins (FATP) are 63 kDa proteins firstly identified in 3T3-L1 preadipocytes by expression cloning strategy on the basis of their facilitation to uptake LCFA [32]. Five and six different isoforms of FATP are found in rodents and humans, respectively [48]. Each FATP displays a specific pattern of expression [48]. For example, FATP5 and FATP2 are highly expressed in the liver [49], while FATP1 is essentially found in the adipose tissue and FATP4 in the gut [48]. Interestingly, the intestinal location of FATP4 correlated quite well with fat absorption. Indeed, its expression level is especially high in the jejunum and, to a lesser extent, in the duodenum, but is lacking in the colon [48]. Moreover, the expression of FATP4 was initially found in BBM of mature enterocytes located in the upper side of villi. In contrast, it was low or lacking in undifferentiated cryptic cells [48]. *In vitro* studies strongly also support an involvement of FATP4 in the LCFA uptake. Indeed, mediated-depletion of FATP4 protein by antisense strategy leads to a significant decrease in LCFA uptake in freshly isolated enterocytes [48]. Similarly, a 40% decrease in the fatty acid uptake is reported in enterocytes isolated from FATP4<sup>+/-</sup> mice which

display 48% reduction of FATP4 protein [50]. Finally, FATP4 antagonists decrease LCFA uptake in cells stably transfected with a FATP4 expression vector [51]. The mechanism by which FATPs facilitate the cellular fatty acid transfer is not yet fully established. Since FATP proteins do not contain a putative LCFA-binding site, a role as fatty acid pool former upon the surface of membranes seems unlikely. In contrast, a high amino-acid sequence identity between acyl-CoA synthetases (ACS) and FATPs, as well as a comparable predictive structure including a highly conserved ATP-binding motif, strongly suggests that FATPs might be involved in fatty acid acylation with a preferential substrate specificity for LCFA and very LCFA [52,53]. The fact that membrane extracts of Cos1 cells transfected with a murine FATP4 expression vector display a high ACS activity is consistent with this assumption [54]. Such a function might be crucial. Indeed, acylation of LCFA is absolutely required for their subsequent metabolic use. Moreover, plasma membranes are impermeable to fatty acyl-CoA (FA-CoA). Therefore, it has been proposed that FATP4 contributes to uptake of LCFA by trapping them as CoA derivatives [10,53,55]. In brief, FATP4 might play an indirect role in intestinal lipid uptake through a vectorial acylation of LCFA. Nevertheless, this hypothesis has been recently challenged by the demonstration that FATP4 is rather expressed in the endoplasmic reticulum (ER) membrane than in BBM [55,56]. Moreover, the physiological impact of FATP4 on fat absorption remains also elusive *in vivo*. FATP4 inhibitors do not display any effects on fat absorption in wild-type mice [51]. Similarly, no change in lipid fecal elimination and weight gain is found in FATP4<sup>+/-</sup> mice subjected to standard or high fat diets [50]. Unfortunately, deletion of both FATP4 alleles results in embryonic lethality by reason of dramatic perinatal skin defect [50]. To produce viable FATP4<sup>-/-</sup> mice and explore further its physiological role in intestinal fat absorption, the skin phenotype has been recently rescued using an FATP4 transgene driven by a keratinocyte-specific promoter [57]. These FATP4-null mice and their wild-type littermates display indistinguishable intestinal TAG absorption or fecal fat output when they are fed with a standard chow. The lack of effect being not due to compensatory induction of other LBP, it has been concluded that FATP4 is dispensable for fat absorption in the mouse. However, an increase in the enterocyte TAG levels was found when FATP4<sup>-/-</sup> mice were subjected to a high fat/cholesterol diet suggesting an involvement of FATP4 in the TAG processing [57]. It is noteworthy that TAG re-esterification takes place in the ER membrane which is also the main expression site for FATP4 gene. Therefore, it is likely that the ACS-like function of FATP4 is involved in the metabolic fate of TAG in the mouse enterocyte. The fact that the human FATP4 Gly-209-Ser polymorphism is associated with a decrease in post-prandial triacylglycerolemia and chylomicron/remnant ratio may be consistent with this assumption [58].

##### 2.4.3. CD36

CD36 is a 88 kDa transmembrane glycoprotein firstly identified in rat adipocytes by labelling with sulfo-N-succinimidyl derivatives of LCFA under conditions where LCFA uptake was significantly inhibited [33]. CD36 is a multifunctional protein homologous to the class B scavenger receptor SR-B1. CD36 increases the uptake of LCFA by cardiomyocytes and adipocytes [59,60] and that of oxidized-LDL by macrophages [61], modifies platelet aggregation by binding to thrombospondin and collagen [62], facilitates the phagocytosis of apoptotic cells by macrophages [63] and increases the cyto-adhesion of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* [64,65]. In addition, CD36 has also recently been shown to play a role in the taste-reception of dietary lipids on the tongue [66,67]. Analysis of its amino-acid sequence predicts a receptor-like structure. Two transmembrane domains located near the N- and C-terminal tails result in a hairpin configuration with a



large extracellular hydrophobic domain [68,33,69]. CD36 binds ionized LCFA with an affinity in the nanomolar range and a stoichiometry of 3 mol FA by 1 mol protein [70,71]. Compelling evidence shows that it plays a significant role in lipid transfer in adipose tissue and heart (reviewed [72]). Indeed, CD36 gene disruption leads to a high blood FFA level and an inability to perform intense efforts in the mouse [73,74]. Similar function might also exist in the small intestine. Indeed, CD36 expression level (mRNA and protein) is especially high in the duodeno–jejunum, the major site of fat absorption [75]. Immunocytochemical studies in rats and humans demonstrate that CD36 is strictly localized in the brush border membrane of well differentiated enterocytes [75,76]. Moreover, intestinal CD36 gene expression has been shown to parallel lipids contents of diets. Indeed, jejunal mRNA levels are significantly up-regulated, when rats are chronically submitted to a high fat diet [75] and down-regulated, when they are fed a low fat chow [77]. However, CD36 function in gut remains a matter of debate. In isolated enterocytes, CD36 gene invalidation either impairs LCFA uptake [78] or has no effect [73]. *In vivo*, the lack of dramatic intestinal phenotype in CD36 null mice, as well as in patients with type I CD36 deficiency, seems to preclude a critical role in the net LCFA intestinal absorption [78–80]. Consistently with this assumption, no change in LCFA uptake is found in FAT/CD36-null mice using an *in situ* isolated jejunal loops, an *in vivo* technical known to respect both intestinal microclimate (i.e. unstirred water layer, cell polarization) and lymph/blood circulation (I.N., unpublished data). By contrast, a disappearance of CD36 in BBM of enterocytes is observed when starved rats or mice are refed a standard laboratory chow (I.N. et al., unpublished data). This phenomenon is rapid and strictly lipid-dependent. The mechanism responsible for this membrane change is presently unknown. A cellular internalization of CD36 via an endocytotic transport is possible. Indeed, it has been reported that CD36 is co-localized with Cav-1 in caveolae vesicles [81–83,56,84]. Such a transport might target LCFA toward the sites of lipoprotein synthesis (ER and Golgi, Fig. 1B). However, the efficiency of this transport system is questionable, especially during the post-prandial period. An alternative hypothesis is an involvement of CD36 in cell signalisation. As numerous receptors [85], ligand-induced internalization of CD36 is followed by an ubiquitin/proteasome-mediated degradation in the enterocyte (I.N. et al., unpublished data). This finding seems more consistent with a role as a receptor rather than an efficient lipid transporter. It is noteworthy that cytoplasmic C-terminal tail of CD36 is able to physically interact with Src kinases in various tissues [67,86–89]. This system might constitute a functional complex allowing a lipid sensing as it has been recently shown in the mouse taste buds [67,89]. Indeed, LCFA binding to lingual CD36 induces neuromediator release by taste receptor cells through a signalling cascade triggered by Src kinases. Resulting lipid signal conveyed by gustatory pathway contributes to the spontaneous fat preference and cephalic phase of the digestion [67]. In the small intestine, a lipid-sensing might lead to metabolic adaptation at the origin of more efficient lipid handling by enterocytes. TAG retention in enterocytes and production of smaller chylomicrons occurring in CD36-null mice subjected to a high fat diet correlate quite well with this assumption [73,80,90]. Therefore, intestinal CD36 seems rather play a role in the lipoprotein synthesis and secretion than in LCFA uptake. Contribution of CD36 as an intestinal lipid sensor is also supported by recent data showing that CD36 can link dietary fat intake to satiety via the synthesis of the endocannabinoid oleyletanolamide [91]. Recent identification of a CD36-related receptor responsible for the olfactory detection of a fatty acid-derived pheromone in *Drosophila* [92] suggests that the lipid-sensing function of CD36, previously reported in the mouse [66], may be widespread throughout the animal kingdom.

In conclusion, the direct contribution of plasma membrane LBP (FABPpm, FAPT4 and FAT/CD36) to the LCFA uptake seems unlikely in the small intestine. However *in vivo* experiments using transgenic mouse models suggest that they can affect the metabolic fate of LCFA in the enterocyte (Fig. 2).

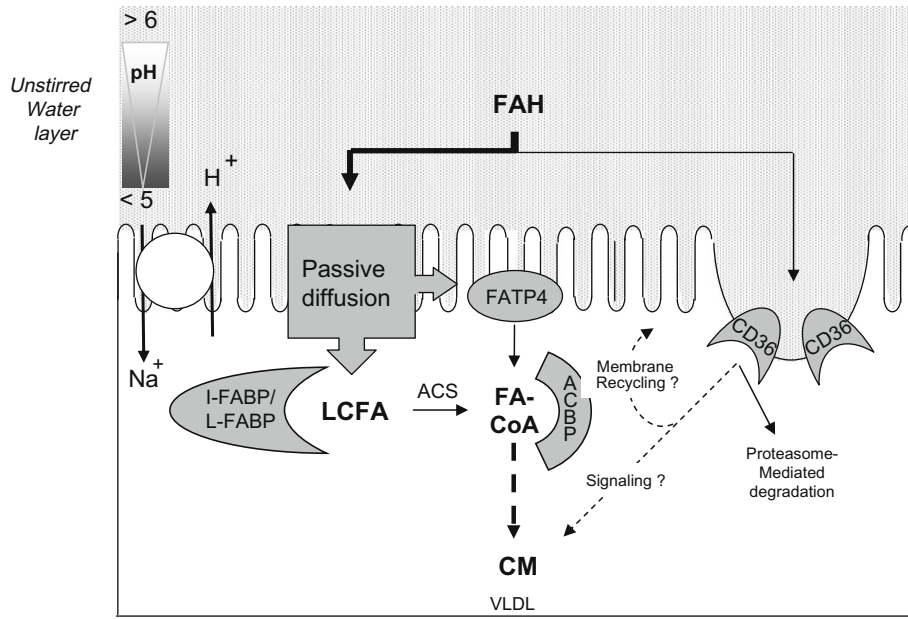
### 3. Intracellular trafficking of LCFA

Once into the enterocyte, LCFA and FCoA are reversibly bound to fatty acid-binding proteins (FABPs) and acyl-CoA binding protein (ACBP), respectively (Fig. 1B).

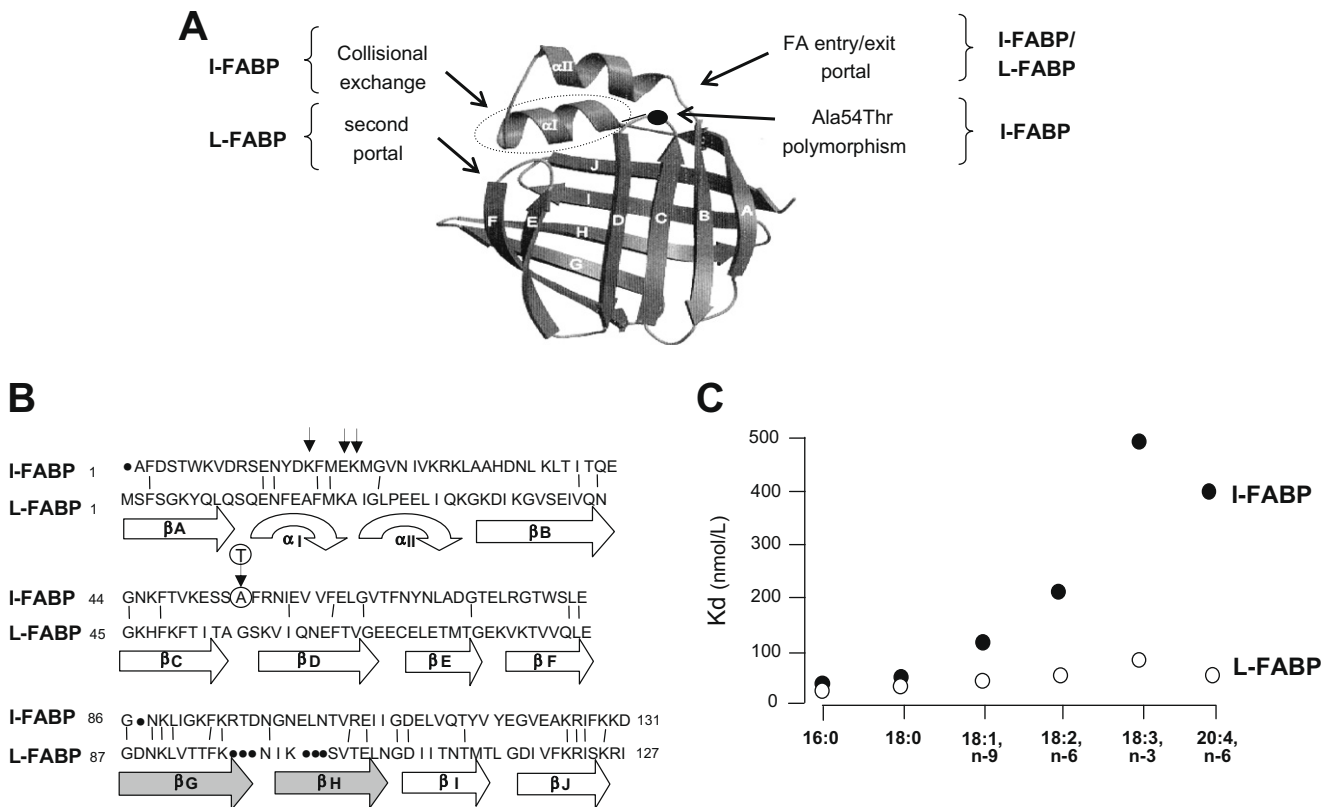
#### 3.1. Why two different FABPs?

FABPs belong to a multigenic family of 14–15 kDa intracellular proteins exhibiting a high affinity for various hydrophobic molecules (LCFA, bile acids or retinoids) (for a review see [93]). Two different FABPs are expressed in the small intestine: the intestinal-type (I-FABP/FABP2) and the liver-type (L-FABP/FABP1). There is an extensive inter-species conservation of FABP peptide sequences since more than 80% homology exists between human and rat L-FABP. In contrast, there is less than 30% homology between I-FABP and L-FABP in a same species [94]. Despite specific peptide sequences, members of FABP family display a similar tertiary structure that consists of two  $\alpha$  helices ( $\alpha I$ ,  $\alpha II$ ) and ten anti-parallel  $\beta$  strands ( $\beta A$ – $\beta J$ ) organized in two almost orthogonal  $\beta$  sheets forming an hydrophobic pocket [95]. A “portal” region constituted by the  $\alpha$  helices connected to the  $\beta C/\beta D$  and  $\beta E/\beta F$  strands allows the entry and exit of LCFA [95,96] (Fig. 3A). The small intestine constitutes a unique example of an organ in which two different FABPs are highly co-expressed. The physiological advantage of such specificity remains elusive. It is likely that I-FABP and L-FABP exert both common (redundant) and specific functions. I-FABP or L-FABP overexpression increases LCFA influx in cell lines in which these proteins are lacking, as fibroblastic L cells [97] and pluripotent mouse embryonic ES cells [98], or only one FABP-type is constitutively expressed, as hBRIE 380i (+I-FABP/–L-FABP) [99] and HepG2 (–I-FABP/+L-FABP) [100]. This driving force, which might participate in the high efficiency of intestinal LCFA uptake, is likely due to common trapping properties of these FABPs.

I-FABP is strictly confined to the small intestine. It only binds LCFA with a ratio of one mole for one mole of protein. Peptide YY specifically induces I-FABP gene expression in enterocyte-like hBRIE380i cells [101]. This regulatory peptide is secreted by ileal endocrine cells when dietary fat reaches the distal part of the gut. The fact that peptide YY acts as a paracrine agent might explain why I-FABP induction found in rodents subjected to a high fat diet is especially high in the ileum [102,103]. Using a resonance energy transfer assay, Hsu and Storch have demonstrated that the transfer of fluorescent anthroxyloxy-FA from I-FABP to acceptor membrane vesicles takes place through a direct collisional interaction [104]. This exchange requires ionic interactions between few amino-acid residues of the helicoidal domain of I-FABP (Fig. 3A and B) with anionic phospholipids of membranes. In the helix-less mutant I-FABP obtained by site-directed mutagenesis, the collisional exchanges are fully suppressed. In these conditions, transfer of anthroxyloxy-FA occurs by aqueous diffusion as reported for the L-FABP [105]. I-FABP may also utilize the membrane-protein interaction for LCFA acquisition [106]. Since LCFA delivered on the apical side of enterocytes are preferentially bound to I-FABP [107], this dynamic exchange system appears to be especially well adapted to facilitate a vectorial transport of dietary lipids from the BBM to cellular compartments devoted to lipoprotein synthesis. It is thought that the collision with a target membrane yields a conformational change in the flexible region of I-FABP backbone



**Fig. 2.** Intestinal absorption of long-chain fatty acids: a working model. For a detailed explanation see Sections 2 and 3. ACBP, acyl-CoA-binding proteins; ACS, acyl-CoA synthetases; CM, chylomicrons; FAcOA, long-chain acyl-CoA; FAH, protonated long-chain fatty acids; FATP4, fatty acid transport protein 4; I-FABP, intestinal fatty acid-binding protein; LCFA, long-chain fatty acids; L-FABP, liver fatty acid-binding protein; VLDL, very low density lipoproteins.



**Fig. 3.** Main features of fatty acid-binding proteins expressed in the small intestine. (A) Example of a typical tertiary structure of a FABP. (B) Amino-acid sequence alignment of human I-FABP and L-FABP with the localization of  $\alpha$  helices and  $\beta$  stands. Arrows indicate amino-acids responsible for the collisional exchange. The Thr54Ala polymorphism is shown. (C) Binding affinity of I-FABP and L-FABP for various LCFA.

constituted by the distal half of  $\alpha$ -II helix and  $\beta$ C- $\beta$ D turns (Fig. 3A). This event might trigger the “hinged opening” of the portal domain and facilitates LCFA release [108]. Therefore, a punctual modifica-

tion in this molecular region of I-FABP might have significant functional consequences. Human Ala54Thr polymorphism of I-FABP gene is consistent with this hypothesis. One base substitution in



codon 54 of FABP2 gene leads to the change of Ala54 by Thr54 (Fig. 3A). Initially found in the Pima indians, this genetic polymorphism is associated with a high TAG plasma levels [109], an insulin resistance [110] and an increase in the body mass index [111]. The fact that Thr54 I-FABP displays a 2-fold greater affinity for LCFA than the Ala54 wild-protein might explain these metabolic disturbances [110]. Indeed, a greater avidity for LCFA of mutant I-FABP could lead to an increase in both cellular fatty acid uptake and TAG-rich lipoproteins synthesis [110]. According to this assumption, a dramatic rise in LCFA transport and TAG secretion is found in Thr54I-FABP-transfected Caco-2 cells as compared to cells transfected the wild-type isoform [112]. Similarly, organ-culture of jejunal explants expressing the Thr54 allele appears to be associated with a rise in TAG synthesis and chylomicron output [113]. Conversely, the down-regulation of I-FABP gene is associated with a decrease in the [<sup>14</sup>C]-palmitate uptake, TAG synthesis and secretion in Caco-2 cells [114]. Collectively, these data suggest that a change in I-FABP binding properties and/or expression levels can affect the intestinal fat absorption. Paradoxically, I-FABP gene invalidation does not lead to a lipid malabsorption in the mouse [115]. Likewise, mouse I-FABP gene deficiency mimics human Thr54 mutation. Indeed, feeding a high fat diet increases weight gain, triacylglycerolemia and insulin resistance in male I-FABP-null mice [115]. Origin of these discrepancies remains unclear. One possibility might be that metabolic alterations induced by Thr54 mutation are secondary to a drop in LCFA transfer activity of I-FABP. Whatever the mechanism involved, these data clearly show that I-FABP and, thereby small intestine plays a role in the metabolic syndrome.

In contrast to I-FABP, L-FABP is also expressed in liver and, in a lesser extent, in kidneys. Because of a hydrophobic pocket much larger (440 Å<sup>3</sup> versus 234 Å<sup>3</sup> for the I-FABP) [94], L-FABP can bind 2 LCFA as well as various bulky hydrophobic molecules as bile acids [116] or heme [117]. This difference in volume cavity also affects LCFA binding affinities. Indeed, one of two binding sites of L-FABP exhibits a higher avidity for unsaturated LCFA (folded molecules) than I-FABP [118] (Fig. 3C). L-FABP displays other specificities not found for I-FABP. L-FABP-mediated transfer of LCFA takes place through an aqueous diffusion [104]. Its intestinal expression is up-regulated by LCFA through a PPAR-dependent mechanism [119]. L-FABP seems also to exert an active role as partner of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), nuclear receptors considered as a cellular lipid sensor [120]. This positive regulatory loop associated to a binding ratio of LCFA to L-FABP/I-FABP of 3.3 [107] strongly suggest that L-FABP can act as an intracellular reservoir for LCFA. Through this action, L-FABP might support lipid metabolism when lipid supply is low as well as protect the cell against harmful effect of an excess of free fatty acid during post-prandial period. From a physiological point of view, this last function might be essential to maintain the intestinal mucosa integrity required to an efficient lipid absorption. Finally, a role of L-FABP in lipoprotein processing has been recently reported *in vitro*. L-FABP seems to contribute to the budding of ER membrane facilitating the formation of pre-chylomicron transfer vesicles (PCTV) which are subsequently targeted towards the Golgi apparatus [121]. The physiological relevance of this finding is supported by *in vivo* studies. Indeed, L-FABP gene disruption leads to a TAG retention in enterocytes associated with a decrease in intestinal TAG output in mice subjected to an acute lipid load [122]. The fact that L-FABP gene is tightly regulated by the lipid content of diet is also consistent with such a function. However, these effects are not reproduced when L-FABP-null mice were only fed a standard laboratory chow suggesting the existence of an alternative mechanism [122]. It is noteworthy that L-FABP-null mice grow normally what suggests a normal intestinal absorption

when the lipid content of diet is low as in the standard laboratory chow (4% lipids, w/w).

In summary, physiological functions of FABPs in the small intestine are likely more complex than those initially assigned (i.e. LCFA uptake and intracellular trafficking). Their respective structural features speak for a specialization at least in high dietary fat supply: I-FABP being predominantly devoted to the TAG-rich lipoprotein synthesis, while L-FABP might be involved in the formation of PCTV, membrane protection and gene regulation. Because I-FABP and L-FABP gene disruption does not lead to a severe phenotype in mice fed a low fat diet, existence of a functional redundancy to ensure a correct fat absorption, especially during the post-prandial period is likely. Double I-FABP/L-FABP knock-out mice might provide new insights concerning their respective physiological functions.

### 3.2. Acyl-CoA-binding protein: an housekeeping protein

Thio-esterification of LCFA in FA-CoA is an obligatory step initiating the cellular lipid metabolism. It is catalyzed by a set of membrane-associated ACSs. The newly synthesized FA-CoA which are not immediately metabolised are bound to a specific carrier protein, the acyl-CoA binding protein (ACBP) (Fig. 1). This LBP is an ubiquitous 10 kDa soluble FA-CoA transporter conserved from the yeast to the mammal (for a review see, [123]). The 86 amino-acid residues of ACBP are folded in four  $\alpha$ -helix forming a boomerang structure [124,125]. The acyl chain of FA-CoA is buried in a hydrophobic groove of the binding pocket within it is totally protected from the aqueous solvent by its acyl-CoA head [126,127]. ACBP binds with a stoichiometry of 1:1 and an affinity in the nanomolar range both medium and long-chain FA-CoA [127,128]. In the small intestine from rats and mice, ACBP is co-expressed with FABPs in absorptive cells [129]. In rat, a similar ACBP mRNA level is found along the cephalo-caudal axis of the small intestine (I.N. et al., unpublished data) in contrast what is observed for L-FABP and I-FABP. The precise function of ACBP in this organ is not yet fully determined. ACBP might facilitate FA-CoA desorption from FATP4 and other ACSs and, thus, contribute to the lipoprotein synthesis (Fig. 2). Indeed, ACBP has been reported to regulate the cellular FA-CoA disposal for microsomal TAG synthesis [126]. The fact that the ACBP gene disruption leads to a drastic reduction in TAG accumulation in pre-adipocytes is consistent with this assumption [130]. The detection of ACBP and FA-CoA in the nucleus of different cells [131] suggests a possible interference of ACBP expression and/or FA-CoA disposal with fundamental regulatory pathways [130].

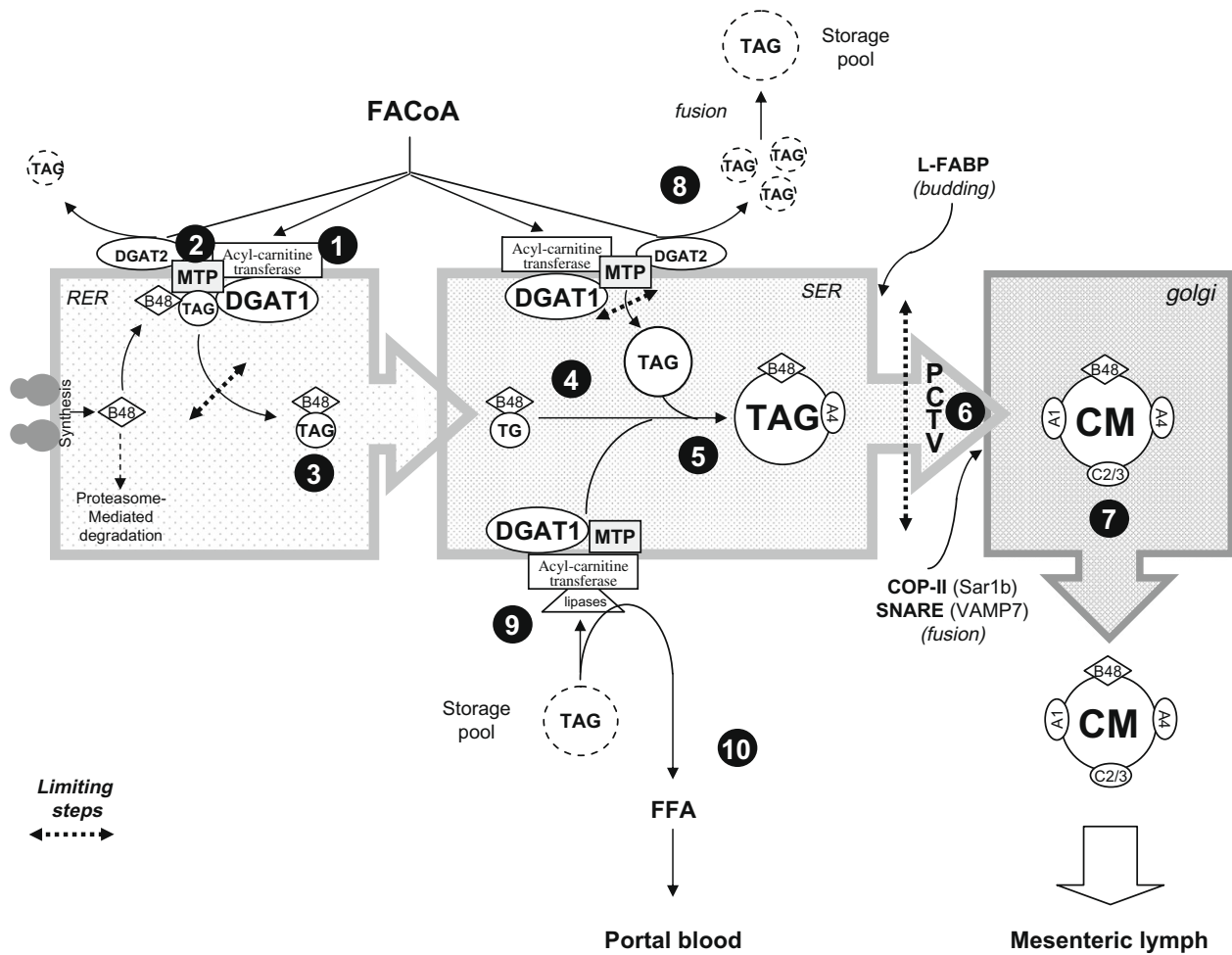
A working model illustrating the main steps involved in LCFA uptake and trafficking in the absorptive intestinal cells is proposed in Fig. 2.

## 4. Chylomicron assembly and trafficking

FA-CoA are rapidly re-esterified in TAG in the ER before to form pre-CM then CM in the Golgi apparatus (Fig. 4). During the last past years, significant progress in the understanding of molecular events responsible for CM assembly, trafficking and release have been realized (for recent reviews see, [132–134]).

### 4.1. Re-esterification step

Re-esterification of FA-CoA takes place in the ER membrane via two multi-enzymatic systems [135]. The 2-monoglyceride pathway, specific of the small intestine, is located in the smooth ER (SER). It is responsible for up to 80% of newly synthesized TAG during the post-prandial period. Enzymes of the  $\alpha$ -glycerophosphate pathway, also active in the liver, are found on rough ER (RER). Their



**Fig. 4.** Synthesis of intestinal lipoproteins: a working model. For a detailed explanation see Section 4. ApoB48, apolipoprotein B48; CM, chylomicrons; DGAT, acyl-CoA-diacylglycerol acyltransferases; FFA, free fatty acids; MTP, microsomal triacylglycerol transfer protein; RER, rough endoplasmic reticulum; SER, smooth endoplasmic reticulum; TAG, triacylglycerol (triglycerides).

activity is predominant during the interprandial and fasting periods. In contrast to the 2-monoglyceride pathway, which only produces TAG,  $\alpha$ -glycerophosphate pathway leads also to the synthesis of phospholipids [136]. Whatever the pathways, the final reaction leading to TAG synthesis is catalyzed by the acyl-CoA-diacylglycerol acyltransferases (DGAT). Two unrelated DGAT, termed DGAT1 and DGAT2, are co-expressed in the small intestine [137,138]. Despite similar biochemical functions, these enzymes display several differences. DGAT1 is mainly expressed in the proximal small intestine [137,139] in which it represents 85–90% of the total DGAT activity, whereas DGAT2 is more importantly found in adipose tissue and liver [140]. DGAT2 appears to be located in the cytosolic side of the ER membrane [141]. In contrast, the active site of DGAT1 is located in the lumen of ER [138,142]. Therefore, intestinal TAG re-esterification takes place on the two sides of the ER membrane suggesting the existence of two different pools of newly synthesized TAG (Fig. 4). Consistently with this assumption, DGAT1 over-expression in the liver mainly leads to an increase in lipoprotein secretion, while over-expression of DGAT2 essentially produces a TAG accumulation in the cytoplasm as lipid droplets [143].

Paradoxically, DGAT1 gene disruption does not lead to a lipid malabsorption when mice were fed a standard laboratory chow (3% lipids, w/w). DGAT2-mediated synthesis of TAG might explain this data suggesting some functional redundancies between these two enzymes. However, a reduction of post-absorptive chylomicronemia and an accumulation of cytosolic lipid droplets in entero-

cytes are found in DGAT1-null mice subjected to a high fat diet [139]. Therefore, DGAT2 appears to be insufficient to fully compensate the absence of DGAT1 in a high fat situation. Direct investigation of DGAT2 gene role in the small intestine is presently lacking. Indeed, DGAT2 gene invalidation, leading to deep epidermal defects, is lethal soon after birth [140]. Generation of mice with targeted DGAT2 gene disruption in spatio-temporal manner will be required to explore further its function. It is noteworthy that the diacylglycerol transacylase [144] and the lecithine-cholesterol acyltransferases [145] can also constitute alternative pathways for the TAG synthesis in the small intestine. In brief, we can think that during post-prandial period TAG generated by DGAT1 are immediately available for the lipoprotein synthesis in contrast to TAG produced by DGAT2 which are mainly stored as a cytosolic pool.

#### 4.2. TAG transfer in the endoplasmic reticulum

Existence of active DGAT on the two sides of ER membrane raises the question of mechanisms involved in the TAG delivery into ER cisternae. Existence of two complementary transfer systems is likely (Fig. 4). A first system is required for the delivering of FA-CoA to DGAT1 active site by reason of inability of these molecules to cross the membranes (Fig. 4, reaction 1). The carnitine acyltransferase-like system, initially identified in hepatic microsomes [146], might assume such a function in the small intestine. Indeed,

the intraduodenal infusion of the specific carnitine palmitoyltransferase inhibitor etomoxir dramatically (~75%) decreases TAG output in lymph in rats subjected to a lipid load [142]. The second system allowing the TAG transfer into the endoplasmic reticulum cisternae involves the microsomal triacylglycerol transfer protein (MTP) (Fig. 4, reaction 2). Mainly expressed in the upper part of the villi of the proximal intestine [147], MTP is known to bind and shuttle neutral lipids within membranes [148]. It consists of two non covalently bound proteins. A 97 kDa subunit, which belongs to the large lipid-transfer protein superfamily [149], contains 3 functional domains allowing the association of MTP with ER membranes, the adsorption of neutral lipids (TAG and cholesterol esters) and the binding of the apolipoprotein B48 (ApoB48). A 55 kDa subunit, identified as the protein disulfide isomerase, promotes the proper folding of the large subunit promoting both its retention in ER and its binding properties. MTP appears to be the most important factor regulating the intestinal ApoB lipoprotein assembly and secretion [132,150]. First MTP binds and shuttles TAG molecules within ER membrane [151] because of its phospholipids and TAG transfer activity [152]. Second, the initial lipidation of ApoB48 occurs through a direct interaction with MTP. A physical interaction between MTP and ApoB48 has been demonstrated by using co-precipitation experiments [153]. When MTP and ApoB48 are co-expressed in HeLa cells, that do not make lipoprotein particles, small dense lipoproteins are produced. This phenomenon appears to be strictly MTP-dependent since the lipoprotein is lacking in absence of the MTP expression vector [154]. It is thought that MTP is needed for a proper folding of ApoB48 and the formation of a secretion competent particle. Third, MTP protects nascent ApoB48 lipoprotein against a rapid proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway [155,156]. Consistently with these functions, mice with conditional intestine-specific MTP deficiency develop a dramatic phenotype associating fat malabsorption, cytoplasmic lipid droplet accumulation and virtual disappearance of ApoB48 lipoproteins [157]. In human, a similar syndrome is found in patients with abetalipoproteinemia, a rare autosomal recessive disease due to structural defects in the MTP gene [158]. Conversely, the human polymorphism leading to an over-expression of MTP is associated with an increased blood level of Apo B48 bound to TAG-rich lipoprotein. [159]. Altogether these data demonstrate that MTP plays a significant rate-limiting role in lipoprotein synthesis (Fig. 4, reaction 2). MTP has also been identified in the Golgi apparatus [160] and in the BBM [161]. To date, the functional relevance of these observations remains elusive.

#### 4.3. Pre-chylomicron synthesis

CM are large TAG-rich lipoprotein particles that transport dietary lipids from the small intestine to other locations in the body. CM synthesis is considered to be a three step process which occurs in the ER [132,152]. First, the primordial lipoprotein particles containing one molecule of Apo B48, phospholipids and small amounts of TAG are synthesized in the RER (Fig. 4, reaction 3). Synthesis of primordial lipoprotein particles requires the MTP-mediated lipidation of the newly synthesized ApoB48 which is an obligatory, non exchangeable, CM partner in contrast to other constitutive apolipoproteins. This fundamental role has been highlighted by using a mouse model producing ApoB only in the liver. In these animals, the lack of ApoB48 in the small intestine totally prevents the formation of CM and results in a severe intestinal fat malabsorption with appearance of large cytoplasmic lipid droplets [162]. Similarly, a drop in lymph CM levels associated with an accumulation of TAG in cytosol is found in mice programmed to produce only the ApoB100 in the small intestine [163,164]. Second, re-esterification of TAG and cholesterol esters in the SER leads to the formation of lipid droplets (Fig. 4, reaction 4). Third, these two particles

merge leading to the core expansion of the primordial lipoproteins and the synthesis of nascent lipoproteins (Fig. 4, reaction 5). Incorporation of apolipoprotein AIV (ApoAIV) to the nascent CM is thought to stabilize the particle. Such a function might explain why (i) the ApoAIV gene expression is tightly correlated to the lipid content of the diet [165] and (ii) its over-expression produces larger CM [166,167].

#### 4.4. Transfer of prechylomicrons to the Golgi

Transfer of pre-CM from SER to the Golgi constitutes the second rate-limiting step in the intestinal fat absorption [168]. It is a vectorial transport. In brief, the cargo buds from the SER membrane and forms pre-CM transfer vesicles (PCTV) which translocate to and fuse with the Golgi cis-membrane to deliver pre-CM in Golgi cisternae (Fig. 4, reaction 6). This targeted transport, specific of the small intestine, appears to be tightly controlled by a set of proteins [169,170,170–173]. The molecular mechanism at the origin of this transport is progressively elucidated. It has been recently shown that L-FABP plays a role in the SER membrane deformation leading to PCTV budding [121]. This unexpected function might explain why an impaired intestinal TAG secretion is found in L-FABP-null mice [122]. However, the mechanism involved remains elusive. It has been proposed that L-FABP organizes the PCTV budding-machinery under the control of the phosphorylation of a 9 kDa protein by PKC $\zeta$  [173]. The PCTV membrane also contains a vectorial protein: the vesicle-associated membrane protein-7 (VAMP7) which belongs to the specific v-soluble-N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (v-SNARE) family. This protein, only found in the small intestine [172], seems to be crucial for the targeting of PCTV to the Golgi membrane. Indeed, the use of an antibody raised against VAMP7 leads to 85% decrease in the PCTV transfer [172]. Finally, PCTV fusion with the cis-Golgi membrane requires the presence of Sar1b protein, a member of coatamer II proteins (COPII) system [174]. Indeed, missense mutations of SARA2 gene encoding for the Sar1b protein is found both in CM retention disease and Anderson's disease, two rare human pathologies characterized by a severe malabsorption, fat laden enterocytes and the inability to produce chylomicrons [169]. Final maturation of CM takes place in the Golgi through post-translational modification (i.e. glycolysation and addition of the minor apolipoproteins Apo A1, Apo CII and apo CIII (Fig. 4, reaction 7)).

#### 4.5. Generation of intestinal lipid droplets

Both in the healthy mouse and human, a lipid load leads to the formation of lipid droplets in the cytoplasm of enterocytes [175–179]. Similar event can be reproduced *in vitro* in Caco-2 cells [180]. It is a transient intestinal steatosis due to the conjunction of highly efficient LCFA uptake and TAG re-esterification levels with the existence of two rate-limiting steps in the CM synthesis: MTP-mediated transfer of neutral lipids through ER membrane and vectorial targeting of PCTV into Golgi (Fig. 4). When the TAG synthetic rate is upper to their subsequent transfer into ER cisternae, DGAT1-synthesized TAG pile up on the cytosolic face of the ER and/or are formed at the external side of the ER membrane by DGAT2 [177] (Fig. 4, reaction 8). It is likely that these intestinal cytosolic lipid droplets are surrounded with a phospholipid monolayer as shown in liver cells [181]. Cytosolic TAG pool, accumulated during post-prandial period, is transient. It might provide substrates for the formation of TAG-rich lipoprotein during the interprandial period [177,176]. This pathway requires an efficient TAG hydrolysis (Fig. 4, reaction 9). Interestingly, several cytosolic and microsomal lipases, including pancreatic TAG lipase [182], hormone-sensible lipase [183] and arylacetamide deacetylase [184], have been identified in the enterocyte. Some of FFA released from

**Table 1**  
Lessons from genomics.

Proteins	Lipid fecal loss (low and high fat diet)	Intestinal lipid metabolism	Triacylglyceridemia after a lipid rich meal	References
<b>FATP4</b> Fatp-4 <sup>-/-</sup> /Ivl-Fatp4 <sup>tg;+</sup> mice Human Gly209 polymorphism	Unchanged Undetermined	Subtle intestinal TAG retention on Western diet. Unchanged in a chow fed mice	No change in blood TAG levels and kinetics Decrease in triacylglyceridemia and ratio chylomicrons/remnants.	[57] [58]
<b>CD36</b> CD36 <sup>-/-</sup> mice Human CD36 deficiency	Unchanged Undetermined	Fat laden enterocytes. Decreased lymphatic TAG secretion on high fat diet	Increased blood TAG and FFA levels. Small CM leading to a decrease in LPL-mediated CM clearance Small CM. Increased blood TAG and FFA levels	[79,80,90] [80]
<b>I-FABP</b> I-FABP <sup>-/-</sup> mice Human Ala54Thr polymorphism	Undetermined Undetermined	Undetermined Increased Apol B synthesis and CM secretion <i>in vitro</i>	Hypertriacylglyceridemia in male, only Post-prandial hypertriglyceridemia	[112,115] [110,113,109]
<b>L-FABP</b> L-FABP <sup>-/-</sup> mice	Unchanged	Fat laden enterocytes. Decreased lymphatic TAG secretion on high fat diet. Unchanged in a chow fed mice	Decreased lymphatic TAG secretion	[122]
<b>DGAT1</b> DGAT-1 (-/-) mice	Unchanged	Fat laden enterocytes. Decreased lymphatic TAG secretion on high fat diet. Unchanged in a chow fed mice	Decreased blood CM and TAG levels	[139]
<b>MTP</b> Conditional intestinal MTP <sup>-/-</sup> mice Human MTP deficiency	Steatorrhoea Steatorrhoea	Massive fat laden enterocytes. Lack of CM-sized particles within the secretory pathway <i>Idem</i>	Apobetalipoproteinemia <i>Idem</i>	[157] [158]
<b>ApoB</b> Mice producing Apo B only in the small intestine	Steatorrhoea	Massive fat laden enterocytes Lack of CM-sized particles within the secretory pathway	Absence of CM secretion No modification of plasma TAG levels after 4 h fasting	[162]
<b>Sar1b</b> Human mutations in SARA 2 gene	Steatorrhoea	Fat laden enterocytes.	inability to produce chylomicrons	[169]

cytosolic TAG pool by lipases might also exit the enterocyte to be transported to the liver *via* the portal vein (Fig. 4, reaction 10).

## 5. Lessons learned from genomics

The generation of transgenic mouse models with a targeted knock-out or over-expression of genes involved in fat absorption as well as the identification of related human polymorphisms has evidenced several intestinal specific features (Table 1).

First, in contrast to what is demonstrated in muscles and adipose tissue, CD36 gene has only a neglected role in the intestinal LCFA uptake. This finding highlights that a direct generalization of a gene function found in one organ to another one, without to take in account of its own specificities (i.e. micro-environment and phenotype) is physiologically irrelevant. By contrast, intestinal CD36 plays a role in the metabolic fate of re-esterified TAG. Indeed, CD36 gene invalidation is associated with fat laden enterocytes and a decrease in lymphatic CM secretion. The molecular mechanism at the origin of these CD36-mediated effects must to be elucidated. Microclimate lining BBM explains why LCFA uptake by enterocytes remains efficient during a lipid load. In contrast, the rate-limiting steps in the fat absorption takes place at the ER and Golgi levels and are dependent of MTP and proteins responsible for the vectorial targeting of pre-CM into the Golgi (e.g. L-FABP, Sar1b).

Second, invalidation of several genes, considered for a long time as crucial for fat absorption (e.g. I-FABP, DGAT1), does not lead to a clear phenotype when animals are fed a standard chow. Metabolic redundancies (e.g. I-FABP versus L-FABP or DGAT1 versus DGAT2) are likely responsible for this observation. Existence of alternative pathways contributing to the efficiency of lipid absorption is of a

great physiological interest. Indeed, they prevent an excessive fecal fat output and, hence, energy loss.

Third, genomics has contributed to reveal unexpected gene functions as, for instance, the role of L-FABP gene in the PCTV synthesis and transfer towards the Golgi. Targeted gene modifications specifically in the small intestine might provide new insights in intestinal fat absorption in a near future.

## 6. Do dietary lipids affect the intestinal function?

Chronic fat overconsumption increases the obesity risk in number of species. Although the small intestine is responsible for fat body disposal, its role in this phenomenon has been neglected. The fact that the small intestine has long been considered a simple selective barrier able to efficiency absorb dietary fat explain this paradox. Recent data strongly suggest that the high TAG bioavailability of intestine might be not attributable to inborn properties but acquired properties. Indeed, intestinal fat absorption capacity can be adapted to the fat content of the diet in the mouse. This fat-mediated adaptation takes place through two complementary events. First, there is a lipid-mediated induction of intestinal cell proliferation, which might lead to an increased absorptive area [103]. Consistent with this assumption, rat studies show that high fat diets increase the height of villi and induce the rate of enterocyte migration along the crypt-to-villus axis [185,186]. It is noteworthy that the effect of lipids on intestinal trophism appears to be more efficient than that of other nutrients. Second, mice subjected to a chronic high fat diet display a coordinate induction of genes (i.e. CD36, FATP4, I-FABP, L-FABP, MTP, Apo AIV). This lipid-mediated modification is rapid and adaptative since the gene



expression returns to control values when mice are re-fed a low fat diet [103,187]. Interestingly, these genes seem to play a significant role in the final size of CM by facilitating the expansion core of TAG in the CM, and hence, in their subsequent blood clearance by LPL. Moreover, it has been recently reported that lipid content of the diet is also able to modulate gene expression of secreted signalling molecules which could affect the metabolic homeostasis of peripheral organs [188]. All together, these emergent data highlight that the lipid-mediated impact on the small intestine could contribute to the etiology of metabolic disorders linked to a high fat diet.

## 7. Intestinal contribution to dyslipidemia

Hypertriglyceridemia is a metabolic disorder generally associated with insulin-resistance, obesity, metabolic syndrome. Adverse effects of a chronic post-prandial high TAG levels on cardio-vascular function is well established. Although CM and their remnants can be atherogenic [189], contribution of the small intestine in the genesis of this dyslipidemia is not much studied as compared to the liver implication. The fact that triacylglycerolemia is usually determined in fasted human can explain this paradox. However, it is well known that the plasma TAG level remains elevated for the most of the day even in subjects with normal fasting TAG [190,191]. Post-prandial triacylglycerolemia results not only from the TAG-rich lipoprotein secretion but also from their subsequent blood clearance by endothelial LPL. CM size and number are known to affect LPL activity and, hence, blood TAG clearance. A small number of large CM are more rapidly cleared by LPL than a large number of small CM [192–194]. CM size is highly dependent on expression levels of few genes expressed in the small intestine. For example, CD36-null mice secrete smaller CM than wild-type mice [90] and intestinal ApoAIV overexpression produces larger TAG-rich lipoproteins [166,167]. LPL activity is also under control of apolipoproteins CII (apoCII) and CIII (ApoCIII) acquired during the intestinal CM biogenesis (Fig. 4, reaction 7) or by exchange with hepatic lipoproteins. Apo CII is a co-factor which activates LPL. For this reason, the low lipolytic activity of LPL found in Apo CII-deficient human can be corrected by the addition of Apo CII [195]. In contrast, Apo CIII is an LPL inhibitor. Therefore, ApoCII/ApoCIII ratio found in CM determines the efficiency of their blood clearance by LPL.

Generally, fat feeding increases the size of the CM particles rather than their number [196]. However, this effect is highly dependent from the quality of dietary lipids. A diet rich in unsaturated fatty acids leads to larger CM than a diet containing mainly saturated fatty acids [197–199]. The nature of absorbed fatty acids also affects their blood clearance. In the mouse, a high fat diet mainly composed of monounsaturated fatty acids specifically up-regulates the expression of ApoCII gene but down-regulates the ApoCIII gene in the small intestine. This change, not reproduced in the liver, might explain why mice subjected to this diet displayed a lower post-prandial triacylglycerolemia than mice fed standard chow [103]. In humans, studies have shown that post-prandial blood lipid levels are also highly dependent of the fatty acid composition of the test meal (SFA > MUFA > PUFA) (for a review, see [200]).

The intestinal impact on the blood TAG levels seems to be still more important during insulin-resistance [201]. Enterocytes from insulin-resistant hamsters secrete more TAG, more ApoB48 and thus a greater number of chylomicrons than controls [202]. Similar alterations has been also found *in vivo* in diabetic rabbit [203], and as initially suggested by the Tomkin's team [204], in humans [205].

## 8. Conclusions and future directions

This review illustrates the remarkable capacity of the small intestine to absorb dietary fat. Modulation of intestinal plasticity

(i.e. cell proliferation and coordinate gene regulation) by dietary lipids and the existence of compensatory redundant mechanisms allow the adaptation of the fat absorption to the lipid content of the diet. This lipid-mediated adaptability appears to be sufficient to prevent an excessive lipid elimination in faeces when fat supply is enhanced. This physiological feature maximizes the absorption of foods known to be rich in energy, in essential fatty acids and in lipid-soluble vitamins (A, D, E, and K) which display numerous fundamental biological functions. Likely inherited from evolution, these lipid-mediated intestinal adaptations might constitute an advantage allowing the survival in an environment of food scarcity. Conversely, it might contribute to increase the prevalence of obesity and related diseases during periods of food abundance. Nevertheless, molecular mechanisms responsible for this adaptation are yet not fully understood. For instance, the regulator(s) at the origin the coordinated modulation of genes responsible for intestinal metabolic fate of dietary lipids remains to be determined. The small intestine also secretes numerous substances that may also stimulate intestinal adaptation under certain extreme conditions as high fat feeding, and this idea is being explored. A better understanding of the mechanisms leading to lipid-dependent intestinal adaptation may provide new therapeutic approaches and/or dietary recommendations allowing the optimisation of blood CM clearance and, hence, decrease prevalence of fat-mediated diseases in the population.

## Acknowledgments

This work was supported by the National Institute of Agro-nomic Research (INRA) and the National Institute of Health and Medical Research (INSERM) through the Research Program in Human Nutrition and Alimentation (PRNH to PB), and by grants from Burgundy Council (to PB).

## References

- Armand M, Borel P, Dubois C, Senft M, Peyrot J, Salducci J, et al. Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. *Am J Physiol* 1994;266:G372–81.
- Mu H, Hoy CE. The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog Lipid Res* 2004;43:105–33.
- Eyster KM. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv Physiol Educ* 2007;31:5–16.
- Linder ME, Deschenes RJ. Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:74–84.
- Berk PD, Stump DD. Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids. *Mol Cell Biochem* 1999;192:17–31.
- McArthur MJ, Atshaves BP, Frolov A, Foxworth WD, Kier AB, Schroeder F. Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J Lipid Res* 1999;40:1371–83.
- Hajri T, Abumrad NA. Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu Rev Nut* 2002;22:383–415.
- Hamilton JA, Guo W, Kamp F. Mechanism of cellular uptake of long-chain fatty acids: do we need cellular proteins? *Mol Cell Biochem* 2002;239:17–23.
- Pohl J, Ring A, Stremmel W. Uptake of long-chain fatty acids in HepG2 cells involves caveolae: analysis of a novel pathway. *J Lipid Res* 2002;43:1390–9.
- Mashek DG, Coleman RA. Cellular fatty acid uptake: the contribution of metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:274–8.
- Kampf JP, Kleinfeld AM. Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? An unknown protein mediates free fatty acid transport across the adipocyte plasma membrane. *Physiol (Bethesda)* 2007;22:7–14.
- Zakim D. Thermodynamics of fatty acid transfer. *J Membr Biol* 2000;176:101–9.
- Kampf F, Zakim D, Zhang F, Noy N, Hamilton JA. Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. *Biochemistry* 1995;34:11928–37.
- Brunaldi K, Miranda MA, Abdulkader F, Curi R, Procopio J. Fatty acid flip-flop and proton transport determined by short-circuit current in planar bilayers. *J Lipid Res* 2005;46:245–51.
- Kampf JP, Cupp D, Kleinfeld AM. Different mechanisms of free fatty acid flip-flop and dissociation revealed by temperature and molecular species dependence of transport across lipid vesicles. *J Biol Chem* 2006;281:21566–74.
- Kleinfeld AM, Storch J, Transfer of long-chain fluorescent fatty acids between small and large unilamellar vesicles. *Biochemistry* 1993;32:2053–61.

- [17] Kleinfeld AM, Chu P, Romero C. Transport of long-chain native fatty acids across lipid bilayer membranes indicates that transbilayer flip-flop is rate limiting. *Biochemistry* 1997;36:14146–58.
- [18] Stremmel W. Uptake of fatty acids by jejunal mucosal cells is mediated by a fatty acid binding membrane protein. *J Clin Invest* 1988;82:2001–10.
- [19] Trotter PJ, Ho SY, Storch J. Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. *J Lipid Res* 1996;37:336–46.
- [20] Storch J, Herr FM, Hsu KT, Kim HK, Liou HL, Smith ER. The role of membranes and intracellular binding proteins in cytoplasmic transport of hydrophobic molecules: fatty acid-binding proteins. *Comp Biochem Physiol* 1996;115B:333–9.
- [21] Tranchant T, Besson P, Hoinard C, Pinault M, Alessandri JM, Delarue J, et al. Long-term supplementation of culture medium with essential fatty acids alters alpha-linolenic acid uptake in Caco-2 clone TC7. *Can J Physiol Pharmacol* 1998;76:621–9.
- [22] Chabowski A, Gorski J, Luiken JJ, Glatz JF, Bonen A. Evidence for concerted action of FAT/CD36 and FABPpm to increase fatty acid transport across the plasma membrane. *Prostaglandins, Leukot and Essent Fatty Acids* 2007;77:345–53.
- [23] Wilson FA, Sallee VL, Dietschy JM. Unstirred water layers in intestine: rate determinant of fatty acid absorption from micellar solutions. *Science* 1971;174:1031–3.
- [24] Shiau YF, Fernandez P, Jackson MJ, McMonagle S. Mechanisms maintaining a low-pH microclimate in the intestine. *Am J Physiol* 1985;248:G608–17.
- [25] Orsenigo MN, Tosco M, Zoppi S, Faelli A. Characterization of basolateral membrane Na/H antiport in rat jejunum. *Biochim Biophys Acta* 1990;1026:64–8.
- [26] Tso P. Intestinal lipid absorption. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 3rd ed. 1994. p. 1867–907.
- [27] Shiau YF. Mechanisms of intestinal fat absorption. *Am J Physiol* 1981;240:G1–9.
- [28] Kamp F, Westerhoff HV, Hamilton JA. Movement of fatty acids, fatty acid analogues and bile acids across phospholipid bilayers. *Biochemistry* 1993;32:11074–86.
- [29] Schoeller C, Keelan M, Mulvey G, Stremmel W, Thomson AB. Oleic acid uptake into rat and rabbit jejunal brush border membrane. *Biochim Biophys Acta* 1995;1236:51–64.
- [30] Ross AC. Overview of retinoid metabolism. *J Nutr* 1993;123:346–50.
- [31] Stremmel W, Lotz G, Strohmeyer G, Berk PD. Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. *J Clin Invest* 1985;75:1068–76.
- [32] Schaffer JE, Lodish HF. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 1994;79:427–36.
- [33] Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem* 1993;268:17665–8.
- [34] Potter BJ, Stump D, Schwieterman W, Sorrentino D, Jacobs LN, Kiang CL, et al. Isolation and partial characterization of plasma membrane fatty acid binding proteins from myocardium and adipose tissue and their relationship to analogous proteins in liver and gut. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;148:1370–6.
- [35] Berk PD, Wada H, Horio Y, Potter BJ, Sorrentino D, Zhou SL, et al. Plasma membrane fatty acid-binding protein and mitochondrial glutamic-oxaloacetic transaminase of rat liver are related. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3484–8.
- [36] Stremmel W, Strohmeyer G, Borchard F, Kochwa S, Berk PD. Isolation and partial characterization of a fatty acid-binding protein in rat liver plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4–8.
- [37] Stremmel W, Theilmann L. Selective inhibition of long-chain fatty acid uptake in short-term cultured rat hepatocytes by an antibody to the rat liver plasma membrane fatty acid-binding protein. *Biochim Biophys Acta* 1986;877:191–7.
- [38] Zhou SL, Stump D, Sorrentino D, Potter BJ, Berk PD. Adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells involves augmented expression of a 43-kDa plasma membrane fatty acid-binding protein. *J Biol Chem* 1992;267:14456–61.
- [39] Sorrentino D, Stump D, Potter BJ, Robinson RB, White R, Kiang C-L, et al. Oleate uptake by cardiac myocytes is carrier mediated and involves a 40-kDa plasma membrane fatty acid binding protein similar to that in liver, adipose tissue, and gut. *J Clin Invest* 1988;82:928–35.
- [40] Luiken JJ, Turcotte LP, Bonen A. Protein-mediated palmitate uptake and expression of fatty acid transport proteins in heart giant vesicles. *J Lipid Res* 1999;40:1007–16.
- [41] Clarke DC, Miskovic D, Han XX, Calles-Escandon J, Glatz JF, Luiken JJ, et al. Overexpression of membrane-associated fatty acid binding protein (FABPpm) in vivo increases fatty acid sarcolemmal transport and metabolism. *Physiol Genomics* 2004;17:31–7.
- [42] Isola LM, Zhou SL, Kiang CL, Stump DD, Bradbury MW, Berk PD. 3T3 fibroblasts transfected with a cDNA for mitochondrial aspartate aminotransferase express plasma membrane fatty acid-binding protein and saturable fatty acid uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:9866–70.
- [43] Zhou SL, Stump D, Isola L, Berk PD. Constitutive expression of a saturable transport system for non-esterified fatty acids in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* 1994;297:315–9.
- [44] Stump DD, Zhou SL, Berk PD. Comparison of plasma membrane FABP and mitochondrial isoform of aspartate aminotransferase from rat liver. *Am J Physiol* 1993;265:G894–902.
- [45] Turcotte LP, Srivastava AK, Chiasson JL. Fasting increases plasma membrane fatty acid-binding protein (FABP(PM)) in red skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1997;166:153–8.
- [46] Berk PD, Zhou SL, Kiang CL, Stump D, Bradbury M, Isola LM. Uptake of long chain free fatty acids is selectively up-regulated in adipocytes of Zucker rats with genetic obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Biol Chem* 1997;272:8830–5.
- [47] Zhou S-L, Gordon RE, Bradbury M, Stump D, Kiang C-L, Berk PD. Ethanol up-regulates fatty acid uptake and plasma membrane expression and export of mitochondrial aspartate aminotransferase in HepG2 cells. *Hepatology* 1998;1998:1064–74.
- [48] Stahl A, Hirsch DJ, Gimeno RE, Punreddy S, Ge P, Watson N, et al. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol Cell* 1999;4:299–308.
- [49] Stahl A, Gimeno RE, Tartaglia LA, Lodish HF. Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12:266–73.
- [50] Gimeno RE, Hirsch DJ, Punreddy S, Sun Y, Orregon AM, Wu H, et al. Targeted deletion of fatty acid transport protein-4 results in early embryonic lethality. *J Biol Chem* 2003;278:49512–6.
- [51] Blackburn C, Guan B, Brown J, Cullis C, Condon SM, Jenkins TJ, et al. Identification and characterization of 4-aryl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones as inhibitors of the fatty acid transporter FATP4. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16:3504–9.
- [52] Hall AM, Wiczor BM, Herrmann T, Stremmel W, Bernlohr DA. Enzymatic properties of purified murine fatty acid transport protein 4 and analysis of acyl-CoA synthetase activities in tissues from FATP4 null mice. *J Biol Chem* 2005;280:11948–54.
- [53] Jia Z, Pei Z, Maiguel D, Toomer CJ, Watkins PA. The fatty acid transport protein (FATP) family: very long chain acyl-CoA synthetases or solute carriers? *J Mol Neurosci* 2007;33:25–31.
- [54] Herrmann T, Buchkremer F, Gosch I, Hall AM, Bernlohr DA, Stremmel W. Mouse fatty acid transport protein 4 (FATP4): characterization of the gene and functional assessment as a very long chain acyl-CoA synthetase. *Gene* 2001;270:31–40.
- [55] Milger K, Herrmann T, Becker C, Gotthardt D, Zickwolf J, Ehehalt R, et al. Cellular uptake of fatty acids driven by the ER-localized acyl-CoA synthetase FATP4. *J Cell Sci* 2006;119:4678–88.
- [56] Ehehalt R, Sparla R, Kulaksiz H, Herrmann T, Fullekrug J, Stremmel W. Uptake of long chain fatty acids is regulated by dynamic interaction of FAT/CD36 with cholesterol/sphingolipid enriched microdomains (lipid rafts). *BMC Cell Biol* 2008;9:45.
- [57] Shim J, Moulson CL, Newberry EP, Lin MH, Xie Y, Kennedy SM, et al. Fatty acid transport protein 4 is dispensable for intestinal lipid absorption in mice. *J Lipid Res* 2008. doi:10.1194/jlr.M800400-JLR200.
- [58] Gertow K, Bellanda M, Eriksson P, Boquist S, Hamsten A, Sunnerhagen M, et al. Genetic and structural evaluation of fatty acid transport protein-4 in relation to markers of the insulin resistance syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:392–9.
- [59] Coburn CT, Knapp Jr FF, Febbraio M, Beets AL, Silverstein RL, Abumrad NA. Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem* 2000;275:32523–9.
- [60] Hajri T, Ibrahim A, Coburn CT, Knapp Jr FF, Kurtz T, Pravenec M, et al. Defective fatty acid uptake in the spontaneously hypertensive rat is a primary determinant of altered glucose metabolism, hyperinsulinemia, and myocardial hypertrophy. *J Biol Chem* 2001;276:23661–6.
- [61] Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1993;268:11811–6.
- [62] Chen CH, Cartwright Jr J, Li Z, Lou S, Nguyen HH, Gotto Jr AM, et al. Inhibitory effects of hypercholesterolemia and ox-LDL on angiogenesis-like endothelial growth in rabbit aortic explants. Essential role of basic fibroblast growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1303–12.
- [63] Ren Y, Silverstein RL, Allen J, Savill J. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med* 1995;181:1857–62.
- [64] Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B. CD36 directly mediates cytoadherence of plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. *Cell* 1989;58:95–101.
- [65] Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 2001;108:785–91.
- [66] Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, Montmayeur JP, et al. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest* 2005;115:3177–84.
- [67] Gaillard D, Laugerette F, Darcel N, El-Yassimi A, Passilly-Degrace P, Hichami A, et al. The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *Faseb J* 2008;22:1458–68.
- [68] Rac ME, Safranow K, Poncyljusz W. Molecular basis of human CD36 gene mutations. *Mol Med* 2007;13:288–96.
- [69] Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 1992;80:1105–15.
- [70] Baillie RA, Jump DB, Clarke SD. Specific effects of polyunsaturated fatty acids on gene expression. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:53–5.

- [71] Ibrahim A, Sfeir Z, Magharaie H, Amri EZ, Grimaldi P, Abumrad NA. Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2646–51.
- [72] Ibrahim A, Abumrad NA. Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:139–45.
- [73] Drover VA, Ajmal N, Nassir F, Davidson NO, Nauli AM, Sahoo D, et al. CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J Clin Invest* 2005;115:1290–7.
- [74] Hajri T, Hall AM, Jensen DR, Pietka TA, Drover VA, Tao H, et al. CD36-facilitated fatty acid uptake inhibits leptin production and signaling in adipose tissue. *Diabetes* 2007;56:1872–80.
- [75] Poirier H, Degrace P, Niot I, Bernard A, Besnard P. Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP). *Eur J Biochem* 1996;238:368–73.
- [76] Lobo MV, Huerta L, Ruiz-Velasco N, Teixeira E, de la Cueva P, Celdran A, et al. Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids. *J Histochem Cytochem* 2001;49:1253–60.
- [77] Sukhotnik I, Gork AS, Chen M, Drongowski RA, Coran AG, Harmon CM. Effect of low fat diet on lipid absorption and fatty-acid transport following bowel resection. *Pediatr Surg Int* 2001;17:259–64.
- [78] Nassir F, Wilson B, Han X, Gross RW, Abumrad NA. CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J Biol Chem* 2007;282:19493–501.
- [79] Drover VA, Nguyen DV, Bastie CC, Darlington YF, Abumrad NA, Pessin JE, et al. CD36 mediates both cellular uptake of very long chain fatty acids and their intestinal absorption in mice. *J Biol Chem* 2008;283:13108–15.
- [80] Masuda D, Hirano KI, Oku H, Sandoval JC, Kawase R, Yuasa-Kawase M, et al. Chylomicron remnants are increased in the postprandial state in CD36 deficiency. *J Lipid Res* 2008. doi:10.1194/jlr.P700032-JLR200.
- [81] Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, et al. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 1994;126:111–26.
- [82] Tao N, Wagner SJ, Lublin DM. CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. *J Biol Chem* 1996;271:22315–20.
- [83] Galbiati F, Volonte D, Meani D, Milligan G, Lublin DM, Lisanti MP, et al. The dually acylated NH2-terminal domain of gi1alpha is sufficient to target a green fluorescent protein reporter to caveolin-enriched plasma membrane domains. Palmitoylation of caveolin-1 is required for the recognition of dually acylated g-protein alpha subunits in vivo. *J Biol Chem* 1999;274:5843–50.
- [84] Greaves J, Salaun C, Fukata Y, Fukata M, Chamberlain LH. Palmitoylation and membrane interactions of the neuroprotective chaperone cysteine-string protein. *J Biol Chem* 2008;283:25014–26.
- [85] Miranda M, Sorkin A. Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. *Mol Interv* 2007;7:157–67.
- [86] Huang M-M, Bolen JB, Barnwell JW, Shattil SJ, Brugge JS. Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the fyn, lyn, and yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7844–8.
- [87] Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* 2000;6:41–8.
- [88] Rahaman SO, Lennon DJ, Febbraio M, Podrez EA, Hazen SL, Silverstein RL. A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab* 2006;4:211–21.
- [89] El-Yassimi A, Hichami A, Besnard P, Khan NA. Linoleic acid induces calcium signaling, SRC-kinase phosphorylation and neurotransmitters release in mouse CD36-positive gustatory cells. *J Biol Chem* 2008;283:12949–59.
- [90] Nauli AM, Nassir F, Zheng S, Yang Q, Lo CM, Vonlehmden SB, et al. CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology* 2006;131:1197–207.
- [91] Schwartz GJ, Fu J, Astarita G, Li X, Gaetani S, Campolongo P, et al. The lipid messenger OEA links dietary fat intake to satiety. *Cell Metab* 2008;8:281–8.
- [92] Benton R, Vannice KS, Vosshall LB. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature* 2007;450:289–93.
- [93] Storch J, Corsico B. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu Rev Nut* 2008;28:73–95.
- [94] Thompson J, Winter N, Terwey D, Bratt J, Banaszak L. The crystal structure of the liver fatty acid-binding protein. A complex with two bound oleates. *J Biol Chem* 1997;272:7140–50.
- [95] Sacchettini JC, Gordon JL. Rat intestinal fatty acid binding protein. A model system for analyzing the forces that can bind fatty acids to proteins. *J Biol Chem* 1993;268:18399–402.
- [96] Thompson H, Zhu Z, Banni S, Darcy K, Loftus T, Ip C. Morphological and biochemical status of the mammary gland as influenced by conjugated linoleic acid: implication for a reduction in mammary cancer risk. *Cancer Res* 1997;57:5067–72.
- [97] Prows DR, Schroeder F. Metallothionein-IIA promoter induction alters rat intestinal fatty acid binding protein expression, fatty acid uptake, and lipid metabolism in transfected L-cells. *Arch Biochem Biophys* 1997;340:135–43.
- [98] Atshaves BP, Foxworth WB, Frolov A, Roths JB, Kier AB, Oetama BK, et al. Cellular differentiation and I-FABP protein expression modulate fatty acid uptake and diffusion. *Am J Physiol* 1998;274:C633–44.
- [99] Holehouse EL, Liu ML, Aponte GW. Oleic acid distribution in small intestinal epithelial cells expressing intestinal-fatty acid binding protein. *Biochim Biophys Acta* 1998;1390:52–64.
- [100] Wolfrum C, Ellinghaus P, Fobker M, Seedorf U, Assmann G, Börschers T, et al. Phytanic acid is ligand and transcriptional activator of murine liver fatty acid binding protein. *J Lipid Res* 1999;40:708–14.
- [101] Hallden G, Aponte GW. Evidence for a role of the gut hormone PYY in the regulation of intestinal fatty acid-binding protein transcripts in differentiated subpopulations of intestinal epithelial cell hybrids. *J Biol Chem* 1997;272:12591–600.
- [102] Bass NM. The cellular fatty acid binding proteins: aspects of structure, regulation, and function. *Int Rev Cytol* 1988;111:143–84.
- [103] Petit V, Arnould L, Martin P, Monnot MC, Pineau T, Besnard P, et al. Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. *J Lipid Res* 2007;48:278–87.
- [104] Hsu M-H, Palmer CNA, Griffin KJ, Johnson EF. A single amino acid change in the mouse peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  alters transcriptional responses to peroxisome proliferators. *Mol Pharmacol* 1995;48:559–67.
- [105] Corsico B, Cistola DP, Frieden C, Storch J. The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collisional transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:12174–8.
- [106] Storch J, Thumser AE. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2000;1486:28–44.
- [107] Alpers DH, Bass NM, Engle MJ, DeSchryver-Kecskemeti K. Intestinal fatty acid binding protein may favor differential apical fatty acid binding in the intestine. *Biochim Biophys Acta* 2000;1483:352–62.
- [108] Hodsdon ME, Cistola DP. Ligand binding alters the backbone mobility of intestinal fatty acid-binding protein as monitored by  $^{15}\text{N}$  NMR relaxation and  $^1\text{H}$  exchange. *Biochemistry* 1997;36:2278–90.
- [109] Agren JJ, Valve R, Vidgren H, Laakso M, Uusitupa M. Postprandial lipemic response is modified by the polymorphism at codon 54 of the fatty acid-binding protein 2 gene. *Arterioscl Thromb Vas Biol* 1998;18:1606–10.
- [110] Baier LJ, Sacchettini JC, Knowler WC, Eads J, Paolisso G, Tataranni PA, et al. An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995;95:1281–7.
- [111] Hegele RA, Harris SB, Hanley AJ, Sadikyan S, Connelly PW, Zinman B. Genetic variation of intestinal fatty acid-binding protein associated with variation in body mass in aboriginal Canadians. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4334–7.
- [112] Baier LJ, Bogardus C, Sacchettini JC. A polymorphism in the human intestinal fatty acid binding protein alters fatty acid transport across Caco-2 cells. *J Biol Chem* 1996;271:10892–6.
- [113] Levy E, Menard D, Delvin E, Stan S, Mitchell G, Lambert M, et al. The polymorphism at codon 54 of the FABP2 gene increases fat absorption in human intestinal explants. *J Biol Chem* 2001;276:39679–84.
- [114] Darimont C, Gradoux N, de Pover A. Epidermal growth factor regulates fatty acid uptake and metabolism in Caco-2 cells. *Am J Physiol* 1999;276:G606–12.
- [115] Vassileva G, Huwyler L, Poirier K, Agellon LB, Toth MJ. The intestinal fatty acid binding protein is not essential for dietary fat absorption in mice. *Faseb J* 2000;14:2040–6.
- [116] Thumser AE, Wilton DC. The binding of cholesterol and bile salts to recombinant rat liver fatty acid-binding protein. *Biochem J* 1996;320:729–33.
- [117] Thompson J, Ory J, Reese-Wagoner A, Banaszak L. The liver fatty acid binding protein – comparison of cavity properties of intracellular lipid-binding proteins. *Mol Cell Biochem* 1999;192:9–16.
- [118] Richieri GV, Ogata RT, Kleinfeld AM. Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB. *J Biol Chem* 1994;269:23918–30.
- [119] Poirier H, Braissant O, Niot I, Wahli W, Besnard P. 9-*cis*-Retinoic acid enhances fatty acid-induced expression of the liver fatty acid-binding protein gene. *FEBS Lett* 1997;412:480–4.
- [120] Wolfrum C, Borrmann CM, Franke WW, Gorski J, Spener F. Fatty acids and drugs interacting with FABP and PPAP in hepatocytes: a signaling path to the nucleus. *Chem Phys Lipids* 1999;101:149.
- [121] Neeli I, Siddiqi SA, Siddiqi S, Lagakos WS, Binias B, Ghevi T, et al. Liver fatty acid-binding protein initiates budding of pre-chylomicron transport vesicles from intestinal endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2007;282:17974–84.
- [122] Newberry EP, Xie Y, Kennedy SM, Luo J, Davidson NO. Protection against Western diet-induced obesity and hepatic steatosis in liver fatty acid-binding protein knockout mice. *Hepatology* 2006;44:1191–205.
- [123] Knudsen J, Neergaard TB, Gaigg B, Jensen MV, Hansen JK. Role of acyl-CoA binding protein in acyl-CoA metabolism and acyl-CoA-mediated cell signaling. *J Nutr* 2000;130:294S–8S.
- [124] Knudsen J, Mandrup S, Rasmussen JT, Andreassen PH, Poulsen F, Kristiansen K. The function of acyl-CoA-binding protein (ACBP)/diazepam binding inhibitor (DBI). *Mol Cell Biochem* 1993;123:129–38.
- [125] Kragelund BB, Andersen KV, Madsen JC, Knudsen J, Poulsen FM. Three-dimensional structure of the complex between acyl-coenzyme A binding protein and palmitoyl-coenzyme A. *J Mol Biol* 1993;230:1260–77.

- [126] Knudsen J, Jensen MV, Hansen JK, Faergeman NJ, Neergaard TB, Gaigg B. Role of acylCoA binding protein in acylCoA transport, metabolism and cell signaling. *Mol Cell Biochem* 1999;192:95–103.
- [127] Frolov A, Schroeder F. Acyl coenzyme A binding protein conformational sensitivity to long chain fatty acyl-CoA. *J Biol Chem* 1998;273:11049–55.
- [128] Rosendal J, Ertbjerg P, Knudsen J. Characterization of ligand binding to acyl-CoA-binding protein. *Biochem J* 1993;290:321–6.
- [129] Yanase H, Shimizu H, Kanda T, Fujii H, Iwanaga T. Cellular localization of the diazepam binding inhibitor (DBI) in the gastrointestinal tract of mice and its coexistence with the fatty acid binding protein (FABP). *Arch Histol Cytol* 2001;64:449–60.
- [130] Mandrup S, Sorensen RV, Helledie T, Nohr J, Baldursson T, Gram C, et al. Inhibition of 3T3-L1 adipocyte differentiation by expression of acyl-CoA-binding protein antisense RNA. *J Biol Chem* 1998;273:23897–903.
- [131] Helledie T, Antonius M, Sorensen RV, Hertzelt AV, Bernlohr DA, Kolvråa S, et al. Lipid-binding proteins modulate ligand-dependent trans-activation by peroxisome proliferator-activated receptors and localize to the nucleus as well as the cytoplasm. *J Lipid Res* 2000;41:1740–51.
- [132] Hussain MM, Fatma S, Pan X, Iqbal J. Intestinal lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol* 2005;16:281–5.
- [133] Mansbach 2nd CM, Gorelick F. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G645–50.
- [134] Black DD. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G519–24.
- [135] Bell RM, Ballas LM, Coleman RA. Lipid topogenesis. *J Lipid Res* 1981;22:391–403.
- [136] Tso P, Karlstad MD, Bistrrian BR, DeMichele SJ. Intestinal digestion, absorption, and transport of structured triglycerides and cholesterol in rats. *Am J Physiol* 1995;268:G568–577.
- [137] Cases S, Smith SJ, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, et al. Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13018–23.
- [138] Cases S, Stone SJ, Zhou P, Yen E, Tow B, Lardizabal KD, et al. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem* 2001;276:38870–6.
- [139] Buhman KK, Smith SJ, Stone SJ, Repa JJ, Wong JS, Knapp Jr FF, et al. DGAT1 is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis. *J Biol Chem* 2002;277:25474–9.
- [140] Stone SJ, Myers HM, Watkins SM, Brown BE, Feingold KR, Elias PM, et al. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem* 2004;279:11767–76.
- [141] Stone SJ, Levin MC, Farese Jr RV. Membrane topology and identification of key functional amino acid residues of murine acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase-2. *J Biol Chem* 2006;281:40273–82.
- [142] Washington L, Cook GA, Mansbach 2nd CM. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase in the rat small intestine reduces export of triacylglycerol into the lymph. *J Lipid Res* 2003;44:1395–403.
- [143] Yamazaki T, Sasaki E, Kakinuma C, Yano T, Miura S, Ezaki O. Increased very low density lipoprotein secretion and gonadal fat mass in mice overexpressing liver DGAT1. *J Biol Chem* 2005;280:21506–14.
- [144] Lehner R, Kuksis A. Triacylglycerol synthesis by an sn-1,2(2,3)-diacylglycerol transacylase from rat intestinal microsomes. *J Biol Chem* 1993;268:8781–6.
- [145] Oelkers P, Tinkelenberg A, Erdeniz N, Cromley D, Billheimer JT, Sturley SL. A lecithin cholesterol acyltransferase-like gene mediates diacylglycerol esterification in yeast. *J Biol Chem* 2000;275:15609–12.
- [146] Abo-Hashema KA, Cake MH, Power GW, Clarke D. Evidence for triacylglycerol synthesis in the lumen of microsomes via a lipolysis-esterification pathway involving carnitine acyltransferases. *J Biol Chem* 1999;274:35577–82.
- [147] Swift LL, Jovanovska A, Kakkad B, Ong DE. Microsomal triglyceride transfer protein expression in mouse intestine. *Histochem Cell Biol* 2005;123:475–82.
- [148] Atzel A, Wetterau JR. Mechanism of microsomal triglyceride transfer protein catalyzed lipid transport. *Biochemistry* 1993;32:10444–50.
- [149] Smolenaars MM, Madsen O, Rodenburg KW, Van der Horst DJ. Molecular diversity and evolution of the large lipid transfer protein superfamily. *J Lipid Res* 2007;48:489–502.
- [150] Gordon DA, Jamil H. Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly. *Biochim Biophys Acta* 2000;1486:72–83.
- [151] Jamil H, Dickson Jr JK, Chu CH, Lago MW, Rinehart JK, Biller SA, et al. Microsomal triglyceride transfer protein. Specificity of lipid binding and transport. *J Biol Chem* 1995;270:6549–54.
- [152] Hussain MM, Rava P, Pan X, Dai K, Dougan SK, Iqbal J, et al. Microsomal triglyceride transfer protein in plasma and cellular lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2008;19:277–84.
- [153] Wu X, Zhou M, Huang LS, Wetterau J, Ginsberg HN. Demonstration of a physical interaction between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B during the assembly of ApoB-containing lipoproteins. *J Biol Chem* 1996;271:10277–81.
- [154] Gordon DA, Jamil H, Sharp D, Mullaney D, Yao Z, Gregg RE, et al. Secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from HeLa cells is dependent on expression of the microsomal triglyceride transfer protein and is regulated by lipid availability. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7628–32.
- [155] Hussain MM, Shi J, Dreizen P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res* 2003;44:22–32.
- [156] Hussain MM. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis* 2000;148:1–15.
- [157] Xie Y, Newberry EP, Young SG, Robine S, Hamilton RL, Wong JS, et al. Compensatory increase in hepatic lipogenesis in mice with conditional intestine-specific Mttp deficiency. *J Biol Chem* 2006;281:4075–86.
- [158] Berriot-Varoqueaux N, Aggerbeck LP, Samson-Bouma M. Microsomal triglyceride transfer protein and abetalipoproteinemia. *Ann Endocrinol (Paris)* 2000;61:125–9.
- [159] Karpe F, Olivecrona T, Hamsten A, Hultin M. Chylomicron/chylomicron remnant turnover in humans: evidence for margination of chylomicrons and poor conversion of larger to smaller chylomicron remnants. *J Lipid Res* 1997;38:949–61.
- [160] Levy E, Stan S, Delvin E, Menard D, Shoulders C, Garofalo C, et al. Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. *J Biol Chem* 2002;277:16470–7.
- [161] Slight I, Bendayan M, Malo C, Delvin E, Lambert M, Levy E. Identification of microsomal triglyceride transfer protein in intestinal brush-border membrane. *Exp Cell Res* 2004;300:11–22.
- [162] Young SG, Cham CM, Pitas RE, Burri BJ, Connolly A, Flynn L, et al. A genetic model for absent chylomicron formation: mice producing apolipoprotein B in the liver, but not in the intestine. *J Clin Invest* 1995;96:2932–46.
- [163] Kendrick JS, Chan L, Higgins JA. Superior role of apolipoprotein B48 over apolipoprotein B100 in chylomicron assembly and fat absorption: an investigation of apobec-1 knock-out and wild-type mice. *Biochem J* 2001;356:821–7.
- [164] Lo CM, Nordskog BK, Nauli AM, Zheng S, Vonlehmden SB, Yang Q, et al. Why does the gut choose apolipoprotein B48 but not B100 for chylomicron formation? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G344–52.
- [165] Tso P, Liu M, Kalogeris TJ, Thomson AB. The role of apolipoprotein A-IV in the regulation of food intake. *Annu Rev Nut* 2001;21:231–54.
- [166] Lu S, Yao Y, Meng S, Cheng X, Black DD. Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid transport in newborn swine intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:31929–37.
- [167] Lu S, Yao Y, Cheng X, Mitchell S, Leng S, Meng S, et al. Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid secretion in IPEC-1 cells by increasing chylomicron size. *J Biol Chem* 2006;281:3473–83.
- [168] Kumar NS, Mansbach 2nd CM. Prechylomicron transport vesicle: isolation and partial characterization. *Am J Physiol* 1999;276:G378–86.
- [169] Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, et al. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet* 2003;34:29–31.
- [170] Siddiqi SA, Gorelick FS, Mahan JT, Mansbach 2nd CM. COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci* 2003;116:415–27.
- [171] Siddiqi SA, Mahan J, Siddiqi S, Gorelick FS, Mansbach 2nd CM. Vesicle-associated membrane protein 7 is expressed in intestinal ER. *J Cell Sci* 2006;119:943–50.
- [172] Siddiqi SA, Siddiqi S, Mahan J, Peggs K, Gorelick FS, Mansbach 2nd CM. The identification of a novel endoplasmic reticulum to Golgi SNARE complex used by the prechylomicron transport vesicle. *J Biol Chem* 2006;281:20974–82.
- [173] Siddiqi SA, Mansbach 2nd CM. PKC(zeta)-mediated phosphorylation controls budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci* 2008;121:2327–38.
- [174] Shoulders CC, Stephens DJ, Jones B. The intracellular transport of chylomicrons requires the small GTPase, Sar1b. *Curr Opin Lipidol* 2004;15:191–7.
- [175] Sabesin SM, Frase S, Ragland JB. Accumulation of nascent lipoproteins in rat hepatic Golgi during induction of fatty liver by orotic acid. *Lab Invest* 1977;37:127–35.
- [176] Buschmann RJ, Manke DJ. Morphometric analysis of the membranes and organelles of small intestinal enterocytes. II. lipid-fed hamster. *J Ultrastruct Res* 1981;76:15–26.
- [177] Mansbach CM, Dowell R. Effect of increasing lipid loads on the ability of the endoplasmic reticulum to transport lipid to the Golgi. *J Lipid Res* 2000;41:605–12.
- [178] Cartwright IJ, Plonne D, Higgins JA. Intracellular events in the assembly of chylomicrons in rabbit enterocytes. *J Lipid Res* 2000;41:1728–39.
- [179] Robertson MD, Parkes M, Warren BF, Ferguson DJ, Jackson KG, Jewell DP, et al. Mobilisation of enterocyte fat stores by oral glucose in humans. *Gut* 2003;52:834–9.
- [180] Chateau D, Pauquai T, Delers F, Rousset M, Chambaz J, Demignot S. Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells. *J Cell Physiol* 2005;202:767–76.
- [181] Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *J Biol Chem* 2002;277:44507–12.
- [182] Mahan JT, Heda GD, Rao RH, Mansbach 2nd CM. The intestine expresses pancreatic triacylglycerol lipase: regulation by dietary lipid. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G1187–96.
- [183] Grober J, Lucas S, Sorhede-Winzell M, Zaghini I, Mairal A, Contreras JA, et al. Hormone-sensitive lipase is a cholesterol esterase of the intestinal mucosa. *J Biol Chem* 2003;278:6510–5.
- [184] Trickett JI, Patel DD, Knight BL, Saggerson ED, Gibbons GF, Pease RJ. Characterization of the rodent genes for arylacetamide deacetylase, a



- putative microsomal lipase, and evidence for transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2001;276:39522–32.
- [185] Thomson AB, Cheeseman CI, Keelan M, Fedorak R, Clandinin MT. Crypt cell production rate, enterocyte turnover time and appearance of transport along the jejunal villus of the rat. *Biochim Biophys Acta* 1994;1191:197–204.
- [186] Thomson AB, Keelan M, Clandinin MT, Walker K. Dietary fat selectively alters transport properties of rat jejunum. *J Clin Invest* 1986;77:279–88.
- [187] Kondo H, Minegishi Y, Komine Y, Mori T, Matsumoto I, Abe K, et al. Differential regulation of intestinal lipid metabolism-related genes in obesity-resistant A/J vs. obesity-prone C57BL/6J mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E1092–9.
- [188] de Wit NJ, Bosch-Vermeulen H, de Groot PJ, Hooiveld GJ, Bromhaar MM, Jansen J, et al. The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice. *BMC Med Genomics* 2008;1:14.
- [189] Zilversmit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* 1979;60:473–85.
- [190] Ginsberg HN. Hypertriglyceridemia: new insights and new approaches to pharmacologic therapy. *Am J Cardiol* 2001;87:1174–80. A1174.
- [191] Lopez-Miranda J, Perez-Martinez P, Marin C, Moreno JA, Gomez P, Perez-Jimenez F. Postprandial lipoprotein metabolism, genes and risk of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:132–8.
- [192] Quarfordt SH, Goodman DS. Heterogeneity in the rate of plasma clearance of chylomicrons of different size. *Biochim Biophys Acta* 1966;116:382–5.
- [193] Martins IJ, Mortimer BC, Miller J, Redgrave TG. Effects of particle size and number on the plasma clearance of chylomicrons and remnants. *J Lipid Res* 1996;37:2696–705.
- [194] Xiang SQ, Cianflone K, Kalant D, Sniderman AD. Differential binding of triglyceride-rich lipoproteins to lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 1999;40:1655–63.
- [195] Olivecrona G, Beisiegel U. Lipid binding of apolipoprotein CII is required for stimulation of lipoprotein lipase activity against apolipoprotein CII-deficient chylomicrons. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1997;17:1545–9.
- [196] Hayashi H, Fujimoto K, Cardelli JA, Nutting DF, Bergstedt S, Tso P. Fat feeding increases size, but not number, of chylomicrons produced by small intestine. *Am J Physiol* 1990;259:G709–719.
- [197] Levy E, Roy CC, Goldstein R, Bar-On H, Ziv E. Metabolic fate of chylomicrons obtained from rats maintained on diets varying in fatty acid composition. *J Am Coll Nutr* 1991;10:69–78.
- [198] Sakr SW, Attia N, Haourigui M, Paul JL, Soni T, Vacher D, et al. Fatty acid composition of an oral load affects chylomicron size in human subjects. *Br J Nut* 1997;77:19–31.
- [199] Cartwright IJ, Higgins JA. Increased dietary triacylglycerol markedly enhances the ability of isolated rabbit enterocytes to secrete chylomicrons: an effect related to dietary fatty acid composition. *J Lipid Res* 1999;40:1858–66.
- [200] Lairon D. Macronutrient intake and modulation on chylomicron production and clearance. *Atheroscler Suppl* 2008;9:45–8.
- [201] Adeli K, Lewis GF. Intestinal lipoprotein overproduction in insulin-resistant states. *Curr Opin Lipidol* 2008;19:221–8.
- [202] Haidari M, Leung N, Mahbub F, Uffelman KD, Kohen-Avramoglu R, Lewis GF, et al. Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and ApoB48-containing lipoprotein overproduction. *J Biol Chem* 2002;277:31646–55.
- [203] Phillips C, Bennett A, Anderton K, Owens D, Collins P, White D, et al. Intestinal rather than hepatic microsomal triglyceride transfer protein as a cause of postprandial dyslipidemia in diabetes. *Metabolism* 2002;51:847–52.
- [204] Curtin A, Deegan P, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH. Elevated triglyceride-rich lipoproteins in diabetes. A study of apolipoprotein B-48. *Acta Diabetol* 1996;33:205–10.
- [205] Duez H, Lamarche B, Uffelman KD, Valero R, Cohn JS, Lewis GF. Hyperinsulinemia is associated with increased production rate of intestinal apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in humans. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2006;26:1357–63.

# Luminal Lipid Regulates CD36 Levels and Downstream Signaling to Stimulate Chylomicron Synthesis\*

Received for publication, February 21, 2011, and in revised form, May 23, 2011. Published, JBC Papers in Press, May 24, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.233551

Thi Thu Trang Tran<sup>‡</sup>, Hélène Poirier<sup>‡</sup>, Lionel Clément<sup>‡</sup>, Fatiha Nassir<sup>Å</sup>, Maurice M. A. L. Pelsers<sup>Å</sup>, Valérie Petit<sup>‡</sup>, Pascal Degrace<sup>Å</sup>, Marie-Claude Monnot<sup>‡</sup>, Jan F. C. Glatz<sup>Å</sup>, Nada A. Abumrad<sup>Å</sup>, Philippe Besnard<sup>‡</sup>, and Isabelle Niot<sup>Å†1</sup>

From the <sup>‡</sup>Physiologie de la Nutrition, U866 INSERM/Université de Bourgogne, AgroSup Dijon, 21000 Dijon, France, the <sup>Å</sup>Department of Molecular Genetics, Maastricht University, 6200 MD Maastricht, The Netherlands, the <sup>Å</sup>Department of Medicine, Center for Human Nutrition, Washington University, St. Louis, Missouri 63110, and the <sup>Å</sup>Physiopathologie des Dyslipid mies, U866 INSERM/Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France

The membrane glycoprotein CD36 binds nanomolar concentrations of long chain fatty acids (LCFA) and is highly expressed on the luminal surface of enterocytes. CD36 deficiency reduces chylomicron production through unknown mechanisms. In this report, we provide novel insights into some of the underlying mechanisms. Our *in vivo* data demonstrate that CD36 gene deletion in mice does not affect LCFA uptake and subsequent esterification into triglycerides by the intestinal mucosa exposed to the micellar LCFA concentrations prevailing in the intestine. In rodents, the CD36 protein disappears early from the luminal side of intestinal villi during the postprandial period, but only when the diet contains lipids. This drop is significant 1 h after a lipid supply and associates with ubiquitination of CD36. Using CHO cells expressing CD36, it is shown that the digestion products LCFA and diglycerides trigger CD36 ubiquitination. *In vivo* treatment with the proteasome inhibitor MG132 prevents the lipid-mediated degradation of CD36. *In vivo* and *ex vivo*, CD36 is shown to be required for lipid activation of ERK1/2, which associates with an increase of the key chylomicron synthesis proteins, apolipoprotein B48 and microsomal triglyceride transfer protein. Therefore, intestinal CD36, possibly through ERK1/2-mediated signaling, is involved in the adaptation of enterocyte metabolism to the postprandial lipid challenge by promoting the production of large triglyceride-rich lipoproteins that are rapidly cleared in the blood. This suggests that CD36 may be a therapeutic target for reducing the postprandial hypertriglyceridemia and associated cardiovascular risks.

CD36 (also known as fatty acid translocase) is a transmembrane glycoprotein expressed in many tissues. It is a multifunctional protein homologous to scavenger receptor class B, type I. CD36 facilitates uptake of long chain fatty acids (LCFA)<sup>2</sup> in

cardiomyocytes (1) and adipocytes (2, 3) and that of oxidized LDL by macrophages (4). CD36 is involved in platelet aggregation by binding thrombospondin and collagen (5), phagocytosis of apoptotic cells by macrophages (6), and the cytoadhesion of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* (7). In addition, CD36 has recently been shown to play a role in taste perception of dietary fatty acid on the tongue by triggering a cell signaling cascade (8–10).

Deletion of CD36 in mice highlighted the importance of this protein for optimal utilization of dietary lipids. Significant impairment in the uptake of LCFA by skeletal muscle, heart, and adipose tissues was shown (2). Insulin- and exercise-dependent translocation of CD36 from an intracellular pool to the sarcolemma was documented and postulated to increase the muscle efficiency by allowing adaptive changes in LCFA uptake and utilization (11, 12). Finally, CD36-deficient mice exhibit a loss of the spontaneous preference for lipid-rich foods and a decrease of olfactory-mediated rise in digestive secretions (8, 9). In humans, variants in the CD36 gene have been associated with abnormalities of lipid and glucose metabolism (13) and with altered susceptibility to the metabolic syndrome (14) and diabetes-associated coronary disease (15).

In the small intestine, expression of CD36 is especially high in the brush border membrane (BBM) of duodeno-jejunal enterocytes both in rodents and humans (16, 17). Although this location correlates with the main site of LCFA absorption, the physiological role played by CD36 in the gut remains incompletely understood. In isolated enterocytes from the proximal intestine, CD36 deletion impairs LCFA uptake (18). However, *in vivo*, the lack of impairment in intestinal net lipid absorption in CD36<sup>−/−</sup> mice (18, 19), as well as in subjects with type I CD36 deficiency (20), seems to preclude a quantitative role of intestinal CD36 in LCFA uptake similar to that demonstrated in skeletal muscle, heart, and adipose tissues. By contrast, lipoprotein synthesis and/or secretion are deeply impaired in enterocytes from CD36<sup>−/−</sup> mice, where smaller chylomicrons are produced. This event might explain the postprandial hypertriglyceridemia found in CD36-deficient mice and humans (20–22). Indeed, the efficiency of blood triglyceride (TG) clearance is positively linked to chylomicron size (23). Therefore, it can be speculated that CD36 plays a role in regulating the metabolic fate of lipids rather than LCFA uptake in the small intestine. However, the molecular mechanisms by which this effect would occur remain unknown. One possibility could be a

\* This work was supported, in whole or in part, by the National Institute of Health and Medical Research (INSERM) and by grants from the Research Program in Human Nutrition SensoFAT of the French National Research Agency (L'Agence Nationale de la Recherche, ANR) (to P. B.) and from the Burgundy Council (to P. B.). This work was also supported by National Institutes of Health Grants R01 DK60022 and DK33301 (to N. A. A.).

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: Physiologie de la Nutrition, AgroSup Dijon, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France. Tel.: 33-3-80-77-40-24; E-mail: niot@u-bourgogne.fr.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: LCFA, long chain fatty acid(s); MTP, microsomal triglyceride transfer protein; apoB, apolipoprotein B; HSC70, heat shock cognate protein 70; TG, triglycerides; BBM, brush border membrane.

## Lipid Signaling by Intestinal CD36 and Chylomicron Formation

CD36-dependent modulation of ERK, because it was previously shown to regulate lipoprotein formation (24–26), and it is activated by ligand binding to CD36 (27).

To explore this concept, experiments were conducted *in vivo* in rats and in wild-type or CD36<sup>-/-</sup> mice, *ex vivo* in intestinal segments, and *in vitro* in stably transfected CHO cells. The present data show that CD36 undergoes rapid ubiquitination and degradation triggered by digestion products during intestinal lipid absorption. This process is associated with CD36-dependent activation of ERK and with increased expression of the key proteins of lipoprotein synthesis apoB48 and MTP.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials**—Antibodies against rat CD36 were generated in rabbits and used as described previously (16). Anti-mouse CD36 (R & D System or Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-ubiquitin (Zymed Laboratories Inc., Invitrogen), anti-phospho-ERK1/2 (Thr-202/Tyr-204) and anti-ERK1/2 (Cell Signaling Technology), anti-apoB, anti-HSC70 (Santa Cruz Biotechnology), anti-MTP (BD Sciences), secondary antibody peroxidase conjugate goat anti-rabbit (Chemicon International), anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich), and donkey anti-goat (Santa Cruz Biotechnology) were from commercial sources. Protein A/G Plus-agarose immunoprecipitation reagent was from Santa Cruz; MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al) was from Sigma-Aldrich; the ECL kit was from PerkinElmer Life Sciences; triolein was from Sigma; and oleic acid, 2-monolein, and miolein were from Larodan Fine Chemicals.

**Animals and Experimental Procedures**—The care and use of laboratory animals followed guidelines of the animal ethics committee of Burgundy University, which approved all protocols. The rats or mice were housed in a controlled environment (constant temperature and humidity, darkness from 6 p.m. to 6 a.m.). They were fed a standard laboratory chow containing 3% (w/w) lipids (UAR A-04 for rats and mice; Usine d'Alimentation Rationnelle). The alipidic diet was prepared by Safe.

**Rats**—Male Wistar rats weighting 180–200 g (Elevage Dépré) were fasted for 48 h. In a first protocol, the animals were refed either a standard laboratory chow containing 3% lipids (w/w, sunflower oil) or a fat-free diet. After sacrifice (by isoflurane anesthesia), jejunal samples (1 cm) taken 24 cm after the pylorus were prepared for immunohistochemistry using antibody against CD36 raised in rabbits (16).

In a second protocol, 48-h fasted rats were force-fed 3 ml of sunflower oil or sucrose (isocaloric, 5.27 M). Mucosa from jejunal segments (25 cm taken 10 cm after pylorus) was obtained at different times after and used to prepare homogenates and BBM. Mucosa samples were rapidly frozen and stored at –80 °C until RNA purification.

**Mice**—Male C57Bl6 (CD36<sup>+/+</sup>) and CD36<sup>-/-</sup> mice (provided by Dr. Jan Glatz) (12 weeks of age) weighing 25–30 g were fasted for 12 h prior to oil gavage (0.5 ml of sunflower oil) and sacrificed by isoflurane anesthesia. The small intestine was divided into three equal parts. The first centimeter was taken from the middle part of the small intestine, considered as the jejunum and treated for immunohistochemistry using antibody anti-CD36 from R & D System. The mucosa from jejunal seg-

ments was scraped at 1, 2, and 4 h after the gavage for homogenate preparation and mRNA analysis. The same protocol was performed in mice subjected 30 min before the gavage to an intraperitoneal injection of 100  $\mu$ l of Me<sub>2</sub>SO containing 14 mg/kg of body weight of the proteasome inhibitor MG132, whereas the control group received the same volume of Me<sub>2</sub>SO. The animals were sacrificed 4 h after the oil gavage.

**Jejunal Homogenate and Brush Border Membrane**—Scraped mucosa obtained from rats were weighed and homogenized (with buffer A, which contained 1 g/16.7 ml of 100 mM mannitol, and 10 mM Tris-HCl, pH 7.1) using a Dounce potter homogenizer. Purified BBM were prepared according to Shirazi-Beechey *et al.* (28). Briefly, MgCl<sub>2</sub> was slowly added to homogenates to reach a final concentration of 10 mM. The samples were stored on ice for 30 min followed by centrifugation (3,000  $\times$  g, 30 min, 4 °C). Supernatants were centrifuged (27,000  $\times$  g, 30 min, 4 °C) (Beckman LE-70, SW41Ti rotor). The supernatant was removed, and the pellet was resuspended in 3.8 mol of buffer B (300 mM mannitol, 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.4) and centrifuged (27,000  $\times$  g, 30 min, 4 °C) (Beckman centrifuge, 70.1Ti rotor). The supernatant was removed, and the BBM pellet was resuspended in 150  $\mu$ l of buffer B and stored at –20 °C. The purity of BBM preparation and membrane yield were evaluated by assaying the BBM-specific enzyme sucrase-isomaltase according to the Dahlqvist method (29), and enzyme content was related to 1 mg of starting mucosa. The proportion of the sucrase activity retrieved in the BBM fraction corresponds to the efficiency of BBM extraction. Enrichment was obtained by dividing specific activity (UI/mg of protein) of the sucrase in BBM fraction by that of the homogenate. Yield and enrichment were consistent with previous reports (28). To prepare microsomal and cytosolic fractions, the remaining homogenate from the same animals was centrifuged (18,000  $\times$  g, 10 min, 4 °C), and the supernatant was transferred and centrifuged (105,000  $\times$  g, 60 min, 4 °C) to yield a microsomal (pellet) and a cytosolic (supernatant) fraction. The pellet was resuspended in 200  $\mu$ l of buffer B. The fractions were stored at –20 °C. When mice were used, a jejunal homogenate was obtained by adding 50 mg of jejunal mucosa to 0.5 ml of buffer A with 1% Triton X-100.

Jejunal triglyceride content was evaluated after lipid extraction of mucosa according to the Delsal method (30). Dried extracts dissolved in 1% Triton X-100 (in chloroform) were dried then redissolved in water for triglyceride determination using CHOD-PAP (Roche Applied Science).

**Intestinal Fatty Acid Uptake: In Situ Isolated Jejunal Loop**—Isoflurane-anesthetized, 16-h fasted mice were laparotomized, and a 10-cm jejunal loop was isolated *in situ* and infused with 0.5 ml of a radiolabeled solution of linoleic acid in 2180  $\mu$ M solution containing 10% of [1-<sup>14</sup>C]linoleic acid (50 mCi/mmol) emulsified with 10 mM sodium taurocholate to form micelles. Radioactivity incorporation into the different lipid classes in the mucosa was determined (31).

**Isolated Intestinal Segment Culture**—The proximal small intestine from 16-h fasted wild-type and CD36<sup>-/-</sup> mice was cut into small segments (3-cm length) taken 3 cm after the pylorus, split as described by Pardo *et al.* (32). After a 15-min stabilization period, intestinal segments were treated with 240  $\mu$ M lin-

oleic acid or vehicle (ethanol 0.01%) for 10–20 min. The treatment was ended by submerging the intestinal segment into liquid nitrogen. The mucosa was collected by scraping into ice-cold radioimmune precipitation assay buffer containing anti-protease and anti-phosphatase mixture.

**Evaluation of CD36 Ubiquitination in Mice Jejunum and in CHO Cells**—CD36 was immunoprecipitated overnight at 4 °C from 500  $\mu$ g of jejunal homogenate using 1  $\mu$ g of anti-CD36 (R & D System). Then protein A/G-agarose plus beads were added, and the incubation continued for another 2–3 h. The final pellet was washed three times in radioimmune precipitation assay buffer and boiled for 10 min in SDS sample buffer. After centrifugation, the supernatant was analyzed by SDS-PAGE, and the proteins were electroblotted onto PVDF membranes. The membranes were treated with a denaturing buffer (6 M guanidine HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) for 30 min at 4 °C, followed by extensive PBS washing and then used for detection of ubiquitin or CD36 proteins.

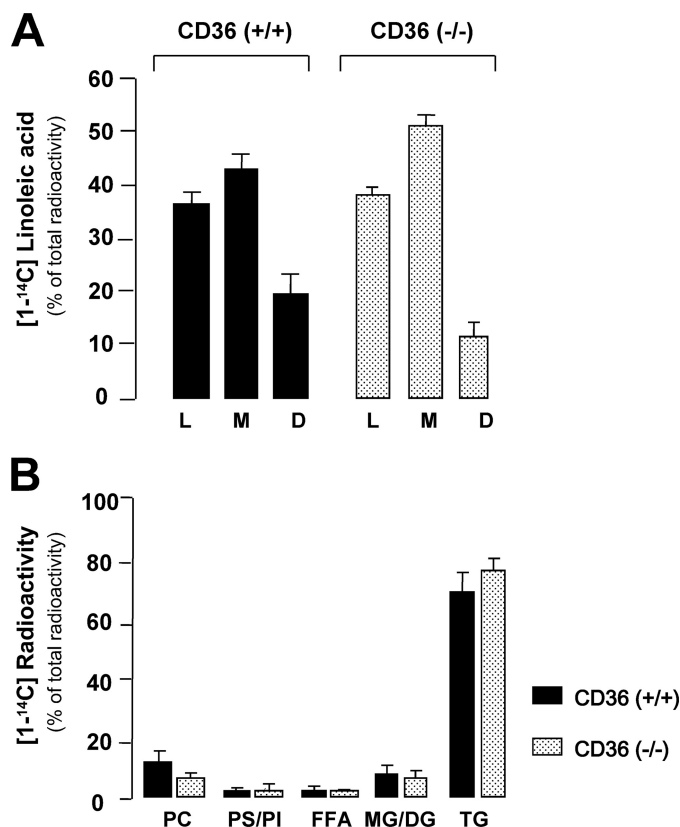
In CHO cells, the carboxyl-FLAG-tagged WT or carboxyl lysine mutant (K/A) human CD36 were generated as described (33). The cells were transfected (Lipofectamine 2000; Invitrogen) with empty vector (control) or with vector containing WT CD36 or CD36 where the two C-terminal lysines (469 and 472) were substituted with alanine (K/A). The cells were then selected for stable transfections using hygromycin. Stably transfected cells plated in 6-well plates were incubated for 2 h with either BSA or BSA together with 100  $\mu$ M of oleic acid, triolein (Sigma), 2-monolein, or diolein (Larodan Fine Chemicals). The cells were lysed, and clarified lysates were immunoprecipitated with FLAG affinity gel (Sigma). Immunocomplexes were eluted with FLAG peptide, resolved by SDS-PAGE, and immunoblotted with either anti-ubiquitin antibody (Zymed Laboratories Inc.) or anti-CD36 antibody (Santa Cruz).

**Real Time PCR, Western Blotting, and ELISA Analyses**—mRNA levels were measured by real time PCR (9, 31). CD36 protein levels were determined using Western blotting (16) and sandwich ELISA (34). Quantification of immune signals was by densitometry and with Quantity One software (Bio-Rad).

**Statistics**—All of the data are presented as the means  $\pm$  S.E. for the indicated number of animals. Significance of differences between groups of observations was tested with a paired Student's *t* test.  $p \leq 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

**CD36 Gene Deletion Does Not Affect Micellar LCFA Uptake and TG Re-esterification in Mouse Jejunum**—To determine whether CD36 plays a critical role in intestinal LCFA uptake under close to physiological FA delivery conditions, emulsified lipid solution containing [ $^{14}$ C]linoleic acid as tracer was infused into the lumen of *in situ* jejunal loops isolated in fasted wild-type and CD36<sup>-/-</sup> mice. This *in vivo* technique maintains both intestinal microclimate (*i.e.* unstirred water layer and cell polarization) and lymph/blood circulations (31). A large lipid load (2180  $\mu$ M) was used to mimic the postprandial period. Five minutes after infusion, the distribution of radioactivity in lumen and mucosa was similar in CD36<sup>+/+</sup> and CD36<sup>-/-</sup> mice, confirming that CD36 does not contribute to net lipid absorp-



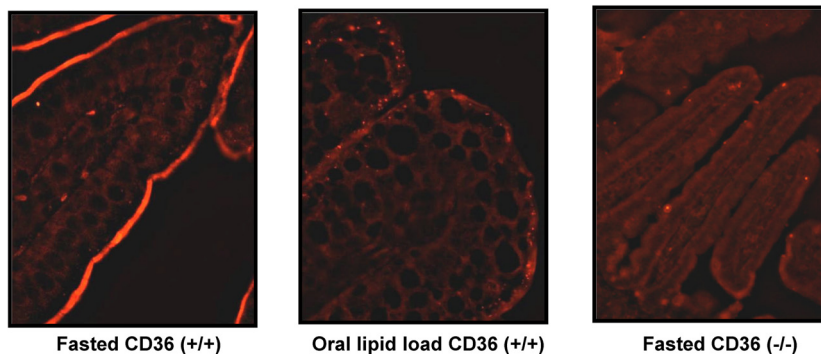
**FIGURE 1. CD36 deficiency does not alter jejunal uptake and esterification of micellar fatty acids in the mouse.** Linoleic acid (0.5 ml, 2180  $\mu$ M) in solution containing [ $^{14}$ C]linoleic acid (51 mCi/mmol) emulsified with 10 mM taurocholic acid was infused into *in situ* isolated jejunal loops of fasted mice. L and M correspond to the percentage of [ $^{14}$ C]linoleic acid remaining respectively in the lumen (L) and the mucosa (M). The percentage of [ $^{14}$ C]linoleic acid disappeared (D) (mainly absorbed or oxidized) was determined by subtraction of the radioactivity remaining into M and L from the radioactivity initially infused into the lumen. The values shown are the means  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). B, relative distribution of [ $^{14}$ C] radioactivity in various lipid classes in the mucosa. PC, phosphatidylcholine; PS/PI, phosphatidylserine/phosphatidylinositol; DG/MG, di- and monoglyceride; FFA, free fatty acid.

tion in the mouse small intestine (Fig. 1A). Similar results were obtained using a lower concentration of linoleic acid (400  $\mu$ M) (data not shown). Similarly, analysis of radioactivity incorporation into the different lipid classes in the mucosa did not reveal a difference in TG synthesis between CD36<sup>-/-</sup> mice and controls (Fig. 1B). Cellular radioactivity was recovered mostly in TG 5 min after infusion, supporting physiological relevance of the experimental model used.

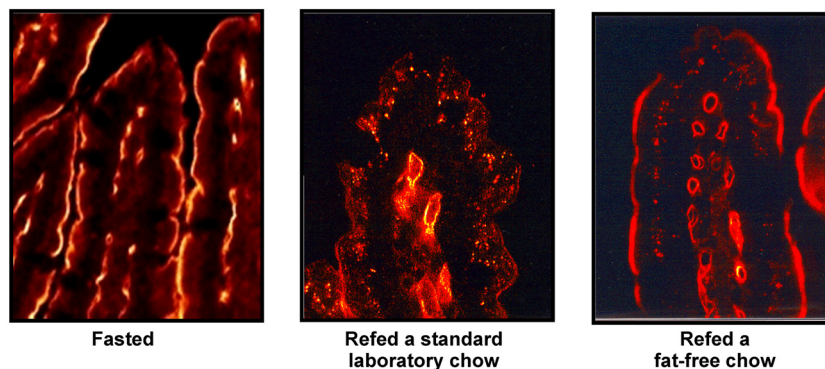
**Lipid-dependent Disappearance of CD36 from the Luminal Side of Jejunal Epithelium**—To gain insight into how intestinal CD36 can influence the metabolic fate of LCFA in enterocytes, the effect of nutritional status on CD36 localization in the absorptive epithelium was explored by immunohistochemistry. In fasted mice, prominent staining was detected in the epithelial lining of villi (Fig. 2A). Surprisingly, disappearance of this immunostaining was observed 4 h after an oral lipid load. The fact that no staining was observed in CD36<sup>-/-</sup> mice confirms signal specificity. Similar results were observed in fasted rats refed a standard laboratory chow containing 3% lipids (w/w). Interestingly, immunostaining persisted when fasted rats were fed a fat-free diet, demonstrating that CD36 removal from the



**A MOUSE**



**B RAT**



**FIGURE 2. Lipid-dependent disappearance of CD36 protein from the luminal side of mice and rat jejunum.** *A*, immunolocalization of CD36 in jejunal epithelium in mice. Fasted controls were compared with experimental mice 4 h after force-feeding with 0.5 ml oil. Immunostaining of CD36 on CD36<sup>-/-</sup> mice demonstrates specificity of the antibody (R & D System). *B*, immunolocalization of CD36 in jejunal epithelium in the rat. Fasted controls were compared with rats refed for 6 h a standard laboratory chow containing 3% lipids (w/w) or a lipid-free diet. Specific CD36 immunostaining was performed using an antiserum raised in rabbit against purified rat CD36 and a FITC-conjugated anti-rabbit antibody raised in goat. In negative control micrographs, the primary antibody was omitted.

**TABLE 1**  
**Characteristics of BBM fractions isolated from rat jejunal mucosa**

Homogenates and BBM fractions were prepared as indicated under "Experimental Procedures." Sucrase activity was evaluated in each fraction. Five rats were used in each group. NS, not significant.

	Total sucrase activity		Enrichment factor (BBM/homogenate)	Efficiency of BBM extraction
	Homogenate	BBM		
	<i>units/min/mg of protein</i>			<i>%</i>
Fasted controls	0.79 ± 0.09	11.53 ± 1.52	14.82 ± 1.43	13.44 ± 0.96
Oil load	0.50 ± 0.06 (NS)	9.72 ± 0.85 (NS)	20.17 ± 2.38 (NS)	10.51 ± 1.72 (NS)
Sucrose load	0.66 ± 0.11 (NS)	11.00 ± 0.42 (NS)	16.67 ± 0.56 (NS)	15.27 ± 0.53 (NS)

apical side of enterocytes is a physiological event related to dietary lipids.

*CD36 Removal from the BBM Is Not Associated with CD36 Recovery in Intracellular Fractions*—To explore whether the disappearance of staining resulted from a translocation of CD36 from the apical plasma membrane to an intracellular pool as reported for scavenger receptor class B, type I (35), CD36 content in jejunal mucosa homogenates and in purified BBM was assayed by sandwich ELISA. Fasted rats were subjected to an oral lipid load (3 ml of sunflower oil) to optimize the detection of changes in CD36 localization. To confirm lipid dependence, a set of rats was force-fed a sucrose solution providing a similar caloric load to the oil gavage. Activity of sucrase, a BBM enzyme marker, was determined to verify the efficiency of BBM purification. BBM fractions from fasted and force-fed rats exhibited equivalent enrichment and degree of purity and thus can be compared (Table 1).

Consistent with earlier data (Fig. 2*B*), a lipid load led to a 3-fold decrease of CD36 in jejunal BBM from rats 6 h after gavage (Fig. 3, *A* and *C*). Similar results were found when the data were expressed as a ratio of CD36 level to sucrase activity, demonstrating that it was BBM-related (Fig. 3*B*). In agreement with our earlier immunohistochemistry results, this effect was lipid-mediated because no change was observed in sucrose force-fed animals (Fig. 3, *A* and *B*). To explore whether lipid-mediated disappearance of CD36 from BBM is associated with intracellular transfer of the protein, CD36 was assayed in jejunal homogenates by both ELISA (Fig. 3, *D* and *E*) and Western blotting (Fig. 3*F*). Total CD36 content in mucosa of lipid force-fed rats remained low as compared with fasted controls.

To further analyze this result, CD36 content in cytosolic and microsomal/endosomal fractions (105,000 × *g* supernatants and pellets, respectively) isolated from jejunal homogenates

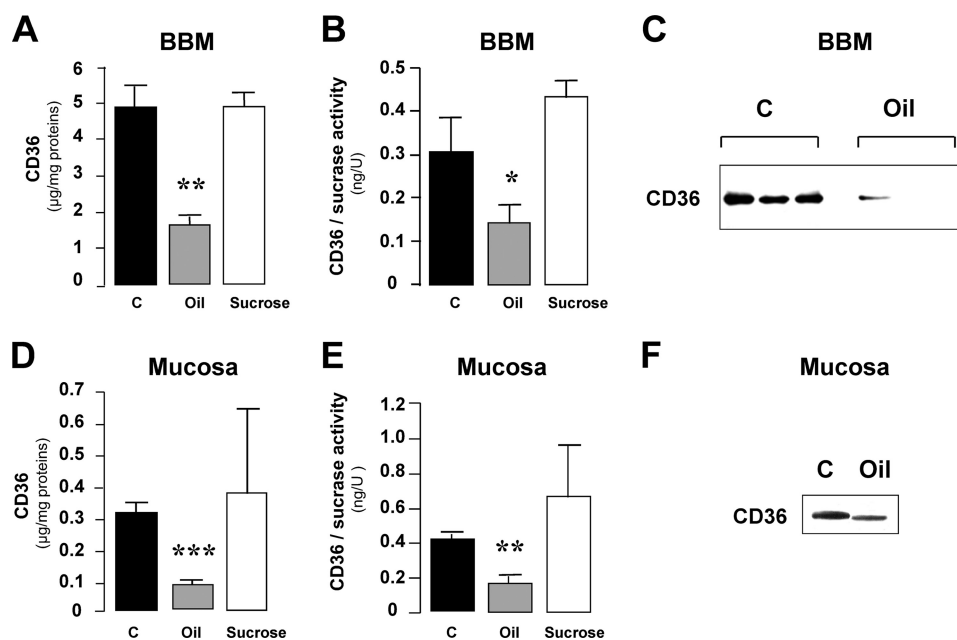


FIGURE 3. **CD36 removal from BBM does not quantitatively match its intracellular transfer.** CD36 content in purified BBM and jejunal mucosa from fasted control rats (C) and from rats 6 h after force-feeding with 3 ml of oil were assayed by both ELISA (A, B, D, and E) and Western blotting (C and F). To determine whether the oil effect on CD36 levels in BBM and jejunal mucosa is specific, a set of animals were also force-fed with a sucrose solution providing a similar caloric load as the oil gavage. The activity of sucrase, a BBM enzyme marker, was determined to verify the efficiency of BBM purification (B and E). The values are the means  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

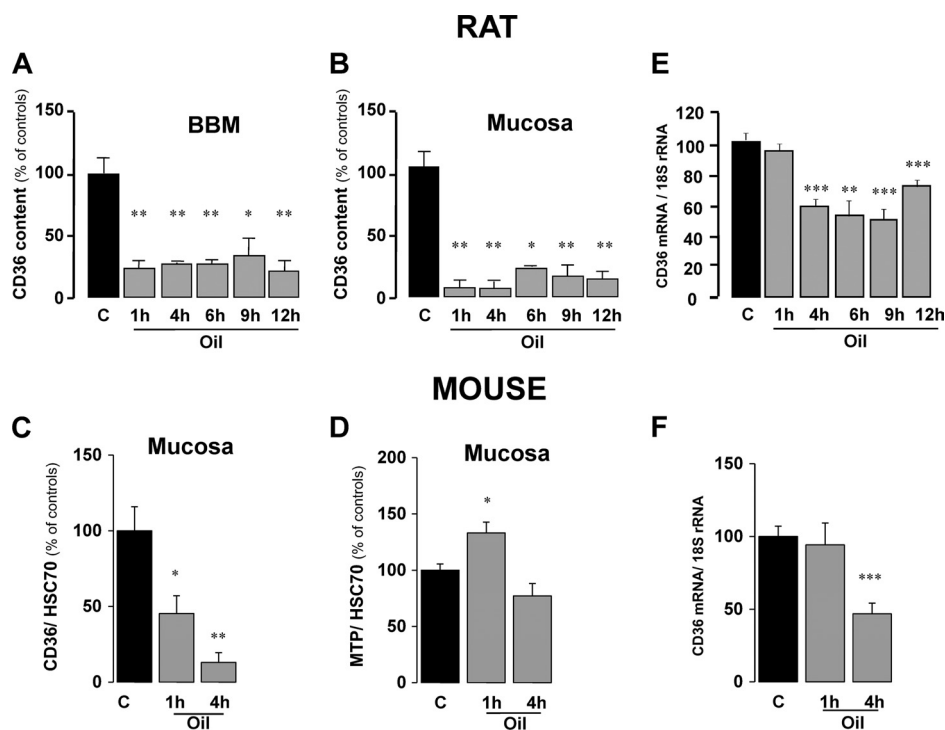


FIGURE 4. **Time course of lipid-induced drop in jejunal CD36 protein content.** A and B, CD36 content in purified BBM (A) and jejunal mucosa (B) from fasted and oil gavaged rats was assayed by ELISA at 1, 4, 6, 9, and 12 h after the gavage. C, expression of CD36 in mice mucosa was analyzed by Western blotting (15  $\mu$ g) at 1 and 4 h after force-feeding with oil and compared with fasted controls. D, to explore the specificity of the oil effect on CD36, expression of MTP was also examined. These data were normalized to HSC70 expression, which remained unchanged in these experimental conditions and served as an internal control for protein loading. The values are the means  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ . E and F, CD36 mRNA levels were assayed in jejunal mucosa from fasted control rats and experimental animals at 1, 4, 6, 12, and 30 h after force-feeding with 3 ml of sunflower oil (E) and in jejunal mucosa from fasted and experimental mice at 1 or 4 h after force-feeding with 0.5 ml of oil (F). The data were normalized to 18 S rRNA for differences in RNA loading. The values are the means  $\pm$  S.E. ( $n = 5$ ). \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

was assayed by ELISA. Cytosol CD36 content was 8-fold higher in lipid-fed than in fasted rats ( $2.47 \pm 0.34\%$  of total CD36 versus  $0.29 \pm 0.09\%$ ;  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ). However, it

remained dramatically low and could not account for the 65% decrease in protein in BBM fractions and homogenates. Because no CD36 was found in microsomal/endosomal frac-

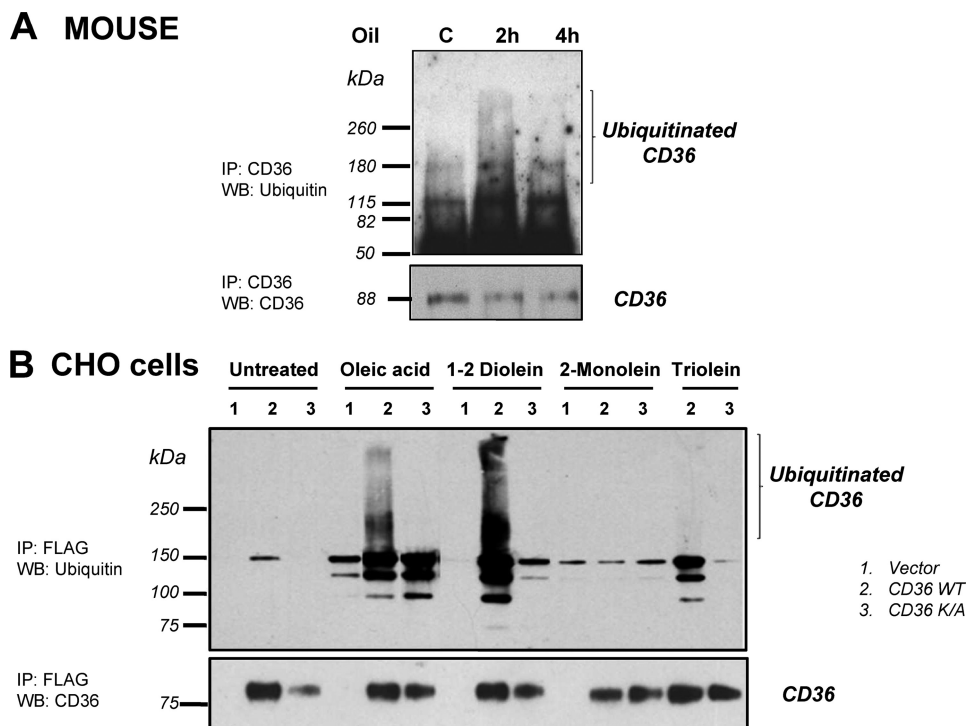


FIGURE 5. **Lipids induce polyubiquitination of jejunal CD36 *in vivo* and in CD36-transfected CHO cells *in vitro*.** A, fasted control mice were force-fed with 0.5 ml of oil and sacrificed 2 or 4 h later. The jejunal mucosa homogenates were immunoprecipitated (IP) with anti-CD36 antibody. Immunocomplexes were analyzed by Western blotting (WB) with anti-ubiquitin or anti-CD36 antibodies. The data are representative of three different experiments. B, CHO cells transfected with an empty vector (lane 1), FLAG-CD36 (lane 2), or double mutated CD36 (K469A and K472A) (lane 3) were treated 2 h with (100  $\mu$ M) of the indicated lipid; oleic acid, 1–2 diolein, and 2-monolein were added in presence of BSA. The cells were lysed, and clarified lysates were immunoprecipitated (IP) with FLAG affinity gel. The immunocomplexes were then analyzed by Western blotting (WB) using an anti-ubiquitin antibody or an anti-CD36 antibody.

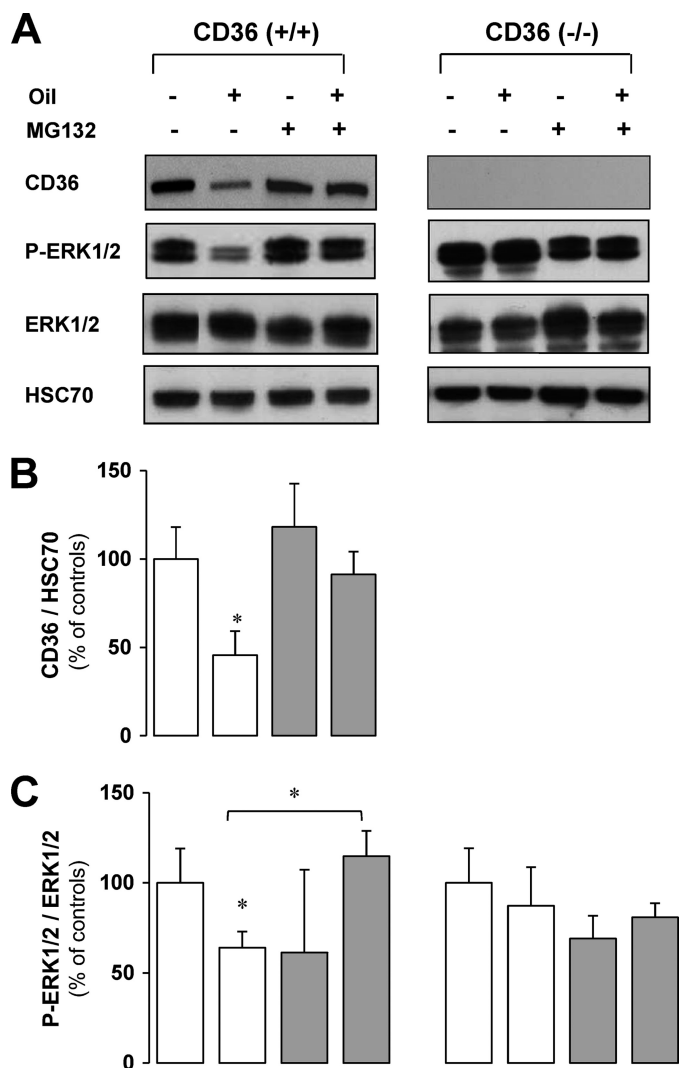
tions (data not shown), these results strongly suggest that a major part of internalized intestinal CD36 is degraded 6 h after the lipid load.

**Dietary Lipids Specifically Induce a Rapid Drop in Jejunal CD36 Content**—To study the kinetics of the lipid-mediated disappearance of CD36 protein, CD36 content in whole mucosa and in purified BBM was explored at various times following the oral lipid load in rats. As shown in Fig. 4A, the amount of CD36 in BBM dramatically decreased 1 h after force-feeding. This effect remained significant 12 h after the gavage, likely because of the high lipid load used in this experiment. The same pattern was observed when CD36 was assayed in the whole mucosa, which excludes quantitative CD36 accumulation in the intracellular compartment (Fig. 4B). Similar data were also obtained in the mouse (Fig. 4C). The lipid-mediated decrease in CD36 protein in jejunal mucosa is specific to this scavenger receptor because two other lipid-binding proteins, coexpressed with CD36 in differentiated enterocytes, were either unchanged (intestinal fatty acid-binding protein; data not shown) or increased (MTP) (Fig. 4D). The lipid-mediated drop in intestinal CD36 levels did not associate with a change in CD36 mRNA 1 h after the lipid load (Fig. 4, E and F). In contrast, a significant decrease in CD36 mRNA levels occurred 4 h after the load in rats (Fig. 4E) and mice (Fig. 4F). Thus, two regulatory mechanisms seem to be involved in the decrease of intestinal CD36 content triggered by dietary lipids: an early post-translational mechanism followed by a more delayed transcriptional regulation.

**Dietary Lipids Trigger Degradation of Intestinal CD36 via the Ubiquitin-Proteasome Pathway**—Polyubiquitination tags proteins targeted to proteasomes or lysosomes for subsequent degradation (36). To determine whether the lipid-mediated drop in CD36 levels measured in intestinal mucosa involves the ubiquitin-proteasome pathway, jejunal CD36 from mice subjected or not to a lipid load was immunoprecipitated before immunoblotting with an antibody against ubiquitin. The CD36 signal obtained at 2 h was smeared, which is typical of polyubiquitination. This smearing was diminished at 4 h after the lipid load, likely reflecting degradation of the ubiquitinated protein (Fig. 5A). Therefore, dietary fat induces in the small intestine rapid ubiquitination of CD36.

Fat digestion produces 1,2-diglycerides, 2-monoglycerides, and free LCFA. To explore which among these lipids might be responsible for down-regulation of CD36 levels, ubiquitination of FLAG-tagged human CD36 (FLAG-CD36) stably expressed in CHO cells was examined next. To determine whether Lys-469 and Lys-472 in the carboxyl-cytoplasmic tail of CD36 are the putative ubiquitination sites, CHO cells stably expressing a FLAG-CD36 double mutant where the Lys were substituted by Ala were used. Incubation of CHO cells for 2 h in presence of 100  $\mu$ M of the various lipids showed that oleic acid and 1,2-diolein led to CD36 ubiquitination (Fig. 5B, lanes 2). This effect was dependent on presence of Lys-469 and Lys-472 because it was not observed with mutated CD36 (Fig. 5B, lanes 3). In contrast, 2-monolein and triolein were inefficient in inducing CD36 ubiquitination. To assess whether ubiquitination induces





**FIGURE 6. Degradation of CD36 by the proteasome (A and B) leads to a decrease in the ERK1/2 (A and C) activation in CD36<sup>+/+</sup> mice but not in CD36<sup>-/-</sup> mice.** Control fasted CD36<sup>+/+</sup> and CD36<sup>-/-</sup> mice were injected intraperitoneally with MG132 (14 mg/kg) 30 min before gavage (0.5 ml oil) and sacrificed 4 h later. CD36, HSC70, phosphorylated ERK1/2 (P-ERK1/2), and ERK1/2 levels in jejunal mucosa were analyzed by Western blotting. A representative signal is shown from four independent experiments, quantified by densitometry, and standardized to HSC70 signal or total ERK1/2 as the loading control. The data are expressed as percentages of controls not treated with MG132. The values are the means  $\pm$  S.E. ( $n = 4$ ). \*,  $p < 0.05$ .

proteasomal degradation of CD36, fasted mice were treated with the proteasome inhibitor MG132 before gavage with oil. Consistent with our earlier data (Fig. 4C), a dramatic drop in CD36 content in the intestinal mucosa took place 4 h after the gavage. MG132 treatment prevented this lipid-mediated decrease, demonstrating involvement of the proteasome in CD36 degradation (Fig. 6, A and B).

*The Lipid-mediated Degradation of Intestinal CD36 Affects the Activation Levels of ERK1/2, ApoB48, and MTP Protein Expression*—There is evidence from the literature indicating that ligand binding to CD36 mediates cell-specific responses especially via activation of the MAPKs family pathway (37) including ERK1/2 (27, 38). Because the modulation of ERK1/2 activation has been demonstrated to be involved in the assembly of apoB containing lipoproteins (24, 25), we hypothesized

that a defect in CD36 signaling could be involved in the reduction of intestinal lipoprotein production in CD36<sup>-/-</sup> mice (21).

To examine whether the lipid-mediated degradation of CD36 observed in the postprandial period is linked to ERK activation *in vivo*, the phosphorylation of this MAPK was measured in mouse intestines after the lipid load when CD36 was degraded or not by MG132 treatment (Fig. 6A). As shown in Fig. 6B, there was basal activation of ERK1/2 in the fasted state (control), which was similar in CD36<sup>+/+</sup> and CD36<sup>-/-</sup> mice. However, in CD36<sup>+/+</sup> mice, 4 h after the lipid ingestion as CD36 protein levels significantly decreased, an associated decrease in ERK1/2 activation was observed (Fig. 6B). Moreover, this decrease was blunted when degradation of CD36 was prevented by MG132. In contrast, in CD36<sup>-/-</sup> mice neither the lipid load nor MG132 treatment significantly affected ERK1/2 activation (Fig. 6, A and C). Together, these *in vivo* data suggested that dietary LCFA mediated ERK1/2 activation during intestinal absorption is dependent on CD36 protein level. This interpretation would imply that LCFA are able to activate ERK1/2 via CD36 before its degradation. The direct effect of LCFA on CD36 protein level and ERK activation was determined *ex vivo*, in isolated intestinal segments from CD36<sup>+/+</sup> and CD36<sup>-/-</sup> mice incubated in presence of linoleic acid (240  $\mu$ M, complexed with BSA) for a short time (10 to 20 min) to avoid CD36 degradation. As expected, LCFA treatment led to activation of ERK1/2 after 5 min (data not shown) and 10 min (+ 60%), when the level of CD36 had not decreased yet. After 20 min of LCFA treatment, ERK1/2 activation was reduced, but at that time CD36 protein levels were significantly decreased ( $-30\%$ ) (Fig. 7A). In agreement with our *in vivo* data, LCFA treatment did not affect ERK1/2 activation in intestinal segments derived from CD36<sup>-/-</sup> mice (Fig. 7A).

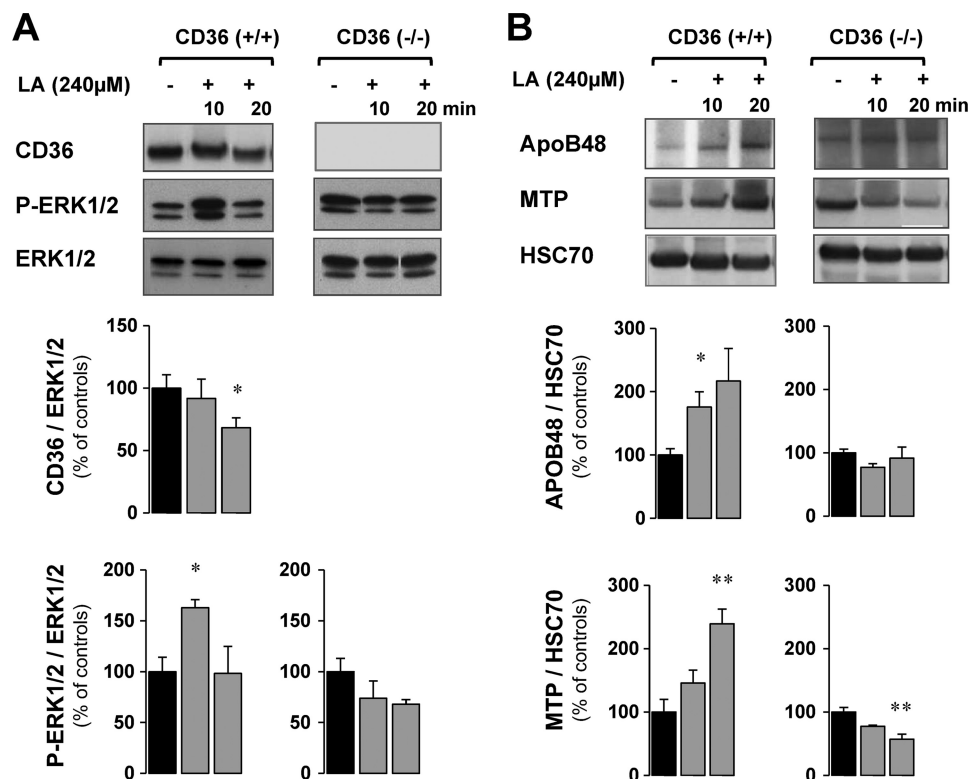
These data demonstrated that LCFA induce CD36-dependent ERK1/2 activation and subsequently CD36 degradation, which correlates with a reduction of ERK1/2 activation. Finally, to determine whether the CD36-associated modulation of ERK1/2 affects proteins involved in formation of chylomicrons, apoB48 and MTP protein content was evaluated in the mucosa of intestinal segment isolated from CD36<sup>+/+</sup> and CD36<sup>-/-</sup> mice and cultured with LCFA. Our data demonstrated that LCFA treatment increased apoB48 after 10 min when lipid-mediated activation of ERK1/2 was highest and MTP after 20 min when ERK1/2 activation was down-regulated in CD36<sup>+/+</sup> mouse segments. These effects were not observed in CD36<sup>-/-</sup> mouse segments (Fig. 7B).

## DISCUSSION

CD36 deficiency has been documented to impair intestinal chylomicron production, but how this occurs remains unclear. In this report, we provide novel insight into the potential underlying mechanisms. We present the first demonstration that CD36 disappears from the luminal side of intestinal villi early during the postprandial period. This phenomenon is lipid-dependent and is triggered by LCFA and/or diglycerides derived from gastric and pancreatic digestion of dietary TG. In addition it is highly lipid-sensitive and observed in both rats and mice fed a standard chow containing only 3% lipids. We also show that lipid-induced down-regulation of CD36 in the intestinal



## Lipid Signaling by Intestinal CD36 and Chylomicron Formation



**FIGURE 7. The LCFA-mediated ERK1/2 activation requires CD36 and triggers an up-regulation of apoB48 and MTP protein expression.** Isolated intestinal segments from CD36<sup>+/+</sup> and CD36<sup>-/-</sup> mice were cultured in the presence of linoleic acid (240 μM, complexed with BSA) for 10–20 min. *A*, CD36, phosphorylated ERK1/2 (P-ERK1/2), and ERK1/2 levels in jejunal mucosa were analyzed by Western blotting. A representative signal is shown from four independent experiments, quantified by densitometry, and standardized to total ERK1/2 as the loading control. *B*, apoB48, MTP, and HSC70 levels in jejunal mucosa were analyzed by Western blotting. A representative signal is shown from four independent experiments, quantified by densitometry, and standardized to HSC70 as the loading control. The data are expressed as percentages of controls not treated with LCFA. The values are the means ± S.E. ( $n = 4$ ). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

mucosa reflects targeted CD36 proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway. Moreover, we document *in vivo* and *ex vivo* that CD36 is required for dietary lipid activation of ERK1/2 and that the activation level parallels that of CD36 protein. Finally, we demonstrate, using *ex vivo* experiments, that CD36/lipid-dependent modulation of ERK1/2 associates a sequential up-regulation of apoB48 and MTP, two proteins required for the assembly of large chylomicrons.

Indirect evidence suggesting lipid induced down-regulation of CD36 was previously reported in rat red quadriceps where CD36 level decreased 2 h after intravenous infusion of a TG emulsion (39). A potential mechanism was provided by the finding in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myotubes that LCFA can induce CD36 ubiquitination and its subsequent degradation by the proteasome (33). Our findings indicate that during lipid absorption, digestive products, in particular LCFA and diglycerides, induce down-regulation of luminal CD36 content in the intestinal mucosa via its internalization and targeting to degradation.

This rapid degradation of CD36 in the intestine argues against its efficient participation in LCFA uptake during the postprandial period. Consistent with this, CD36 deletion does not affect lipid uptake (Fig. 1) using *in situ* isolated intestinal segments and a micellar FA delivery system. This model keeps intact the unstirred water layer lining the BBM, a property of enterocytes that is not applicable to other lipid-utilizing cells (*i.e.* adipocytes, myocytes, and hepatocytes). Our data are in agreement with the fact that fecal lipid content was not altered

in the CD36<sup>-/-</sup> mice (22). Enterocytes are subjected to very high levels of lipid during postprandial periods, which is not the case for other cells. Luminal lipid levels would greatly exceed CD36 capacity because the protein functions at low (nanomolar) concentrations of LCFA. In addition, the unstirred water layer, which has a low pH gradient, induces LCFA protonation, which facilitates their membrane permeation (for review see Ref. 40). The findings in this study together with previously published work (19) suggest that CD36 likely functions in the early stages of absorption to initiate events that regulate intracellular FA processing.

There is a large body of evidence to support the function of membrane CD36 in transducing intracellular signals after binding a number of ligands such as thrombospondin-1 in endothelial cells (41, 42), oxidized LDL in macrophages (43), and LCFA in taste bud cells (8, 9). CD36 localizes to plasma membrane detergent-resistant microdomains implicated in cell signaling (44). CD36-dependent signal transduction is generally associated with activation of Src and MAP family kinases (for review see Ref. 37). The cytoplasmic C-terminal tail of CD36 mediates these interactions in various tissues (10, 42, 43, 45), including mouse taste buds (9, 10). Moreover, in macrophages it has been demonstrated that the C-terminal domain of CD36 is associated with MEKK2 (a MAP kinase pathway component) (43), and CD36-dependent activation of the ERK1/2 has been demonstrated in at least two studies (27, 38). Our data support the involvement of ERK1/2 in CD36-mediated regulation of chylo-

micron formation. Indeed, *in vivo* as well as *ex vivo* LCFA activation of ERK1/2 is tightly correlated with CD36 protein levels and is reduced in parallel with CD36 during lipid absorption. Furthermore CD36 is required for LCFA activation of ERK1/2 as shown by our *in vivo* and *ex vivo* studies using CD36<sup>-/-</sup> mice. As with numerous surface receptors (36) exposed to persistent and high supply of ligand, intestinal CD36 is down-regulated by its LCFA ligands via ubiquitination and degradation. This would serve as a feedback regulatory and potentially protective mechanism (36, 46).

Interestingly, the LCFA-induced down-regulation may also be important for optimization of chylomicron formation. The lipid CD36-dependent ERK1/2 activation associated with an early increase in intestinal apoB48 *versus* a more delayed increase in MTP. These two proteins are essential for the assembly and secretion of chylomicrons (40). In the small intestine, MTP is required for transfer of the TG to the apoB-containing prechylomicrons in the lumen of the endoplasmic reticulum, a process that plays a rate-limiting role in lipoprotein synthesis. Mice with conditional intestine-specific MTP deficiency exhibit fat malabsorption, cytoplasmic lipid droplet accumulation in enterocytes, and virtual disappearance of apoB48 lipoproteins (47). ApoB48 is the preferred protein coat for chylomicron lipid and is needed for efficient chylomicron formation (48). Furthermore, our data are in agreement with the lower lymphatic apoB48 secretion observed in CD36<sup>-/-</sup> mice (22).

MAPK activation has been previously implicated in regulating levels of the apoB48 and MTP proteins. MEK1/2 inhibition (and consequently ERK1/2 inhibition) decreased apoB48 production in hamster enterocytes (25). In contrast, the ERK1/2 cascade exerts an inhibitory effect on MTP gene transcription (26). In the liver, inhibition of the ERK phosphorylation pathway triggers formation of large sized apoB lipoproteins (24). Consistent with these findings, in our studies, MG132 treatment of CD36<sup>+/+</sup> mice, which prevents the reduction in ERK1/2 phosphorylation, also prevents up-regulation of MTP mRNA (data not shown). Together, the data suggest that dietary lipid-induced CD36 degradation may play a role in the formation of large chylomicrons via down-regulation of ERK1/2 activation and subsequent up-regulation of MTP.

We thus propose a model in which LCFA binding to the extracellular domains of CD36 at the early stages of intestinal lipid absorption activates ERK1/2, which triggers an increase in mucosal apoB48 protein. LCFA also induce CD36 ubiquitination. In presence of high LCFA, a significant proportion of CD36 is progressively ubiquitinated and degraded, leading to a decrease in CD36 levels. Consequently, CD36-dependent activation of intestinal ERK1/2 also decreases, which would be important to trigger the increase in MTP protein required for apoB48 lipidation (24) and chylomicron formation. These CD36-dependent events may explain why in CD36<sup>-/-</sup> mice subjected to high fat diet, more intestinal lipid retention is observed and why smaller lipoprotein particles are secreted (21). In conclusion, our data indicate that CD36 degradation, which may be dependent on the LCFA content of the diet, could be the signal leading to the formation of large apoB48-rich TG lipoproteins via reducing ERK1/2 activation and increasing

MTP level. Overall, these novel observations suggest that CD36 operates as a lipid sensor, responsible for transducing signals related to the dietary lipid content that optimize the formation of large chylomicrons containing apoB48.

A better understanding of the factors that regulate CD36 and its signaling pathways and how they contribute to lipid-dependent intestinal adaptation (31, 40) is important. It might provide new therapeutic approaches and/or dietary recommendations that optimize chylomicron size and consequently blood chylomicron clearance to decrease the prevalence of postprandial hypertriglyceridemia and the associated risk of cardiovascular diseases.

## REFERENCES

- Habets, D. D., Coumans, W. A., Voshol, P. J., den Boer, M. A., Febbraio, M., Bonen, A., Glatz, J. F., and Luiken, J. J. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 204–210
- Coburn, C. T., Knapp, F. F., Jr., Febbraio, M., Beets, A. L., Silverstein, R. L., and Abumrad, N. A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 32523–32529
- Ibrahimi, A., Sfeir, Z., Magharaie, H., Amri, E. Z., Grimaldi, P., and Abumrad, N. A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 2646–2651
- Endemann, G., Stanton, L. W., Madden, K. S., Bryant, C. M., White, R. T., and Protter, A. A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 11811–11816
- Chen, C. H., Cartwright, J., Jr., Li, Z., Lou, S., Nguyen, H. H., Gotto, A. M., Jr., and Henry, P. D. (1997) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 1303–1312
- Ren, Y., Silverstein, R. L., Allen, J., and Savill, J. (1995) *J. Exp. Med.* **181**, 1857–1862
- Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J., and Seed, B. (1989) *Cell* **58**, 95–101
- Laugerette, F., Passilly-Degrace, P., Patris, B., Niot, I., Febbraio, M., Montmayeur, J. P., and Besnard, P. (2005) *J. Clin. Invest.* **115**, 3177–3184
- Gaillard, D., Laugerette, F., Darcel, N., El-Yassimi, A., Passilly-Degrace, P., Hichami, A., Khan, N. A., Montmayeur, J. P., and Besnard, P. (2008) *FASEB J.* **22**, 1458–1468
- El-Yassimi, A., Hichami, A., Besnard, P., and Khan, N. A. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 12949–12959
- Luiken, J. J., Dyck, D. J., Han, X. X., Tandon, N. N., Arumugam, Y., Glatz, J. F., and Bonen, A. (2002) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**, E491–E495
- Bonen, A., Han, X. X., Habets, D. D., Febbraio, M., Glatz, J. F., and Luiken, J. J. (2007) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **292**, E1740–E1749
- Yamashita, S., Hirano, K., Kuwasako, T., Janabi, M., Toyama, Y., Ishigami, M., and Sakai, N. (2007) *Mol. Cell Biochem.* **299**, 19–22
- Love-Gregory, L., Sherva, R., Sun, L., Wasson, J., Schappe, T., Doria, A., Rao, D. C., Hunt, S. C., Klein, S., Neuman, R. J., Permutt, M. A., and Abumrad, N. A. (2008) *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1695–1704
- Ma, X., Bacci, S., Mlynarski, W., Gottardo, L., Soccio, T., Menzaghi, C., Iori, E., Lager, R. A., Shroff, A. R., Gervino, E. V., Nesto, R. W., Johnstone, M. T., Abumrad, N. A., Avogaro, A., Trischitta, V., and Doria, A. (2004) *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2197–2205
- Poirier, H., Degrace, P., Niot, I., Bernard, A., and Besnard, P. (1996) *Eur. J. Biochem.* **238**, 368–373
- Lobo, M. V., Huerta, L., Ruiz-Velasco, N., Teixeira, E., de la Cueva, P., Celdrán, A., Martín-Hidalgo, A., Vega, M. A., and Bragado, R. (2001) *J. Histochem. Cytochem.* **49**, 1253–1260
- Nassir, F., Wilson, B., Han, X., Gross, R. W., and Abumrad, N. A. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 19493–19501
- Drover, V. A., Nguyen, D. V., Bastie, C. C., Darlington, Y. F., Abumrad, N. A., Pessin, J. E., London, E., Sahoo, D., and Phillips, M. C. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 13108–13115
- Masuda, D., Hirano, K., Oku, H., Sandoval, J. C., Kawase, R., Yuasa-Kawase, M., Yamashita, Y., Takada, M., Tsubakio-Yamamoto, K., Tochino, Y., Koseki, M., Matsuura, F., Nishida, M., Kawamoto, T., Ishigami, M., Hori, M., Shimomura, I., and Yamashita, S. (2009) *J. Lipid Res.* **50**, 999–1011
- Drover, V. A., Ajmal, M., Nassir, F., Davidson, N. O., Nauli, A. M., Sahoo,

## Lipid Signaling by Intestinal CD36 and Chylomicron Formation

- D., Tso, P., and Abumrad, N. A. (2005) *J. Clin. Invest.* **115**, 1290–1297
22. Nauli, A. M., Nassir, F., Zheng, S., Yang, Q., Lo, C. M., Vonlehmden, S. B., Lee, D., Jandacek, R. J., Abumrad, N. A., and Tso, P. (2006) *Gastroenterology* **131**, 1197–1207
23. Quarfordt, S. H., and Goodman, D. S. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* **116**, 382–385
24. Tsai, J., Qiu, W., Kohen-Avramoglu, R., and Adeli, K. (2007) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 211–218
25. Federico, L. M., Naples, M., Taylor, D., and Adeli, K. (2006) *Diabetes* **55**, 1316–1326
26. Au, W. S., Kung, H. F., and Lin, M. C. (2003) *Diabetes* **52**, 1073–1080
27. Kuda, O., Jenkins, C. M., Skinner, J. R., Moon, S. H., Su, X., Gross, R. W., and Abumrad, N. A. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 17785–17795
28. Shirazi-Beechey, S. P., Davies, A. G., Tebbutt, K., Dyer, J., Ellis, A., Taylor, C. J., Fairclough, P., and Beechey, R. B. (1990) *Gastroenterology* **98**, 676–685
29. Dahlqvist, A. (1970) *Enzymol. Biol. Clin.* **11**, 52–66
30. Delsal, J. L. (1954) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **36**, 1329–1334
31. Petit, V., Arnould, L., Martin, P., Monnot, M. C., Pineau, T., Besnard, P., and Niot, I. (2007) *J. Lipid Res.* **48**, 278–287
32. Pardo, V. G., Facchinetti, M. M., Curino, A., Boland, R., and de Boland, A. R. (2007) *Biogerontology* **8**, 13–24
33. Smith, J., Su, X., El-Maghrabi, R., Stahl, P. D., and Abumrad, N. A. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 13578–13585
34. Pelsers, M. M., Lutgerink, J. T., Nieuwenhoven, F. A., Tandon, N. N., van der Vusse, G. J., Arends, J. W., Hoogenboom, H. R., and Glatz, J. F. (1999) *Biochem. J.* **337**, 407–414
35. Hansen, G. H., Niels-Christiansen, L. L., Immerdal, L., and Danielsen, E. M. (2003) *Gut* **52**, 1424–1431
36. Miranda, M., and Sorkin, A. (2007) *Mol. Interv.* **7**, 157–167
37. Silverstein, R. L., and Febbraio, M. (2009) *Sci. Signal.* **2**, re3
38. Baranova, I. N., Bocharov, A. V., Vishnyakova, T. G., Kurlander, R., Chen, Z., Fu, D., Arias, I. M., Csako, G., Patterson, A. P., and Eggerman, T. L. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 8492–8506
39. Hevener, A. L., Reichart, D., Janez, A., and Olefsky, J. (2001) *Diabetes* **50**, 2316–2322
40. Niot, I., Poirier, H., Tran, T. T., and Besnard, P. (2009) *Prog. Lipid Res.* **48**, 101–115
41. Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y. H., Cook, R. F., and Sargiacomo, M. (1994) *J. Cell Biol.* **126**, 111–126
42. Jiménez, B., Volpert, O. V., Crawford, S. E., Febbraio, M., Silverstein, R. L., and Bouck, N. (2000) *Nat. Med.* **6**, 41–48
43. Rahaman, S. O., Lennon, D. J., Febbraio, M., Podrez, E. A., Hazen, S. L., and Silverstein, R. L. (2006) *Cell Metab.* **4**, 211–221
44. Eehalt, R., Sparla, R., Kulaksiz, H., Herrmann, T., Füllekrug, J., and Stremmel, W. (2008) *BMC Cell Biol.* **9**, 45
45. Huang, M. M., Bolen, J. B., Barnwell, J. W., Shattil, S. J., and Brugge, J. S. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 7844–7848
46. Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S., and Sorkin, A. (2006) *Mol. Cell* **21**, 737–748
47. Xie, Y., Newberry, E. P., Young, S. G., Robine, S., Hamilton, R. L., Wong, J. S., Luo, J., Kennedy, S., and Davidson, N. O. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 4075–4086
48. Lo, C. M., Nordskog, B. K., Nauli, A. M., Zheng, S., Vonlehmden, S. B., Yang, Q., Lee, D., Swift, L. L., Davidson, N. O., and Tso, P. (2008) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **294**, G344–G352