



**HAL**  
open science

# DÉTECTION DES LIPIDES ALIMENTAIRES SOUS FORME DE COMPLEXES MICELLAIRES PAR LES ENTÉROCYTES

Olivier Beaslas

► **To cite this version:**

Olivier Beaslas. DÉTECTION DES LIPIDES ALIMENTAIRES SOUS FORME DE COMPLEXES MICELLAIRES PAR LES ENTÉROCYTES. Alimentation et Nutrition. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. NNT : 2008PA066012 . tel-00811592

**HAL Id: tel-00811592**

**<https://theses.hal.science/tel-00811592>**

Submitted on 10 Apr 2013

**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 Paris VI - Pierre et Marie Curie**

**THÈSE de DOCTORAT**

École doctorale de physiologie et physiopathologie

Présentée par

**Olivier BÉASLAS**

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS VI

**DÉTECTION DES LIPIDES ALIMENTAIRES**

**SOUS FORME DE COMPLEXES**

**MICELLAIRES PAR LES ENTÉROCYTES**

Thèse co-dirigée par Monique ROUSSET et Véronique CARRIÈRE

Soutenue le 31 Mars 2008

Devant le jury composé de:

Professeur Joëlle MASLIAH

Docteur Sophie LESTAVEL

Docteur Isabelle NIOT

Professeur Paul André GRIMALDI

Docteur Thierry HUBY

Docteur Véronique CARRIÈRE

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

# Résumé

L'intestin contribue à l'homéostasie lipidique en assurant l'absorption des lipides alimentaires et leur transfert à l'organisme sous forme de lipoprotéines riches en triglycérides (LRT). Ce processus complexe doit être contrôlé au niveau entérocytaire pour faire face aux variations d'apport en lipides, en termes de masse et de composition, entre les périodes post-prandiales et inter-prandiales. De plus, dans les conditions physiologiques, on observe une asymétrie du mode d'apport en lipides entre le compartiment basal et le compartiment apical des entérocytes : au niveau basal, ces cellules sont en contact permanent avec des lipides sériques liés à l'albumine ou aux lipoprotéines, alors qu'au niveau apical, les lipides présents dans la lumière intestinale sont sous forme de micelles constituées des produits de la bile en période inter-prandiale, auxquels s'ajoutent les produits de digestion des triglycérides (TG) en période post-prandiale.

L'Homme est, pour la majeure partie de sa journée, en situation post-prandiale. Nous nous sommes donc intéressés, dans les cellules Caco-2/TC7, à la réponse spécifique des entérocytes aux micelles post-prandiales, en étudiant les effets différentiels exercés par des apports sériques ou luminaux en lipides, et par des micelles inter- ou post-prandiales.

Par une approche transcriptomique, j'ai pu montrer que les lipides modulent l'expression de nombreux gènes entérocytaires (environ 600 gènes sur les 13 000 analysés). Cependant, les profils géniques obtenus diffèrent entre l'apport luminal ou sérique en lipides. De plus, la comparaison des apports apicaux de micelles lipidiques inter- (MIP) ou post-prandiales (MPP) a permis de mettre en évidence que les MPP modulent spécifiquement l'expression de 46 gènes appartenant à trois grandes catégories de fonction: transduction de signaux, métabolisme lipidique, et adhésion/architecture cellulaire. Parmi ces 46 gènes, 20 gènes ont des sites de fixation putatifs ou avérés pour HNF-4. Ces résultats, qui s'ajoutent aux effets spécifiques des MPP sur le trafic de l'apoB, apolipoprotéine de structure des LRT, la synthèse et la sécrétion des TG et l'activation de l'apo A-IV, mis préalablement en évidence dans l'équipe, confortent l'hypothèse d'une détection spécifique des MPP au niveau des entérocytes. Je me suis attaché à décrypter les mécanismes de cette détection et à caractériser le récepteur membranaire capable de reconnaître l'apport de lipides alimentaires sous forme micellaire et d'induire des voies de signalisation aboutissant au transfert trans-épithélial des lipides. J'ai pu montrer que les MPP se lient à une protéine dont le poids moléculaire (75 kDa) correspond à celui du récepteur scavenger SR-BI/CLA-1, exprimé à la bordure en brosse des entérocytes Caco-2/TC7. L'apport apical de MPP conduit à la clusterisation de SR-BI/CLA-1 dans la membrane apicale et à son adressage vers des domaines rafts particuliers, signant ainsi la mise en place d'une plateforme de signalisation. Les MPP induisent spécifiquement, en quelques minutes, le trafic de l'apoB, de la membrane apicale vers les compartiments sécrétoires intracellulaires, et l'activation des kinases ERK et p38MAPK. Ces effets, non reproduits par les MIP, sont abolis lorsque SR-BI/CLA-1 est bloqué par un ligand de forte affinité ou est invalidé par shRNA lentiviraux.

Les résultats de ces travaux montrent donc pour la première fois que les entérocytes sont capables de détecter spécifiquement les lipides alimentaires sous forme micellaire. Cette détection, qui implique le récepteur membranaire SR-BI/CLA-1, induit des voies de signalisation dont le relais intracellulaire pourrait être le facteur transcriptionnel HNF-4, aboutissant à la mise en place des paramètres morphologiques et fonctionnels nécessaires au transfert polarisé des lipides alimentaires.

**Mots-clés:** détection entérocytaire, lipides alimentaires, micelles lipidiques post-prandiales, SR-BI/CLA-1, Caco-2/TC7

**SENSING OF MICELLAR DIETARY LIPIDS  
BY ENTEROCYTES**

# Abstract

Intestine contributes to lipid homeostasis through the absorption of dietary lipids and their transfer to the organism as triglyceride-rich lipoproteins (TRL). This complex process must be controlled in enterocytes to face variations in lipid supplies, in terms of mass and composition, between inter-prandial and postprandial periods. Moreover, in physiological conditions, an asymmetry is observed in the lipids supplied in the basal and apical compartments of enterocytes: at their basal compartment, enterocytes are in the permanent contact of plasma lipids linked to albumin or lipoproteins, while at the apical level, lipids present in the intestinal lumen are under the form of micelles that are composed of bile products during the inter-prandial period, to which are added products of triglyceride (TG) hydrolysis during the postprandial period.

Human are, for the major part of the day, in a postprandial situation. We were thus interested by the specific response of enterocytes to postprandial micelles that we analyzed through the characterization of the differential effects exerted by the supply of plasma or luminal lipids and by inter-prandial or postprandial micelles in Caco-2/TC7 enterocytes.

By a transcriptomic approach, I showed that lipids modulate the expression of more than 600 enterocyte genes among the 13 000 genes analyzed. However, the profile of the targeted genes differed between the supply of lipids as plasma lipids or as luminal lipid micelles. Moreover, the comparison of the effects of an apical supply of inter- (IPM) or postprandial (PPM) lipid micelles revealed that PPM specifically modulate the expression of 46 genes involved in three main function categories: signal transduction, lipid metabolism, and cell adhesion/architecture. Among these 46 genes, 20 genes had putative or known HNF-4 binding sites. These results, combined with previous results from our group showing specific effects of PPM on the traffic of apoB, the structural protein of TRL, on the synthesis and secretion of TG and on apoAI-V transcription, reinforced the hypothesis of a specific sensing of PPM in enterocytes. My purpose was thus to decipher the mechanisms of this sensing and to characterize the membrane receptor that could recognize the supply of dietary lipids as micelles and induce signalling pathways leading to the trans-epithelial transfer of lipids. I showed that PPM bind to a protein with a molecular mass of 75 kDa, compatible with that of the scavenger receptor SR-BI/CLA-1, which is present in the apical brush-border of Caco-2/TC7 cells. The apical supply of PPM leads to the clusterization of SR-BI/CLA-1 in the apical membrane and to its targeting towards particular raft domains, signing the onset of a signalling platform. PPM specifically induce, within minutes, the traffic of apoB, from the apical membrane towards intracellular secretory compartments, and the activation of ERK and p38MAPK. These effects, which are not reproduced by the supply of IPM, are abolished when SR-BI/CLA-1 is blocked by a high affinity ligand or invalidated by lentiviral shRNA.

The results of this work show for the first time that enterocytes are able to specifically detect dietary lipids under micellar form. This sensing, which involves the membrane receptor SR-BI/CLA-1, induces signalling pathways that are relayed intracellularly by the transcription factor HNF-4, leading to the onset of morphological and functional parameters necessary for the polarized transfer of dietary lipids.

**Keywords:** sensing in enterocytes, dietary lipids, post prandial lipid micelles, SR-BI/CLA-1, Caco-2/TC7 cells

*Je remercie le professeur Joëlle Masliah d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.*

*Je remercie les docteurs Sophie Lestavel et Isabelle Niot d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et pour leurs nombreuses remarques constructives sur la première version du manuscrit.*

*Je remercie le professeur Paul André Grimaldi d'avoir accepté d'être examinateur dans ce jury, et de revenir évaluer ce travail hors AERES.*

*Je remercie particulièrement le docteur Thierry Huby d'avoir gentiment accepté d'être examinateur de ce travail. Thierry, mon tuteur de thèse, merci de m'avoir aidé à grandir droit et à avancer. Tes commentaires sur le travail ont toujours été constructifs et nos discussions m'ont bien encouragé.*

*Je tiens à remercier le docteur Véronique Carrière, qui a encadré ce travail de thèse, et qui a dû me supporter pendant presque quatre ans et demi (DEA et thèse). Tu m'as appris beaucoup scientifiquement, et même si je ne t'en ai pas toujours fait la preuve, je sais que cela me sera profitable dans l'avenir.*

*Je veux également remercier le docteur Monique Rousset, directrice "habilitée" de cette thèse. Vous formez un sacré duo avec Véronique. Merci pour toutes tes petites phrases qui ont fait, font et feront leur chemin...parfois la route est longue!!!*

*Je remercie le professeur Jean Chambaz pour l'intégralité de son œuvre.*

*Je remercie l'ensemble des personnes de l'U505, devenue équipes 4, 6, 9 du CRC. Un merci particulier à François "PubMed" Delers, au "club-photo" (Jean-Marc, Philippe et Michel). Merci Maude pour les "je t'offre un café?" et les moments qui l'accompagnent. Un clin d'œil aux mangeuses de salades. Elisabeth, merci pour ta gentillesse et d'avoir alimenté ma "culture". Dior, J'adore.*

*Merci aux doctorant(e)s d'ici et d'ailleurs.*

*Merci à mes petites parenthèses.*

# SOMMAIRE

<b>FIGURES.....</b>	<b>3</b>
<b>ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>6</b>
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>8</b>
Cadre du travail.....	12
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>13</b>
<b>Chapitre I. Le métabolisme lipidique intestinal.....</b>	<b>14</b>
I.1 Structure et fonction de l'intestin grêle.....	14
I.1.1 Anatomie de l'intestin grêle humain.....	14
I.1.2 L'épithélium intestinal.....	16
I.1.2.1 Les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal.....	16
I.1.2.2 Les modèles de cellules entérocytaires .....	18
I.2 Digestion des lipides alimentaires .....	21
I.2.1 Généralités sur la digestion des nutriments.....	21
I.2.2 Transformation intra-luminale des lipides alimentaires.....	23
I.2.3 La solubilisation micellaire.....	26
I.2.4 L'entrée apicale des produits de digestion des lipides dans l'entérocyte.....	28
I.3 Les lipoprotéines riches en triglycérides d'origine intestinale .....	29
I.3.1 Métabolisme intracellulaire des lipides constituant les lipoprotéines riches en triglycérides ...	29
I.3.1.1 Métabolisme du cholestérol et des phospholipides .....	30
I.3.1.2 Re-synthèse des triglycérides.....	31
I.3.2. L'apolipoprotéine B.....	32
I.3.3 Formation des lipoprotéines riches en triglycérides.....	35
I.3.4 Rôle des lipoprotéines riches en triglycérides.....	39
<b>Chapitre II: La détection des lipides alimentaires .....</b>	<b>43</b>
II.1 La perception du goût.....	43
II.1.1 Les récepteurs du goût.....	45
II.1.2 CD36: un récepteur du goût du gras .....	48
II.2 L'apoA-IV .....	52
II.3 L'intestin endocrine .....	54
II.4 Les acides gras et l'hypothalamus .....	57
II.5 Les récepteurs nucléaires: des "senseurs" intracellulaires .....	60

# SOMMAIRE (suite)

<b>Chapitre III. Détecteurs potentiels des lipides alimentaires micellaires au niveau de la membrane apicale des entérocytes .....</b>	<b>67</b>
III.1 La cavéoline-1 .....	67
III.2 Le récepteur CD36 .....	70
III.3 Les transporteurs FATP4 et FABPpm .....	73
III.4 Le transporteur ASBT .....	74
III.5 Le transporteur NPC1L1 .....	75
III.6 Le récepteur "scavenger" SR-BI .....	77
III.6.1 Structure, expression et localisation de SR-BI .....	77
III.6.2 Régulation transcriptionnelle de l'expression de SR-BI .....	80
III.6.3 Rôle de SR-BI dans le métabolisme du cholestérol .....	81
III.6.4 Les voies de signalisations intracellulaires déclenchées par SR-BI .....	83
 <b><i>TRAVAIL EXPÉRIMENTAL</i>.....</b>	<b>85</b>
<b>Etude transcriptomique des effets des lipides sur les entérocytes .....</b>	<b>86</b>
1-Profiles transcriptionnels des gènes modulés en fonction du mode d'apport des lipides .....	89
2-Identification des gènes spécifiquement modulés par les lipides alimentaires apportés au pôle apical des cellules sous forme de micelles lipidiques post-prandiales .....	93
<b>Article 1: .....</b>	<b>97</b>
 <b>Etude des événements précoces de la détection des micelles post-prandiales par les entérocytes .....</b>	<b>123</b>
<b>Article 2: .....</b>	<b>140</b>
 <b><i>CONCLUSION GÉNÉRALE</i>.....</b>	<b>162</b>
 <b><i>DISCUSSION</i> .....</b>	<b>169</b>
 <b><i>PERSPECTIVES</i>.....</b>	<b>177</b>
 <b><i>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i> .....</b>	<b>181</b>

# FIGURES

## **Avant-propos:**

Figure 1: Mécanismes potentiels de la détection du glucose chez la levure.

## **Introduction, Chapitre I:**

Figure 2: Anatomie du système digestif

Figure 3: Structure de l'épithélium intestinal

Table 1: Les différents types de cellules entéroendocrines et les peptides sécrétés

Figure 4: Structure d'entérocytes et de leur domaine apical

Figure 5: Modèles de cellules épithéliales intestinales normales

Figure 6: Protéines exprimées par des cellules Caco-2 différenciées

Figure 7: La lignée Caco-2 et son clone Caco-2/TC7

Figure 8: Structure des lipides alimentaires

Figure 9: Principales étapes de la digestion et de l'absorption des lipides alimentaires

Figure 10: Les acides biliaires, structure et classification

Figure 11: Modèles moléculaires des micelles en fonction de leurs constituants

Figure 12: Diffusion des lipides à travers la couche non agitée et solubilisation par les acides biliaires

Figure 13: Les transporteurs de lipides présents dans la membrane apicale des entérocytes et leur relais intracellulaires

Figure 14: Les deux voies de synthèse des triglycérides dans l'entérocyte

Figure 15: Structure des protéines ApoB48 et ApoB100

Figure 16: Traduction et translocation de l'apoB

Figure 17: Structure et composition des lipoprotéines

Figure 18: Modèle en deux étapes d'assemblage des VLDL hépatiques

Figure 19: Synthèse d'apoB48 et assemblage de chylomicrons

Figure 20: Le transport des lipides

Figure 21: Maladies associées au dysfonctionnement du trafic intracellulaire de l'apoB

## **Introduction, Chapitre II:**

Figure 22: Localisation et innervation des papilles gustatives

Figure 23: Bourgeons du goût, cellules sensorielles et zones de la langue répondant aux cinq saveurs

- Figure 24: Localisation des récepteurs du goût T1R2+T1R3
- Figure 25: Le bourgeon du goût et la structure prédictive du récepteur au goût du gras, CD36, exprimé à la surface apicale des cellules du goût
- Figure 26: Perception orosensorielle des lipides alimentaires chez la souris: modèle de travail
- Figure 27: Mécanisme proposé de la détection d'acides gras dans l'hypothalamus
- Figure 28: Modèle proposé pour l'action du C75
- Figure 29: Vue générale des récepteurs nucléaires "senseurs" d'acides gras
- Figure 30: Effets physiologiques de l'activation de PPAR $\gamma$
- Figure 31: Résumé des effets pléiotropes de HNF-4 $\alpha$  dans le foie

### **Introduction, Chapitre III:**

- Figure 32: Représentation schématique de la cavéoline-1 au sein d'un domaine cavéolaire
- Figure 33: Différentes voies de signalisation activées par le récepteur CD36
- Figure 34: Représentation schématique de la protéine SR-BI

### **Travail expérimental:**

#### **Etude transcriptomique des effets des lipides sur les entérocytes**

- Figure 35: Les conditions d'apports en lipides aux cellules Caco-2/TC7 cultivées sur filtre
- Figure 36: Analyse transcriptome en fonction du mode d'apport des lipides aux cellules Caco-2/TC7
- Figure 37: Représentation schématique de la modulation de l'expression de gènes en fonction de l'apport basal ou apical de lipides aux cellules Caco-2/TC7
- Table 2: Gènes différentiellement modulés par les MPP par rapport aux MIP
- Figure 38: Classement par catégories de fonction des gènes dont l'expression est différentiellement modulée par les micelles apicales post-prandiales par rapport aux micelles inter-prandiales.
- Figure 39: Validation des résultats du micro-array Affymetrix.

#### **Etude des événements précoces de la détection des micelles post-prandiales par les entérocytes**

- Figure 40: Le trafic de l'apoB est spécifiquement induit par les micelles contenant les lipides alimentaires
- Figure 41: Voies de signalisation spécifiquement induites par les micelles post-prandiales
- Figure 42: Activation spécifique de ERK et p38MAPK par les MPP

- Figure 43: Effet dose-dépendant de l'activation de ERK et p38MAPK par les micelles post-prandiales.
- Figure 44: Liaison du cholestérol radiomarqué à la membrane apicale des entérocytes Caco-2/TC7
- Figure 45: Localisation subcellulaire de SR-BI après incubation avec des micelles post-prandiales
- Figure 46: Quantité relative de SR-BI à la membrane apicale des cellules Caco-2/TC7 en réponse à l'apport apical de micelles post-prandiales
- Figure 47: L'apport de MPP induit des mouvements de SR-BI vers les domaines rafts
- Figure 48: Invalidation de SR-BI dans les cellules Caco-2/TC7
- Figure 49: Niveaux d'expression de SR-BI dans les cellules Caco2/TC7 transfectées par des constructions shRNA au cours des passages en culture
- Figure 50: L'invalidation de SR-BI dans les cellules Caco-2/TC7 affecte la phosphorylation de ERK1/2 induite par les MPP
- Figure 51: Les effets spécifiques des MPP sont affectés par la présence de HDL3, un ligand de forte affinité de SR-BI

### **Conclusion générale**

- Figure 52: Effets spécifiques des micelles post-prandiales sur les entérocytes et implication de SR-BI dans la détection des lipides alimentaires par les entérocytes

### **Perspectives:**

- Figure 53: Construction de souris transgéniques invalidées pour SR-BI au niveau intestinal et de façon inductible

# ABRÉVIATIONS

2-MG	2-monoacylglycérol
5-HT	5-hydroxytryptamine
ACAT	acyl-coenzymeA cholestérol transférase
ACC	acetyl-CoA carboxylase
ADP	adénosine diphosphate
AGLC	acides gras à longue chaîne
AGNE	Acides Gras Non Estérifiés
AMPK	AMP-activated protein kinase
apo	apolipoprotéine
ASBT	Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter
ATP	adénosine triphosphate
AG	acides gras
Caco-2	lignée cellulaire dérivée de Carcinome Colique humain
CCK	cholécystokinine
CEE	cellules entéroendocrines
CD36	Cluster of Differentiation 36
CM	chylomicrons
CPT1	carnitine palmitoyltransferase-1
Cre	C Recombinase
Erk1/2	extracellular signal-regulated kinases
FABP <sub>pm</sub>	Fatty acid binding Protein plasma membrane
FAS	Fatty acid synthase
FAT	Fatty Acid Translocase
FATP4	Fatty acid Transporter protein 4
GIP	gastric inhibitory peptide (glucose-dependent insulinotropic polypeptide)
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GLUT2	Glucose Transporteur Type 2
GPAT	glycérolphosphate acyltransférase
HDL	High Density Lipoprotein
HepG2	lignée cellulaire humaine de carcinome hépatocellulaire
HNF-4 $\alpha$	Hepatic Nuclear Factor 4 $\alpha$
HRE	Hormone Responsive Element.

LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	récepteur aux LDL
L-FABP	L type Fatty acid binding protein
LPC	lysophosphatidylcholine
LRT	lipoprotéines riches en triglycérides
LXR	Liver X Receptors
MG	monoglycéride
MGAT	monoacylglycérol acyltransférase
MODY-1	Maturity Onset Diabetes of the Young-1
MTP	microsomal triglyceride transfer protein
NTS	noyau du tractus solitaire
PC	phosphatidylcholine
PDI	protein disulfide isomérase
PL	phospholipides
PPARs	Peroxisome Proliferator Activated Receptors
PYY	peptide tyrosine tyrosine
RCPG	récepteurs couplés aux protéines G
RCT	Reverse Cholesterol Transport
RE	réticulum endoplasmique
REL	réticulum endoplasmique lisse
SAC	compartiment subapical
SI	saccharase isomaltase
TG	triglycérides
TRPM5	transient receptor potential protein
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WB	Western Blot

# AVANT-PROPOS

Jusqu'à une période récente, les relations entre l'alimentation et la santé ont été perçues au travers de maladies associées à des carences nutritionnelles. L'évidence de cette relation reposait sur les grands tableaux cliniques qui accompagnaient les famines, les déficits alimentaires majeurs ou les carences spécifiques qui ont émaillé l'histoire de l'humanité et qui demeurent dramatiquement présents dans les pays en voie de développement.

Au cours des dernières décennies, en France comme dans l'ensemble des autres pays industrialisés, une situation d'abondance s'est développée, favorisant la disparition des grandes maladies de carence, et entraînant de nouveaux enjeux de santé publique liés à l'excès et aux déséquilibres nutritionnels. Les pathologies qui en résultent (maladies cardiovasculaires, obésité, diabète,...) dépendent de facteurs physiologiques, génétiques et de nombreux facteurs environnementaux qui interviennent dans leur initiation ou leur développement. Parmi les facteurs environnementaux, la modification des habitudes alimentaires est aujourd'hui considérée comme jouant un rôle essentiel.

Dans l'ensemble des pays industrialisés, les habitudes alimentaires ont beaucoup plus changé au cours de la deuxième moitié du 20<sup>ème</sup> siècle qu'au cours des siècles précédents (Hercberg 1996). L'évolution de l'alimentation a accompagné les transformations de notre société: modifications des modes de vie, évolutions sociologiques, développement socio-économique, progrès technologiques, changement des goûts des consommateurs et des modes de consommation. De nouveaux aliments ont été introduits, d'autres ont pratiquement disparu de la composition des repas. Manger beaucoup plus que ce qui est nécessaire pour couvrir les besoins énergétiques, avoir une activité physique insuffisante, consommer trop de lipides, notamment d'acides gras saturés, ou trop d'alcool, consommer trop peu de glucides complexes et de fibres, de vitamines ou de minéraux, avoir une alimentation déséquilibrée... accroît le risque de voir apparaître des maladies métaboliques et nutritionnelles qui peuvent non seulement altérer la qualité de vie mais aussi diminuer l'espérance de vie.

Depuis le début des années 1970, de très nombreux travaux issus de la recherche fondamentale, clinique et épidémiologique ont cherché à identifier et à préciser le rôle de

certains facteurs nutritionnels susceptibles d'intervenir comme facteurs de risque, ou au contraire de protection, vis-à-vis du développement de maladies métaboliques. Ces recherches, qui confrontent des données issues de travaux sur modèles cellulaires, sur organes, sur animaux, chez l'Homme sain et malade et au niveau des populations ont mis en évidence, avec des degrés de certitude différents, le rôle de facteurs nutritionnels (excès ou insuffisance) dans le déterminisme de nombreuses maladies. Des approches expérimentales, à finalité plus mécanistique, ont eu pour but de comprendre en détail les interactions entre les nutriments, les tissus et l'organisme, et les événements cellulaires et moléculaires par lesquels l'organisme est renseigné sur l'état d'abondance ou de carence en nutriments.

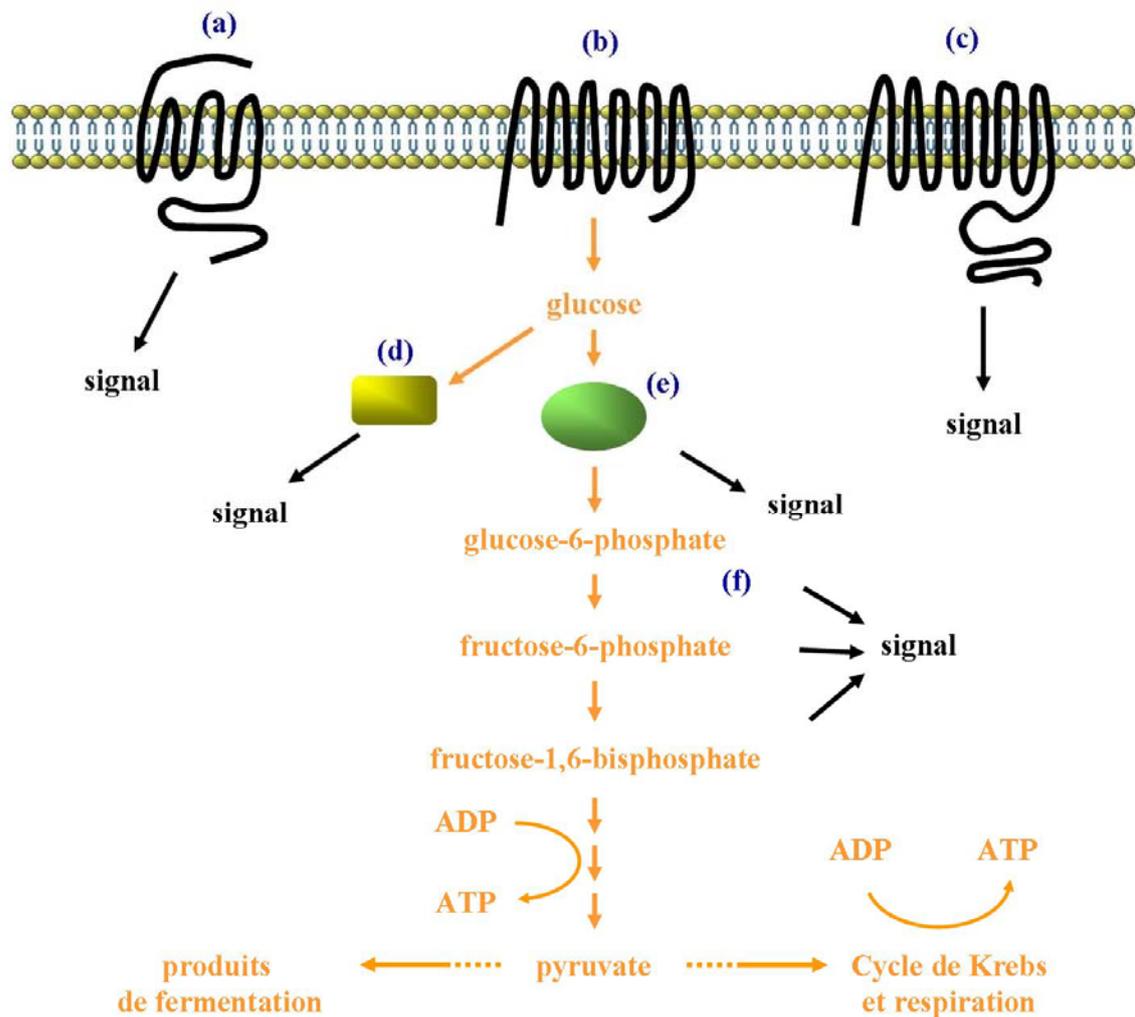
Pendant de nombreuses années, les nutriments n'ont été envisagés que du point de vue de leurs propriétés énergétiques résultant de leur entrée dans les voies métaboliques de biosynthèse de macromolécules, et de leur utilisation comme substrats dans des voies cataboliques. Depuis ces quinze dernières années, les nutriments sont également perçus comme des molécules "signal", renseignant la cellule, et en conséquence l'organe, sur la concentration et la nature du nutriment disponible pour l'organisme. Ces nutriments sont capables d'agir, indépendamment de leurs actions sur les voies métaboliques mises en jeu lors de leur utilisation par la cellule, sur d'autres processus cellulaires. Ces études ont tiré profit du fait qu'au sein du monde vivant, tous les organismes, du plus simple au plus complexe, ont développé les mécanismes nécessaires à leur développement et à leur homéostasie énergétique, mais aussi des systèmes capables de les renseigner sur l'abondance ou la carence environnementale en nutriments.

Le terme de "détecteur de nutriments" a donné cours à de nombreuses interprétations. C'est pourquoi en 2004, la Biochemical Society organisait un congrès intitulé "Nutrient Sensing through the Plasma Membrane of Eukaryotic Cells" afin de faire le point sur ces systèmes de détection des nutriments chez la levure, les plantes, les mammifères. Dans une revue résumant les différents points de vue exposés (Holsbeeks et coll. 2004), les auteurs s'accordent à dire que l'approche originale de la détection des nutriments n'est pas basée sur leur métabolisme, mais sur l'existence de protéines situées au niveau de la membrane plasmique et dont la liaison avec les nutriments provoque un changement de conformation du détecteur et déclenche spécifiquement des voies de signalisation. Des interprétations, moins strictes, incluent dans la détection tout système générant un signal pouvant

également résulter d'un ou plusieurs événements cellulaires induits par le métabolisme de ce nutriment (Holsbeeks et coll. 2004).

La difficulté d'étude de la détection des nutriments est de dissocier les effets cellulaires issus de leur transfert et de leur métabolisme de ceux provoqués par leur détection. Il s'agit de déterminer si la détection des nutriments se fait exclusivement à la surface cellulaire, au niveau de la membrane plasmique, ou en conjonction avec les événements métaboliques intracellulaires induits par l'entrée de ces nutriments. Bien que la détection de diverses sources de carbone et d'azote, comme la concentration extracellulaire en acides aminés et en ammonium, soit particulièrement étudiée chez la levure (Forsberg and Ljungdahl 2001), la majorité des publications porte sur la détection des sucres. En effet, de la levure (Rolland et coll. 2002a) aux cellules eucaryotes multicellulaires animales (Rolland et coll. 2001) ou végétales (Rolland et coll. 2002b; Francis and Halford 2006), la détection des sucres par les cellules et les voies de signalisation induites indépendamment des voies métaboliques, font l'objet de nombreuses recherches.

C'est dans ce contexte que le sucre, et en particulier le glucose, est considéré aujourd'hui comme jouant un rôle comparable à celui d'une hormone, c'est-à-dire que le glucose n'est pas seulement détecté par sa métabolisation intracellulaire. Chez la levure, des mutations ciblées de transporteurs de glucose génèrent constitutivement un signal, même en absence de substrat, mettant en évidence le découplage entre l'activité de transport et la fonction de signalisation de ces récepteurs (Ozcan et coll. 1996). D'autres mécanismes sont également envisagés : des études réalisées chez la levure proposent que des récepteurs aient pu évoluer, à partir de protéines de liaison du glucose, tels que des transporteurs ou des kinases, pour spécifier l'information du statut nutritionnel de l'environnement de la levure (Rolland et coll. 2002a) (Figure1). Toujours en ce qui concerne les sucres, il a été montré, dans les cellules hépatiques, que le transporteur membranaire GLUT2 détecte le glucose et active, par sa large boucle intracytoplasmique, des voies de signalisation induisant la transcription de gènes indépendamment du métabolisme du glucose (Guillemain et coll. 2000). De plus, il a été montré que la perte de la détection des sucres par GLUT2 affectait l'homéostasie glucidique chez la souris (Stolarczyk et coll. 2007).



**Figure 1: Mécanismes potentiels de la détection du glucose chez la levure.**

Le glucose peut être détecté par des récepteurs spécifiques du glucose dans la membrane plasmique (a), par un transporteur actif de glucose (b) ou un transporteur homologue qui a évolué en détecteur de glucose (c). Si le mécanisme de détection du glucose est dépendant du métabolisme, le détecteur peut être un homologue d'une kinase d'hexose, qui a évolué en protéine régulatrice à faible ou sans activité catalytique (d) ou une enzyme active phosphorylant le glucose pour laquelle les fonctions catalytiques et régulatrices sont très liées (e). Enfin, le signal glucose peut être un messenger métabolique (f), le glucose-6-phosphate ou un métabolite en aval (d'après (Rolland et coll. 2002a)).

La majorité des études concernant les mécanismes de signalisation de "l'état d'abondance" en nutriments chez les mammifères a été menée sur le système nerveux central, le foie et le tissu adipeux. Cependant, un autre organe, l'intestin, qui est le premier à faire face aux produits résultant de la digestion des aliments, doit être pris en considération. C'est l'intestin qui assure l'absorption des nutriments, c'est à dire leur transfert de la lumière intestinale vers le milieu intérieur et la circulation, où ils seront alors disponibles pour les différents organes. Cette fonction, indispensable à l'organisme, est assurée par les entérocytes, cellules hautement polarisées, représentant la population majoritaire de l'épithélium intestinal. Ces cellules seraient donc des acteurs importants du maintien de l'homéostasie énergétique par la capacité qu'elles auraient à détecter la

présence de nutriments dans la lumière intestinale et à mettre en place les événements intracellulaires pour assurer au mieux leur absorption et leur transfert à l'organisme.

### **Cadre du travail**

L'équipe au sein de laquelle j'ai réalisé mon travail de thèse s'intéresse au transfert trans-épithélial des lipides alimentaires par les entérocytes, et aux mécanismes de contrôle de cette fonction par lesquels les entérocytes participent à l'homéostasie énergétique ou à ses dérèglements dans les pathologies métaboliques (diabète, obésité, dyslipidémies).

Dans le cadre du transfert des lipides alimentaires, qui résulte d'un processus intracellulaire complexe, je me suis particulièrement intéressé aux événements précoces conditionnant cette fonction entérocytaire, à savoir la détection luminale des lipides alimentaires et les voies de signalisation et les événements cellulaires qui en découlent.

Pour mieux comprendre les systèmes de détection et de signalisation, il est nécessaire de bien connaître le contexte dans lequel se produisent ces événements. Pour cela, savoir quel est l'environnement, le type cellulaire concerné, l'architecture intra-cellulaire et les fonctions métaboliques des cellules est un prérequis indispensable. C'est pourquoi, dans la partie introductive, je rappellerai les caractéristiques des cellules de l'épithélium intestinal et ce qui est connu de leurs fonctions respectives, puis je ferai le point sur les données actuelles concernant les processus de digestion des lipides au niveau intestinal et sur les étapes entérocytaires conduisant à l'assemblage et à la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides : les chylomicrons.

Enfin, je rapporterai les connaissances sur la détection des lipides alimentaires. Nous verrons que les données sont beaucoup moins avancées qu'en ce qui concerne les sucres. De plus, les lipides concernés ont été essentiellement étudiés individuellement. Il en ressort que l'une des originalités de notre approche sur l'étude de la détection des lipides alimentaires par l'entérocyte a été la prise en compte du mode physiologique de l'apport des lipides alimentaires dans la lumière intestinale sous la forme d'une structure lipidique complexe: la micelle.

# **INTRODUCTION**

# Chapitre I. Le métabolisme lipidique intestinal

Après un repas, les molécules complexes issues de l'alimentation sont hydrolysées en unités absorbables au cours de la digestion, qui s'effectue dès la bouche puis au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle. Les nutriments résultant de la digestion passent de la lumière intestinale au compartiment lymphatique ou sanguin à travers la muqueuse intestinale, au niveau des entérocytes. Ce transfert transépithélial est accompagné de réactions complexes, notamment en ce qui concerne l'absorption des lipides.

## I.1 Structure et fonction de l'intestin grêle

### I.1.1 Anatomie de l'intestin grêle humain

L'intestin grêle humain mesure de 7 à 9 mètres. Il s'étend du pylore au colon et comprend trois parties distinctes, le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Figure 2).

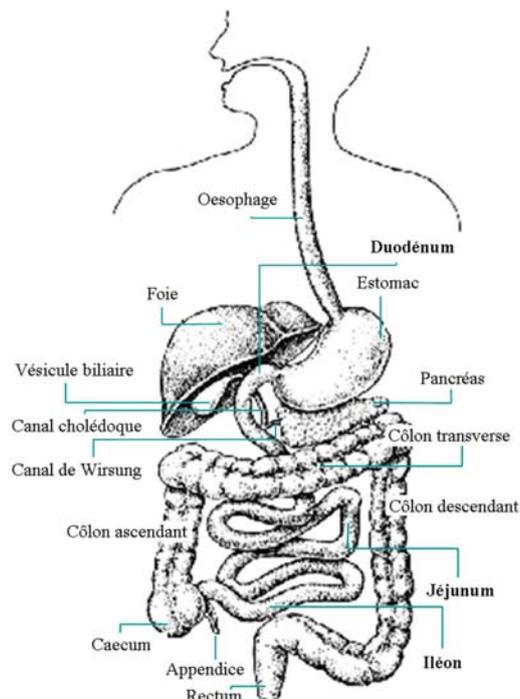
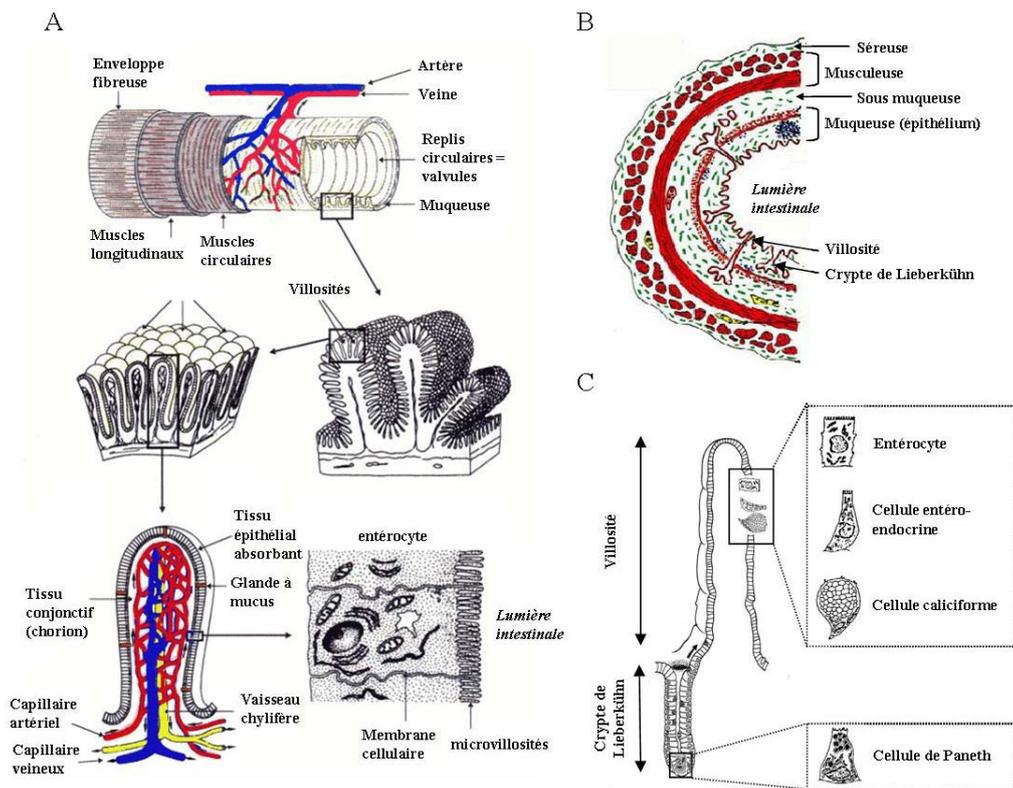


Figure 2 : Anatomie du système digestif

Le duodénum, qui correspond au segment supérieur de l'intestin grêle, est un segment de trajet horizontal formant un angle droit descendant dans lequel débouchent le canal cholédoque, qui vient du foie, et le canal de Wirsung, issu du pancréas. Le jéjunum, où se fait la majorité de l'absorption des nutriments, fait suite au duodénum et représente 2/5 de l'intestin grêle tandis que les 3/5 restants constituent l'iléon.

La capacité d'absorption de l'intestin grêle est très importante, notamment grâce (1) à sa longueur, (2) à la surface de sa paroi formée de replis circulaires macroscopiques, les valvules conniventes, (3) aux nombreuses évaginations de la muqueuse, hautes de 0,5 à 1 mm, les villosités intestinales, et enfin (4) à la multitude des microvillosités présentes à la surface des entérocytes. (Figure 3A)



**Figure 3 : Structure de l'épithélium intestinal**  
(A: anatomie, B: coupe transversale, C: les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal)

La paroi de l'intestin grêle se compose de la muqueuse, de la sous-muqueuse, de la musculature et de la séreuse (Figure 3B). Les villosités présentes au niveau de la muqueuse intestinale sont très longues dans le duodénum ; leur taille diminue graduellement le long

de l'intestin grêle et elles sont quasiment absentes dans le colon où a lieu principalement la réabsorption des électrolytes. L'intérieur des villosités renferme, dans un tissu conjonctif lâche appelé chorion, un réseau de capillaires sanguins et lymphatiques (vaisseaux chylifères) permettant le transfert des nutriments absorbés vers le milieu intérieur (Figure 3A). Les cryptes de Lieberkühn s'ouvrent dans la lumière intestinale entre les villosités (Figure 3B et C). Au niveau de ces cryptes, les cellules se divisent continuellement et assurent le renouvellement de l'épithélium intestinal, processus qui se déroule en 5 à 7 jours chez l'Homme (3-4 jours chez la souris).

## I.1.2 L'épithélium intestinal

### I.1.2.1 Les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est composé d'une monocouche de cellules comprenant quatre types cellulaires: les cellules de Paneth, qui se différencient en migrant au fond de la crypte, les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les entérocytes qui se différencient en migrant le long de la villosité (Figure 3C). Les cellules de Paneth, situées au fond des cryptes, ont une fonction défensive et secrètent des peptides anti-microbiens. Elles se distinguent par leurs granules apicaux éosinophiles proéminents (Cunliffe and Mahida 2004). Les cellules caliciformes, ou cellules à mucus, produisent les mucines lubrifiant le contenu intestinal et protégeant l'épithélium contre les enzymes intraluminales.

Les cellules entéroendocrines représentent environ 1% des cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal.

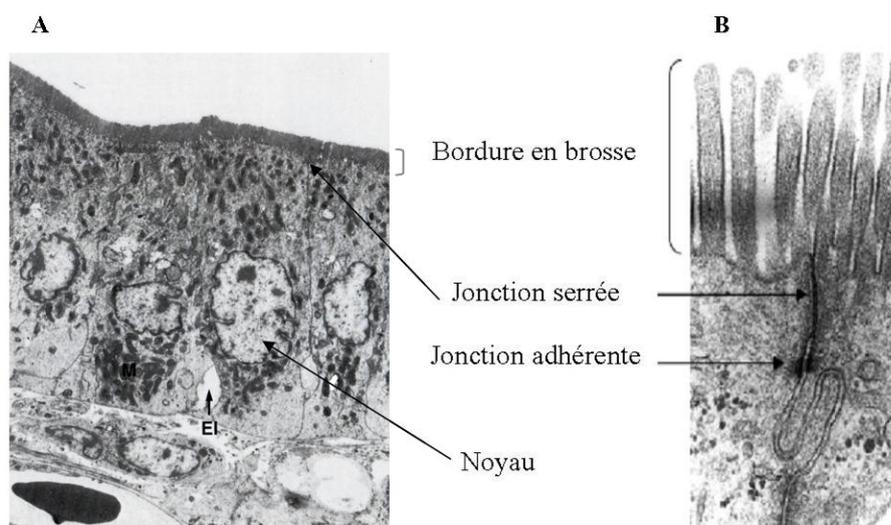
Type cellulaire	Peptide
EC	sérotonine
S	sécrétine
CCK (I)	cholécystokinine
GIP (K)	gastric inhibitory polypeptide
MO	motiline
D	somatostatine
L	glucagon-like peptide
N	neurotensine
EC <sub>1</sub>	substance P

**Table 1: Les différents types de cellules entéroendocrines et les peptides sécrétés**

Ces cellules sont dispersées dans l'épithélium intestinal et sont généralement plus étroites que les cellules absorbantes. Elles contiennent des granules de sécrétion, dont le contenu varie en fonction du type de cellules entéroendocrines. Il existe, au niveau gastrique et intestinal, une quinzaine de types de cellules entéroendocrines sécrétant une trentaine de polypeptides régulateurs aux effets paracrines ou endocrines. Ces molécules sont en fait les précurseurs actifs de plus d'une centaine de peptides hormonaux différents sécrétés par les cellules endocrines de l'intestin, conférant à celui-ci le statut de plus gros organe endocrine de l'organisme (Table 1).

Les entérocytes représentent la majorité (90%) des cellules de l'épithélium intestinal. Ils assurent l'absorption, le métabolisme et le transport des produits issus de la digestion, de la lumière intestinale vers le milieu intérieur et la circulation. Les jonctions serrées entre les entérocytes assurent l'étanchéité de l'épithélium et délimitent deux domaines distincts, tant sur le plan structural que fonctionnel. Chaque entérocyte présente au pôle apical, en contact avec la lumière intestinale, une membrane microvillositaire structurée par des filaments d'actine, la bordure en brosse, et au pôle basolatéral, une membrane plasmique qui fait face au milieu intérieur.

Face à la lumière intestinale, la membrane apicale contient les systèmes de digestion et d'absorption permettant l'entrée des nutriments dans la cellule. La membrane basolatérale contient l'équipement protéique nécessaire à leur sécrétion et à la réception des signaux neuro-hormonaux et nutritionnels de l'organisme (Figure 4).



**Figure 4: Structure d'entérocytes (A) et de leur domaine apical (B)**

Noter les espaces intercellulaires (EI) à la base des entérocytes, par lesquels sont sécrétés les chylomicrons qui se dirigent vers les chylifères centraux.

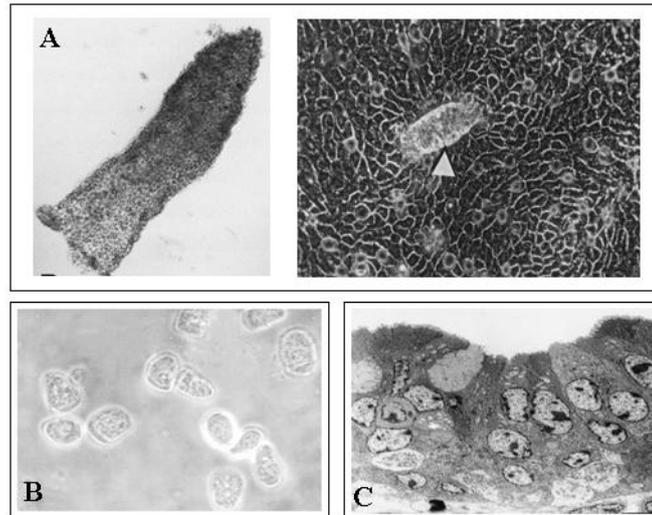
### ***1.1.2.2 Les modèles de cellules entérocytaires***

Afin de pouvoir décrypter les mécanismes qui gouvernent les fonctions spécifiques des entérocytes, de nombreuses tentatives ont eu pour but l'obtention de modèles de cellules intestinales les plus proches possible de la situation normale *in vivo* (Figure 5).

Une méthode d'isolement d'entérocytes de porc utilisant un traitement de l'intestin à la pronase et à la collagénase a permis d'obtenir des entérocytes isolés qui peuvent être mis en culture et conservent des propriétés métaboliques pendant 2 à 3 heures (Bader et coll. 2000). Il est à noter que les entérocytes isolés par cette méthode ont perdu leur polarité, alors qu'isolés dans les mêmes conditions les hépatocytes maintiennent leurs fonctions pendant une dizaine de jours.

Toujours à partir d'intestin de porc, des explants ont été mis en culture. Ceux-ci perdent en moins de 3 heures certaines de leurs caractéristiques fonctionnelles et en moins de 5 heures leurs caractéristiques morphologiques (Danielsen et coll. 1991).

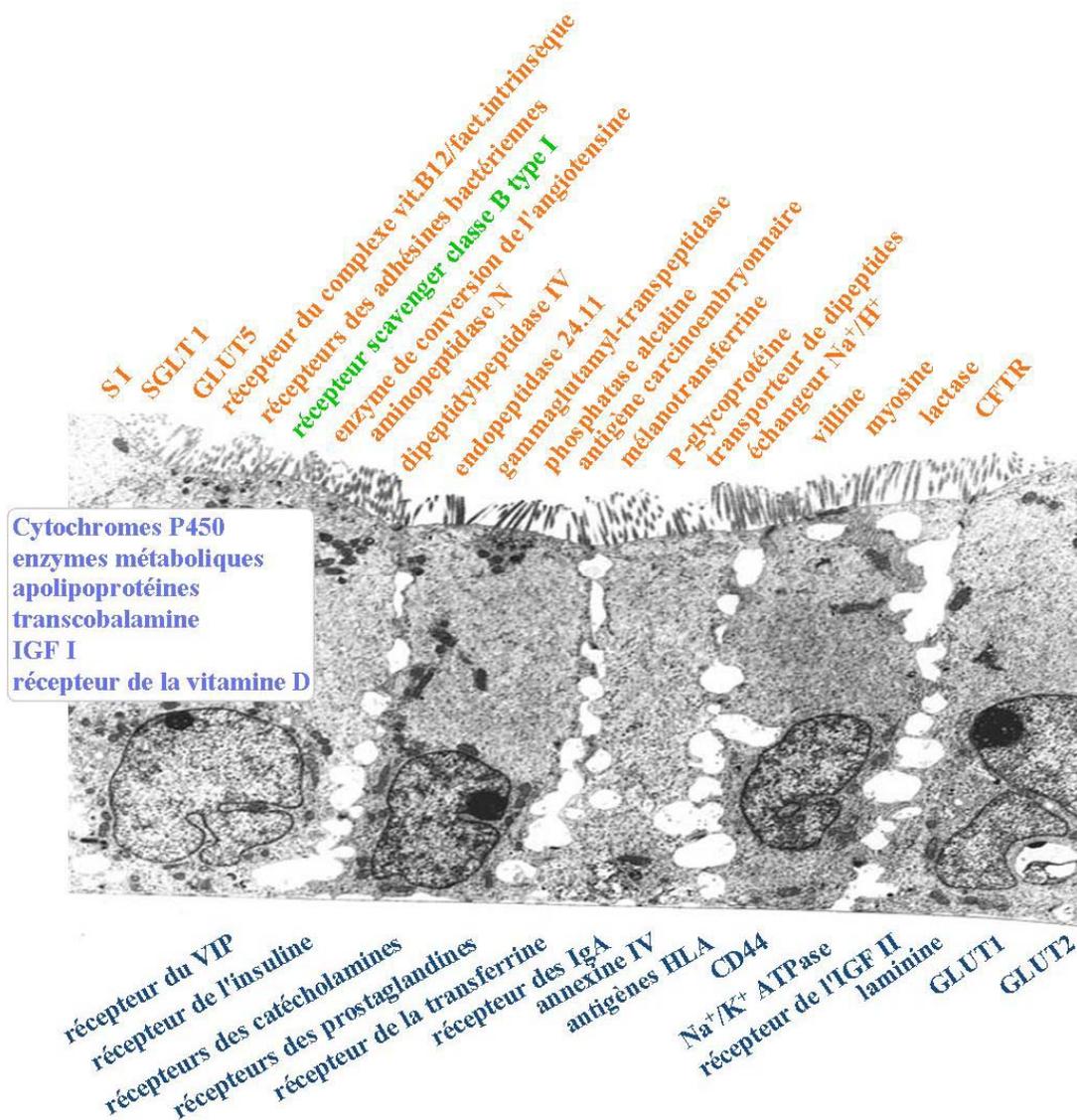
Enfin, un modèle intéressant a été généré à partir d'intestin de fœtus humain. L'utilisation de MatriSpense® (solution non enzymatique) a permis l'isolement de cellules épithéliales de villosités intestinales qui maintiennent des caractéristiques de cellules entérocytaires différenciées pendant 5 à 7 jours en culture (Perreault and Beaulieu 1998). Cependant, cette méthode, qui consiste à dissocier l'épithélium et la lame basale, se révèle inopérante à partir de tissu adulte. En effet, des études réalisées sur du tissu murin ont permis de mettre en évidence que la dissociation des jonctions cellules/matrice extracellulaire induit une apoptose extrêmement rapide (15 min) (Fouquet et coll. 2004). La nécessité d'avoir accès à de l'intestin fœtal limite donc la possibilité d'utiliser couramment ce type de primo-culture et ne permet pas l'analyse de fonctions ne s'exprimant qu'au niveau de l'intestin adulte, ce qui est le cas, entre autres, pour les fonctions liées à l'absorption des nutriments après le sevrage.



**Figure 5: Modèles de cellules épithéliales intestinales normales**

A : Cellules de villosités isolées à partir de fœtus humain par le MatriSpense®. A gauche : épithélium villositaire détaché. A droite : aspect, après 12 jours de culture, des cellules mises en culture à partir du feuillet épithélial détaché. La flèche montre le reliquat du fragment d'épithélium originel au dessus de la monocouche de cellules épithéliales qui se sont développées à partir de ce fragment (d'après (Perreault and Beaulieu 1998)). B : entérocytes isolés de porc en survie (d'après (Bader et coll. 2000)). C : explants d'intestins de Porc (d'après (Danielsen et coll. 1991)).

La lignée cellulaire Caco-2, établie à partir d'un adénocarcinome colique humain, présente des caractéristiques de différenciation de cellules entérocytaires (Zweibaum 1986). En 1983, il a été rapporté que les cellules Caco-2 cultivées dans des conditions de culture standard s'organisaient spontanément en une monocouche de cellules polarisées (Pinto 1983). Ces cellules présentent des jonctions serrées, un noyau en position basale et des microvillosités apicales organisées en bordure en brosse. Au niveau de cette bordure en brosse sont exprimées des hydrolases telles que la saccharase-isomaltase, la lactase, l'aminopeptidase N, la dipeptidylpeptidase IV ou la phosphatase alcaline (Figure 6), normalement associées aux microvillosités des entérocytes (Kenny and Maroux 1982). De plus, la différenciation entérocytaire des cellules Caco-2 est liée à leur croissance : les cellules sont indifférenciées en phase exponentielle de croissance ; la confluence une fois atteinte, les cellules arrêtent progressivement de se diviser et commencent à exprimer des caractéristiques de différenciation entérocytaire. En phase stationnaire, elles forment une monocouche de cellules totalement différenciées. La mise en place du phénotype entérocytaire dans les cellules en culture, en relation avec la phase de croissance cellulaire, est à rapprocher du processus de différenciation associé à l'arrêt des divisions dans les cryptes et à la migration des cellules le long de l'axe crypto-villositaire dans l'intestin grêle.



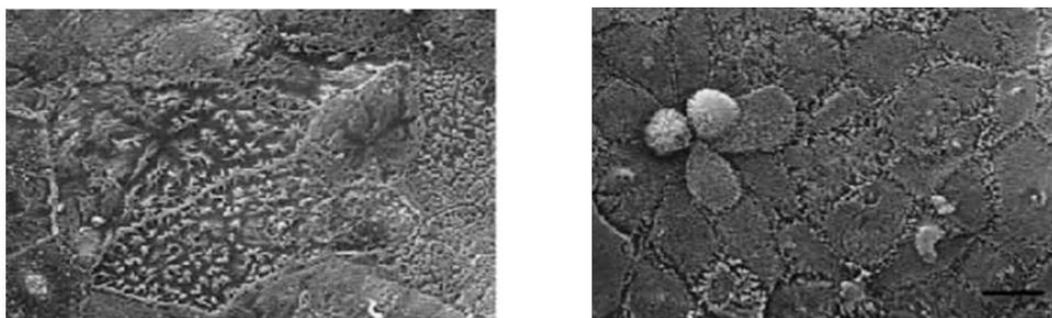
**Figure 6 : Protéines exprimées par des cellules Caco-2 différenciées.**

Les protéines exprimées au pôle apical sont indiquées en orange, les protéines intracellulaires, en bleu clair et en bleu foncé les protéines du pôle basolatéral.

Le nombre de marqueurs spécifiques des cellules entérocytaires, de même que l'activité des hydrolases exprimées dans les cellules Caco-2, atteignent des niveaux proches de ceux observés dans l'intestin grêle adulte (Rousset 1986). Ceci explique le fait que de très nombreuses études nécessitant l'utilisation d'entérocytes différenciés en culture aient été réalisées sur les cellules Caco-2, dans la mesure où il n'existe pour le moment aucune lignée de cellules intestinales normales différenciables *in vitro* (Delie and Rubas 1997).

La culture de la lignée cellulaire Caco-2 a permis d'observer, au cours des passages, une augmentation de l'activité d'hydrolases spécifiques de l'intestin. La saccharase-isomaltase (SI), par exemple, voit à post-confluence son activité multipliée par 7 entre le

passage 29 et le passage 198. Ces données ont conduit au clonage de la lignée parentale à ces deux passages. Parmi les différents clones obtenus, l'un d'entre eux, Caco-2/TC7, représente une population de cellules entérocytaires plus homogènes morphologiquement et s'est avéré avoir des caractéristiques fonctionnelles encore plus marquées que la population parentale (Chantret et coll. 1994 ; Zucco et coll. 2005) (Figure 7).



**Figure 7: La lignée Caco-2 (à gauche) et son clone Caco-2/TC7 (à droite).**  
Photos de la surface apicale en microscopie à balayage. Noter la plus grande homogénéité de la bordure en brosse des cellules Caco-2/TC7 (Chantret et coll. 1994).

La culture sur filtre des cellules Caco-2/TC7 a permis de se rapprocher encore plus de l'asymétrie *in vivo* de l'environnement des entérocytes entre compartiment apical et compartiment basal, correspondant respectivement à la lumière intestinale et au compartiment plasmatique. En particulier, le milieu de culture n'est supplémenté en sérum que dans le compartiment basal après la confluence cellulaire, et les nutriments sont apportés dans le milieu apical sous leur forme physiologique, par exemple, comme nous le verrons dans les études effectuées au cours de cette thèse, sous forme de micelles en ce qui concerne le cas particulier des lipides alimentaires (Morel et coll. 2004).

## **I.2 Digestion des lipides alimentaires**

### **I.2.1 Généralités sur la digestion des nutriments**

La digestion intestinale est mécanique, les contractions des fibres lisses assurant la progression des nutriments le long de l'intestin, et chimique par l'action conjuguée des sécrétions gastriques, pancréatiques et biliaires.

L'activité motrice intrinsèque de l'intestin grêle favorise le transfert des aliments venant de l'estomac et permet l'acheminement des résidus du repas précédent dans le côlon

tout en empêchant la stagnation et la prolifération bactérienne. L'intestin grêle reste donc en activité même à l'état de jeûne. Au cours des repas, ce cycle s'interrompt et la motilité de l'intestin grêle est caractérisée par des contractions irrégulières en période post-prandiale. La motilité associée à l'activité post-prandiale favorise le brassage des nutriments présents dans la lumière intestinale avec les sucs digestifs gastriques, pancréatiques et biliaires et leur présentation à la surface absorbante de la bordure en brosse des entérocytes (Ganong 1999).

Le duodénum reçoit le chyme gastrique, imprégné des enzymes salivaires et stomacales. Ce chyme est formé par un brassage important des aliments, des liquides et des sécrétions stomacales grâce aux contractions péristaltiques des muscles lisses de la paroi stomacale une demi-heure après la prise d'aliments. Les sécrétions stomacales se composent d'enzymes, comme la pepsine et d'acide chlorhydrique, qui facilite la lyse des macromolécules en molécules plus simples et qui joue également un rôle d'antiseptique.

La bile est déversée (environ 700 ml par jour) de la vésicule biliaire dans le duodénum *via* le canal cholédoque. La bile contient de l'eau, des sels minéraux, du mucus, des phospholipides, du cholestérol, des pigments biliaires (dont la biliverdine et la bilirubine, provenant toutes deux de la dégradation de l'hémoglobine par le foie) et des sels biliaires. Dans le foie, environ 0,6 g d'acides biliaires (essentiellement l'acide cholique et chénodesoxycholique) sont produits quotidiennement à partir du cholestérol. Cette production vient s'ajouter au pool d'acides biliaires (3 g au total). Ces acides biliaires sont soumis 6 à 10 fois par jour au cycle d'absorption passive dans le jéjunum, puis d'absorption active dans l'iléon au cours du cycle entéro-hépatique. A chaque cycle, environ 96% des acides biliaires sont absorbés par ces mécanismes, le reste étant excrété dans les selles. Les acides biliaires retournent au foie par la veine porte et sont secrétés à nouveau.

Les sucs pancréatiques se déversent également dans le duodénum. Ils contiennent plusieurs enzymes qui finissent de dégrader les particules alimentaires: la trypsine, entre autres, fragmente les protéines, l'amylase pancréatique termine la transformation des glucides et la lipase digère les lipides.

La muqueuse duodénale sécrète du mucus et des bicarbonates, dont le rôle est de protéger la muqueuse et de neutraliser le pH. Les sucs digestifs contiennent diverses enzymes (lipases, disaccharidases, aminopeptidases, ribonucléases) de l'eau, des sels minéraux et du mucus (pH 8-9). La cholécystokinine (CCK), hormone sécrétée par des cellules entéroendocrines du duodénum, induit la sécrétion par le pancréas de la lipase pancréatique, et la contraction de la vésicule biliaire qui permet la sécrétion de la bile.

Les aliments sont ainsi dégradés en nutriments ou métabolites pouvant franchir la barrière intestinale et passer dans la circulation sanguine et lymphatique. Les résidus non digérés chemineront dans la lumière intestinale et subiront d'autres transformations au niveau du colon (participation du microbiote digestif) pour finalement constituer les fèces (Ganong 1999).

## I.2.2 Transformation intra-luminale des lipides alimentaires

Les lipides alimentaires constituent une source calorique importante dans le régime occidental (30-40% de l'apport calorique ou 90-100 g par jour). Les triglycérides (TG) représentent la majorité (97%) des lipides alimentaires absorbés chez l'Homme. En conditions physiologiques, le système digestif peut digérer et absorber les TG à 95%. Une perte fécale des lipides alimentaires supérieure à 5%, i.e. la stéatorrhée, indique un état de malabsorption (Ganong 1999). L'intestin grêle humain reçoit quotidiennement d'autres lipides tels que les phospholipides (PL) et le cholestérol, constituants de la bile (Figure 8). Les phospholipides de la bile sont l'essentiel des phospholipides de la lumière intestinale. Ainsi, 11 à 20 g de phospholipides biliaires arrivent quotidiennement dans la lumière intestinale tandis que l'apport alimentaire n'est que de 1 à 2 g (Northfield and Hofmann 1975). Le cholestérol que l'on trouve dans la lumière intestinale a deux origines: l'alimentation et la production hépatique, excrétée *via* les voies biliaires rejoignant le cycle entéro-hépatique précédemment décrit. Chez l'Homme, sous régime occidental, sur les 1,2 à 1,7 g de cholestérol entrant quotidiennement dans la lumière intestinale, seuls 300 à 500 mg sont d'origine alimentaire. Les mécanismes d'absorption ne distinguent pas l'origine de ces deux sources de cholestérol. En moyenne, un individu n'absorbe journalièrement que 50% du cholestérol total présent dans la lumière intestinale (Turley and Dietschy 2003).

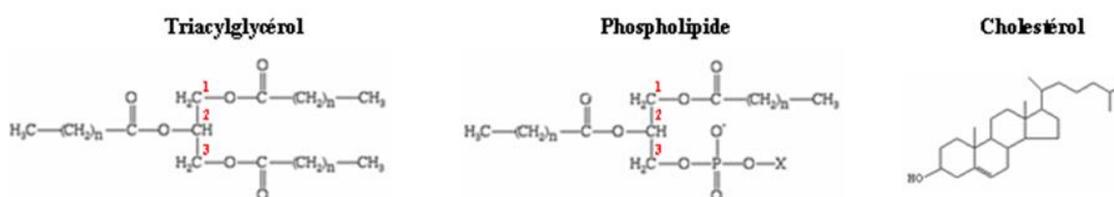
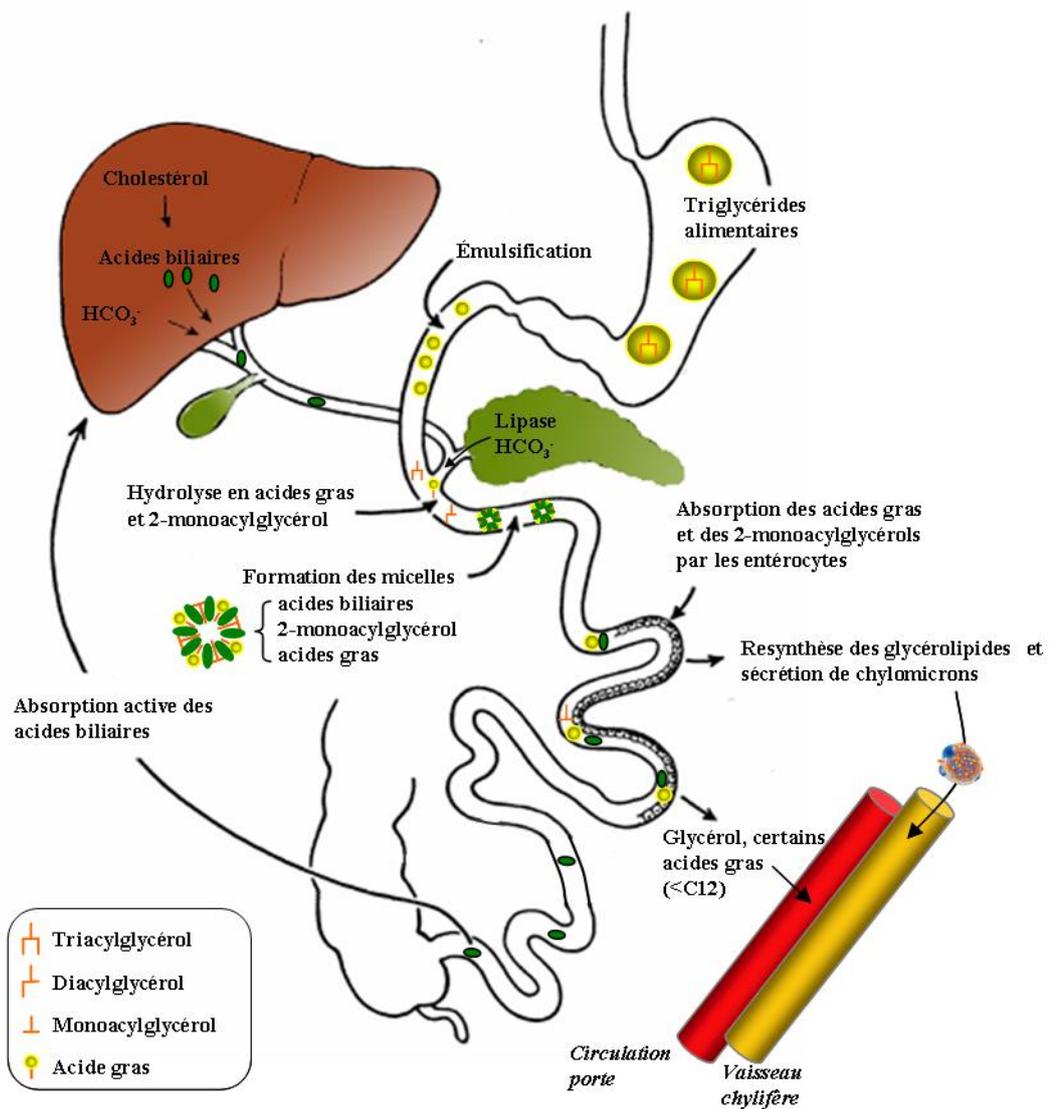


Figure 8: Structure des lipides alimentaires.

Les triglycérides sont des molécules complexes, qui doivent être hydrolysées pour traverser l'épithélium intestinal. A l'entrée de l'intestin grêle, 70% des lipides alimentaires sont encore sous forme de triglycérides non hydrolysés. L'hydrolyse des lipides commence

dès le début du système digestif par l'action de la lipase linguale (qui contribue au maximum à 30 % d'hydrolyse des lipides alimentaires) et de la lipase gastrique puis de la lipase pancréatique (contribution majeure). La lipase gastrique hydrolyse les fonctions esters des acides gras. Les diacylglycérols et acides gras résultant de l'action de la lipase gastrique ainsi que les phospholipides présents dans l'alimentation forment une émulsion dans l'estomac. L'émulsion arrivant dans la lumière du duodénum est constituée de toutes petites gouttelettes de moins de 0,5 µm de diamètre (Hernell et coll. 1990; Mu and Hoy 2004) (Figure 9).



**Figure 9 : Principales étapes de la digestion et de l'absorption des lipides alimentaires** (d'après (Wilson and Dietschy 1971))

La digestion des lipides se poursuit sous l'action conjointe de la bile et de la lipase pancréatique qui se déversent dans le duodénum. L'action détergente des sels biliaires permet la solubilisation des lipides qui passent d'une émulsion à une forme micellaire, rendant ainsi les triglycérides accessibles pour l'hydrolyse par la lipase pancréatique. Cette enzyme n'agit qu'à l'interface lipide/eau et ne peut être fonctionnelle en présence de sels biliaires, inhibant son activité lipase, qu'en interaction avec la colipase (Borgstrom 1975; Crandall and Lowe 2001).

La majorité des TG, constitués d'un squelette glycérol acylé avec trois acides gras, sont hydrolysés par la lipase pancréatique en position sn-1 et sn-3 (Figure 8). Cette réaction libère du 2-monoacylglycérol (2-MG) et des acides gras (AG). Les acides gras (AG) principaux sont le palmitate (16:0), le stéarate (18:0), l'oléate (18:1) et le linoléate (18:2).

La digestion des phospholipides (PL) a lieu dans l'intestin grêle. Dans la bile, les PL (principalement la phosphatidylcholine, PC) sont retrouvés dans des micelles associées au cholestérol et aux sels biliaires. La phospholipase A2 pancréatique, sécrétée sous forme de proenzyme et activée dans l'intestin grêle par clivage trypsique d'un heptapeptide en position N-terminale, est la seule phospholipase importante dans la digestion chez les animaux. Elle est activée en présence de sels biliaires et hydrolyse la PC en position sn-2 (Figure 8) ce qui produit de la lysophosphatidylcholine (LPC) et un AG (Borgstrom et coll. 1957; Ganong 1999).

Le cholestérol alimentaire est essentiellement sous forme de stérols libres, avec seulement 10-15 % de forme estérifiée. Les esters de cholestérol entrant dans l'intestin grêle doivent être au préalable hydrolysés par la cholestérol estérase, sécrétée par le pancréas, pour que la forme libre puisse être absorbée. Cette enzyme a une très large spécificité et hydrolyse aussi les TG et les phosphoglycérides (Lombardo et coll. 1980). Son activité est augmentée en présence de sels biliaires tels que le cholate de sodium. La cholestérol estérase a une propriété unique d'auto association. En effet, en présence de sels biliaires, l'enzyme s'associe en di- et tétramères ce qui lui permet de conserver son activité en la protégeant de la protéolyse (Meyer 1989).

### I.2.3 La solubilisation micellaire

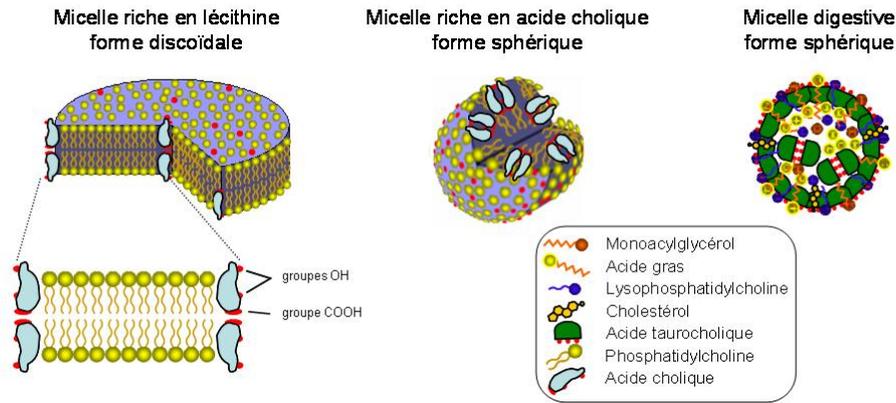
La membrane de la bordure en brosse des entérocytes est séparée du contenu luminal par la couche non agitée, couche d'eau se mélangeant très peu avec le digestat. De ce fait, les molécules solubles accèdent à la bordure en brosse par diffusion à travers la couche aqueuse. Dans le cas des AG et MG, leur solubilité en milieu aqueux étant très faible (de l'ordre de 10  $\mu\text{M}$ ), très peu de molécules peuvent rejoindre la bordure en brosse (Figure 12, flèche 1); la solubilisation des MG et AG sous forme de micelles augmente considérablement le nombre de molécules disponibles pour l'absorption par l'entérocyte (Figure 12, flèche 2). La concentration en acides gras passe d'une concentration de 10  $\mu\text{M}$  dans le milieu aqueux à 10 mM dans la solution micellaire d'acides biliaires (Tso et coll. 2004).

Les deux principaux acides biliaires synthétisés par le foie sont l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique. La conjugaison de ces acides avec la glycine ou la taurine a lieu dans le foie, et les conjugués, l'acide glycocholique et l'acide taurocholique, forment des sels de sodium et de potassium dans la bile hépatique alcaline. Dans le colon, les bactéries transforment l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique, en acides désoxycholique et acide lithocholique respectivement (Figure 10A et B).



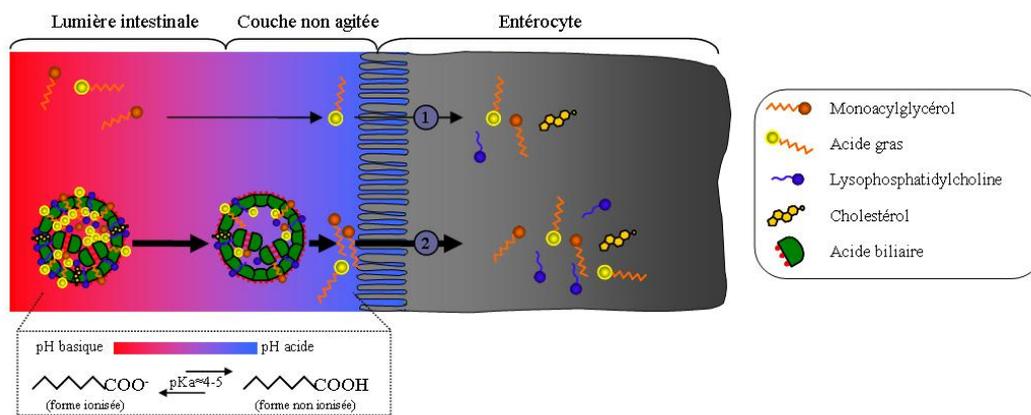
**Figure 10: Les acides biliaires, structure (A) et classification (B)**

Les acides biliaires sont amphipathiques et possèdent à la fois une partie polaire et hydrosoluble tandis que l'autre partie est non polaire et liposoluble (Figure 10A). Les acides biliaires forment des disques cylindriques ou des sphères, les micelles, dont les faces hydrophiles sont tournées vers l'extérieur et les faces hydrophobes vers l'intérieur. Des résultats obtenus par diffusion des rayons X et microscopie électronique à transmission sur des micelles ont montré que leur structure dépend du rapport molaire lécithine (phosphatidylcholine)/sel biliaire (Figure 11) (Mazer et coll. 1980).



**Figure 11 : Modèles moléculaires des micelles en fonction de leurs constituants**  
(d'après (Mazer et coll. 1980))

Le rôle principal des micelles de sels biliaires est de faciliter l'absorption des lipides en maintenant ceux-ci sous forme hydrosoluble, en surmontant la résistance de la couche aqueuse non agitée et en maintenant à une concentration élevée une source locale d'acides gras et de cholestérol. Des pompes à protons, localisées au niveau de la membrane apicale des entérocytes, génèrent dans cette zone un gradient de pH. Quand le pH local devient inférieur au pKa des acides gras à longues chaînes, ces derniers se protonent. Cet événement est à l'origine de la dissociation micellaire (Shiau et coll. 1985). Bien qu'il existe des protéines intestinales membranaires, telles que FABPpm, FATP4, CD36, (qui seront abordées ultérieurement dans cette introduction) (pour revue (Petit et coll. 2007b)), capables de transporter isolément les lipides, constituants des micelles, de plus en plus de travaux de recherches s'intéressant au captage des lipides montrent que la condition d'apport sous forme de micelles favorise ce captage (pour revue (Tso et coll. 2004)). Il est fort probable que tout ceci soit relativement instable et échangeable et que les micelles se dissocient, se réassocient, et qu'au moins une petite quantité de micelles atteigne la surface cellulaire sous leur forme initiale. (Figure 12).

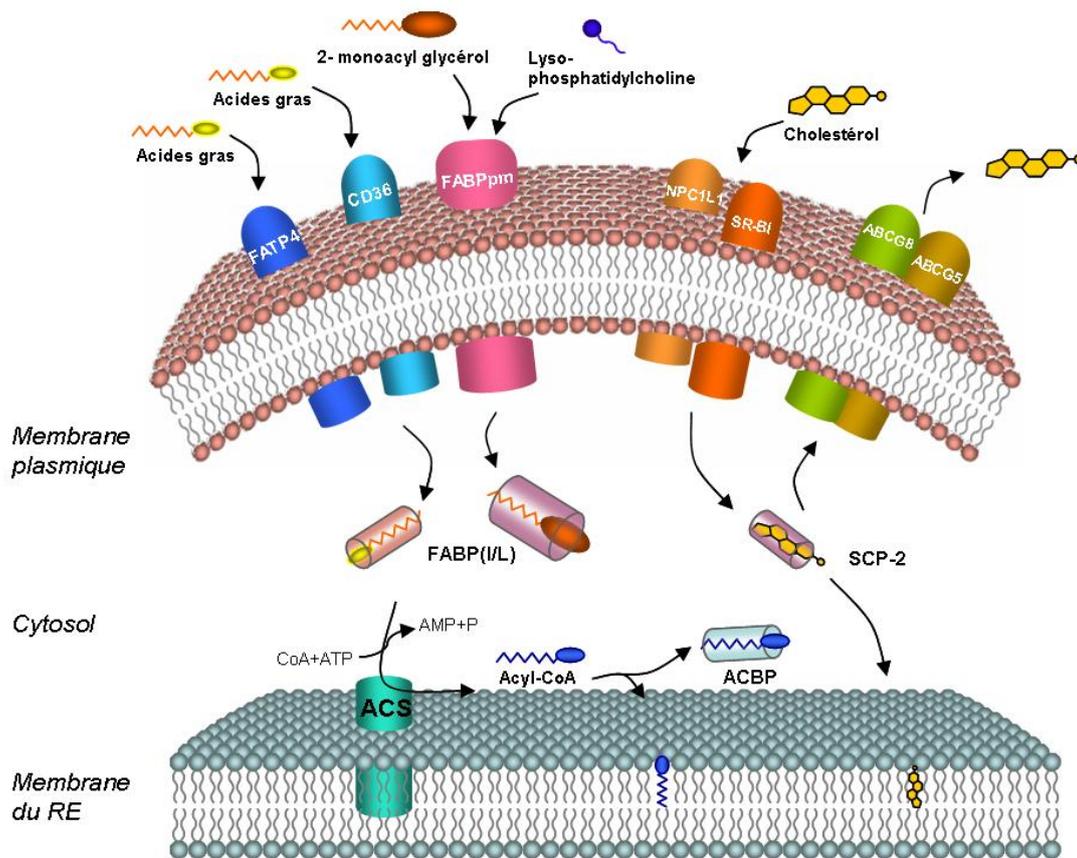


**Figure 12 : Diffusion des lipides à travers la couche non agitée et solubilisation par les acides biliaires.** (adapté de (Nordskog et coll. 2001))

## I.2.4 L'entrée apicale des produits de digestion des lipides dans l'entérocyte

Les lipides entrent dans l'entérocyte soit par diffusion passive, à travers la bicouche phospholipidique de la membrane, soit par un transport facilité.

Les acides gras non-ionisés traversent beaucoup plus rapidement la bicouche phospholipidique, par un mécanisme de flip-flop, que les acides gras ionisés à longues chaînes, et n'auraient donc pas besoin de transporteur pour effectuer leur passage transmembranaire (Kamp et coll. 1995). Cependant, plusieurs travaux indiquent que l'entrée des acides gras dans la cellule se fait par l'un ou l'autre de ces mécanismes en fonction de la concentration en lipides. Ainsi, en faible concentration (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ), le linoléate (Chow and Hollander 1979), comme l'oléate (Murota and Storch 2005), sont absorbés *via* un transporteur tandis qu'à des concentrations plus fortes (de l'ordre du  $\text{mM}$ ), ce ou ces transporteurs peuvent être saturés et les acides gras seront majoritairement absorbés par diffusion passive.



**FATP4:** Fatty Acid Transport Protein 4; **FABPpm:** plasma membrane Fatty Acid Binding Protein; **NPC1L1:** Niemann-Pick C1 like 1 protein; **SR-BI:** Scavenger Receptor class B type I; **ABCG:** ATP-Binding Cassette protein G5 et G8; **FABP(IL):** Fatty Acid Binding Protein (Intestine/Liver); **SCP-2:** Sterol Carrier Protein 2; **ACBP:** Acyl-CoA Binding Protein; **ACS:** Acyl-CoA Synthase

**Figure 13: Les transporteurs de lipides présents dans la membrane apicale des entérocytes et leur relais intracellulaires.**

Des protéines localisées dans la membrane de la bordure en brosse permettent le transport facilité des acides gras, du 2-monoglycéride, du cholestérol et des acides biliaires. La plupart de ces protéines peuvent transporter plusieurs types de ligands. Ces transporteurs membranaires et les relais intracellulaires sont recensés dans la Figure 13. Certains d'entre eux seront présentés en détail dans le chapitre III.

Si la solubilisation micellaire augmente nettement la disponibilité des produits d'hydrolyse des lipides alimentaires au niveau de la bordure en brosse des entérocytes, la forme sous laquelle les lipides entrent dans la cellule épithéliale, c'est à dire la micelle entière ou bien chacun des composants indépendamment, n'est pas bien connue. S'il a été observé que les AG rentrent moins rapidement que les MG dans l'entérocyte (Tso et coll. 2004), d'autres études montrent cependant qu'ils sont en compétition pour être absorbés au niveau de la membrane apicale des cellules Caco-2 (Ho and Storch 2001), suggérant que les acides gras et le MG peuvent traverser la membrane apicale de l'entérocyte *via* un transporteur commun (Murota and Storch 2005).

### **I.3 Les lipoprotéines riches en triglycérides d'origine intestinale**

Contrairement aux monosaccharides et acides aminés, les lipides sont sécrétés dans le milieu intérieur sous forme de molécules complexes, les lipoprotéines. Après re-synthèse intracellulaire, les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol estérifiés sont associés à des apolipoprotéines pour former des lipoprotéines, dont les lipoprotéines intestinales riches en triglycérides, les chylomicrons, qui passeront dans des espaces intercellulaires situés au pôle basal des entérocytes (les espaces de Grünhagen) pour pénétrer dans le chylifère central et aboutir au canal thoracique, court-circuitant ainsi le foie.

#### **I.3.1 Métabolisme intracellulaire des lipides constituant les lipoprotéines riches en triglycérides**

Après le passage de la membrane plasmique apicale, c'est au niveau du réticulum endoplasmique (RE) que vont être adressés les produits d'hydrolyse des triglycérides. En effet, cet organe assure différentes fonctions, notamment la synthèse des phospholipides et du cholestérol pour la production de membranes, ainsi que la synthèse de TG.

### ***1.3.1.1 Métabolisme du cholestérol et des phospholipides***

Chez les vertébrés, le cholestérol existe sous forme de cholestérol libre et sous forme de cholestérol estérifié. Le cholestérol libre est principalement retrouvé dans les membranes où il participe à la fluidité et à la perméabilité membranaire. L'homéostasie du cholestérol dans l'organisme nécessite qu'il soit éliminé. Ceci est réalisé en grande partie sous forme d'acides biliaires produits par le foie ainsi que par desquamation de la muqueuse intestinale et une possible sécrétion dans la lumière intestinale de cholestérol néosynthétisé par l'entérocyte (pour revue (Wang 2007)). Après absorption, le cholestérol libre alimentaire peut être estérifié dans les entérocytes par l'action de l'acyl-coenzymeA cholestérol transférase (ACAT) (Chang et coll. 1993). Deux enzymes, l'ACAT1 et l'ACAT2, produits de deux gènes différents, sont capables d'estérifier le cholestérol. La topologie des ACAT dans la membrane du réticulum endoplasmique indique que l'ACAT1 a son site actif du côté cytosolique, suggérant un rôle de cette enzyme dans la formation du cholestérol estérifié au sein de gouttelettes lipidiques cytosoliques de stockage, structures que l'on observe transitoirement en période post-prandiale dans les entérocytes. L'ACAT2, au contraire, a son site actif à la face luminale du réticulum endoplasmique et serait, d'après les auteurs, à l'origine de la synthèse des esters de cholestérol sécrétés associés aux lipoprotéines (Joyce et coll. 2000). Ce rôle d'ACAT2 a été conforté par les travaux de Buhman et coll., (Buhman et coll. 2000), montrant que les souris ACAT2<sup>-/-</sup> ont un défaut d'absorption et d'estérification du cholestérol par les cellules intestinales, ce qui les rend résistantes à l'hypercholestérolémie induite par l'alimentation. Ces résultats sont en faveur du rôle d'ACAT2 dans la synthèse de cholestérol estérifié pour la formation des chylomicrons.

Les phospholipides, composants majoritaires des membranes, sont apportés par la bile et en moindre quantité par l'alimentation. Le phospholipide majoritairement présent dans l'intestin est la phosphatidylcholine qui est hydrolysée en lysophosphatidylcholine pour être absorbée par l'intestin (Ganong 1999). Des travaux anciens, réalisés sur de la muqueuse intestinale de rat, ont montré que la moitié de la phosphatidylcholine absorbée est hydrolysée en lysophosphatidylcholine puis réacylée pour être incorporée dans les chylomicrons (Scow et coll. 1967) alors que l'autre moitié est totalement hydrolysée, par une lécithinase présente dans la muqueuse intestinale, en AG servant à la re-synthèse des triglycérides et des phospholipides retrouvés dans les chylomicrons (Le Kim and Betzing 1976).

### 1.3.1.2 Re-synthèse des triglycérides

A l'intérieur de la cellule, les produits d'hydrolyse des triglycérides, notamment les acides gras, sont transportés par des protéines cytosoliques, les FABP (Fatty Acid Binding Protein), jusqu'au réticulum endoplasmique. Les TG sont re-synthétisés selon deux voies, la voie de la MGAT (monoacylglycérol acyltransférase) majoritaire dans l'entérocyte et la voie de la GPAT (glycérolphosphate acyltransférase) retrouvée dans tous les tissus (Coleman and Lee 2004) (Figure 14).

L'importance respective de chacune de ces deux voies dans la synthèse de triglycérides dépend de l'apport en 2-monoglycérides. En période d'absorption lipidique, donc en présence de 2-monoglycérides, la voie de la MGAT est prépondérante pour la formation de triglycérides (Mansbach and Parthasarathy 1982). A l'inverse, en période inter-prandiale, la voie du glycérol-3-phosphate, intermédiaire formé au cours de la glycolyse, est majoritaire.

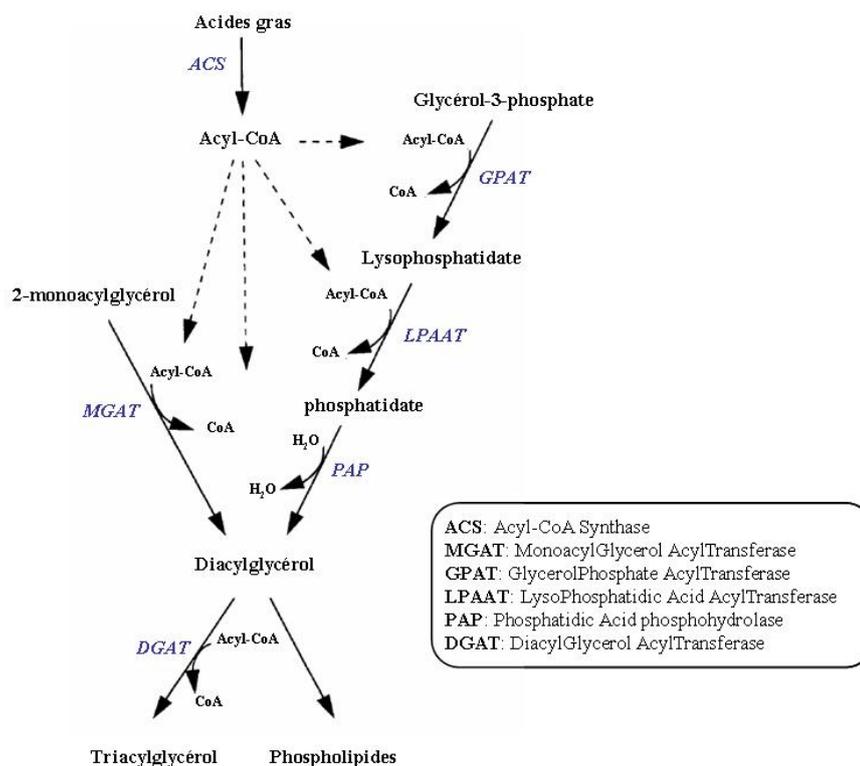


Figure 14: Les deux voies de synthèse des triglycérides dans l'entérocyte.

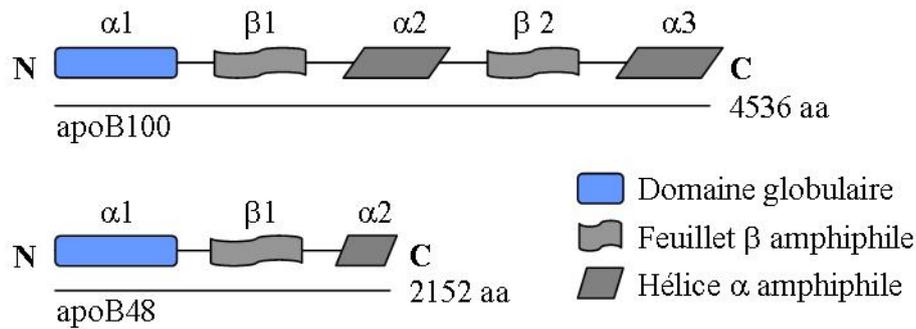
Les TG resynthétisés sont ensuite adressés vers le système sécrétoire (Chateau et coll. 2005) pour être assemblés avec l'apoB et/ou stockés sous forme de gouttelettes lipidiques cytosoliques dont il a été montré qu'elles pouvaient être remobilisées pour la sécrétion (Pauquai et coll. 2006).

La MTP, capable de transférer les lipides d'une membrane à une autre et formant un hétérodimère avec la PDI (protein disulfide isomerase, chaperonne ubiquitaire du RE), est indispensable à la formation de gouttelettes de TG dans la lumière du RE (Shelness and Ledford 2005).

### **I.3.2. L'apolipoprotéine B**

L'apolipoprotéine B est l'apolipoprotéine non échangeable retrouvée associée aux lipoprotéines plasmatiques. Dans le génome humain, il existe un seul gène *apob* d'environ 45 kb. Les protéines apoB48 (forme intestinale) et apoB100 (forme hépatique) sont issues du même ARNm initial. Celui-ci est édité, dans les tissus intestinaux de l'Homme et des rongeurs ainsi que dans le foie des rongeurs, au niveau de la cytidine 6666 substituée par un uracile ("C-to-U editing"). Ceci a pour conséquence l'apparition d'un codon stop, entraînant l'arrêt de la traduction (Davidson and Shelness 2000). Dans l'édition de l'ARNm de l'apoB au niveau intestinal, la protéine apobec-1 (apoB-mRNA editing-catalytic-subunit 1), qui est une cytidine déaminase, est l'élément central de l'édition et fonctionne au sein d'un complexe multiprotéique, appelé éditosome. Ce phénomène d'édition apparaît progressivement au cours du développement embryonnaire. L'intestin foetal humain ne synthétise que de l'apoB100, tandis que dès le troisième trimestre de grossesse, le profil d'édition ressemble à celui de l'adulte, c'est-à-dire 90% d'apoB48 exprimée dans l'intestin (Davidson and Shelness 2000).

La structure de l'apoB48 et de l'apoB100, protéines très hydrophobes, conditionne leur fonction au sein des lipoprotéines. L'apoB100 est ainsi organisée en 5 domaines de la façon suivante : Nter- $\alpha$ 1- $\beta$ 1- $\alpha$ 2- $\beta$ 2- $\alpha$ 3-Cter, et l'apoB48 en 3 domaines : Nter- $\alpha$ 1- $\beta$ 1- $\alpha$ 2-Cter (Figure 15).



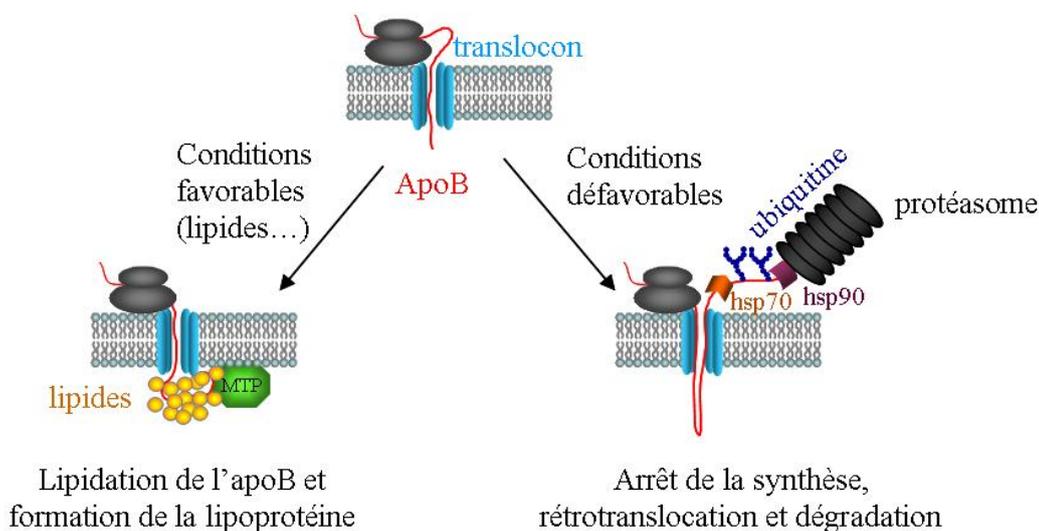
**Figure 15 : Structure des protéines ApoB48 et ApoB100** (d'après (Segrest et coll. 2001))

Les domaines  $\beta$  sont des domaines amphiphiles interagissant directement, au coeur de la lipoprotéine, avec les lipides neutres. Les domaines  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  sont des hélices  $\alpha$ , proches des domaines retrouvés dans les apolipoprotéines échangeables, et sont plutôt localisés en surface de la lipoprotéine. Le domaine  $\alpha 1$  s'organise de manière globulaire, notamment grâce à l'établissement de nombreux ponts disulfures (Segrest et coll. 1998; Segrest et coll. 2001).

De nombreuses études ont mis en évidence un système original à "topologie bitopique" de passage de l'apoB néosynthétisée dans le translocon, c'est à dire que certaines régions de l'apoB sont exposées dans le cytosol et d'autres dans la lumière du RE (Furukawa et coll. 1992; Du et coll. 1998). Ainsi, le polypeptide en cours de synthèse commence à s'accumuler à la fois dans la lumière du RE et dans le cytoplasme (Furukawa et coll. 1992).

L'un des points majeurs dans la régulation de la synthèse et de la maturation de l'apoB au niveau hépatique réside dans le système de dégradation lié à la translocation. La dégradation de l'apoB dépend directement de la teneur cellulaire en lipides. En effet, lorsque les conditions de synthèse et d'assemblage de la lipoprotéine ne sont pas rassemblées, que l'apoB naissante n'est pas correctement stabilisée par une lipidation faisant intervenir la microsomal triglyceride transfer protein (MTP), l'apoB est alors dégradée (Fisher and Ginsberg 2002) (Figure 16). Si la MTP n'est pas présente, l'apoB subit immédiatement une rétrotranslocation (Johnson and Haigh 2000), puis une multi-ubiquitinylation sur sa partie cytoplasmique, pour être dégradée par le protéasome (Yeung et coll. 1996) (Figure 16). Ce phénomène fait intervenir un processus de liaison des chaperonnes cytosoliques hsp70 et hsp90 à l'apoB (Fisher et coll. 1997; Gusarova et coll. 2001). Cette première étape de lipidation de l'apoB conditionnant la quantité d'apoB

disponible pour l'assemblage de la lipoprotéine serait donc régulée par le rapport MTP/hsp70.



**MTP:** Microsomal triglyceride Transfer Protein; **hsp:** Heat Shock Protein

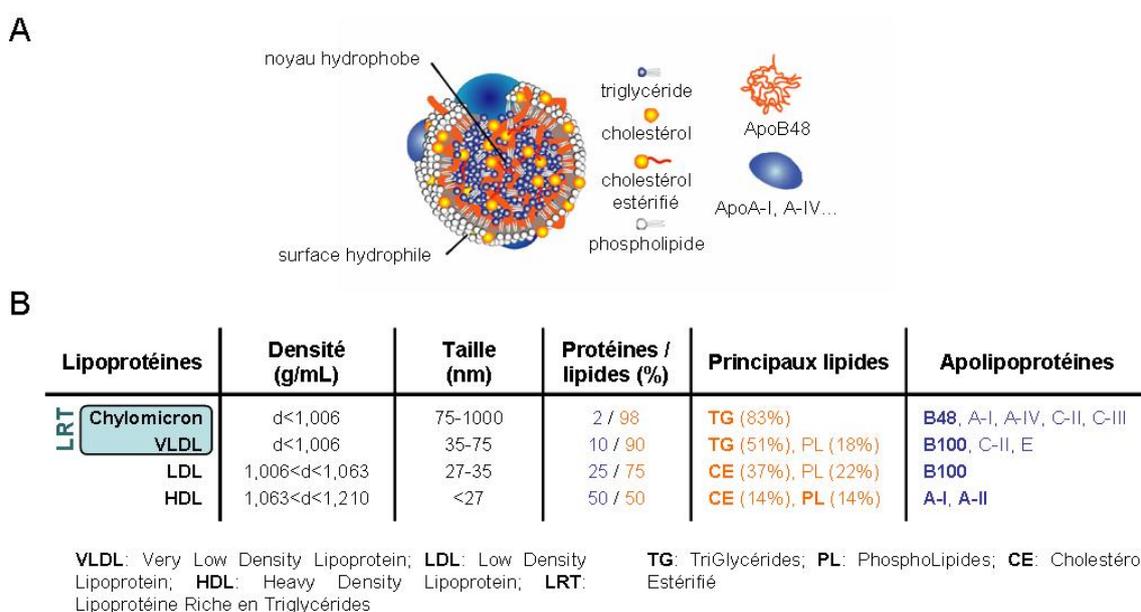
**Figure 16 : Traduction et translocation de l'apoB** (d'après (Fisher and Ginsberg 2002))

La lipidation de l'apoB est d'autre part physiquement liée à sa structuration pendant son passage dans le translocon. Dans les cellules HepG2, il a été montré que cela fait intervenir un certain nombre de protéines chaperonnes résidentes dans le RE telles que la calnexine, la calréticuline, BiP, GRP94, ERp72 et la PDI (Linnik and Herscovitz 1998; Zhang and Herscovitz 2003).

Dans l'intestin, les étapes de dégradation de l'apoB48 par le protéasome ne sont pas prouvées et il semble que les mécanismes soient différents. En effet, si l'apoB100 est dégradée par le protéasome dans les cellules hépatiques HepG2, dans les cellules entérocytaires Caco-2, il n'y a pas de modulation de l'expression de l'apoB48 en réponse aux lipides, ni en terme de régulation génique, ni en terme de dégradation par le protéasome (Liao and Chan 2000). En revanche, dans les entérocytes de hamsters, l'équipe d'Adeli (Haidari et coll. 2002) a montré que l'apoB48 est dégradée *via* le système ubiquitine-protéasome, dégradation qui peut être modulée en fonction de l'état nutritionnel et de l'apport lipidique.

### I.3.3 Formation des lipoprotéines riches en triglycérides

Les lipoprotéines riches en triglycérides (LRT) représentent des assemblages supramoléculaires complexes comprenant : un cœur hydrophobe, composé de triglycérides (TG), de cholestérol, d'esters de cholestérol, recouvert d'une monocouche de phospholipides, et une partie protéique constituée par des apolipoprotéines (apo) (Figure 17A). Les apos associées aux LRT intestinales sont essentiellement l'apoB, indispensable à la structuration et à l'assemblage de la lipoprotéine (Davidson and Shelness 2000), et des apolipoprotéines échangeables, comme les apos AIV, CIII ou A1, dont les rôles sont encore mal caractérisés, mais qui ne sont pas strictement indispensables à l'assemblage des LRT. Les différentes classes de LRT se caractérisent par leur densité, dépendante de l'enrichissement en TG, les chylomicrons (CM, LRT intestinale) étant plus riches en TG que les VLDL (Very low density lipoprotein). Les CM, dont la taille peut varier de 75 à 1000 nm, sont constitués à 98% de lipides (Figure 17B).

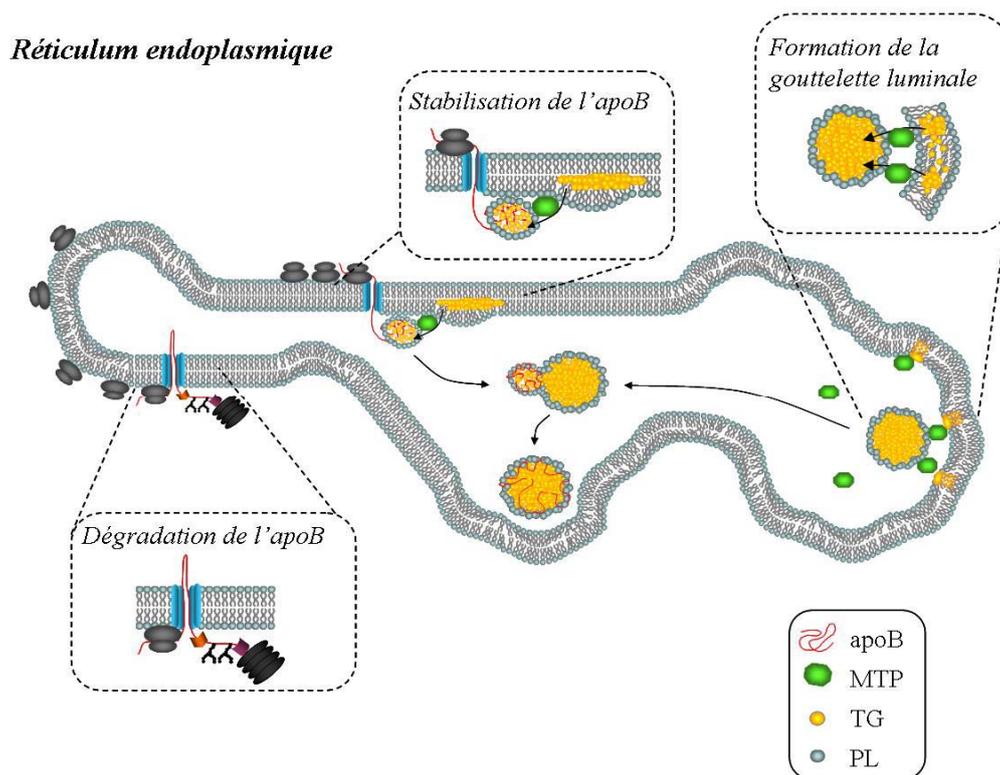


**Figure 17: Structure (A) et composition (B) des lipoprotéines**

Les étapes d'assemblage des lipoprotéines sont principalement décrites au niveau hépatique, pour les VLDL (Olofsson et coll. 2000; Fisher and Ginsberg 2002). Il en ressort un modèle en deux étapes où l'apoB et la MTP, indispensable à l'activité de transfert de lipides, jouent un rôle primordial.

La première étape de formation des VLDL consiste en une lipodation stabilisatrice de l'apoB, durant sa traduction/translocation à travers la membrane du réticulum endoplasmique rugueux, grâce à l'action de la MTP, qui conduit à la formation d'une "prélipoprotéine" (Gordon et coll. 1996). La deuxième étape est réalisée dans le réticulum endoplasmique lisse (REL) où sont synthétisés les lipides et plus particulièrement les triglycérides. La formation de gouttelettes lipidiques de TG dans la lumière du REL puis leur fusion avec la particule d'apoB lipidée/stabilisée donne naissance à une lipoprotéine riche en triglycérides (Figure 18). Si la MTP est indispensable dans l'étape précoce de lipodation de l'apoB ainsi qu'à la formation de la gouttelette lipidique, elle n'est pas essentielle pour la fusion des deux entités (Shelness and Ledford 2005).

Les VLDL, assemblées dans le RE, pourraient encore être lipidées dans l'appareil de Golgi par la MTP. Cette lipodation supplémentaire serait quantitativement très importante lorsque la synthèse de TG est stimulée (Swift et coll. 2003).



**Figure 18: Modèle en deux étapes d'assemblage des VLDL hépatiques**  
(adapté de (Fisher and Ginsberg 2002))

Il existe des spécificités dans la synthèse des lipoprotéines riches en TG intestinales (CM, spécifiquement sécrétés au niveau intestinal et VLDL) vis à vis des VLDL hépatiques, selon plusieurs critères moléculaires et cellulaires. En effet, 1) en période post-

prandiale les AG alimentaires sont apportés en masse au pôle apical des entérocytes sous forme de micelles complexes; au contraire, l'hépatocyte reçoit un apport plus constant d'acides gras plasmatiques au pôle basolatéral, sous forme d'AG non estérifiés complexés à l'albumine et de "remnants" de lipoprotéines, issus de l'hydrolyse des LRT par la lipoprotéine lipase. 2) Les CM et les VLDL intestinales sont assemblés dans les entérocytes à partir de l'apoB48 alors que les VLDL hépatiques sont assemblées à partir de l'apoB100.

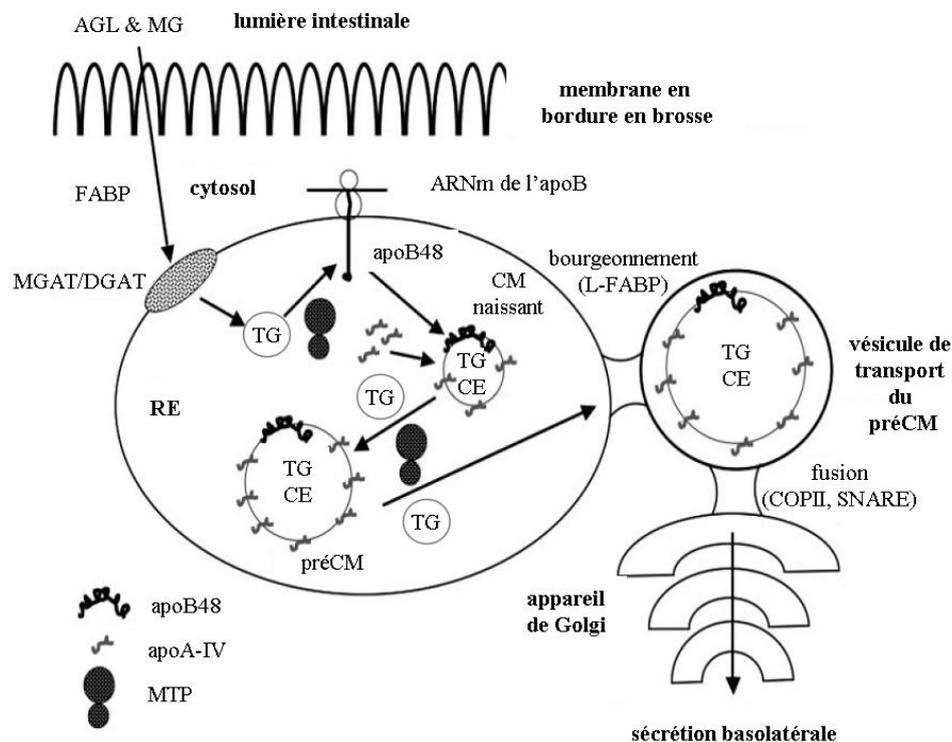
Les travaux réalisés sur l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines intestinales montrent néanmoins que les mécanismes mis en jeu présenteraient des similarités avec le modèle hépatique en deux étapes (Hamilton et coll. 1998; Hussain 2000; Cartwright and Higgins 2001; Hussain et coll. 2005) (Figure 19). Le devenir de la prélipoprotéine, issue de la lipidation de l'apoB par la MTP, semble dépendre des lipides disponibles dans la lumière du RE, eux-mêmes directement proportionnels à l'apport de lipides alimentaires dans la lumière intestinale. L'hypothèse de l'assemblage en deux étapes au niveau entérocytaire a été confortée par les travaux de Hamilton (Hamilton et coll. 1998). En utilisant des souris dont le gène de l'apoB est invalidé dans l'intestin, cette équipe a pu observer la formation de particules lipidiques, de forme et de taille équivalentes à celles des chylomicrons, dans le RE de ces entérocytes n'exprimant pas l'apoB. L'apoB n'est donc pas nécessaire à la formation des gouttelettes de TG mais est indispensable, en revanche, à leur transport du RE vers l'appareil de Golgi. Le point de contrôle le plus important concernerait la formation des gouttelettes riches en TG dans le REL, qui permettrait de contrôler l'assemblage final, la taille et le taux de production des CM (Cartwright et coll. 2000; Cartwright and Higgins 2001).

Des travaux sur l'assemblage des chylomicrons et le trafic de l'apoB en fonction de l'apport de lipides dans des cellules entérocytaires Caco-2 ont été réalisés au laboratoire (Morel et coll. 2004). Les résultats indiquent que la présence de lipides plasmatiques est nécessaire pour que l'apoB, synthétisée dans le RE, soit transportée après maturation, *via* l'appareil de Golgi, jusqu'au niveau de la bordure en brosse des cellules (Morel et coll. 2004). Après un apport apical de micelles comportant des lipides alimentaires, ce stock d'apoB "prêt à l'emploi" est délocalisé du compartiment apical vers la partie basolatérale des cellules, en même temps qu'apparaissent des gouttelettes lipidiques de TG, permettant ainsi la formation de LRT et leur sécrétion (Morel et coll. 2004). Toutefois, le lieu de l'assemblage entre l'apoB et les TG, les deux composants majeurs des LRT, reste posé.

Le transport des lipoprotéines à apoB pose la question de savoir si ces structures, de diamètres allant de 35-75 nm dans le foie à 75-1000 nm dans l'intestin, utilisent le mode de

transport classique de vésicules de tailles bien inférieures, allant de 50 à 80 nm de diamètre. Le transport du RE à l'appareil de Golgi, des TG et de l'apoB48 (Kumar and Mansbach 1999) ainsi que de l'apoB100 hépatique (Gusarova et coll. 2003), est réalisé *via* des vésicules contenant sec13, sec31 et sar1 qui sont des protéines de manteau à COPII (Siddiqi et coll. 2003). Ces protéines de manteau à COPII sont caractéristiques des vésicules du transport RE-appareil de Golgi, qui est le système de transport de la plupart des protéines sécrétées. Cependant ces vésicules contenant l'apoB ne contiennent pas d'albumine ni d'autres protéines devant être sécrétées. L'apoB est donc transportée par un système vésiculaire qui lui est spécifique.

La régulation du transport intestinal des lipides est complexe et le métabolisme glucidique semble interférer avec ce processus. En effet, un environnement pauvre en glucose favorise la sécrétion de CM et l'enrichissement des lipoprotéines en triglycérides (Pauquai et coll. 2006). L'étape de contrôle serait la répartition des triglycérides néosynthétisés, au niveau de la membrane du REL, entre le compartiment cytosolique, dans des gouttelettes de stockage, et la lumière du réticulum endoplasmique, où ils seront alors disponibles pour l'assemblage des LRT et leur sécrétion.



**Figure 19: Synthèse d'apoB48 et assemblage de chylomicrons (CM)**

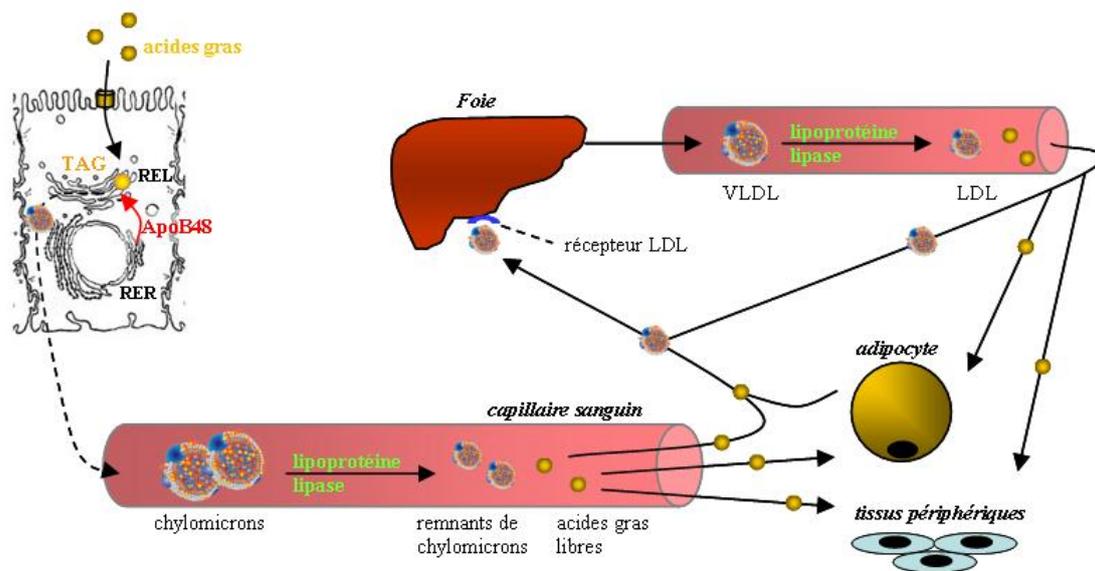
Les acides gras libres (AGL) et les monoglycérides (MG) traversent la membrane en bordure en brosse et sont transloqués au réticulum endoplasmique à l'aide de protéines liant les acides gras (FABP). Les triglycérides (TG) sont resynthétisés par deux enzymes: acyl-CoA: monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) et acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT). L'apoB-48 néosynthétisée est lipidée par la microsomal triglyceride transferase (MTP). Le chylomicron naissant est ensuite lipidé par addition d'un cœur de triglycérides (TG) et d'esters de cholestérol (CE) (d'après (Black 2007))

D'autres apolipoprotéines telle que l'apoA-IV, non essentielles à la structure du chylomicron, peuvent intervenir dans la régulation de l'assemblage des lipoprotéines. En effet, la rétention forcée de l'apoA-IV dans le réticulum endoplasmique séquestre également l'apoB à l'intérieur du réticulum endoplasmique, suggérant que ces deux protéines interagissent dans la voie de sécrétion des chylomicrons (Gallagher et coll. 2004).

Des changements environnementaux, comme il s'en produit au cours du cycle circadien, ont été également impliqués dans les niveaux d'expression et d'activité de la MTP, qui sont corrélés aux niveaux plasmatiques des LRT à apoB (Pan and Hussain 2007).

### **I.3.4 Rôle des lipoprotéines riches en triglycérides**

Le rôle des LRT intestinales est de transporter les lipides d'origine alimentaire dans le compartiment plasmatique, permettant ainsi leur disponibilité (notamment sous forme d'acides gras, de phospholipides, de cholestérol), mais aussi des vitamines liposolubles vers les différentes cellules de l'organisme, pour des besoins structurels ou énergétiques. En situation post-prandiale, l'apport des lipides alimentaires permet la synthèse et la sécrétion des CM dans les canaux chylifères puis dans la circulation sanguine. Les chylomicrons sont transformés dans la circulation (ajout et échanges d'apolipoprotéines) et les lipides sont partiellement hydrolysés par la lipoprotéine lipase : il en résulte la formation de CM "remnants" (de taille plus petite: 50-100 nm), déplétés en TG et donc enrichis en cholestérol. Ces particules sont captées par tous les tissus, et principalement par le foie, grâce à des récepteurs comme le récepteur aux LDL (LDLR) et le "LDL-receptor related protein" (LRP) (May et coll. 2005). A l'instar des CM, les VLDL sécrétées par le foie sont progressivement hydrolysées par l'action de la lipoprotéine lipase, ce qui conduit à la formation de LDL. Les acides gras libres produits seront stockés par le tissu adipeux et utilisés par les tissus périphériques comme le muscle, ou re-captés par le foie (Karpe 1999; Kawakami and Yoshida 2005) (Figure 20).



REL: Réticulum Endoplasmique Lisse; RER: RE Rugueux

**Figure 20 : Le transport des lipides** (adapté de (Karpe 1999)

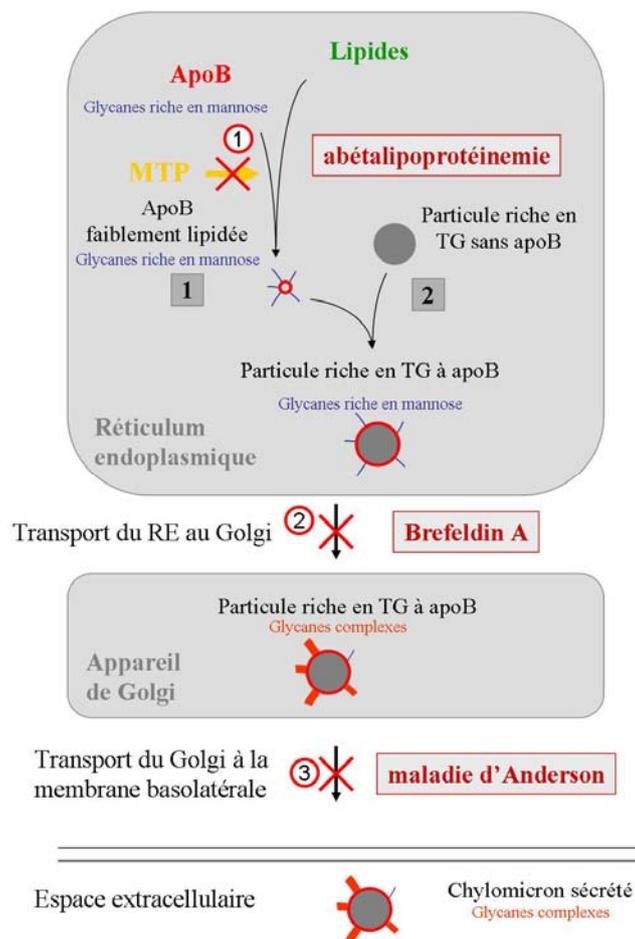
Dans ce cycle, les lipases sont responsables de l'apparition d'un stock plus ou moins important d'acides gras libres qui seront stockés par le tissu adipeux, utilisés par les tissus périphériques ou re-captés par le foie.

Certaines pathologies métaboliques sont directement liées à des anomalies de composition, de structure ou de sécrétion des CM. Des maladies d'origine génétique se caractérisent par des perturbations de la synthèse ou de la sécrétion des CM (Figure 21).

L'abétalipoprotéïnémie est une pathologie génétique récessive induisant une déficience en lipoprotéines intestinales, conduisant ainsi à une accumulation massive de TG dans les entérocytes. Cette pathologie entraîne des troubles sévères de malabsorption des graisses et des vitamines liposolubles, accompagnés de retards de croissance, de syndromes de malnutrition et parfois de signes de rachitisme. L'absence de lipoprotéines d'origine intestinale observée lors d'abétalipoprotéïnémie est due à des mutations dans le gène *mtp*, codant la protéine MTP (① dans la Figure 21). L'assemblage et la sécrétion de lipoprotéines hépatiques sont également abolis dans ces conditions (Hussain 2000).

La maladie de rétention des CM et la maladie d'Anderson sont des pathologies caractérisées par l'absence de vitamines liposolubles, des niveaux bas de cholestérol plasmatique et une absence de CM dans la circulation sanguine, associés à des diarrhées et des stéatorrhées. Ces maladies diffèrent des abétalipoprotéïnémies, dans lesquelles manque l'étape initiale d'assemblage des CM, et se caractérisent par une rétention massive des CM dans les entérocytes. De plus, la sécrétion de LRT hépatiques n'est pas touchée dans la

maladie d'Anderson. Les protéines apoB, apobec-1 et MTP ne sont pas impliquées dans ces maladies (Dannoura et coll. 1999; Hussain 2000). Jones et coll ont mis en évidence que ces pathologies de rétention de chylomicrons sont associées à une mutation sur les deux allèles du gène SARA2, qui code la protéine Sar1b (Jones et coll. 2003). Cette petite GTPase participe à l'assemblage des vésicules de transport du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi (vésicules COPII) et est nécessaire au transport intracellulaire des CM (Shoulders et coll. 2004). Dans ces 2 types de pathologies, l'apolipoprotéine B est bien adressée au réticulum endoplasmique, mais dans un cas s'arrête à ce compartiment (② dans la Figure 21); alors qu'elle est transportée jusqu'à l'appareil de Golgi dans la maladie d'Anderson. Ceci suggère que la maladie d'Anderson est causée par un défaut de sécrétion au niveau du transport vésiculaire post-Golgien (Berriot-Varoqueaux et coll. 2001) (③ dans la Figure 21)



**Figure 21 : Maladies associées au dysfonctionnement du trafic intracellulaire de l'apoB.** La Brefeldin A est un antibiotique qui bloque le trafic des protéines du RE vers l'appareil de Golgi. Les cercles 1,2 et 3 sont les différents points de blocage évoqués dans le texte. D'après (Berriot-Varoqueaux et coll. 2001)

A l'inverse, l'accumulation plasmatique de LRT d'origine intestinale, rencontrée dans les hyperlipidémies post-prandiales caractéristiques des dyslipidémies liées à l'insulino-résistance et au diabète de type 2 (Basciano et coll. 2005), est un facteur de risque majeur de l'athérosclérose. A jeûn, les VLDL représentent plus de 95% des LRT plasmatiques alors que ce pourcentage diminue à l'état post-prandial où 80% des triglycérides plasmatiques sont transportés par les CM (Karpe 1999). Dans le cadre de la prévention des maladies cardio-vasculaires, la détection des facteurs de risque (hypercholestérolémie, hypertriglycéridémie...) est toujours pratiquée à jeûn et ne prend donc pas en compte les événements post-prandiaux. De plus en plus d'études sont consacrées à l'hypertriglycéridémie post-prandiale et suggèrent que les "remnants" des LRT, chylomicrons tout comme VLDL, sont athérogènes lorsque leur concentration plasmatique est chroniquement élevée en période post-prandiale (Kawakami and Yoshida 2005). Ainsi, il a été montré que chez les patients ayant fait prématurément un accident coronarien, la progression des lésions coronariennes est corrélée à la quantité de "remnants" de CM en période post-prandiale (Karpe et coll. 1999).

**L'intestin, par sa contribution majeure d'apport de lipoprotéines dans la circulation sanguine, participe au maintien de l'homéostasie lipidique en permettant une distribution systémique des lipides et est également susceptible de participer à la mise en place et au développement de problèmes d'athérosclérose *via* le métabolisme de ses produits de sécrétion dans la circulation (les chylomicrons qui deviennent des "remnants" de chylomicrons sous l'action de la lipoprotéine lipase). Il est donc primordial de considérer l'intestin en situation post-prandiale comme un acteur important des processus métaboliques physiologiques et pathologiques.**

**Dans ce contexte, les mécanismes contrôlant l'expression de gènes impliqués dans les étapes clés de l'assemblage et de la sécrétion des lipoprotéines intestinales (APOB, MTP, ...) devraient être particulièrement pris en compte.**

## **Chapitre II: La détection des lipides alimentaires**

De très nombreux signaux sont générés par l'apport de nutriments à l'organisme. Il faut distinguer différents niveaux d'intégration des signaux associés à la perception des nutriments. Certains signaux sont générés avant même que les aliments ne soient ingérés (perception visuelle), d'autres signaux sont issus de l'interaction des nutriments avec des récepteurs, qui sont localisés depuis la bouche jusqu'à l'intestin. Il existe d'autre part un retentissement des signaux générés par la détection des nutriments ou leur métabolisme au niveau d'un organe, sur la fonction d'autres organes. Ainsi la plupart des signaux générés le long du tractus digestif contribuent à informer l'organisme, et en particulier le système nerveux central, de la quantité et de la qualité des nutriments ingérés, ce qui aboutira à la perception des sensations de rassasiement et de satiété.

L'objectif de ce chapitre est de faire le point sur ce que l'on sait actuellement des différents systèmes moléculaires et des acteurs impliqués dans la détection des nutriments, et en particulier sur ce que l'on sait de la détection des lipides alimentaires. La notion de détection des lipides a déjà été abordée dans différents organes (langue, cerveau,...) et à différents niveaux (surface cellulaire et médiateurs intracellulaires). Cependant, dans les études rapportées ci-dessous, les lipides concernés ont été étudiés individuellement, selon la séquence d'étude : un lipide, un récepteur ou un stimulus, un médiateur, et n'ont pas pris en compte le mode physiologique d'apport des lipides alimentaires dans la lumière intestinale sous la forme d'une structure lipidique complexe: la micelle.

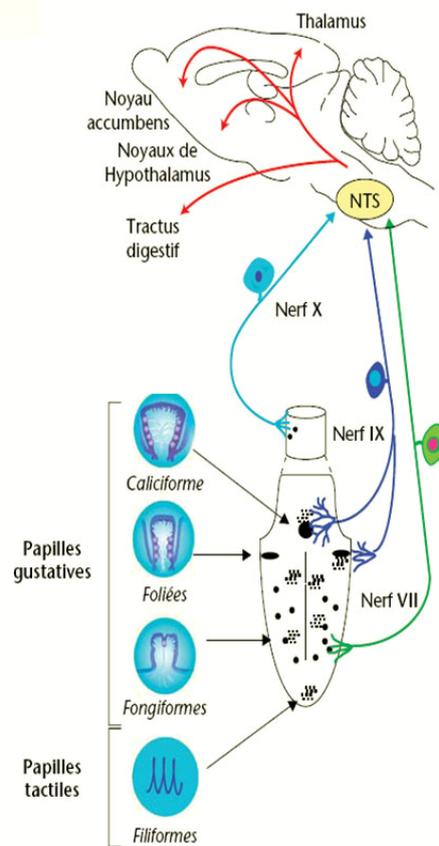
### **II.1 La perception du goût**

Le contrôle de la prise alimentaire est un paramètre majeur du maintien de l'homéostasie énergétique. Elle est dépendante de la quantité d'aliments ingérés mais également conditionnée, en temps réel, par la perception de ce que l'on mange. On parle ainsi de détection oro-sensorielle des nutriments.

Les rongeurs (rats et souris) montrent une préférence pour les lipides, en particulier les acides gras à longue chaîne (Tsuruta et coll. 1999; Takeda et coll. 2000). Ce choix serait fait en amont des étapes post-ingestives où il y a libération de peptides régulateurs par le tractus digestif et le cerveau. Il a donc été suggéré qu'une dimension gustative intervient dans cette préférence spontanée pour les lipides (Takeda et coll. 2001;

Fukuwatari et coll. 2003). Chez les mammifères, le goût agit de concert avec l'olfaction et les sensibilités somesthésiques (perception de la texture, température) pour indiquer si un aliment peut être ingéré.

Cinq perceptions gustatives sont classiquement décrites : le sucré, le salé, l'amer, l'acide et l'umami (goût induit par certains acides aminés comme le glutamate). La perception de ces saveurs est assurée par différentes protéines chimioréceptrices trouvées au niveau des cellules sensorielles des bourgeons du goût. On trouve ces derniers dans les papilles gustatives, leur densité étant particulièrement élevée au niveau de l'épithélium lingual. Des bourgeons du goût existent également, mais de façon diffuse, dans d'autres tissus incluant le voile du palais, le pharynx, le larynx et la partie supérieure de l'œsophage.



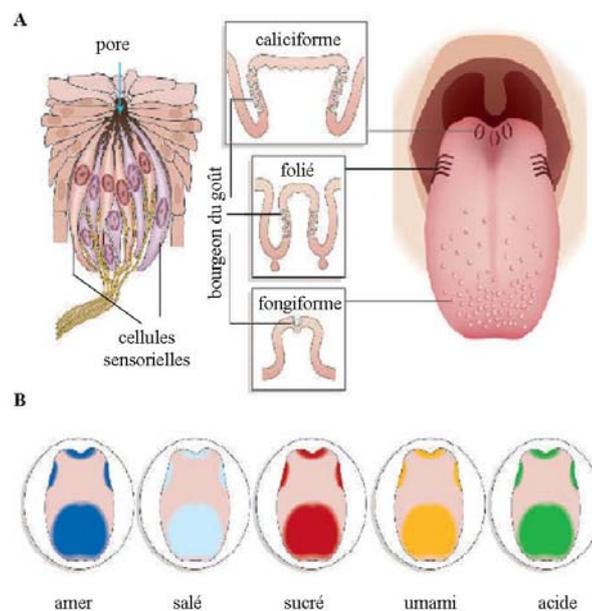
**Figure 22: Localisation et innervation des papilles gustatives** (d'après (Gaillard et coll. 2006))

Au niveau de la langue, on distingue trois sortes de papilles gustatives (Figure 22) : les papilles fongiformes, situées dans les deux tiers antérieurs de la langue, contiennent un petit nombre de bourgeons du goût. Elles sont innervées par le nerf VII ou corde du tympan. Dans l'épithélium lingual postérieur, on trouve les papilles caliciformes et foliées. Les premières comportent un sillon circulaire dans lequel débouchent les pores de

centaines de bourgeons du goût. L'Homme possède plusieurs papilles caliciformes formant le « V » lingual. En revanche, la souris n'en a qu'une seule en position centrale. Les foliées ont, quant à elles, une localisation latérale. Les papilles caliciformes et foliées sont innervées par le nerf IX ou glossopharyngien. Dans l'œsophage supérieur, les papilles gustatives sont connectées à des branches du pneumogastrique (nerf X). Les fibres de ces trois nerfs (VII, IX, X) rejoignent au niveau bulbaire le noyau du tractus solitaire (NTS) qui constitue le premier relais de la chaîne sensorielle gustative (Figure 22). Le NTS reçoit également des informations viscérales *via* des afférences du nerf X. Le NTS projette des fibres dans différentes parties du cerveau dont certaines sont impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire (hypothalamus) et le comportement addictif (noyau accumbens). Il renvoie également des informations vers le tractus digestif *via* des fibres du nerf X.

### II.1.1 Les récepteurs du goût

La réponse aux cinq saveurs (sucré, salé, amer, acide et umami) est effectuée par des cellules sensorielles présentes au niveau des bourgeons du goût. Contrairement à ce qui était communément admis, il n'y a pas de "carte" de la langue avec une distribution des cellules réceptrices du goût spécifique de telle ou telle zone. Des résultats récents d'approches moléculaires et fonctionnelles mettent en évidence une réponse gustative dans toutes les aires de la langue où il y a des bourgeons (pour revue (Chandrashekar et coll. 2006), (Figure 23).

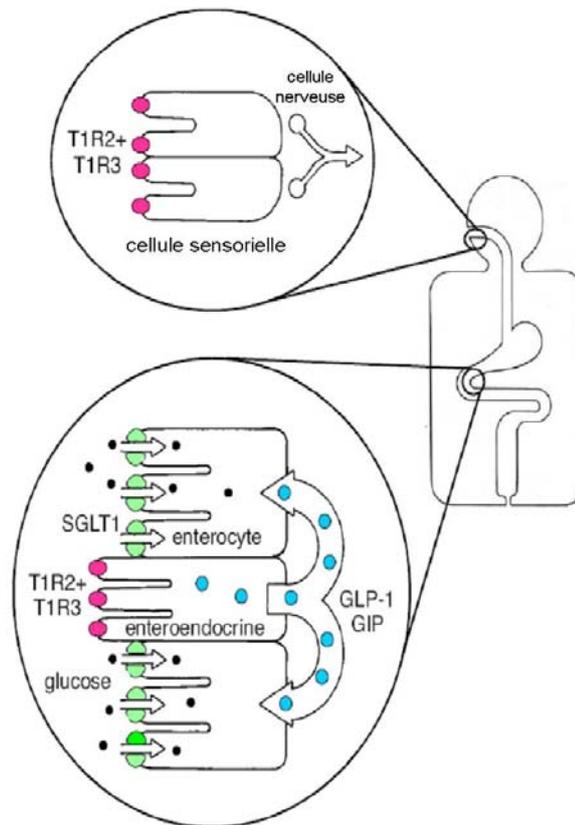


**Figure 23: Bourgeons du goût, cellules sensorielles (A) et zones de la langue répondant aux cinq saveurs (B) (d'après (Chandrashekar et coll. 2006))**

Parmi ces récepteurs du goût, les plus étudiés à ce jour sont ceux concernant le goût sucré. La découverte des récepteurs T1R2 et T1R3 (Taste Receptor), récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), exprimés à la membrane apicale des cellules sensorielles, a permis de décrypter les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la perception du goût sucré. Ces deux récepteurs forment un hétérodimère et c'est ce complexe qui constitue le détecteur du sucré (Nelson et coll. 2001). La liaison de ligands sur les T1Rs active les protéines G hétérotrimériques gustducine ou  $G_{\alpha 2}$  menant au relargage des sous unités  $\beta\gamma$  des protéines G et la stimulation en cascade de la phospholipase C- $\beta 2$  qui produit des seconds messagers intracellulaires et des changements de concentration en calcium intracellulaire qui finalement activent le canal calcium TRPM5 (transient receptor potential protein) (Kusakabe et coll. 2000; Perez et coll. 2002; Palmer 2007). Les souris invalidées pour l'un ou l'autre (ou les deux) récepteur T1R montrent une perte quasi-totale (totale pour la double invalidation) des réponses comportementales et électrophysiologiques aux sucres (Damak et coll. 2003; Zhao et coll. 2003).

L'idée que ces récepteurs du goût puissent s'exprimer dans l'intestin n'est pas nouvelle. En 1982, Newson observait en microscopie électronique des cellules "claires" au niveau des cryptes intestinales chez le rat. Ces cellules ressemblaient à des cellules sensorielles (Newson et coll. 1982). Quelques années plus tard, la preuve de la présence de l' $\alpha$ -gustducine au niveau des cellules épithéliales intestinales renforçait considérablement cette idée (Hofer et coll. 1996). Depuis, plusieurs études ont montré la présence de récepteurs du goût (sucré, amer, umami) au niveau intestinal (Wu et coll. 2002; Dyer et coll. 2005; Bezencon et coll. 2007). Récemment, une fonction de ces récepteurs T1R2+T1R3 au niveau intestinal a été décrite (Le Gall et coll. 2007; Margolskee et coll. 2007), impliquant l'hétérodimère dans la détection des sucres et la régulation transcriptionnelle et traductionnelle des transporteurs de sucre.

D'autre part, les cellules entéroendocrines de type L expriment l' $\alpha$ -gustducine. Une charge en glucose chez des souris invalidées pour l' $\alpha$ -gustducine est inefficace pour induire la sécrétion de GLP-1 (Glucagon-like peptide 1), relargué normalement en réponse au glucose, et contrôlant l'appétit, la sécrétion d'insuline et la motilité gastrique (Jang et coll. 2007). Il est intéressant de noter la présence de ces mêmes récepteurs du goût, qui détectent le sucre, au niveau de la langue et de l'intestin, et surtout la similarité des mécanismes d'action, ce qui en fait une piste intéressante pour les traitements pharmacologiques de l'obésité, du diabète, et les troubles de motilité gastrique, par l'utilisation de substrats non perméants (ligands de T1R2+T1R3), (Figure 24).



**Figure 24: Localisation des récepteurs du goût T1R2+T1R3.**

Les récepteurs du goût se trouvent au niveau des "cellules du goût" dans la bouche et dans les cellules entéroendocrines de l'intestin. La stimulation des T1R2+T1R3 par les sucres active des éléments de signalisation intracellulaires, notamment l' $\alpha$ -gustducine qui déclenche, dans la bouche, des voies nerveuses et, dans l'intestin, le relargage de GLP-1 et de GIP (hormones gastrointestinales). Ces hormones stimulent l'expression de SGLT1 dans les entérocytes, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'absorption du glucose provenant de la lumière intestinale. D'après (Sclafani 2007).

Si on peut envisager que ces mécanismes de détection du goût ne se limitent pas au sucré et s'étendent aux autres modalités gustatives, on peut tout aussi bien penser que ces mécanismes existent aussi pour d'autres types d'aliments, notamment les lipides. Très récemment d'ailleurs, les protéines telles que l' $\alpha$ -gustducine et TRPM5, protéines clés de la transduction de signaux de goût, notamment sucré, ont été étudiées pour leur rôle potentiel dans la préférence pour le gras chez les rongeurs, en utilisant des modèles de souris invalidées au niveau des gènes codant l'une ou l'autre de ces protéines (Sclafani et coll. 2007b). Les résultats observés avec les souris invalidées pour le gène TRPM5 montrent que les animaux présentent une abolition de la préférence spontanée pour le gras, phénotype semblable à celui observé pour les souris invalidées pour le gène codant le récepteur aux acides gras, CD36 (Laugerette et coll. 2005; Sclafani et coll. 2007a).

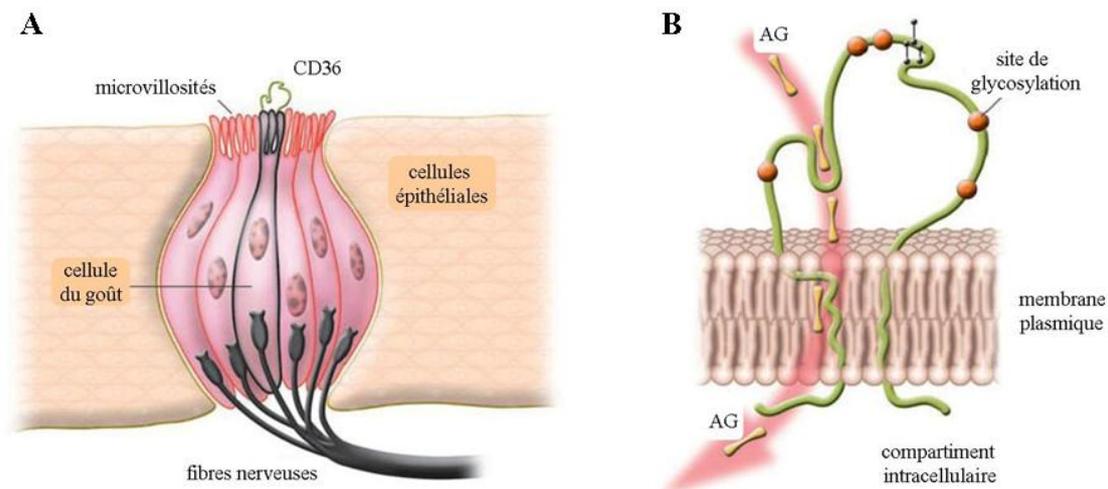
## II.1.2 CD36: un récepteur du goût du gras

On peut imaginer qu'il existe un avantage physiologique à une détection orale des lipides pour une préparation fonctionnelle du tractus digestif à leur arrivée et à leur prise en charge, qui nécessite, comme nous l'avons vu précédemment, la fonctionnalité de voies métaboliques très complexes. En théorie, une perception gustative de lipides alimentaires peut être générée par l'interaction d'un acide gras à longue chaîne avec un récepteur spécifique localisé au niveau des bourgeons du goût.

La protéine CD36 (Cluster of Differentiation 36) appelée également FAT (Fatty Acid Translocase) appartient à la famille des récepteurs "scavengers" de classe B. CD36 est une protéine transmembranaire de 88 kDa, fortement N-glycosylée, exprimée dans de nombreux types cellulaires, notamment les plaquettes, les monocytes, les cellules endothéliales capillaires, les érythroblastes, les adipocytes, et les cellules épithéliales intestinales, mammaires et de la rétine. La structure prédictive de CD36 oriente la quasi-totalité de la protéine du côté extracellulaire, à l'exception de deux courtes extrémités cytoplasmiques (de 9 à 13 acides aminés) qui peuvent être palmitoylées (Gruarin et coll. 2000).

La protéine CD36, qui lie les acides gras à longue chaîne (AGLC) avec une très haute affinité (Baillie et coll. 1996), a été identifiée au niveau de la papille caliciforme chez le rat (Fukuwatari et coll. 1997) et chez la souris (Laugerette et coll. 2005). CD36 présente les caractéristiques structurales et fonctionnelles requises pour être un récepteur gustatif aux lipides (pour revue (Glatz and Lagarde 2007; Laugerette et coll. 2007):

1) dans l'épithélium lingual des rongeurs, l'expression du gène CD36 est strictement restreinte aux bourgeons du goût. Elle est particulièrement élevée dans la partie postérieure de la langue, au niveau des papilles caliciformes et dans une moindre mesure des foliées (Figure 25). En revanche, CD36 n'est que faiblement exprimé dans les papilles fongiformes. La protéine CD36 est localisée au niveau de la partie apicale de certaines cellules sensorielles bordant le pore gustatif. Ce positionnement est particulièrement adéquat pour générer un signal gustatif, puisque la lipase linguale peut libérer des AGLC à proximité immédiate des bourgeons du goût, et donc de CD36, dans les papilles caliciformes et foliées.



**Figure 25: Le bourgeon du goût (A) et la structure prédictive du récepteur au goût du gras, CD36 (B), exprimé à la surface apicale des cellules du goût. D'après (Abumrad 2005).**

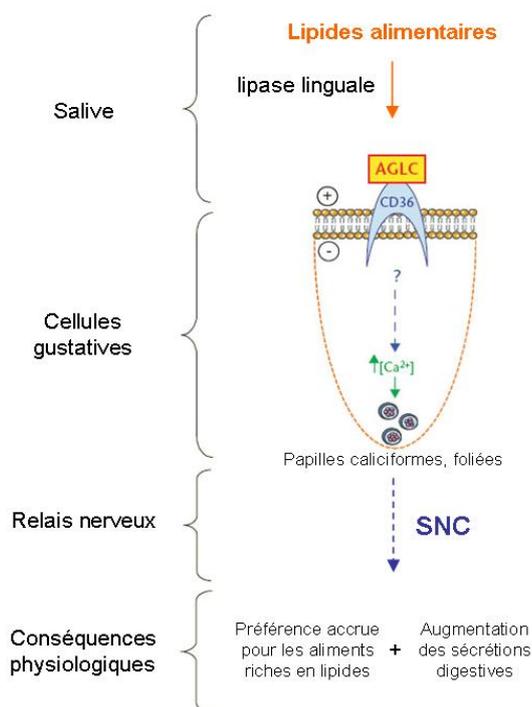
2) CD36 a une structure de type récepteur avec une large poche hydrophobe extracellulaire flanquée de deux courts segments transmembranaires plongeant dans le cytoplasme (Figure 25). Son extrémité C-terminale peut s'associer avec des kinases Src constituant ainsi un ensemble fonctionnel pouvant potentiellement permettre la transduction d'un signal lipidique.

3) Les AGLC induisent de façon sélective, rapide et importante, une élévation de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  dans les cellules gustatives isolées à partir de papilles caliciformes. Or ce changement est connu pour être à l'origine de l'activation des voies nerveuses gustatives afférentes. Cet effet est dépendant de CD36 puisque l'inhibition pharmacologique de son site de liaison supprime totalement la réponse calcique induite par les AGLC. En accord avec ce processus, les acides gras à chaîne moyenne, qui ne sont pas des ligands de CD36, sont incapables d'induire un changement calcique dans les cellules gustatives (Gaillard et coll. 2006). Le mécanisme moléculaire à l'origine de la transduction du signal dans les cellules gustatives est actuellement inconnu. Une implication de la voie des tyrosines kinases est cependant plausible. En effet, certaines kinases Src comme lyn ou fyn, connues pour contrôler les flux calciques intracellulaires, peuvent également interagir avec CD36 (Huang et coll. 1991). De même, les résultats récents obtenus avec l'invalidation du canal calcique TRPM5, similaires à ceux obtenus avec l'invalidation de CD36 (Laugerette et coll. 2005) concernant l'abolition de la préférence spontanée des rongeurs pour le gras, suggèrent que TRPM5 peut faire partie de la voie de signalisation activée par la liaison d'acides gras sur CD36 (Sclafani et coll. 2007b).

4) Les souris dont le gène codant pour CD36 a été invalidé n'ont plus de préférence pour une solution enrichie en AGLC par rapport à une solution aqueuse. En revanche, leur attirance pour le sucré et leur aversion pour l'amer restent équivalentes à celles de souris de type sauvage. En absence de CD36, le système gustatif semble donc fonctionner normalement sauf pour la détection des AGLC (Laugerette et coll. 2005).

5) L'augmentation du flux pancréato-biliaire et du contenu en protéines du suc pancréatique induit par le dépôt oral d'AGLC chez les souris de type sauvage n'existe plus chez les souris dépourvues de CD36. La présence de CD36 au niveau lingual semble donc indispensable pour préparer l'organisme à recevoir des graisses (Laugerette et coll. 2005).

6) La présence d'AGLC au niveau oral entraîne une activation neuronale du noyau du tractus solitaire dans des zones connues pour être en relation avec le nerf IX et le nerf VII. Une fois encore, cette activation est dépendante de CD36 puisque l'activation neuronale observée chez les souris sauvages soumises à un stimulus lipidique oral n'est plus reproduite chez des animaux dont le gène codant pour CD36 a été invalidé (Laugerette et coll. 2007).



**Figure 26: Perception oro-sensorielle des lipides alimentaires chez la souris: modèle de travail** (d'après (Laugerette et coll. 2007)) AGCL: acides gras à longues chaînes, SNC: système nerveux central

Si, pris dans leur ensemble, ces résultats démontrent que le CD36 lingual joue un rôle prépondérant dans la perception orale des lipides alimentaires chez la souris, la littérature suggérant une perception gustative des lipides alimentaires chez l'Homme reste

actuellement très succincte. Les bases moléculaires d'une perception oro-sensorielle chez l'Homme n'existent pas actuellement; on ignore notamment si les cellules réceptrices gustatives sont pourvues de CD36 chez l'Homme. De plus, il existe une controverse sur la présence de lipase au niveau lingual de telle sorte qu'une extrapolation des données obtenues chez la souris à l'Homme n'est pas, à l'heure actuelle, envisageable.

Néanmoins, l'attirance pour les lipides semble exister chez l'Homme puisque des études déjà anciennes rapportent que les sujets obèses ont une préférence accrue pour les aliments riches en graisses comparativement aux personnes minces (Mela 1988). Ces travaux laissent à penser qu'une perception inappropriée des lipides alimentaires pourrait contribuer à la mise en place d'une surcharge pondérale. D'autres travaux, réalisés chez des volontaires sains, indiquent que la présence des lipides en bouche est suffisante pour affecter la triglycémie. En effet, suite à une prise de lipides encapsulés, pour éviter tout contact oral, ils constatent une augmentation plus soutenue de la triglycémie chez les sujets ayant été auparavant exposés au niveau oral à un repas fictif non ingéré et contenant des corps gras, que chez les témoins ayant été exposés au même "repas" dépourvu de tout lipide (Mattes 1996). Ce changement est indépendant de la texture de matrice alimentaire utilisée et de toute perception olfactive. Ceci suggère donc que la présence de lipides dans l'aliment proposé est aussi perçue par la voie gustative chez l'Homme (Mattes 2001). Ils montrent également que cette augmentation de la triglycémie est due à des lipides issus du repas précédant l'expérience, probablement stockés au niveau intestinal (Mattes 2005). Le mécanisme physiologique à l'origine de ces changements est actuellement inconnu.

A l'instar des récepteurs T1Rs présents sur la langue et dans l'intestin, le récepteur CD36 est également exprimé au niveau intestinal, mais restreint aux entérocytes chez l'Homme (Lobo et coll. 2001) (CD36 sera détaillé dans le chapitre suivant en tant que candidat pour la détection des lipides alimentaires micellaires par les entérocytes). On peut alors envisager également, en complément du modèle présenté en Figure 26, une action de CD36 au niveau intestinal, pour faire face à l'apport luminal de produits d'hydrolyse des lipides alimentaires, avec, potentiellement, des conséquences sur le métabolisme intestinal des lipoprotéines (Petit et coll. 2007a).

## **II.2 L'apoA-IV**

L'apolipoprotéine A-IV (apoA-IV), découverte à la fin des années 1970 (Swaney et coll. 1977), est une protéine sécrétée par les entérocytes, associée aux lipoprotéines riches en triglycérides, à savoir les chylomicrons et les VLDL (voir pour revue (Stan et coll. 2003)). Chez l'Homme, l'apoA-IV est une protéine qui est synthétisée par l'intestin grêle, tandis que chez les rongeurs, l'apoA-IV est une protéine un peu plus courte synthétisée par l'intestin et le foie, même si l'intestin contribue là aussi majoritairement au niveau d'apoA-IV circulante (Wu and Windmueller 1979). Dans l'intestin, l'apoA-IV est exprimée selon un gradient décroissant céphalo-caudal et croissant selon l'axe crypto-villositaire, la restriction de son expression dans la villosité étant contrôlée par le facteur transcriptionnel HNF-4 (Sauvaget et coll. 2002; Archer et coll. 2005).

La transcription du gène codant l'apoA-IV et la synthèse de la protéine apoA-IV au niveau intestinal sont stimulées par l'absorption de lipides (pour revue (Stan et coll. 2003; Carriere et coll. 2005; Black 2007)). La production de l'apoA-IV serait dépendante de l'assemblage et/ou du transport des chylomicrons (Hayashi et coll. 1990; Kalogeris et coll. 1994), mais ces résultats ne sont pas étayés d'avantage et l'on ne sait pas si cette régulation est commune à différentes espèces et quels sont les mécanismes impliqués. Dans le laboratoire, nous avons décrypté les mécanismes moléculaires responsables de l'induction transcriptionnelle du gène de l'apoA-IV consécutive à un apport de micelles lipidiques contenant des produits de digestion des lipides alimentaires (Carriere et coll. 2005). Cette induction est dépendante du facteur transcriptionnel HNF-4 et l'importance de régions cis-régulatrices du gène de l'apoA-IV dans cette régulation a été mise en évidence dans les cellules Caco-2/TC7 et *in vivo* sur modèles murins. L'implication du facteur HNF-4 dans la régulation de l'expression du gène de l'apoA-IV par les lipides a également été récemment démontrée dans la lignée épithéliale intestinale de porc nouveau-né, IPEC-1 (Leng et coll. 2007). L'induction de l'expression de l'apoA-IV par les micelles lipidiques est spécifique car elle n'est pas reproduite lorsque les constituants des micelles sont ajoutés isolément au pôle apical des cellules Caco-2/TC7 (Carriere et coll. 2005). Ces observations, associées aux autres résultats obtenus dans le laboratoire, sont à l'origine de l'hypothèse d'une détection des lipides alimentaires apportés sous forme de micelles qui sera développée plus loin et qui a justifié les travaux que j'ai conduits durant ma thèse.

En plus de ses effets sur le métabolisme lipidique intestinal, l'apoA-IV joue un rôle dans la régulation de la prise alimentaire (Fujimoto et coll. 1992) (pour revue (Qin and Tso 2005)), ce qui a amené à considérer cette protéine comme un signal de satiété.

1) L'apoA-IV inhibe la prise alimentaire (Fujimoto et coll. 1992; Fujimoto et coll. 1993; Tso et coll. 2001), la vidange gastrique et la sécrétion d'acide gastrique (Okumura et coll. 1994; Okumura et coll. 1995; Okumura et coll. 1996), de même que la motilité intestinale (Glatzle et coll. 2002; Glatzle et coll. 2003; Glatzle et coll. 2004). Les effets inhibiteurs de l'apoA-IV sur la prise alimentaire sont probablement dus aux modifications des fonctions gastriques et intestinales. Des souris invalidées pour le gène de l'apoA-IV voient tous ces effets d'inhibition atténués par rapport à des souris contrôles (Whited et coll. 2005). De même, l'activation des afférences vagues en réponse aux lipides est réduite chez ces souris apoA-IV *-/-* (Whited et coll. 2005). En effet, l'apport de lipides au niveau intestinal active les afférences vagues *via* un mécanisme dépendant du récepteur à la CCK, le récepteur CCKR1. Ceci entraîne l'activation de neurones du noyau du tractus solitaire (NTS), sur qui convergent les informations d'origine vagale et qui a des connexions avec l'hypothalamus, et provoque des changements réflexes dans les fonctions motrices de l'estomac et dans la sécrétion d'acide gastrique (Lloyd et coll. 1992; Holzer et coll. 1994; Zittel et coll. 1994; Glatzle et coll. 2002; Glatzle et coll. 2003). Ces résultats permettent de conclure que l'activation des afférences vagues et des fonctions gastriques en réponse aux lipides alimentaires dépend, du moins en partie, de l'apoA-IV.

2) L'apoA-IV est également synthétisée au niveau de l'hypothalamus (Liu et coll. 2001). Comparativement à d'autres aires du système nerveux central, le noyau arqué est enrichi en apoA-IV. Le noyau arqué est un noyau hypothalamique jouant un rôle important dans de nombreuses fonctions physiologiques, notamment dans le contrôle de la prise alimentaire *via* ses projections vers le noyau paraventriculaire (PVH), le noyau dorsomédian (DMH), et l'aire hypothalamique latérale (LHA). Le niveau d'ARN messager de l'apoA-IV dans l'hypothalamus est conditionné par l'état nutritionnel de l'animal (Liu et coll. 2001). La mise à jeûn réduit le niveau d'expression du gène de l'apoA-IV dans l'hypothalamus ainsi que dans le jéjunum. Le gavage de lipides restaure des niveaux équivalents à ceux des animaux nourris ad-libitum (Liu et coll. 2001). Il est intéressant de noter que les deux apoA-IV, intestinale et hypothalamique, répondent de la même façon à un jeûne suivi d'un gavage de lipides. On ne sait pas comment l'expression du gène de l'apoA-IV hypothalamique est régulée par les lipides, et s'il s'agit d'un effet direct ou indirect, mais il a été montré récemment que la leptine, hormone réduisant la prise alimentaire, est impliquée dans le contrôle de l'expression du gène de l'apoA-IV (Shen et coll. 2007).

3) La leptine a des effets opposés sur la régulation de l'apoA-IV dans l'intestin et l'hypothalamus : l'administration de leptine fait diminuer le niveau d'apoA-IV intestinale

(Morton et coll. 1998; Doi et coll. 2001) tandis qu'elle augmente le niveau d'apoA-IV hypothalamique (Shen et coll. 2007). La leptine est synthétisée et sécrétée par le tissu adipeux, puis agit au niveau de l'hypothalamus pour diminuer la prise alimentaire et augmenter la dépense énergétique (Friedman and Halaas 1998). Le mécanisme de la régulation de l'apoA-IV par la leptine n'est pas si clair à ce jour. La leptine peut se lier à son récepteur ; il s'en suit la phosphorylation de STAT3 qui peut, suite à sa translocation au noyau (Hubschle et coll. 2001), stimuler l'expression du gène de l'apoA-IV dans les neurones (Shen et coll. 2007). Les souris *ob/ob*, déficientes en leptine, présentent des niveaux périphériques d'apoA-IV élevés et pourtant continuent de manger plus, comparativement aux souris contrôles. Ces souris *ob/ob* ont en revanche des niveaux réduits d'apoA-IV hypothalamique. Il semblerait donc que l'effet satiétogène de l'apoA-IV soit au niveau central et combiné à celui de la leptine. Après un repas riche en graisses, les niveaux d'apoA-IV plasmatiques s'élèvent dans un premier temps, de même que les niveaux de leptine circulante. La leptine pourrait augmenter l'efficacité de l'apoA-IV à réduire la taille des repas, et la présence concomitante de leptine et d'apoA-IV semble être nécessaire pour obtenir une réduction significative de la prise alimentaire (Shen et coll. 2007). Cela permet à ces auteurs de conclure que la leptine et l'apoA-IV agissent en synergie sur la réduction de la prise alimentaire.

### **II.3 L'intestin endocrine**

L'intestin et le système nerveux central synthétisent l'apoA-IV, qui joue un rôle important dans le métabolisme lipidique intestinal et constitue un signal de satiété. Mais l'intestin sécrète aussi des peptides pouvant agir sur la régulation de la prise alimentaire. Il ne s'agit pas ici de traiter de façon exhaustive des sécrétions endocrines intestinales, mais plus d'appréhender l'importance de cet organe dans sa participation au contrôle de la prise alimentaire, notamment par sa capacité à sécréter des peptides en réponse à l'apport de nutriments et des conséquences physiologiques ou physiopathologiques qui en résulteront.

La capacité de l'intestin à percevoir le contenu luminal en nutriments après un repas est d'une importance fondamentale, cette perception permettant d'orchestrer la digestion et d'optimiser l'assimilation des nutriments. De plus, la détection des nutriments par l'épithélium est essentielle pour le contrôle, à court terme, de la prise alimentaire *via* les voies de signalisation allant de l'intestin vers le cerveau.

Après un repas, plusieurs peptides gastro-intestinaux sont sécrétés par les cellules entéroendocrines (CEE). Ces sécrétions sont conditionnées par le contenu luminal en nutriments. Les cellules entéroendocrines sont classées en fonction de la morphologie et du contenu de leurs granules de sécrétion (voir Chapitre I, section I.1.2.1: Les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal). Les mécanismes moléculaires précis de détection des nutriments par les CEE sont encore mal caractérisés.

Le peptide PYY (peptide tyrosine tyrosine) est une hormone intestinale, synthétisée et sécrétée par les cellules endocrines L dans l'intestin grêle distal en réponse à l'ingestion d'aliments (pour revue (Ueno et coll. 2008)). L'apport lipidique est un stimulus fort de relargage de PYY qui, converti par la dipeptidyl peptidase IV en PYY3-36, se lie au récepteur Y2 de la famille des récepteurs NPY. Ces récepteurs Y2 sont distribués dans l'hypothalamus, principalement dans le noyau arqué, et aussi dans l'hippocampe, dans l'intestin, dans les corps neuronaux du ganglion nodal du nerf vague (Koda et coll. 2005). L'hypothèse que PYY3-36 agit comme un facteur de satiété est basée sur l'observation que ce peptide peut inhiber la sensation d'appétit et inhiber la prise alimentaire quand il est administré aux animaux (Batterham et coll. 2002) ou à l'Homme (Batterham et coll. 2003), même si les résultats chez l'animal sont très controversés (Boggiano et coll. 2005; Beglinger and Degen 2006). Récemment, en utilisant un antagoniste du récepteur à la CCK (CCKR1), une interrelation entre l'apoA-IV, CCKR1, l'activation des afférences vagues par le PYY3-36 et l'inhibition de la vidange gastrique a été mise en évidence chez la souris, sans pour autant relier cette voie à l'inhibition de la prise alimentaire médiée par PYY3-36 (Whited et coll. 2007).

Dans l'intestin grêle proximal, le Glucagon-like peptide 1 (GLP-1), le gastric inhibitory peptide (GIP, glucose-dependent insulinotropic polypeptide) et la 5-hydroxytryptamine (5-HT) voient leur sécrétion stimulée par le glucose alors que les acides aminés induisent la sécrétion de gastrine, et les acides luminaux celle de sécrétine. De tous les mécanismes cellulaires responsables de la sécrétion d'entéro-peptides par les CEE, les plus analysés et les mieux compris sont ceux impliqués dans le relargage des incrélines GLP-1 et GIP, induit par le glucose au niveau des cellules L (pour revue (Drucker 2006) et (Todd and Bloom 2007)). Le nombre impressionnant de travaux qui leur sont consacrés est à relier à l'importance de ces mécanismes dans le contrôle de l'homéostasie glucidique et à l'impact de leurs dysfonctionnements dans le diabète de type 2. Récemment il a été montré qu'un apport en lipides peut également stimuler la sécrétion de GLP-1, mais il n'y a pas de mécanismes décrits pour le moment (Lu et coll. 2007). Cela démontre que les concepts

évoluent au fur et à mesure des travaux et qu'il est aujourd'hui impensable de lier un seul nutriment à un seul effet, mais qu'on doit traiter aujourd'hui plus du métabolisme glucido-lipidique que de chacun de ces métabolismes séparément.

La détection des lipides est nettement moins expliquée que celle des sucres jusqu'à présent. En effet, les acides gras, et les lipides en général, sont des nutriments plus difficiles à étudier, du fait de leur comportement complexe d'un point de vue physico-chimique dans un environnement aqueux. De par leur nature hydrophobe, dès que l'on dépasse la limite de solubilisation les acides gras forment préférentiellement des agrégats, sauf s'il y a présence de produits biliaires. La CCK, entéro-peptide majoritairement sécrété par les CEE en réponse aux acides gras libres, stimule la sécrétion biliaire. Ceci suggère l'existence d'un événement précoce capable de détecter les acides gras non solubilisés afin de stimuler rapidement la sécrétion de la CCK. Ces mécanismes moléculaires ont été étudiés chez l'Homme (McLaughlin et coll. 1998b) et sur des lignées murines entéroendocrines, entre autres la lignée STC-1 (McLaughlin et coll. 1998a). Les acides gras (>12 carbonés) augmentent le calcium intracellulaire ( $Ca^{2+}$ ) pour stimuler le relargage de CCK des CEE (McLaughlin et coll. 1998a). L'entrée de  $Ca^{2+}$  extracellulaire induit par les acides gras se fait *via* des canaux  $Ca^{2+}$  de type L (McLaughlin et coll. 1998a) mais les acides gras mobilisent également le  $Ca^{2+}$  intracellulaire stocké dans le réticulum endoplasmique (Hira et coll. 2004). La co-existence de deux types de voies, mais avec des cinétiques différentes, est donc envisagée: une voie initiée à la membrane plasmique qui déclenche l'influx de  $Ca^{2+}$  extracellulaire et une autre voie au niveau du réticulum endoplasmique qui, après l'entrée des acides gras, relargue le  $Ca^{2+}$  stocké. Dans les deux cas, on peut envisager l'implication des récepteurs membranaires de surface ou des transporteurs spécifiques, exprimés par les CEE, dans ces mécanismes (Hira et coll. 2004). Si ces descriptions mécanistiques sont relativement récentes, les effets centraux de la CCK sont, en revanche, étudiés depuis longtemps. Dès 1973, Gibbs démontrait l'effet inhibiteur de la CCK sur la prise alimentaire chez le rat (Gibbs et coll. 1973).

On peut considérer que la détection des produits d'hydrolyse des lipides alimentaires au niveau de l'intestin provoque l'activation de voies de signalisation générant un signal qui sera transmis au système nerveux central et participe ainsi au contrôle, à court terme, de la prise alimentaire. Je n'aborderai pas ici les contrôles à long terme, en fonction de l'état d'équilibre énergétique, éminemment plus complexes, par l'intervention des tissus périphériques, principalement le tissu adipeux, et la sécrétion d'hormones, telles que la

leptine et l'adiponectine, qui vont également agir au niveau central pour contrôler l'appétit et le métabolisme.

## **II.4 Les acides gras et l'hypothalamus**

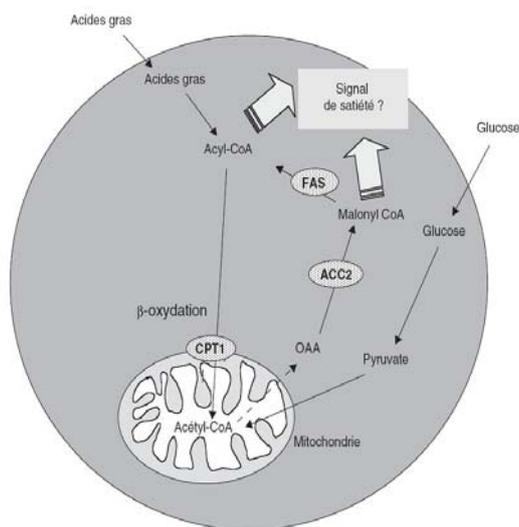
Il a été montré, ces dernières années, une détection des acides gras libres au niveau du système nerveux central capable de réguler la balance énergétique au niveau central (cerveau) et/ou au niveau périphérique.

Les acides gras libres, issus du métabolisme des lipoprotéines, peuvent passer la barrière hémato-encéphalique contrairement à ce qui était admis dans les années 40 (Sperry et coll. 1940). Les études récentes montrent que celle-ci n'est pas imperméable aux acides gras circulants mais plutôt sélective (Edmond 2001; Watkins et coll. 2001); de plus, cette barrière est quasiment inexistante au niveau de l'hypothalamus et plus particulièrement du noyau arqué qui représente la véritable "porte d'entrée" et le lieu principal de détection des hormones et des nutriments vers le système nerveux central (Migrenne et coll. 2007).

La présence de neurones sensibles aux variations des niveaux de glucose extracellulaire est bien démontrée au niveau du cerveau et particulièrement au niveau de l'hypothalamus (pour revue (Levin 2002; Penicaud et coll. 2002)). Il y a maintenant également de nombreuses études qui montrent l'existence de neurones réagissant à des variations de la concentration en acides gras libres (Oomura et coll. 1975; Clement et coll. 2002; Obici et coll. 2002; Wang et coll. 2006). Ainsi, tout comme le glucose, les acides gras peuvent jouer le rôle de molécules informatives au niveau de l'hypothalamus. Les variations de concentration plasmatique des acides gras libres en fonction du statut énergétique seront donc détectées et interprétées au niveau central, entraînant en retour une régulation du métabolisme lipidique et glucidique, et plus largement du métabolisme énergétique, incluant notamment le comportement alimentaire (Migrenne et coll. 2007). Il a ainsi été montré qu'une perfusion intra-cérébro-ventriculaire d'acide oléique chez le rat provoque une baisse de la production hépatique de glucose et une diminution de la prise alimentaire (Obici et coll. 2002). Cet effet de l'acide oléique s'accompagne d'une diminution de l'expression du neuropeptide Y (neuropeptide contrôlant la prise alimentaire) au niveau de l'hypothalamus (Obici et coll. 2002). De même, une augmentation excessive de la concentration plasmatique d'acides gras libres, notamment dans des situations pathologiques, pourrait également altérer le contrôle nerveux de l'homéostasie énergétique *via* des modifications des activités nerveuses parasympathiques et orthosympathiques. Il a

été montré qu'une surcharge en lipides, provoquée par un régime hyperlipidique, ou une perfusion intraveineuse de triglycérides conduisant à un doublement de la concentration plasmatique des acides gras libres, induisent des modifications de l'activité du système nerveux central chez le Rat. Chez l'Homme, une surcharge pondérale s'accompagne bien souvent d'altérations du tonus sympathique (pour revue (Cruciani-Guglielmacci et coll. 2006)).

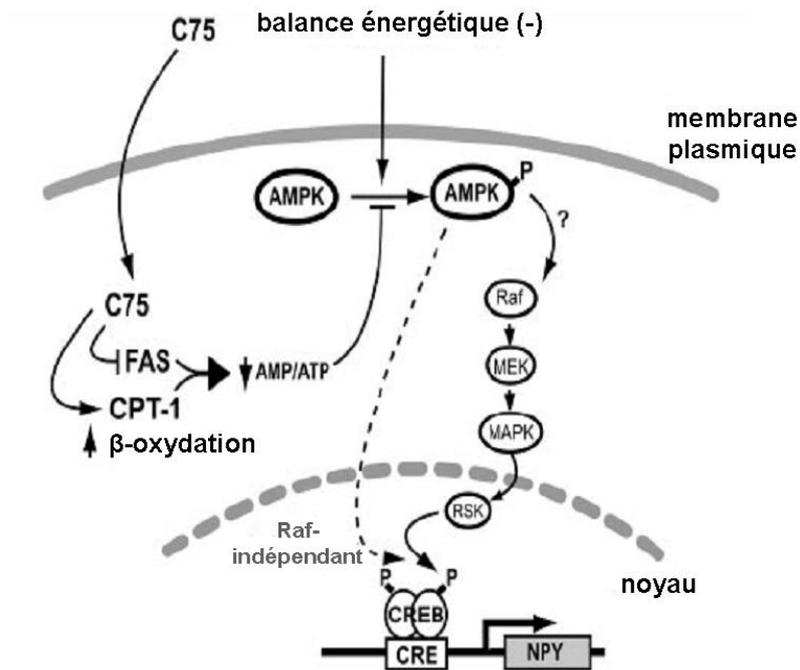
Les mécanismes moléculaires de cette détection d'acides gras libres ne sont pas encore précisément élucidés, mais il y a cependant des éléments permettant d'impliquer le métabolisme des acides gras dans ce mécanisme. Il est maintenant établi que les principales enzymes du métabolisme des acides gras, telles que la FAS (Fatty acid synthase) qui catalyse la synthèse d'acides gras à longues chaînes, la CPT1 (carnitine palmitoyltransferase-1), l'enzyme limitante de l'entrée des acides gras dans la mitochondrie pour l'oxydation, et l'ACC (acetyl-CoA carboxylase) qui génère le malonyl-CoA substrat de la FAS, sont exprimées dans les neurones hypothalamiques (Figure 27). Il est suggéré que le malonyl-CoA est, avec les acyl-CoA, l'un des principaux détecteurs énergétiques de l'hypothalamus. Cette hypothèse repose sur de nombreuses données expérimentales étudiant l'effet de l'inhibition de la FAS, au niveau de l'hypothalamus, *via* notamment l'inhibiteur de synthèse C75, qui provoque l'accumulation de malonyl-CoA et inhibe fortement la prise alimentaire (voir pour revue (Dowell et coll. 2005)).



**Figure 27: Mécanisme proposé de la détection d'acides gras dans l'hypothalamus.**

L'augmentation de la concentration en malonyl-CoA conduit à l'inhibition de la CPT1, ce qui entraîne une diminution de la  $\beta$ -oxydation et une augmentation des acyl-CoA intracellulaires, et finalement est à l'origine d'un signal de satiété. OAA : oxalo-acétate, FAS : fatty acid synthase, ACC2 : acetyl-CoA carboxylase 2, CPT1 : carnitine palmitoyl transférase 1. D'après (Cruciani-Guglielmacci et coll. 2006).

Le malonyl-CoA est un métabolite qui provient du métabolisme des acides gras et du glucose (Figure 27). Ainsi lors d'un repas, l'apport simultané en glucose et en acides gras libres, provoquerait une production importante de malonyl-CoA et une diminution de la  $\beta$ -oxydation (*via* l'effet inactivateur du malonyl-CoA sur la CPT1) conduisant à l'augmentation intracellulaire d'acyl-CoA, déclenchant ainsi deux puissants signaux de satiété : le malonyl-CoA et les acyl-CoA. Des expériences, *in vitro* et *in vivo*, ont montré que ces effets sont en partie relayés, au niveau de l'hypothalamus, par la protéine AMPK (AMP-activated protein kinase), connue pour être un détecteur de la balance énergétique au niveau périphérique (Hardie et coll. 1994). Des augmentations du rapport AMP/ATP, qui sont des signes de problèmes énergétiques potentiels, mènent à la phosphorylation et à l'activation de l'AMPK (Hardie and Carling 1997). Dans les tissus périphériques, l'activation de l'AMPK est contrôlée par l'exercice, le jeûne et l'hypoxie (Hardie and Carling 1997). Au niveau central, des études réalisées sur des cultures primaires de neurones corticaux ont montré que C75 inhibe la FAS, active CPT-1, altère les niveaux d'ATP et provoque des changements de phosphorylation et d'activité de l'AMPK (Landree et coll. 2004). Les changements observés sont biphasiques : tout d'abord se produit une courte diminution du niveau d'ATP allant de pair avec une augmentation transitoire de la phosphorylation de l'AMPK, suivie d'une augmentation persistante pendant plusieurs heures des niveaux d'ATP accompagnée d'une diminution de la phosphorylation et de l'activité de l'AMPK. L'administration de C75 diminue la prise alimentaire en réduisant les niveaux de phosphorylation de l'AMPK dans l'hypothalamus (Landree et coll. 2004). D'une façon générale, un déficit en nutriments va activer l'AMPK qui va alors stimuler les réactions métaboliques productrices d'énergie, telle que l'oxydation des acides gras, et, à l'inverse, réprimer les réactions consommatrices d'énergie, telle que la synthèse des acides gras (pour revue (Long and Zierath 2006)). L'AMPK sert donc de détecteur d'énergie, au niveau des neurones, pour la régulation de la prise alimentaire (Andersson et coll. 2004; Kim et coll. 2004; Minokoshi et coll. 2004). La leptine inactive l'AMPK hypothalamique (Minokoshi et coll. 2004). De même, l'inactivation de l'AMPK contribue à une diminution de l'expression du neuropeptide Y (Kim et coll. 2004), (Figure 28)



**Figure 28: Modèle proposé pour l'action du C75**

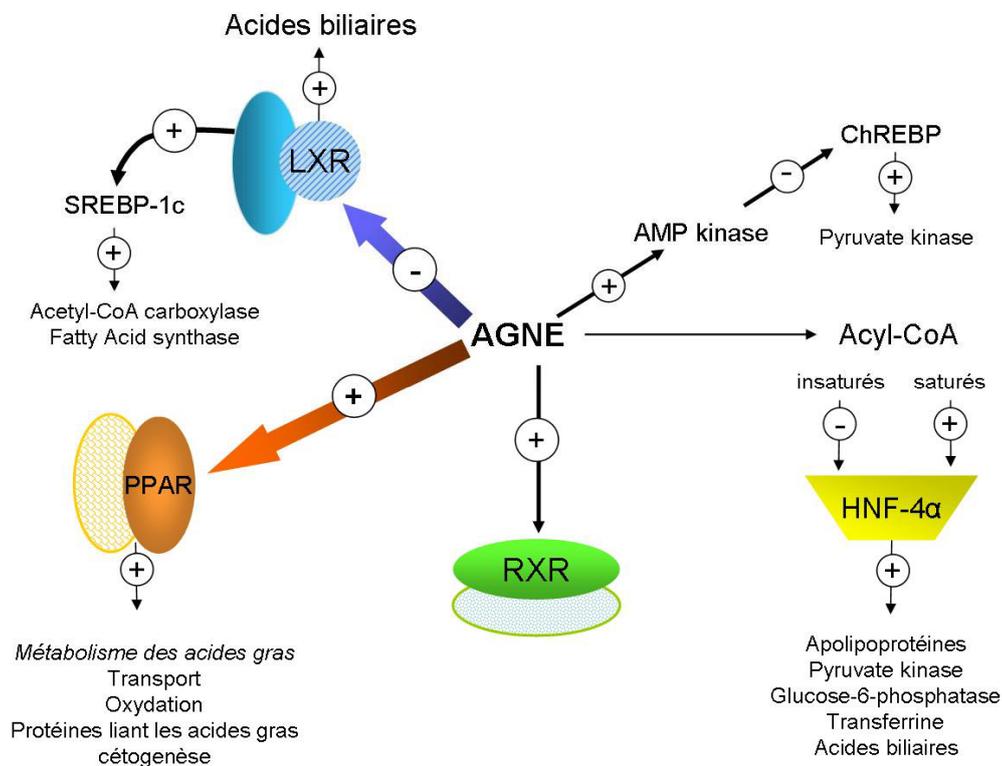
C75 inhibe la FAS, altère l'activité de l'AMPK pour moduler l'expression de gènes, dans les neurones du noyau arqué. AMPK : AMP-activated protein kinase, CPT-1 : carnitine palmitoyl transférase 1, FAS : fatty acid synthase, Raf/Mek/MAPK/RSK: cascade de kinases, CREB : cAMP response element-binding, NPY: NeuroPeptide Y. D'après (Kim et coll. 2004).

Une des difficultés de compréhension de ces mécanismes centraux vient de l'intégration de l'ensemble des signaux hormonaux. En effet, les centres hypothalamiques contrôlant le niveau d'énergie doivent intégrer des signaux multiples, notamment les statuts glucidiques, lipidiques et hormonaux.

## **II.5 Les récepteurs nucléaires: des "senseurs" intracellulaires**

Un changement de composition lipidique, une adaptation à trop ou trop peu d'apport en lipides ont des effets sur l'expression de gènes (Clarke and Jump 1994; Jump et coll. 1996). Ces effets génomiques font intervenir des récepteurs nucléaires (par exemple les PPARs) dont l'activité et/ou l'abondance sont contrôlées par les acides gras ou leur métabolites. Ces actions, contrôlées et coordonnées entre les différents organes, font actuellement dire de ces facteurs nucléaires qu'ils sont de véritables "senseurs" de lipides (pour revue (Grimaldi 2007)) et sont capables d'adapter le métabolisme et le développement de différents tissus en fonction des disponibilités en lipides.

Les acides gras, le cholestérol, les acides biliaires et leurs dérivés métaboliques sont des ligands de différents récepteurs nucléaires, tels que LXR, PPAR, HNF-4 $\alpha$  (liste non exhaustive). Je vais présenter essentiellement le "sensing" des acides gras, et comment il est abordé par l'action de ces "senseurs", considérés comme de véritables relais de signalisation intracellulaire. Ces différents détecteurs relaient les effets transcriptionnels des acides gras soit par la liaison directe à l'ADN (PPAR, LXR, HNF-4 $\alpha$ ) soit de façon indirecte en modulant l'abondance d'autres facteurs transcriptionnels (SREBP, ChREBP), Figure 29.



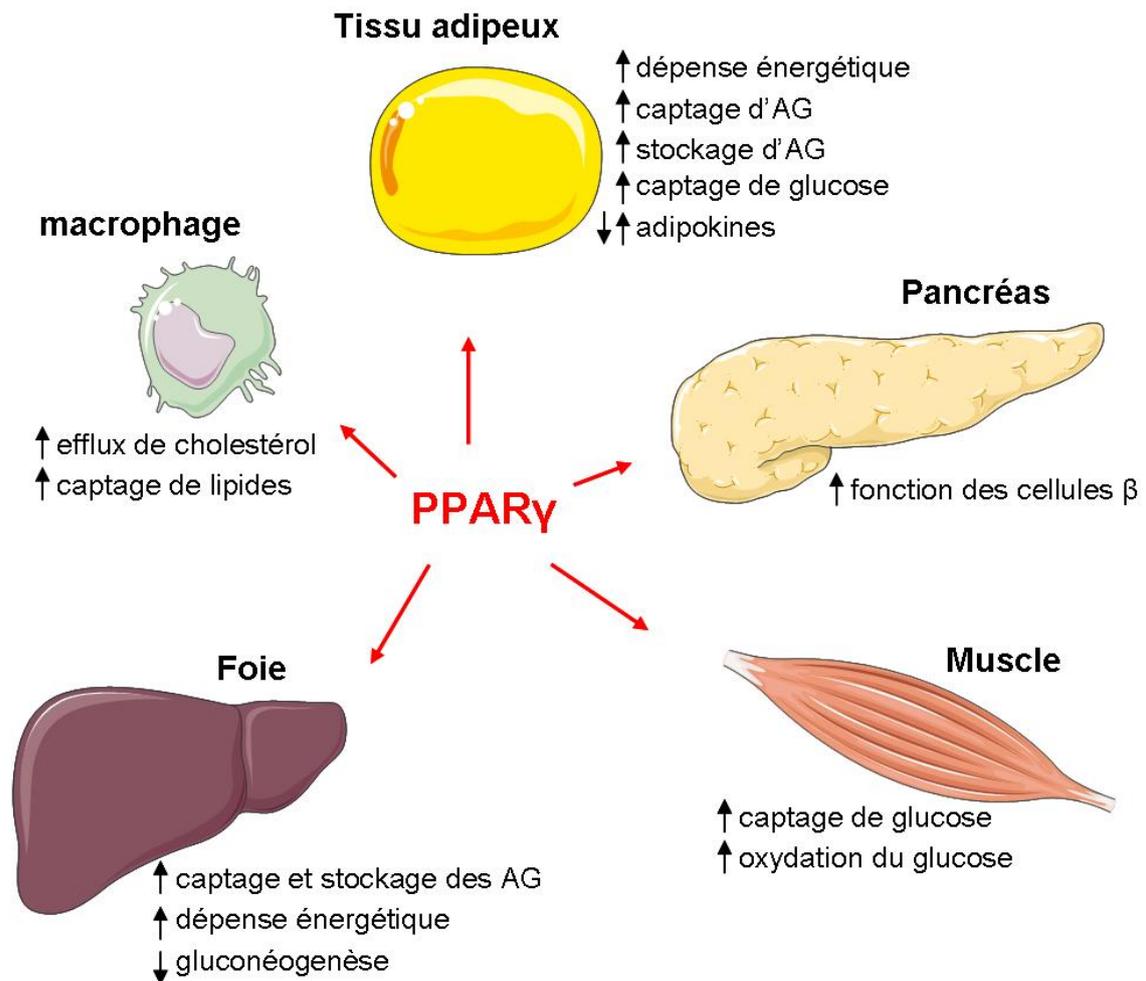
**Figure 29: Vue générale des récepteurs nucléaires "senseurs" d'acides gras (représentation schématique).** Les Acides Gras Non Estérifiés (AGNE) ou leur forme-CoA régulent la transcription de gènes cibles *via* l'interaction directe avec les facteurs nucléaires PPAR, LXR, HNF-4 $\alpha$ . Les acides gras peuvent inhiber de façon indirecte la transcription de gènes codant des enzymes lipogéniques ou la pyruvate kinase du foie, *via* une réduction de l'abondance nucléaire de facteurs de transcription tels que SREBP-1c ou ChREBP (Carbohydrate response element binding protein). RXR pourrait également être considéré comme "senseur" d'acides gras. D'après (Pegorier et coll. 2004)

Parmi les récepteurs nucléaires régulés par les acides gras, les PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptors) sont ceux qui ont été le plus largement étudiés pour leur rôle de "senseurs". Ils sont exprimés dans de nombreux tissus et sont impliqués dans la régulation du captage, du stockage, et de l'utilisation des lipides. Il en existe plusieurs isoformes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ). La modulation d'expression de gènes est due à la liaison

d'hétérodimères PPAR/RXR (Retinoic X Receptor) à une séquence d'ADN spécifique, l'élément de réponse au proliférateur de peroxyosome (PPRE) (pour revue (Desvergne et coll. 2006)). Parmi les ligands des PPARs, les acides gras, en particulier les acides gras insaturés, lient les PPARs au niveau d'une poche du LBD (Ligand Binding Domain), ce qui entraîne le recrutement de coactivateurs, essentiel pour l'interaction avec la machinerie transcriptionnelle.

PPAR $\alpha$  et PPAR $\beta/\delta$  participent au contrôle de l'absorption lipidique dans l'intestin grêle en régulant de façon positive des gènes, telle que la L-FABP (L type Fatty acid binding protein) (Poirier et coll. 1996). Les PPARs, et notamment les PPAR $\gamma$  sont exprimés dans le tissu adipeux blanc, et participent à la régulation de la masse de ce tissu (pour revue (Rosen et coll. 2000)). Chez les sujets sains, les PPARs jouent un rôle important dans la régulation de l'oxydation des acides gras, notamment en période de jeûne, où les acides gras sont relargués par le tissu adipeux et utilisés au niveau du foie et des muscles squelettiques comme source d'énergie. Le jeûne augmente l'expression de PPAR $\alpha$  au niveau du foie (Lemberger et coll. 1996), et l'expression de PPAR $\beta/\delta$  au niveau des muscles squelettiques (Holst et coll. 2003). De telles augmentations d'activité des PPARs régulent positivement des gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras dans ces tissus.

Les PPARs peuvent lier une grande variété d'acides gras et régulent en retour la plupart des voies en lien avec le métabolisme lipidique. C'est l'action coordonnée de ces facteurs de transcription, notamment PPAR $\gamma$  (Figure 30), au niveau des tissus périphériques qui permet actuellement de les considérer comme des "senseurs" de lipides. L'action locale sur l'expression de gènes a des répercussions sur l'homéostasie générale, en adaptant les réponses dans les différents tissus aux conditions d'apport en lipides, ce qui mène à une utilisation efficace, physiologique de tels substrats énergétiques (Grimaldi 2007).



**Figure 30: Effets physiologiques de l'activation de PPAR $\gamma$ .**

PPAR $\gamma$  induit la différenciation adipocytaire et active des gènes impliqués dans le stockage de lipides. Les acides gras (AG) en provenance du plasma sont dirigés vers le tissu adipeux au détriment du muscle squelettique, lequel augmente son captage et son utilisation de glucose. Les effets directs de PPAR $\gamma$  sont aussi observés dans le foie, avec une diminution de la néoglucogenèse et une augmentation du captage et du stockage d'acides gras. De plus, l'activation de PPAR $\gamma$  conduit à une augmentation de l'efflux de cholestérol et du captage des LDL oxydées par les macrophages, en augmentant l'expression de ABCA1 et de CD36 respectivement (d'après (Auwerx et coll. 2003)).

Il existe d'autres récepteurs nucléaires sensibles aux lipides, tel que LXR (Liver X Receptors). Leurs activateurs endogènes sont les oxystérols et autres dérivés du métabolisme du cholestérol. Les LXRs participent à la détection du cholestérol de l'organisme entier et régulent de façon importante le métabolisme du cholestérol et aussi des acides gras (pour revues (Tontonoz and Mangelsdorf 2003; Cummins and Mangelsdorf 2006)). De façon comparable aux PPARs, il existe des isoformes de LXR: LXR $\alpha$  est exprimé dans le foie, le rein, le tissu adipeux, les macrophages; LXR $\beta$  est ubiquitaire. Les LXRs hétérodimérisent avec RXR pour se lier à l'ADN sur leur élément de réponse. La capacité des ligands de LXR à diminuer l'absorption intestinale de cholestérol (Repa et coll.

2000) semble être médiée par l'induction de l'expression des transporteurs ABCG5 et ABCG8 (Repa et coll. 2002) et par la répression de l'expression de NPC1L1 (Duval et coll. 2006). Ces transporteurs, localisés dans la membrane apicale, forment un hétérodimère fonctionnel qui agit en limitant l'absorption du cholestérol et des stérols de plantes au niveau intestinal, et médie l'efflux de cholestérol des hépatocytes dans la bile (Graf et coll. 2002; Yu et coll. 2002). LXR est considéré comme un régulateur central de l'homéostasie du cholestérol, en jouant un rôle de "valve" de sécurité pour limiter la quantité de cholestérol libre dans les tissus confrontés à de grands flux de cholestérol (Cummins and Mangelsdorf 2006).

Si les deux récepteurs nucléaires décrits ci-dessus sont à ce jour considérés dans la littérature comme des "senseurs" intracellulaires de lipides, et acteurs centraux du contrôle de l'homéostasie, il n'en est pas encore de même pour le facteur de transcription HNF-4 $\alpha$  (Hepatic Nuclear Factor 4), impliqué cependant dans la régulation de nombreux gènes, notamment du métabolisme lipidique. Néanmoins, je le présente comme "senseur" intracellulaire de lipides, et sans doute relais d'une détection plus précoce des lipides alimentaires, que je présenterai dans la partie expérimentale et dont je discuterai.

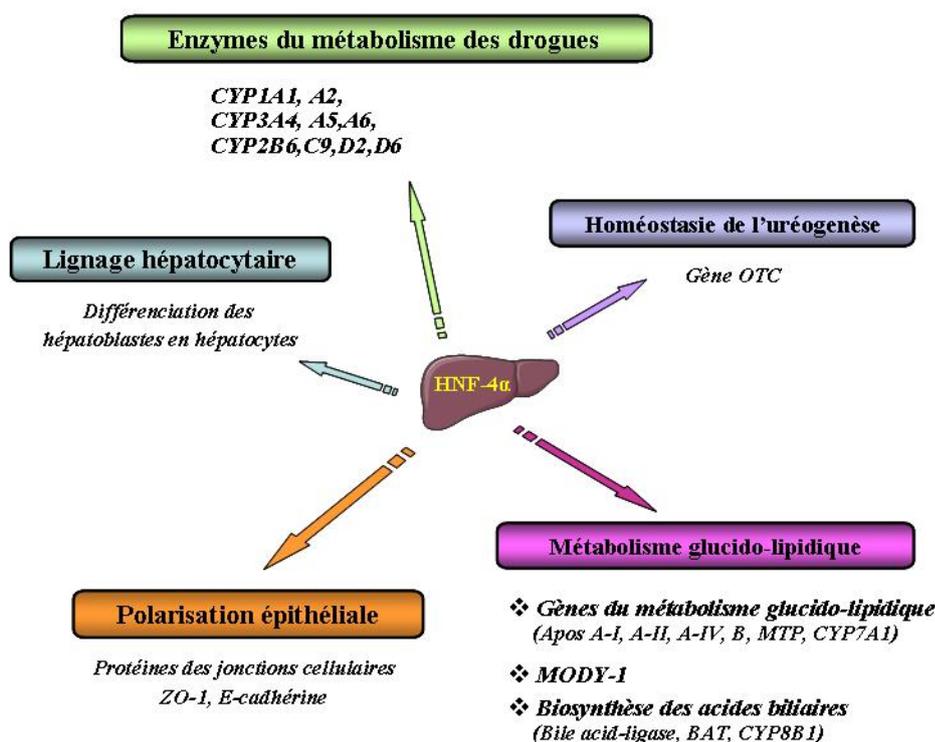
De nombreuses études ont montré que HNF-4 $\alpha$  joue un rôle majeur au niveau hépatique. Des approches récentes *in vivo* et *in silico* suggèrent un rôle clé à HNF-4 dans la fonction des cellules épithéliales intestinales (pour revue (Ribeiro et coll. 2007)). HNF-4 $\alpha$  est un récepteur nucléaire, principalement exprimé dans le foie, l'intestin et les cellules pancréatiques  $\beta$ . Il se lie en homodimère sur des éléments de réponse, nommés HRE pour Hormone Responsive Element.

L'invalidation tissu-spécifique de HNF-4 $\alpha$ , de façon constitutive ou inductible, a permis de détecter, dans l'épithélium hépatique principalement, les rôles pléiotropes que joue HNF-4 $\alpha$  pour la mise en place, la différenciation et la polarisation de ces cellules épithéliales (pour revue (Ribeiro et coll. 2007)). La perte de HNF-4 $\alpha$  a des effets dramatiques sur l'expression de gènes hépatiques, comme les apolipoprotéines A-I, A-II, B, C-II, CIII, la L-fatty acid binding protein, dont les niveaux d'ARN messagers deviennent quasiment indécélables (Li et coll. 2000). L'analyse par micro-array de l'invalidation de HNF-4 $\alpha$  dans le foie foetal, montre que les gènes codant les protéines des différentes catégories de jonctions cellulaires (adhérentes, desmosomes, serrées) sont des cibles de HNF-4 $\alpha$  (Battle et coll. 2006). Dans les cellules épithéliales intestinales les jonctions

cellulaires dépendantes de la E-Cadhérine sont capables de moduler les niveaux de HNF-4 $\alpha$  nucléaires (Peignon et coll. 2006).

Des mutations dans le gène de HNF-4 $\alpha$  sont associées à une forme de diabète de type 2 chez l'Homme, MODY-1 (Maturity Onset Diabetes of the Young-1). *In vivo*, des études d'inactivation conditionnelle de HNF-4 $\alpha$  dans le foie de souris adulte, souligne le rôle clé de HNF-4 $\alpha$  dans la fonction hépatique par son contrôle de l'expression de gènes du métabolisme glucido-lipidique (Hayhurst et coll. 2001).

Les effets pléiotropes de HNF-4 $\alpha$  sont résumés dans la Figure 31.



**Figure 31: Résumé des effets pléiotropes de HNF-4 $\alpha$  dans le foie.** De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont montré que HNF-4 $\alpha$  joue un rôle majeur dans la fonction hépatique. (D'après (Ribeiro et coll. 2007)).

*In vivo* et *ex vivo*, l'induction de la transcription du gène de l'apoA-IV par les lipides intestinaux est contrôlée par HNF-4 $\alpha$  (Carriere et coll. 2005). HNF-4 $\alpha$  a été longtemps considéré comme un récepteur nucléaire orphelin, car aucun ligand endogène n'avait été identifié. Depuis on sait que les acyl-CoA saturés et insaturés lient HNF-4 $\alpha$ , mais tandis que les premiers stimulent l'activité transcriptionnelle de HNF-4 $\alpha$ , les seconds inhibent les effets de HNF-4 $\alpha$  sur la transcription de gènes (Hertz et coll. 1998; Rajas et coll. 2002;

Hertz et coll. 2003), mais il est possible que cette liaison d'acides gras soit plus structurelle que fonctionnelle (Wisely et coll. 2002).

L'ensemble de ces effets fait de HNF-4 $\alpha$  un récepteur nucléaire central, capable d'orchestrer des effets métaboliques différents, associés à sa capacité de liaison de ligands lipidiques, laissant penser que HNF-4 pourrait être aussi un "senseur" intracellulaire de lipides.

**Comme nous avons pu le voir dans ce chapitre, la notion de détection de nutriments est très variable, et dépend du niveau d'observation que l'on choisit, (membranaire, intracellulaire, circulant, central, systémique, ..). Il est cependant à noter que, quelque soit le niveau choisi, ce sont les relations entre ces différents systèmes qui vont mener à une perception générale de l'état énergétique, l'organisme intégrant les différents signaux et répondant au mieux pour maintenir un état adapté à la situation. Les résultats précédemment obtenus dans l'équipe permettent en particulier d'envisager qu'il existe au niveau intestinal une détection des lipides alimentaires arrivant sous forme micellaire, qui impliquerait un détecteur membranaire apical et dont HNF-4 pourrait être un relais intracellulaire. Cette détection pourrait permettre l'adaptation de l'intestin à l'apport massif de lipides en situation post-prandiale.**

## **Chapitre III. Détecteurs potentiels des lipides alimentaires micellaires au niveau de la membrane apicale des entérocytes**

Comme cela a été présenté dans le chapitre I, les lipides arrivent dans la lumière intestinale, au contact de la membrane apicale des entérocytes, sous forme de micelles constituées des produits d'hydrolyse des lipides alimentaires associés aux sécrétions biliaires. Or, ce mode physiologique de présentation des lipides alimentaires dans la lumière intestinale a été peu pris en compte dans les travaux réalisés jusqu'à présent pour étudier la détection des lipides alimentaires. Sans exclure la participation de détecteurs intracellulaires des lipides, l'objectif de ce chapitre est de présenter les protéines exprimées à la membrane apicale des entérocytes pouvant jouer un rôle dans les étapes précoces de la détection entérocytaire des lipides alimentaires. En effet, ces protéines présentes à la membrane apicale des entérocytes sont les premières à être en contact avec les micelles lipidiques et donc plus à même de les détecter et d'activer des voies de signalisation.

### **III.1 La cavéoline-1**

Les cavéolines sont une famille de protéines membranaires de 21 à 25 kDa, impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'endocytose, la transcytose, le transport du cholestérol et la transduction de signaux (Gratton et coll. 2004), et de nombreuses pathologies chez l'Homme (cancers, diabète, maladie d'Alzheimer et dystrophies musculaires) (Engelman et coll. 1998).

Actuellement, il a été décrit 3 gènes codant les cavéolines. Les cavéoline-1 et cavéoline-2 sont exprimées de façon ubiquitaire (Scherer et coll. 1995; Scherer et coll. 1996; Scherer et coll. 1997), tandis que la cavéoline-3 est principalement exprimée dans le muscle (Song et coll. 1996; Tang et coll. 1996; Parton et coll. 1997). La cavéoline-1 peut lier les acides gras, ce qui lui confère un rôle potentiel dans le trafic des lipides, de la membrane plasmique vers les compartiments intracellulaires tels l'appareil de Golgi ou le réticulum endoplasmique où la cavéoline circule sans cesse. Cela suggère aussi que la liaison des acides gras pourrait moduler les événements de signalisation qui sont sous le contrôle de la cavéoline-1 (Trigatti et coll. 1999). Les cavéolines insérées dans le feuillet interne de la membrane plasmique sont les composants structurels des cavéoles (Rothberg et coll. 1992). Les cavéoles, invaginations de 50 à 100 nanomètres à la surface cellulaire, sont abondantes dans de nombreux types cellulaires. Elles sont localisées dans des

domaines particuliers de la membrane plasmique enrichis en cholestérol, en glycosphingolipides et en sphingomyélines, les rafts (Parton and Simons 2007).

Au niveau intestinal, la localisation de la cavéoline-1 est moins stricte. En effet, dans les cellules épithéliales intestinales, les domaines rafts isolés en tant que membranes résistantes au détergent sont hétérogènes quant à leur composition en cavéoline-1. Il y a, à la surface apicale des entérocytes, un trafic permanent de membranes entre les membranes des microvillosités, et les membranes non microvillositaires (notamment au niveau du compartiment subapical (SAC)) (Hansen et coll. 2003b). On retrouve la cavéoline-1 associée aux rafts dans les fractions non microvillositaires, tandis qu'on ne la retrouve pas associée aux rafts dans les fractions villositaires de la membrane apicale des entérocytes (Hansen et coll. 2003b).

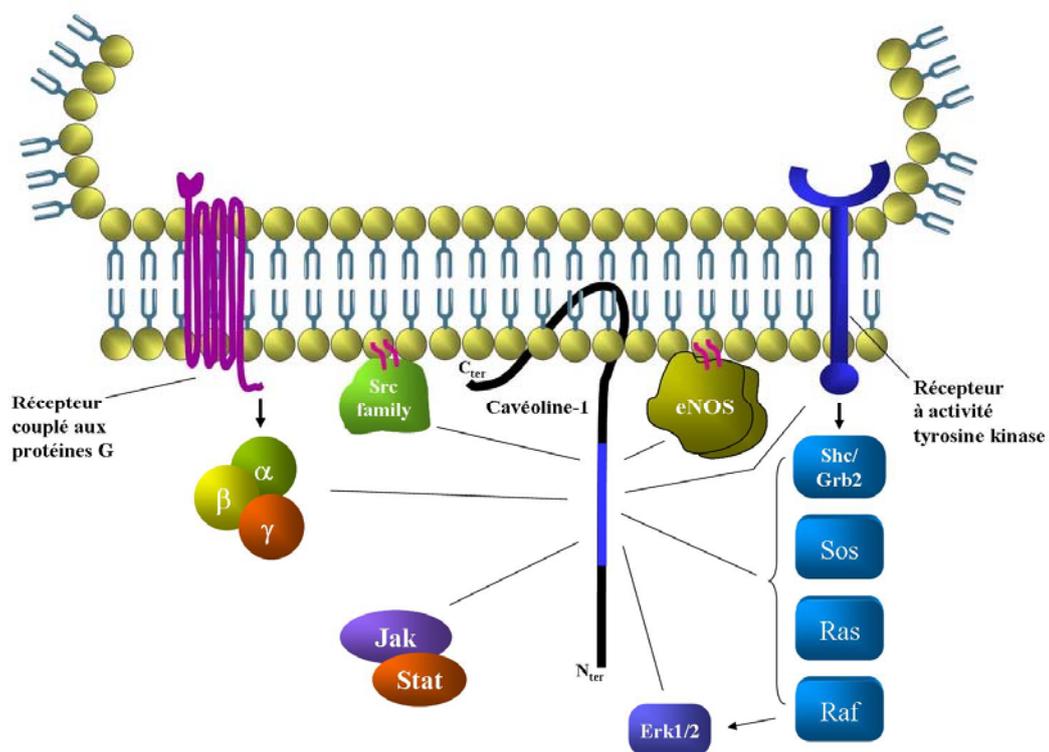
La cavéoline-1 possède des extrémités N et C terminales cytoplasmiques qui peuvent subir des modifications post traductionnelles. L'extrémité C terminale a plusieurs cystéines qui peuvent être S-acylées par palmitoylation (Dietzen et coll. 1995). Elle contient, au cœur de sa séquence, une succession de 33 acides aminés hydrophobes, qui définissent un segment inséré dans le feuillet interne de la membrane plasmique, cependant aucune partie de la protéine n'est située du côté extracellulaire (Smart et coll. 1999).

Ces différents éléments pourraient remettre en question sa légitimité à être un récepteur membranaire des lipides alimentaires micellaires.

Pourtant la cavéoline-1 peut lier le cholestérol (Murata et coll. 1995), ce qui d'ailleurs favorise la formation d'oligomères de cavéoline (Smart et coll. 1999). Les cavéoles et la cavéoline-1 peuvent moduler l'influx ou l'efflux de cholestérol vers des accepteurs de cholestérol tels que les LDL et les HDL, qui sont des lipoprotéines de faible et haute densité respectivement (Gratton et coll. 2004). Le cholestérol de la membrane plasmique, un composant clé des cavéoles et des rafts, peut ainsi modifier la fluidité membranaire et la diffusion de nombreuses molécules de signalisation (Gratton et coll. 2004). La cavéoline-1 peut former des hétérocomplexes, notamment avec l'annexine-2, permettant le trafic du cholestérol exogène des cavéoles vers le réticulum endoplasmique (Uittenbogaard et coll. 2002). Les annexines sont une famille de protéines liant les phospholipides de manière calcium dépendante, impliquées dans de nombreux processus cellulaires (Gerke and Moss 2002). *In vivo*, sur des animaux hypercholestérolémiques dans des conditions de régime riche en lipides, le complexe cavéoline-1/annexine-2 est résistant aux détergents mais peut être désassemblé par l'ezetimibe, un puissant inhibiteur de l'absorption intestinale du cholestérol (Smart et coll. 2004). Cependant, une étude sur des

souris invalidées pour le gène de la cavéoline-1 montre que l'absence de cavéoline-1, non compensée par les autres cavéolines, ne présente pas de défaut dans le transport intestinal du cholestérol, et le traitement à l'ezetimibe a le même effet (diminuer l'absorption du cholestérol) sur les souris sauvages et sur les souris cav-1 KO (Valasek et coll. 2005).

La cavéoline-1 est impliquée dans la transduction de signaux, en grande partie grâce à la présence d'un domaine de 20 acides aminés, de 82 à 101, qui peut interagir avec une grande variété de protéines de signalisation, telles que c-SRC, d'autres kinases, le récepteur à l'insuline, la eNOS, H-Ras, et d'autres sous-unités alpha de protéines G (Okamoto et coll. 1998). Ce domaine est appelé domaine d'échafaudage de la cavéoline (Figure 32).



**Figure 32: Représentation schématique de la cavéoline-1 au sein d'un domaine cavéolaire.**  
D'après (Gratton et coll. 2004)

La cavéoline-1 interagit avec des protéines des voies de signalisation, Ras-Raf, Erk1/2 (extracellular signal-regulated kinases) et Janus kinases (Jak)-Stat. La NO synthase endothéliale et les kinases de la famille Src peuvent être dirigées aux cavéoles et interagir avec la cavéoline-1, au niveau du domaine d'échafaudage (en bleu, Figure 32) du côté N-terminal; v-Src peut phosphoryler la tyrosine 14 de l'extrémité N de la cavéoline-1 (Gratton et coll. 2004).

## **III.2 Le récepteur CD36**

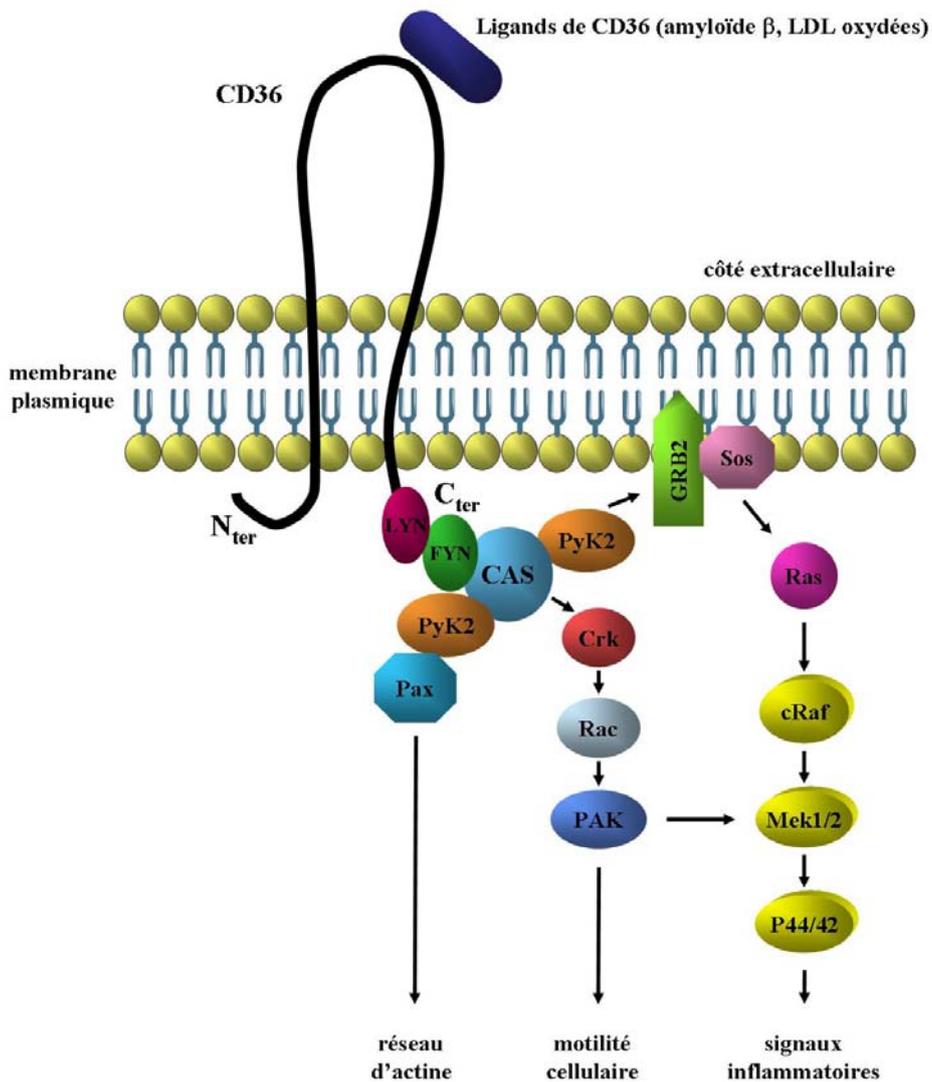
Après avoir présenté CD36, dans le chapitre II, pour sa fonction de détecteur du goût du gras, le voici présenté ici comme candidat potentiel à la détection intestinale des lipides.

CD36 lie un grand nombre de ligands, tels que les lipoprotéines natives et modifiées (Endemann et coll. 1993; Calvo et coll. 1998), les phospholipides anioniques (Rigotti et coll. 1995), le cholestérol (Werder et coll. 2001) et les acides gras (Abumrad et coll. 1993), ainsi que la thrombospondine-1, le collagène, l'amyloïde bêta (Febbraio et coll. 2001). Le récepteur CD36 est également capable de lier les lipoprotéines natives, HDL, LDL et VLDL ainsi que les LDL oxydées ou acétylées. La capacité de CD36 à interagir avec la plupart des lipoprotéines (capacité partagée par le récepteur SR-BI), lesquelles diffèrent dans leur composition en apolipoprotéines, soulève la question de la nature structurale du ligand reconnu sur chaque type de lipoprotéine. La capacité de CD36 à lier les acides gras à longue chaîne (Abumrad et coll. 1993), l'inhibition partielle de la liaison de LDL oxydées par l'acide oléique (Nicholson et coll. 1995), la capacité de la phosphatidylsérine et du phosphoinositol à interagir avec CD36 et à entrer en compétition avec la liaison de LDL acétylées (Rigotti et coll. 1995) sont autant d'éléments qui suggèrent fortement que les acides gras présents dans les lipoprotéines pourraient constituer des éléments de structure reconnus par le récepteur CD36. La liaison de HDL sans apoE sur CD36 vient renforcer cette hypothèse (Calvo et coll. 1998).

Dans les cellules épithéliales intestinales de rat, CD36 est localisé dans la membrane apicale de la bordure en brosse et principalement dans le duodénum et le jéjunum (Poirier et coll. 1996; Chen et coll. 2001). Chez l'Homme, CD36 est localisé dans la membrane en bordure en brosse de l'épithélium intestinal proximal mais n'est pas exprimé dans les cellules Caco-2, ce qui pourrait s'expliquer par son origine colique, où il n'est pas exprimé non plus (Lobo et coll. 2001). Cependant plusieurs études du groupe d'Abumrad, réalisées *in vivo* sur des souris invalidées pour le récepteur CD36, ont montré qu'il n'est pas impliqué dans le captage d'acides gras par les entérocytes, malgré une diminution significative de sécrétion de chylomicrons, lui suggérant un rôle dans l'adressage des acides gras vers le pool de sécrétion des triglycérides dans les entérocytes (Drover et coll. 2005). Ce même groupe a récemment réexaminé le rôle de CD36 dans le captage de lipides. Il en ressort que CD36 est important pour le captage de cholestérol (Nauli et coll. 2006) et aussi pour les acides gras, mais ces observations ne sont valables que pour la partie proximale de l'intestin, pas pour la partie distale (Nassir et coll. 2007). L'invalidation de

CD36 dans ces souris mène à une augmentation de la protéine NPC1L1 sur la partie distale de l'intestin, ne modifiant pas ainsi l'absorption totale de cholestérol (Nassir et coll. 2007). Il est intéressant de noter les interactions fonctionnelles qui doivent exister entre CD36 et NPC1L1.

De par son large spectre de ligands, la fonction de CD36, notamment *via* son extrémité C terminale cytoplasmique, a été étudiée dans de nombreux contextes différents. En l'occurrence, dans la maladie d'Alzheimer, le dépôt extracellulaire de  $\beta$  amyloïde fibrillaire provoque un recrutement local de microglie, ce qui est un marqueur de plaques séniles. Sans développer sur la maladie d'Alzheimer, il faut juste savoir que la microglie constitue le système immunitaire du système nerveux central, qui, activé par l'amyloïde bêta, déclenche une cascade d'événements menant à l'inflammation et à la neurotoxicité associées à la maladie. La microglie exprime de nombreux récepteurs dont des récepteurs scavengers, SR-A, SR-BI et CD36. CD36 participe à la réorganisation du cytosquelette de la microglie en envoyant des signaux au cytosquelette d'actine et régulant la migration cellulaire (Stuart et coll. 2007). L'extrémité C-terminale intracellulaire de CD36, activée en présence de ligand, recrute le complexe protéique P130 Cas/Pyk2/paxillin pour initier une cascade de signalisation proinflammatoire (Stuart et coll. 2007). Dans un autre contexte, qui est celui de l'athérosclérose, le développement et l'accumulation de cellules spumeuses sont liés à l'internalisation en masse de LDL oxydées, dépendante de récepteurs "scavengers". L'extrémité C-terminale cytoplasmique de CD36 interagit avec MEKK2 et ce recrutement est dépendant de l'interaction de CD36 avec Lyn (Rahaman et coll. 2006). L'exposition de macrophages à des LDL oxydées favorise cette interaction, augmente le niveau de phosphorylation de MEKK2 et Lyn, et déclenche l'activation de MAP kinases, telles que JNK1 et JNK2, dépendante de CD36 (Rahaman et coll. 2006), Figure 33.



**Figure 33: Différentes voies de signalisation activées par le récepteur CD36**  
d'après (Stuart et coll. 2007)

Cette capacité à déclencher des signaux intracellulaires en réponse à un ligand est en faveur du rôle d'un détecteur membranaire signalisant l'apport de lipides, dans le contexte entérocytaire. Mais son absence d'expression dans le modèle cellulaire Caco-2, où nous verrons que l'apport de micelles lipidiques contenant les produits de digestion des triglycérides alimentaires induit toute la cascade d'événements conduisant à la sécrétion de LRT, nous laisse penser qu'il n'est pas le détecteur, ou l'unique détecteur, envisageable.

### **III.3 Les transporteurs FATP4 et FABPpm**

Les FATPs (Fatty Acids Transport Proteins) sont, comme leur nom l'indique, des protéines de transport des acides gras. Ces protéines ont aussi une activité enzymatique d'acyl-CoA synthetase (Hall et coll. 2005). Les FATPs sont des protéines transmembranaires de 70 à 80 kDa, avec l'extrémité N-terminale du côté extracellulaire et l'extrémité C-terminale du côté cytosolique. Chez l'Homme et la souris, elles sont principalement exprimées dans les tissus impliqués dans le métabolisme des acides gras (Fitscher et coll. 1998; Hirsch et coll. 1998), à savoir le tissu adipeux, le foie, le cœur, les reins et l'intestin. C'est en 1999, que l'équipe de Stahl démontre que FATP4 est le transporteur majoritaire intestinal d'acides gras (Stahl et coll. 1999). Les ARNm de FATP4 sont présents dans les villosités intestinales, et très fortement exprimés au niveau du jéjunum et de l'iléon (Stahl et coll. 1999). FATP4 est localisé au niveau apical des entérocytes, dans la membrane en bordure en brosse (Stahl et coll. 1999); il est requis pour le captage efficace d'acides gras à longue chaîne à travers la membrane plasmique des entérocytes. La surexpression de FATP4 dans les cellules 293, cellules humaines de rein embryonnaire, augmente le captage de ces acides gras à longue chaîne (Stahl et coll. 1999). Cependant, la localisation cellulaire de FATP4 a été remise en cause en 2006 par l'équipe de Milger qui ne trouve pas de FATP4 localisée à la membrane plasmique, mais dans le réticulum endoplasmique, cela n'empêchant pas de corrélérer le niveau d'expression de FATP4 à l'efficacité de captage d'acides gras, excluant ainsi la nécessité d'une localisation dans la membrane plasmique (Milger et coll. 2006). Le captage d'acides gras serait dépendent de l'activité enzymatique acyl-CoA synthétase de FATP4, qui estérifie les acides gras. Il n'y pas beaucoup d'informations sur le rôle physiologique de FATP4 *in vivo*. La délétion des deux allèles de *FATP4* est délétère au niveau embryonnaire (Gimeno et coll. 2003). En revanche, la délétion d'un seul allèle ne modifie pas l'absorption intestinale de lipides, que ce soit en régime standard ou en régime enrichi en lipides *in vivo*; il diminue cependant le captage d'acides gras à longues chaînes sur des entérocytes isolés (Gimeno et coll. 2003).

Le premier transporteur putatif d'acides gras à avoir été identifié fut FABPpm (Fatty Acid Binding Protein plasma membrane) (Stremmel et coll. 1985a) dans des membranes plasmiques de foie de rat. Ce transporteur est exprimé dans les hépatocytes, les adipocytes, les entérocytes, les myocytes (Stremmel et coll. 1985a; Stremmel et coll. 1985b; Fujii et coll. 1987; Schwieterman et coll. 1988) et les cellules Caco-2 (Trotter et

coll. 1996). Le captage d'acides gras à longue chaîne est saturable. Ce captage est inhibé dans de nombreux types cellulaires (Schwieterman et coll. 1988; Sorrentino et coll. 1988; Stremmel 1988), par l'utilisation d'anticorps dirigés contre FABPpm, mais pas inhibé dans les cellules Caco-2 (Trotter et coll. 1996). Le rôle de FABPpm comme transporteur d'acides gras à longues chaînes fut contesté par la découverte de son homologie avec l'isoforme mitochondriale de l'enzyme aspartate aminotransferase (mAspAT) (Berk et coll. 1990; Stump et coll. 1993). Les principales études récentes portent essentiellement sur le rôle de FABPpm au niveau du muscle squelettique, et de l'influence du régime et de l'exercice sur ce transporteur (pour revue (Roepstorff et coll. 2004)).

### **III.4 Le transporteur ASBT**

L'Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter ou ASBT, a été cloné en 1994 par l'équipe de Dawson, d'abord dans l'iléon de hamster, puis chez la souris, le rat, le lapin et l'Homme (Wong et coll. 1994; Shneider et coll. 1995; Wong et coll. 1995; Kramer et coll. 1999; Saeki et coll. 1999). Ce transporteur d'acide biliaire est une protéine glycosylée de 348 acides aminés et de poids moléculaire de 48 kDa. Il s'agit d'un transporteur couplé à un transport de sodium avec une stoechiométrie de 2 sodium pour 1 acide biliaire transporté (Weinman et coll. 1998). Chez l'Homme, ce transporteur semble fonctionner en monomère, même s'il y a des éléments qui suggèrent une dimérisation (Weinman et coll. 1998). ASBT est fortement exprimé au niveau de l'iléon, du tubule proximal rénal et de l'épithélium biliaire (Lazaridis et coll. 1997; Craddock et coll. 1998). Les études réalisées prédisent une ressemblance avec NTCP (son orthologue hépatique), c'est-à-dire composé de 7 domaines transmembranaires, et des études *in silico* suggèrent l'existence de quatre domaines distincts de liaison (Zhang et coll. 2004). Les mutations héréditaires de ASBT chez l'Homme menant à un syndrome de malabsorption des acides biliaires primaires, c'est-à-dire ceux synthétisés par les hépatocytes à partir du cholestérol, suggèrent qu'ASBT intervient dans les mécanismes de réabsorption intestinale des acides biliaires (Oelkers et coll. 1997). Des souris invalidées pour le gène ASBT présentent une malabsorption intestinale et une absence de circulation entéro-hépatique des acides biliaires (Dawson et coll. 2003) mettant ainsi en évidence le rôle essentiel d'ASBT *in vivo* dans l'absorption intestinale de lipides biliaires. Les acides biliaires exerçant, dans le cycle entéro-hépatique, un rétrocontrôle négatif sur leur propre synthèse hépatique à partir du cholestérol, la taille du pool circulant d'acides biliaires est donc un facteur essentiel influençant l'homéostasie des lipides et du cholestérol (Hofmann 1999; Redinger 2003).

### **III.5 Le transporteur NPC1L1**

En 2004, Altmann et coll annonçaient, par une approche génomique et bioinformatique, que NPC1L1 est le transporteur responsable de l'absorption intestinale du cholestérol (Altmann et coll. 2004). Cette protéine, mise en évidence en 2000 par le groupe de Ioannou (Davies et coll. 2000), appartient à la famille des gènes Niemann-Pick C (NPC) dont les mutations sur les gènes NPC1 et NPC2 sont responsables d'une pathologie lysosomale caractérisée, au niveau cellulaire, par une accumulation intracellulaire de lipides et en particulier de cholestérol non estérifié (Sevin et coll. 2007). La séquence protéique de NPC1L1 présente 42% d'identité avec la protéine NPC1 (Davies et coll. 2000) qui est localisée dans les compartiments endosomaux et lysosomaux (Higgins et coll. 1999; Patel et coll. 1999). NPC1L1 possède un motif YQRL d'adressage de la membrane plasmique au réseau trans-Golgi, suggérant que les localisations et adressages des deux protéines NPC1 et NPC1L1 sont différentes. Les deux protéines ont en commun 13 domaines membranaires, un domaine N terminal conservé, sont théoriquement très glycosylées, et contiennent des domaines sensibles au stérol dans leur région promotrice (Davies et coll. 2000).

NPC1L1 est majoritairement exprimé au niveau gastro-intestinal chez la souris, le rat et majoritairement au niveau hépatique chez l'Homme (Davies et coll. 2005). NPC1L1 est exprimé de façon plus importante au niveau du jéjunum proximal, là où l'absorption du cholestérol est prédominante. La localisation intracellulaire de NPC1L1 est actuellement très controversée. Dans les cellules hépatiques HepG2, NPC1L1 est essentiellement exprimé au niveau intracellulaire où il co-localise avec la GTPase Rab5 (Davies et coll. 2005), et à la membrane des canalicules d'hépatocytes en culture primaire issus de souris transgéniques exprimant la forme humaine de NPC1L1 (Temel et coll. 2007). Dans les entérocytes de souris, NPC1L1 est retrouvé au niveau de la membrane en bordure en brosse (Altmann et coll. 2004). Un autre groupe montre que NPC1L1 est localisé à la membrane apicale des entérocytes mais aussi dans les compartiments lysosomaux, endosomaux, et mitochondriaux dans le jéjunum humain et dans la lignée Caco-2 (Sane et coll. 2006). Enfin, une étude sur lignée cellulaire d'hépatome exprimant NPC1L1 de façon stable a montré un trafic de NPC1L1 entre les compartiments endosomaux et la membrane plasmique, celui-ci semblant dépendre de la disponibilité en cholestérol (Yu et coll. 2006).

Cependant, quelque soit le tissu, foie ou intestin, NPC1L1 est la cible de l'ezetimibe (Garcia-Calvo et coll. 2005; Temel et coll. 2007). Dans les cellules Caco-2, l'ezetimibe fait

diminuer faiblement le captage de cholestérol micellaire, mais significativement l'estérification de ce cholestérol (Field et coll. 2007). Le trafic du cholestérol de la membrane apicale vers le réticulum endoplasmique est très perturbé par l'ezetimibe tandis que le trafic du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique ne l'est pas (Field et coll. 2007). La déplétion en cholestérol augmente l'expression du gène et de la protéine NPC1L1 (Field et coll. 2007). Dans une lignée cellulaire d'hépatome de rat sur-exprimant la protéine NPC1L1 qui présente à la fois une localisation intracellulaire et à la membrane plasmique, la déplétion en cholestérol par l'action de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, provoque la translocation de cette protéine des compartiments intracellulaires vers la membrane plasmique. Cette re-localisation de NPC1L1 à la membrane cellulaire est associée à une augmentation du captage de cholestérol libre, qui peut être spécifiquement inhibé par l'ezetimibe (Yu et coll. 2006). Le même groupe a montré que ce captage de cholestérol libre est non seulement spécifique, NPC1L1 ne capte pas les esters de cholestérol, mais qu'en plus il se fait de façon unidirectionnelle, depuis des HDL vers les cellules d'hépatome (Brown et coll. 2007). Ce qui est intéressant à noter pour NPC1L1, surtout par rapport à SR-BI qui est capable de faire du flux bidirectionnel de lipides, c'est qu'il semble être spécifique d'un substrat, le cholestérol non estérifié, et le transporter exclusivement de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Mais tout ceci est encore controversé à l'heure actuelle. Une des dernières publications remet en cause le récepteur intestinal du cholestérol en remplaçant SR-BI comme LE récepteur de haute affinité pour le cholestérol, à partir d'un travail réalisé sur des vésicules de membranes en bordure en brosse d'intestin de souris (Labonte et coll. 2007).

A ce jour, il est nécessaire que d'autres études viennent compléter les données actuelles, afin de mieux comprendre la part respective des différents récepteurs, et peut être plus que de chercher le rôle de l'un ou l'autre de façon exclusive, essayer d'envisager la synergie d'effet de ces récepteurs. S'il semble qu'il y ait consensus sur le fait que plusieurs récepteurs transportent le cholestérol, il serait intéressant d'étudier, indépendamment de leur efficacité individuelle à le transporter, l'existence d'interactions fonctionnelles entre-eux. Pourquoi sont-ils plusieurs à assurer cette fonction? L'inactivation de NPC1L1 a des effets drastiques de diminution de l'absorption intestinale du cholestérol (Altmann et coll. 2004) tandis que l'inactivation de SR-BI ne modifie pas l'absorption du cholestérol (Altmann et coll. 2002). L'inactivation de CD36 augmente l'expression de NPC1L1 dans l'intestin distal, sans que l'absorption du cholestérol ne soit modifiée (Nassir et coll. 2007). Dans la lignée Caco-2, l'inactivation de NPC1L1 diminue fortement l'expression de SR-BI sans modifier celles des récepteurs ABCA1, ABCG5/G8 et CD36 (Sane et coll. 2006).

Redondance fonctionnelle? Mécanismes de compensation? Spécificité tissulaire? Ces questions ne sont pas encore totalement résolues.

### **III.6 Le récepteur "scavenger" SR-BI**

Parmi les récepteurs membranaires susceptibles de remplir le rôle de détecteur intestinal de lipides alimentaires, j'ai plus particulièrement étudié l'implication du récepteur "scavenger" SR-BI. Je vais donc le présenter de façon plus détaillée.

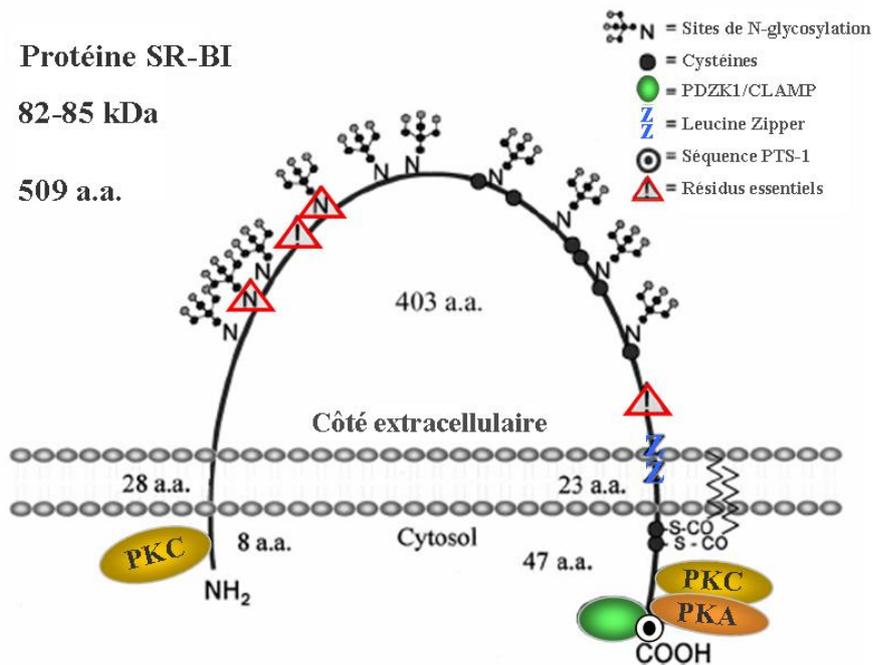
Le récepteur scavenger de classe B de type I (dont l'homologue humain est appelé CLA-1 (CD36 et LIMPII-Analogous-1) est une glycoprotéine de surface identifiée par son homologie au récepteur scavenger CD36 (Calvo and Vega 1993; Acton et coll. 1994). Il est exprimé dans les tissus jouant un rôle important dans le métabolisme du cholestérol, principalement le foie et les tissus stéroïdogènes, mais également dans les tissus particulièrement impliqués dans le transport et le métabolisme des lipides, notamment l'intestin, les macrophages et le tissu adipeux (pour revue (Rhainds and Brissette 2004)). SR-BI, comme les autres récepteurs "scavenger", est un récepteur à multiples ligands, responsable du captage sélectif des esters de cholestérol (à partir des HDL et LDL), et de l'efflux de cholestérol libre vers des lipoprotéines acceptrices. Il est fortement impliqué dans le transport inverse du cholestérol (Rhainds and Brissette 2004).

#### **III.6.1 Structure, expression et localisation de SR-BI**

Le gène codant SR-BI est localisé sur le chromosome 12 chez l'Homme (Cao et coll. 1997; Johnson et coll. 1998) et contient 13 exons (Acton et coll. 1999) avec une structure exonique proche de celle du gène CD36 (Calvo et coll. 1995). La transcription du gène de SR-BI mène à plusieurs espèces d'ARN messager, suite à des épissages alternatifs. Chez l'Homme, les exons 2 et 3 peuvent subir un épissage alternatif, menant à une délétion de 300 paires de bases (une centaine d'acides aminés) (Calvo et coll. 1995). La signification de cette forme plus courte de SR-BI n'est pas connue. L'exon 12 subit également un épissage, produisant ainsi un variant de l'extrémité carboxy-terminale de SR-BI, appelé SR-BII (Webb et coll. 1998). L'extrémité C-terminale de SR-BII est de 3 acides aminés plus courte que celle de SR-BI et les 39 derniers acides aminés sont différents puisqu'ils proviennent de l'exon 13 (Webb et coll. 1997). Les ARNm de SR-BII représentent une fraction importante des ARNm totaux (SR-BI et SR-BII) dans tous les tissus testés chez la

souris (40 % dans le foie, 35 % dans les surrénales, 60% dans le tissu adipeux) et constituent la forme prépondérante dans les testicules (80 %) (Webb et coll. 1997). Cependant, l'étude de l'expression protéique de SR-BII semble relativiser l'importance de cette isoforme car il a été montré qu'elle ne représente que 12 % de la quantité totale SR-BI/II dans le foie de souris (Webb et coll. 1998). Il semble également que l'ARN messager de SR-BII soit moins stable que celui de SR-BI (de Villiers and Smart 1999).

Le récepteur SR-BI est une glycoprotéine de 82 kDa comportant 509 acides aminés, avec deux extrémités cytoplasmiques, N et C terminales, séparées par un grand domaine extracellulaire fortement glycosylé (Acton et coll. 1994), Figure 34. Concernant la forme humaine, ce domaine extracellulaire, qui s'étend de l'acide aminé 37 à l'acide aminé 439, est de structure non définie mais contient six cystéines, dont cinq sont conservées dans CD36 et LIMPII (Calvo and Vega 1993). Ces protéines ont la capacité de former des ponts disulfures extracellulaires. SR-BI possède, du côté intracellulaire, trois sites de phosphorylation par des protéines kinases. La protéine kinase A peut phosphoryler la sérine 481, la protéine kinase C peut phosphoryler les sérines 4 et 477 (Calvo and Vega 1993). SR-BI possède également un motif leucine zipper (domaine de dimérisation, acides aminés 427-455) et une séquence putative d'adressage au peroxyosome (Johnson et coll. 1998). Ces motifs suggèrent que la structure de SR-BI ainsi que sa fonction peuvent être modulées par phosphorylation de ses extrémités cytoplasmiques et par homodimérisation. Des résultats récents, confirmant l'existence de dimères et de tétramères de SR-BI, montrent que l'extrémité C-terminale n'est pas nécessaire à la formation de ces dimères (Sahoo et coll. 2007a; Sahoo et coll. 2007b). Le domaine PDZ de SR-BI, c'est-à-dire les acides aminés de 506 à 509 (EAKL), lie CLAMP/PDZK1, une protéine qui reconnaît des peptides courts ou des épitopes de peptides phosphorylés, correspondant généralement aux 3 à 4 résidus C terminaux des protéines avec lesquelles elle interagit (Hung and Sheng 2002). Ce domaine PDZ est nécessaire à l'adressage et au maintien de SR-BI à la surface cellulaire (Silver 2002).



**Figure 34: Représentation schématique de la protéine SR-BI**  
D'après (Rhains and Brissette 2004)

Si SR-BI est majoritairement présent dans la membrane plasmique, sa localisation au sein de cette membrane n'est pas clairement définie. Certains auteurs trouvent, essentiellement mais pas exclusivement, SR-BI dans les domaines à cavéoline-1 (Babitt et coll. 1997), c'est-à-dire dans des domaines de la membrane plasmique enrichis en cholestérol et en sphingomyéline, tandis que d'autres auteurs ne retrouvent pas ou quasiment pas SR-BI dans les fractions de membranes riches en cavéoline (Levy et coll. 2004; Peng et coll. 2004). SR-BI forme des "patches" ou "clusters" sur des extensions microvillositaires de la membrane plasmique suggérant un rôle de plateforme pour le trafic du cholestérol entre les HDL, les lipoprotéines et les cellules. On ne sait pas exactement la nature des lipides présents dans ces domaines de la membrane, mais SR-BI n'est pas fortement associé avec ce que l'on appelle des rafts, classiquement, des domaines ordonnés riches en phospholipides saturés et en cholestérol, résistants au détergent (Peng et coll. 2004). Selon certains auteurs, SR-BI serait dans des domaines de la membrane plus fluide que les "rafts", ainsi plus favorable à un flux rapide de cholestérol entre la membrane et les HDL (Connelly and Williams 2004).

Au niveau intestinal, SR-BI est exprimé dans la bordure en brosse des entérocytes, et suit un gradient d'expression croissant depuis les cryptes jusqu'au sommet des villosités intestinales et dans la partie proximale de l'intestin, où le cholestérol est principalement absorbé (Hauser et coll. 1998). D'autre part, l'endocytose de SR-BI, observée au cours de l'absorption de lipides par les entérocytes de porc, de la membrane plasmique vers les

gouttelettes lipidiques cytosoliques, se fait principalement par un mécanisme impliquant les puits à clathrine, plus que les rafts et les caveolae (Hansen et coll. 2003a).

La distribution de SR-BI dans la membrane est dynamique et sensible aux conditions environnantes. La translocation de SR-BI d'un pool intracellulaire à la membrane plasmique a été décrite dans les adipocytes, en réponse à des stimulations par l'insuline ou l'angiotensine-II, des hormones qui favorisent le stockage lipidique (Tondu et coll. 2005). Dans l'hépatocyte, en situation de déplétion en cholestérol où SR-BI est principalement localisé à la membrane basolatérale, une charge en cholestérol déclenche une transcytose vers le canalicule biliaire au pôle apical (Harder et coll. 2007). C'est l'effet inverse qui est observé dans un modèle de cellules épithéliales de rein (MDCK) surexprimant SR-BI, où la déplétion en cholestérol induit la transcytose de SR-BI du pôle basolatéral au pôle apical de ces cellules (Burgos et coll. 2004). D'autre part, il peut exister des réarrangements spontanés et la formation de canaux microvillositaires à double membrane, comme observé par surexpression de SR-BI dans des cellules d'insectes Sf9 (Reaven et coll. 2001).

### **III.6.2 Régulation transcriptionnelle de l'expression de SR-BI**

Au cours du développement du tractus digestif, le contrôle de l'expression de SR-BI nécessite un facteur de transcription, nouvellement identifié, et spécifiquement exprimé dans l'intestin, Isx (Intestine-specific homeobox), dont l'inactivation chez la souris mène à des taux dix fois plus élevés de SR-BI spécifiquement au niveau intestinal (Choi et coll. 2006). Chez l'adulte, l'expression de SR-BI est contrôlée, au niveau du foie notamment, par, entre autres, les acides gras (Spady et coll. 1999; Loison et coll. 2002), le cholestérol et l'oestradiol (Fluiter et coll. 1998), la vitamine E (Witt et coll. 2000), les oxystérols (Malerod et coll. 2002) et par le glucose (Muraio et coll. 2007). Le promoteur du gène SR-BI présente de nombreux éléments de réponses aux facteurs transcriptionnels, dont des E-boxes, des sites de liaison Sp1, des demi-sites d'éléments de réponses aux oestrogènes (ERE), des sites SRE (sterol responsive element) et PPRE (peroxysome proliferator responsive element). Les récepteurs nucléaires, PPAR ( $\alpha$  et  $\gamma$ ), HNF-4 $\alpha$  et LXR participent à la modulation d'expression du gène de SR-BI (Malerod et coll. 2003; Malerod et coll. 2005; Lopez and McLean 2006). D'autres récepteurs nucléaires, tel que LRH-1 (Liver receptor homolog 1), récepteur orphelin qui joue un rôle très important dans le contrôle de l'expression de facteurs de transcription dont les HNFs, contrôle l'expression de SR-BI

dans le foie (Schoonjans et coll. 2002). Le facteur transcriptionnel SREBP-1a peut également activer le promoteur de SR-BI (Lopez and McLean 1999)

### **III.6.3 Rôle de SR-BI dans le métabolisme du cholestérol**

SR-BI facilite le captage sélectif d'ester de cholestérol à partir des HDL dans un processus en deux étapes: la première étape consiste en la liaison de la lipoprotéine (*via* l'apoAI) au domaine extracellulaire de SR-BI et la seconde étape consiste dans le transfert sélectif de lipides à la membrane plasmique (Gu et coll. 1998), pour revue (Rhains and Brissette 2004). Mais SR-BI est un récepteur "scavenger" qui, par définition, peut lier de façon spécifique un large spectre de ligands, des lipides, les lipoprotéines natives et modifiées, les phospholipides anioniques (pour revue (Rhains and Brissette 2004). Cependant, la structure tridimensionnelle des ligands de SR-BI est très importante pour que, au-delà de la liaison au domaine extracellulaire, il y ait formation d'un complexe ligand-récepteur qui permette un transfert efficace de lipides (Rhains and Brissette 2004).

La détermination du rôle majeur de SR-BI est venue d'études *in vivo*, qui montrent une diminution des niveaux plasmatiques de cholestérol HDL dans des souris transgéniques surexprimant SR-BI dans le foie (Kozarsky et coll. 1997). A l'inverse, l'analyse de souris invalidées pour SR-BI a révélé une augmentation des niveaux de cholestérol plasmatique, principalement due au HDL cholestérol (Rigotti et coll. 1997). L'ensemble de ces résultats confère à SR-BI, *via* son action sur les HDL, un rôle athéroprotecteur, validé par des expériences *in vivo* sur des modèles de souris de pathologies cardiovasculaires (Trigatti et coll. 2003; Trigatti et coll. 2004; Huby et coll. 2006).

Son rôle dans le métabolisme intestinal du cholestérol a été remis en question, avec des résultats parfois contradictoires obtenus soit chez la souris, où l'expression de SR-BI ne semble pas être essentielle à l'absorption du cholestérol (Mardones et coll. 2001), soit dans les cellules humaines Caco-2, où SR-BI semble jouer un rôle dans l'absorption du cholestérol (Cai et coll. 2001). De même, l'analyse de souris invalidées pour la protéine SR-BI montre que, s'il n'est pas indispensable à l'absorption du cholestérol dans l'intestin, il est néanmoins capable de lier l'ezetimibe (Altmann et coll. 2002), un puissant inhibiteur de l'absorption intestinale du cholestérol. D'autre part, les travaux de Levy et coll. (Levy et coll. 2004), réalisés sur des explants d'intestin humain et dans la lignée Caco-2, montrent que la protéine SR-BI intervient dans l'entrée du cholestérol libre au pôle apical des

entérocytes. Ce rôle de SR-BI dans l'entrée du cholestérol dans les cellules Caco-2 est remis en cause par les travaux de Cai et coll. (Cai et coll. 2004), qui montrent que SR-BI module l'absorption du cholestérol en facilitant son efflux vers des lipoparticules acceptrices. La surexpression intestinale de SR-BI induit une augmentation de l'absorption intestinale de cholestérol (Bietrix et coll. 2006; Labonte et coll. 2007). Il n'est pas évident à ce jour de déterminer précisément le rôle de SR-BI dans le métabolisme intestinal du cholestérol. Les expériences d'inactivation réalisées chez la souris laissent penser que l'absence de SR-BI pourrait être compensée par l'action d'autres transporteurs, tels que ABCA1, ABCG5/G8 ou NPC1L1. A l'heure actuelle, LE transporteur intestinal de cholestérol est NPC1L1 (Altmann et coll. 2004), même si une publication récente replace SR-BI comme le récepteur intestinal de haute affinité liant le cholestérol. En effet, une liaison active du cholestérol, inhibée en présence d'ezetimibe, est toujours présente dans des préparations de vésicules de bordure en brosse provenant de souris invalidées pour NPC1L1 (Labonte et coll. 2007).

D'autre part, l'expression de SR-BI au niveau intestinal pourrait être justifiée par une autre fonction, celle de "senseur" de lipides notamment. Sa capacité à générer des signaux intracellulaires à partir de la membrane plasmique, est un argument en faveur d'un détecteur membranaire, qui, suite à la liaison spécifique de son ligand, déclenche une cascade de signalisation (voir chapitre III.6.4).

Quelques études ont été menées chez l'Homme sur le rôle de SR-BI, dont la distribution tissulaire est semblable à celle de la souris. Mais le métabolisme des lipides et des lipoprotéines diffèrent de façon très importante chez l'Homme et la souris: en effet, la majorité du cholestérol sérique circule associée aux HDL chez la souris, tandis que chez l'Homme adulte, le cholestérol plasmatique est essentiellement associé aux lipoprotéines à apolipoprotéines B, telles que les VLDL et les LDL. A l'inverse des HDL, qui sont plutôt anti-athérogènes, les lipoprotéines à apoB sont plutôt pro-athérogènes (Hodis and Mack 1998; Gianturco and Bradley 1999). Chez des sujets atteints d'hypercholestérolémie familiale, des polymorphismes de SR-BI ont été associés aux concentrations de lipides plasmatiques et à l'indice de masse corporelle (Tai et coll. 2003). Trois mutations, dans l'exon 1, l'exon 8 et l'intron 5, ont été associées à ces paramètres. La mutation de l'exon 8 a la prévalence la plus forte chez les caucasiens, ce polymorphisme ayant été associé aux plus fortes concentrations de HDL-cholestérol et aux plus bas niveaux de LDL-cholestérol, particulièrement chez les hommes (Morabia et coll. 2003; Osgood et coll. 2003; Morabia et coll. 2004). La mutation de l'exon 1 et la mutation sur l'exon 8 sont, indépendamment l'une

de l'autre associées à une triglycéridémie post prandiale plus faible (Perez-Martinez et coll. 2004; Tanaka et coll. 2007), impliquant ainsi SR-BI dans le métabolisme des lipoprotéines enrichies en triglycérides en période post-prandiale.

### **III.6.4 Les voies de signalisations intracellulaires déclenchées par SR-BI**

Plusieurs voies de signalisation impliquant des cascades de phosphorylation ont été décrites pour le récepteur SR-BI sur des cellules endothéliales. La liaison des lipoprotéines HDL à SR-BI provoque l'activation de la protéine Ras qui en retour stimule la cascade de signalisation de la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase). Cette signalisation est inhibée par l'action d'un anticorps bloquant anti-SR-BI (Grewal et coll. 2003). Une autre voie de signalisation impliquant la protéine PI3Kinase (phosphatidylinositol 3-kinase) et la tyrosine kinase Src est également associée au récepteur SR-BI (Mineo and Shaul 2007). L'initiation de ces voies de signalisation nécessite la présence de l'extrémité C terminale et le domaine d'interaction aux domaines PDZ de SR-BI (Assanasen et coll. 2005). Une des protéines partenaires de SR-BI est la protéine PDZK1 (Yesilaltay et coll. 2005). La phosphorylation de PDZK1 joue un rôle important dans la régulation de l'expression hépatique de SR-BI (Nakamura et coll. 2005). Les souris invalidées pour PDZK1 présentent des niveaux d'expression de la protéine SR-BI très bas dans le foie. L'étude des souris invalidées pour SR-BI ou PDZK1, ou les deux, a permis de déterminer l'implication de PDZK1 dans la stabilité du niveau d'expression de SR-BI. En revanche, l'adressage à la membrane et la fonctionnalité de SR-BI, dans ces modèles ne sont pas altérés par l'absence de PDZK1 (Yesilaltay et coll. 2006). PDZK1 est sans doute nécessaire pour la formation d'un complexe protéique proche de l'extrémité C-terminale de SR-BI, comprenant notamment des kinases comme celles évoquées ci-dessus. A ce jour ces voies de signalisation dépendantes de SR-BI n'ont pas été étudiées dans les cellules intestinales.

Je fais le choix de ne pas présenter les protéines ABCG5/G8, qui certes sont exprimées à la membrane apicale des entérocytes, mais participent à l'excrétion de cholestérol, et n'ont aucune fonction connue de captage extracellulaire de cholestérol ou d'autres lipides. Elles participent à la régulation de l'homéostasie du cholestérol en pompant les stérols et cholestérol des entérocytes vers la lumière intestinale pour en limiter l'absorption. Leur rôle essentiel semble être au niveau hépatique, autre lieu de leur

expression, où elles favorisent l'élimination du cholestérol par les sécrétions hépatobiliaires (Oram and Vaughan 2006). Concernant l'intestin, à mon sens, ils n'interviennent de toute façon qu'en deuxième acteur, après l'entrée du cholestérol *via* NPC1L1 et/ou SR-BI et de ce fait ne correspondent pas à ce que l'on entend par détecteur intestinal membranaire de lipides alimentaires luminaux.

**En conclusion, un certain nombre de protéines sont exprimées à la membrane apicale des entérocytes et sont impliquées dans le métabolisme des lipides. Mais les controverses sont nombreuses pour ce qui est de la localisation membranaire apicale de telle ou telle protéine. Les controverses sont aussi nombreuses sur le type de ligand se liant sur ces protéines. La difficulté est encore plus grande pour des récepteurs dits "scavenger" c'est-à-dire capable de lier de multiples ligands. Cependant, toutes ces protéines ont un rôle potentiel de détecteur des lipides, que ce soit les acides gras ou le cholestérol, dans la mesure où ils sont exposés très précocement à l'apport de ces nutriments.**

**Le transfert entérocytaire des lipides alimentaires résulte d'un processus intracellulaire complexe. Dans le cadre de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé aux événements précoces conditionnant cette fonction, à savoir la détection luminale des lipides alimentaires, les voies de signalisation et les événements cellulaires qui en découlent, en particulier la modulation de l'expression de gènes entérocytaires par les micelles post-prandiales.**

**Le décryptage des mécanismes auxquels je me suis intéressé, et qui devront être validés *in vivo*, a été réalisé dans le modèle cellulaire Caco-2/TC7, qui reproduit en culture nombre de caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de l'entérocyte humain.**

# **TRAVAIL EXPÉRIMENTAL**

## **Etude transcriptomique des effets des lipides sur les entérocytes**

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, les études sur l'impact des lipides, y compris au niveau intestinal, ont été réalisées en s'intéressant généralement à l'effet de l'apport d'un lipide en particulier, qu'il s'agisse d'acide gras ou de cholestérol. Or, nous savons qu'au niveau intestinal les entérocytes sont exposés aux lipides sous forme de micelles complexes du côté luminal, et sous forme de lipoprotéines ou de lipides liés à l'albumine du côté plasmatique. Il est donc primordial d'envisager que ces différents modes d'apport en lipides puissent avoir des impacts différents sur la fonction entérocytaire. De plus, il convient d'analyser si les micelles lipidiques post-prandiales exercent des effets spécifiques au niveau intestinal, lorsqu'on sait l'implication des lipides alimentaires dans les pathologies métaboliques, en pleine expansion dans les pays industrialisés, et le rôle que peut jouer l'intestin dans ces processus.

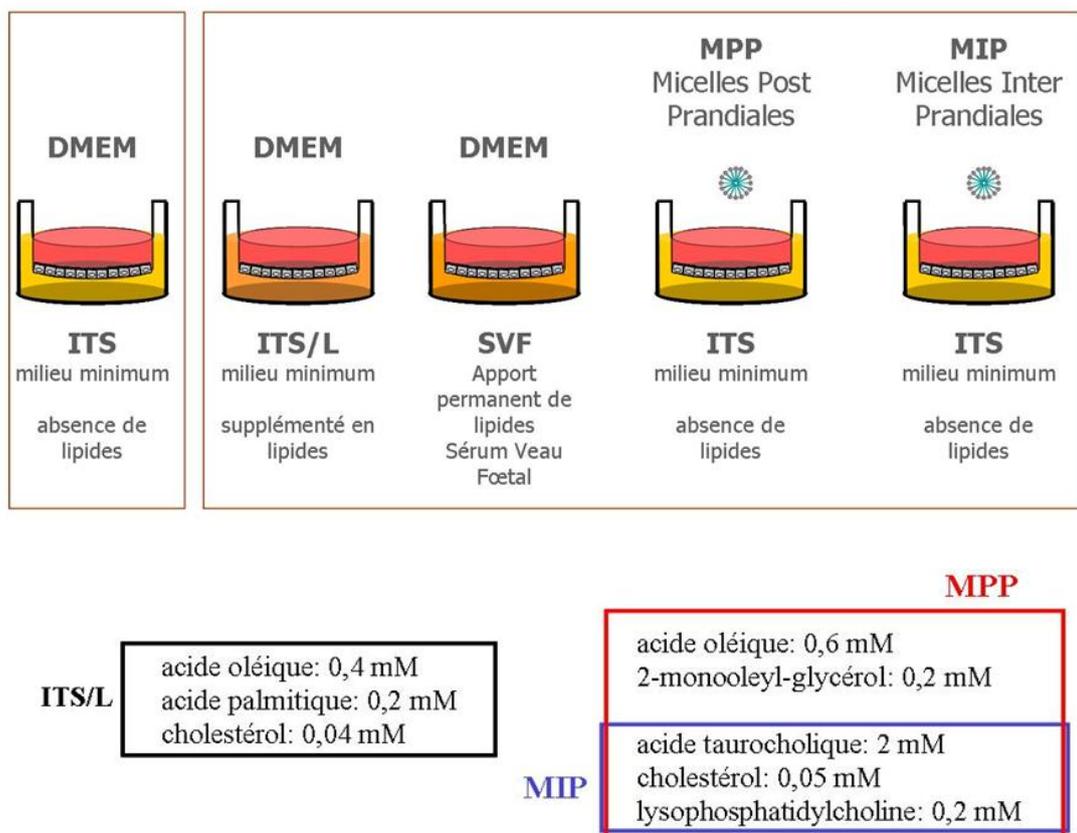
L'étude des mécanismes du transfert transépithélial des lipides, de l'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides au niveau entérocytaire et de leur sécrétion, a permis de mettre en évidence des acteurs de ces mécanismes, entre autres au niveau transcriptionnel. Plusieurs études ont, par exemple, montré que l'expression du gène de l'apoA-IV peut être induite par les lipides, mais les mécanismes de régulation responsables de cette activation restaient obscurs. Les travaux réalisés dans l'équipe, sur le modèle d'entérocytes Caco-2/TC7, ont permis de montrer que la transcription du gène de l'apoA-IV est induite par les lipides sériques, ainsi que par les lipides luminaux. Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu sont différents. Seule l'induction par les micelles lumineuses post-prandiales implique la participation du facteur transcriptionnel HNF-4. Les constituants des micelles apportés seuls ou en combinaison incomplète ne reproduisent pas cet effet spécifique des micelles post-prandiales complètes sur l'induction de la transcription du gène de l'apoA-IV (Carriere et coll. 2005). Un effet différentiel des lipides liés à l'albumine apportés au pôle basal des cellules et des micelles post-prandiales apportées au pôle apical sur le trafic de l'apoB a également été observé dans les cellules Caco-2/TC7 (Morel et coll. 2004).

**A partir de ces résultats, l'étude rapportée dans l'article 1 a eu pour but de déterminer si les effets différentiels du mode d'apport des lipides, mis en évidence sur le trafic de l'apoB et sur la régulation de l'expression de l'apoA-IV, sont limités à ces acteurs de la sécrétion des lipoprotéines ou concernent de façon plus globale la fonction entérocytaire. Un deuxième objectif a été de déterminer s'il existe, comme les**

**résultats précédemment obtenus par l'équipe le suggèrent, un impact spécifique des lipides alimentaires apportés sous forme de micelles.** Cette étude, difficile à entreprendre *in vivo*, a été conduite dans le modèle entérocytaire Caco-2/TC7, en s'intéressant aux effets transcriptionnels des lipides apportés sous leur forme physiologique dans le compartiment basal ou luminal.

Les cellules sont cultivées sur filtre. Une première semaine de culture est nécessaire pour atteindre la confluence après un ensemencement à 60 000 cellules par cm<sup>2</sup>. A la confluence, les cellules forment une monocouche jointive de cellules épithéliales qui se différencient en entérocytes parfaitement polarisés. A partir de ce stade, les deux compartiments, apicaux et basaux, étant bien individualisés grâce à la formation de jonctions serrées, on ne met plus de sérum dans le compartiment apical. Deux semaines de culture supplémentaires permettront alors d'optimiser la fonctionnalité de ces cellules.

Au bout de 21 jours de culture, quatre conditions d'apport en lipides ont été comparées (Figure 35).



**Figure 35: Les conditions d'apports en lipides aux cellules Caco-2/TC7 cultivées sur filtre.**  
 ITS: Insuline-Transferrine-Sélénium, ITS/L: ITS supplémenté en lipides, SVF: sérum de veau fœtal, MPP: micelles post prandiales, MIP: micelles inter-prandiales dépourvues de produits d'hydrolyse des triglycérides.

L'effet des lipides du compartiment plasmatique a été étudié dans des cellules cultivées en permanence en présence de sérum (20% SVF) ou de milieu minimum (1% ITS ; insuline, transferrine, sélénium) supplémenté en lipides couplés à l'albumine (ITS/L) dans le milieu de culture du compartiment basal. Le milieu SVF est un milieu DMEM (Dulbecco) auquel sont ajoutés 20% de sérum de veau fœtal (préalablement décomplémenté par un chauffage de 30 min à 56°C), 1% d'acides aminés non-essentiels et 1% d'antibiotiques (penicilline streptomycine). Le milieu ITS/L est un milieu minimum, ITS, supplémenté en lipides (0,4 mM d'acide oléique, 0,2 mM d'acide palmitique, 0,04 mM cholestérol) couplés à l'albumine sérique bovine (1% BSA sans acides gras) avec un rapport molaire de 4 acides gras pour 1 albumine. Les cellules Caco-2/TC7 sont cultivées en présence d'ITS/L dans le compartiment basal à partir de la confluence. Il est à noter qu'un apport prolongé de milieu ITS/L dans le compartiment apical est toxique pour les cellules (résultats personnels).

L'effet des micelles luminales a été analysé dans des cellules où les micelles inter-prandiales (MIP) ou post-prandiales (MIP + produits de digestion des triglycérides) ont été ajoutées dans le compartiment apical pendant 24h, le milieu basal étant dépourvu de lipides (ITS). Les micelles sont préparées extemporanément à partir d'un culot sec des constituants repris dans de l'acide taurocholique. Les solutions stock des différents lipides sont préparées par solubilisation en chloroforme-méthanol (2/1), et conservées à -20°C. Pour la préparation des micelles, le volume adéquat de chaque constituant est prélevé à la seringue Hamilton, en verre, et le mélange est séché sous azote à 45°C. Le culot obtenu est alors resuspendu dans de l'acide taurocholique (2mM final) chauffé à 56°C, vortexé, puis chauffé de nouveau et complété par du DMEM au volume adéquat pour obtenir les concentrations indiquées dans la Figure 35. Les micelles, MIP ou MPP, sont déposées dans le compartiment apical.

Ces quatre conditions (compartiment basal: ITS/L ou SVF; compartiment apical: MPP ou MIP) ont été comparées à une situation où les milieux des deux compartiments sont totalement dépourvus de lipides (ITS), mais où la présence d'insuline, de transferrine et de sélénium permet une croissance et une différenciation normale des cellules.

Après une incubation de 24 heures à 37°C (10% de CO<sub>2</sub>) dans les différentes conditions d'apport en lipides, les ARN sont extraits des cellules par de l'isothiocyanate de guanidium et centrifugation sur gradient de chlorure de césium. Cette méthode permet

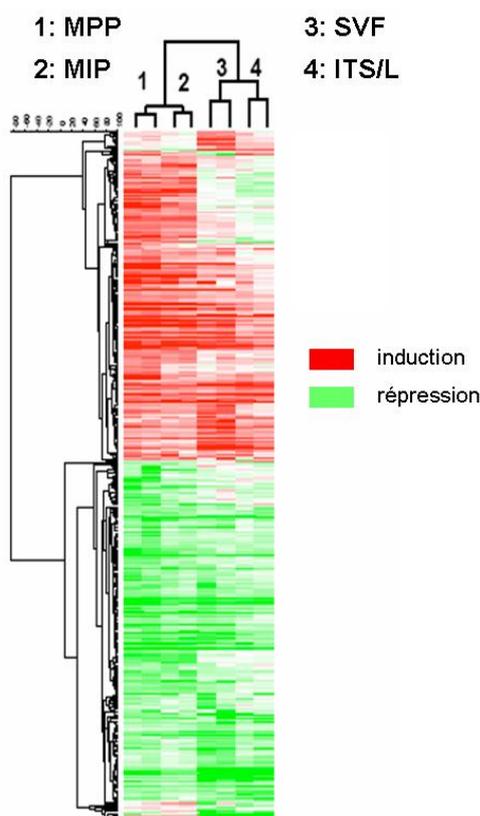
d'obtenir des ARN purs, de qualité et avec un bon rendement quelle que soit leur taille, pour l'hybridation sur les puces Affymetrix. Les produits d'hybridation sont détectés par automate et quantifiés informatiquement pour fournir des données brutes de chaque paire. Des analyses comparatives entre différentes conditions fournissent des ratios d'intensité d'expression pour chaque gène testé (13.000 environ). Exprimés en base 2, ces ratios ont été convertis au laboratoire en décimales pour faciliter la lecture. Chaque condition de culture a été analysée en duplicate.

La classification des gènes par catégories de fonctions cellulaires est basée sur les termes de Gene Ontology (GO) comprenant les annotations de la puce Affymetrix utilisée HG-U95Av2. Les gènes exprimés différemment ont été analysés selon des voies prédéfinies et des catégories de fonctions issues de KEGG, GO termes et en utilisant les ressources bioinformatiques de DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).

Concrètement, toute la culture cellulaire et la préparation des ARN ont été effectuées au laboratoire. L'hybridation des ARN sur les puces Affymetrix, et les comparaisons initiales des différentes conditions d'apport en lipides ont été menées par Sanofi-Aventis, qui nous a fourni les données brutes des ratios et des comparaisons des différentes analyses. L'ensemble des données a alors été analysé au laboratoire en utilisant différents logiciels bioinformatiques, (Bibliosphère, DAVID, LINNEA pathways, Babelomics, ...) et une forte proportion d'analyses manuelles. La validation des résultats par la méthode TLDA (Taqman Low Density Array) a également été réalisée au laboratoire.

## **1-Profils transcriptionnels des gènes modulés en fonction du mode d'apport des lipides**

Une première analyse a eu pour but de comparer les quatre conditions d'apport en lipides (SVF, ITS/L, MPP et MIP) par rapport à la condition sans lipides (ITS). Seuls les gènes présentant un facteur d'induction ou de répression par rapport à la condition ITS d'au moins 1,6 ont été retenus.



**Figure 36: Analyse transcriptomique en fonction du mode d'apport des lipides aux cellules Caco-2/TC7.** Regroupement hiérarchique des 412 gènes qui sont modulés dans les différentes conditions d'apport en lipides sur les cellules Caco-2/TC7. Les lignes représentent les 412 gènes dont l'expression est modulée dans au moins une condition d'apport en lipides, d'un facteur supérieur ou égal à 2 par rapport à la condition sans lipide, ITS. Les colonnes représentent les 4 conditions d'apport en lipides (selon la figure 35), analysées en duplicate et comparées à la condition ITS.

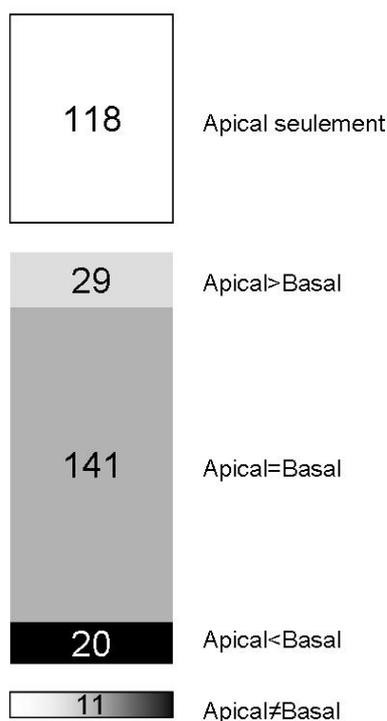
Le rouge indique une augmentation d'expression, tandis que le vert indique une diminution d'expression des gènes par rapport à la condition ITS. MPP: micelles post-prandiales; MIP: micelles inter-prandiales; ITS milieu contenant insuline/transferrine/sélénium; ITS/L: milieu ITS supplémenté en lipides; SVF: sérum de veau fœtal.

Les résultats obtenus montrent que l'apport de lipides module l'expression de 412 gènes par rapport à la condition sans lipide. Cependant, l'analyse du regroupement de ces gènes indique que les différentes conditions d'apport en lipides donnent des profils d'expression de gènes différents: les profils de gènes modulés par les lipides du compartiment basal (SVF et ITS/L) sont proches entre eux et regroupés dans une même sous-branche et les profils de gènes modulés par les micelles apicales sont regroupés entre eux dans une autre sous-branche (Figure 36).

Compte-tenu des profils différents observés, nous avons analysé plus en détail les gènes modulés de façon différentielle par les lipides apicaux et basaux, en considérant les gènes modulés d'au moins un facteur 1,6 par rapport à la condition ITS. Pour cela, nous avons regroupé les deux conditions d'apport apical des lipides (MPP et MIP) en calculant

la moyenne des niveaux d'expression de chaque gène dans ces deux conditions, pour la comparer avec le niveau d'expression dans la condition d'apport basal en lipides, ITS/L. Nous avons choisi de ne pas y ajouter la condition SVF pour ne pas inclure dans notre analyse des gènes pouvant être régulés par des facteurs sériques, indépendamment des lipides. Nous avons donc obtenu une catégorie "apical" correspondant au regroupement des conditions MPP et MIP, et une catégorie "basal" correspondant à la condition ITS/L.

Nous avons ainsi identifié 319 gènes modulés par les lipides apicaux et/ou basaux d'un facteur au moins 1,6 par rapport à la condition sans lipides ITS et nous les avons classés par catégorie de fonction à l'aide de la base de données DAVID (**D**atabase for **A**nnotation, **V**isualization and **I**ntegrated **D**iscovery (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)). Nous avons ensuite comparé les niveaux d'expression de chaque gène dans la condition "apical" et dans la condition "basal" et le calcul du ratio apical/basal nous a permis d'identifier les gènes modulés préférentiellement ou spécifiquement par les lipides apicaux ou basaux (Figure 37).



**Figure 37: Représentation schématique de la modulation de l'expression de gènes en fonction de l'apport basal ou apical de lipides aux cellules Caco-2/TC7.** 319 gènes sont significativement modulés par un apport apical ou basal de lipides (avec au moins un facteur 1,6 comparé à la condition ITS). 118 gènes sont modulés exclusivement par les micelles apicales; 190 gènes sont modulés par les lipides apicaux et basaux, dont 29 le sont préférentiellement par les lipides apicaux; 141 le sont de façon équivalente par les lipides apicaux et basaux; et 20 préférentiellement par les lipides basaux. 11 gènes sont inversement modulés par les micelles apicales ou par les lipides basaux.

\* 118 gènes (dont 83 induits et 35 réprimés) sont spécifiquement modulés par les lipides apportés au pôle apical (aucune modification de leur expression n'est observée en présence de lipides au pôle basal par rapport à la condition ITS). Ces gènes sont classés principalement dans 4 catégories de fonction: "adhésion cellulaire/architecture", "récepteur/transduction du signal", "noyau/transcription/traduction" et "métabolisme lipidique". L'analyse informatique révèle que les gènes induits sont majoritairement impliqués dans les fonctions cellulaires liées aux interactions cellule-matrice et cellule-cellule ainsi que dans les voies métaboliques associées à la biosynthèse des stéroïdes.

\* 29 gènes (dont 14 induits et 15 réprimés) sont préférentiellement modulés par les lipides apicaux bien qu'ils soient également modulés par les lipides basaux. Pour ces gènes, le rapport de leur niveau d'expression dans la condition "apical" par rapport à la condition "basal" est supérieur à 1,6. Les gènes induits sont principalement regroupés dans deux catégories de fonction: la catégorie "adhésion cellulaire/architecture" et la catégorie "métabolisme lipidique". Parmi ces gènes est notamment retrouvé le gène de l'apoA-IV. En revanche les gènes réprimés sont majoritairement regroupés dans les catégories "métabolisme des acides aminés" et "noyau/transcription/traduction".

\* 141 gènes (dont 62 induits et 79 réprimés) sont modulés de façon comparable par les lipides apicaux et basaux. L'analyse informatique montre que 10 gènes (*PFK*, *PKM2*, *GPI*, *PGK1*, *ALDOA*, *PGAM*, *TPI1* et *LDHA*) sur les 62 gènes induits sont impliqués dans le métabolisme glucidique et plus particulièrement dans la glycolyse. Les gènes réprimés sont répartis dans différentes catégories de fonction, cependant certains d'entre eux seraient impliqués dans des processus cellulaires mis en jeu lors de la réponse à un stress.

\* 20 gènes sont préférentiellement modulés par les lipides apportés au pôle basal. Leurs niveaux d'expression présentent un rapport apical/basal inférieur à 0,6. Ces gènes, répartis dans diverses catégories de fonction sont essentiellement réprimés par les lipides basaux. L'analyse informatique n'a pas pu mettre en évidence de voie métabolique associée à la modulation de ces gènes.

\*11 gènes sont inversement modulés par les lipides apicaux et les lipides basaux. Tous ces gènes, à l'exception de l'apolipoprotéine D, sont induits par les lipides apicaux et réprimés par les lipides basaux. Ces gènes sont essentiellement regroupés dans la catégorie "adhésion cellulaire/architecture" (comprenant deux constituants des filaments intermédiaires, les kératines 8 et 18 et deux constituants des microtubules, les tubulines 2A et 1B) et dans la catégorie "métabolisme lipidique" comprenant les gènes *LDLR*, *INSIG1* et *NSDHL* impliqués dans le métabolisme du cholestérol.

Les listes des gènes modulés par les lipides apportés soit au pôle apical soit au pôle basal sont rapportées dans les tables annexes de l'article 1.

## 2-Identification des gènes spécifiquement modulés par les lipides alimentaires apportés au pôle apical des cellules sous forme de micelles lipidiques post-prandiales

Nous nous sommes alors intéressés aux gènes dont l'expression serait spécifiquement modulée par les lipides alimentaires. Pour cela nous avons comparé la modulation de l'expression génique par des apports apicaux de micelles lipidiques inter-prandiales (MIP) et post-prandiales (MPP). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que les MPP modulaient spécifiquement l'expression de 46 gènes (Table 2).

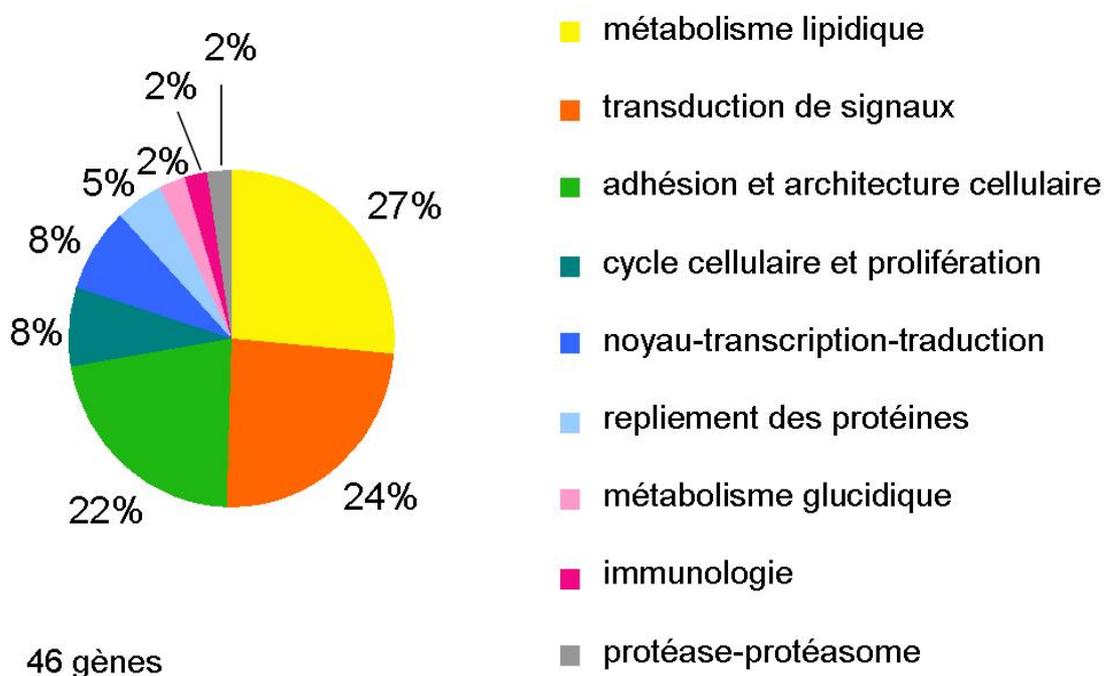
Nom des protéines	gène	catégorie de fonction	facteur de modulation (duplicate)	
<b>GENES INDUITS</b>				
decay accelerating factor for complement (CD55)	<i>CD55</i> *	immune-related	7.5	3.0
dual specificity phosphatase 1	<i>DUSP1</i>	receptor-signal transduction	5.2	2.7
phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	<i>PCK1</i> *	glucid metabolism	4.5	3.7
ras homolog gene family, member B	<i>RHOB</i>	receptor-signal transduction	2.6	2.4
apolipoprotein A-IV	<i>APOA4</i> *	lipid metabolism	2.6	2.4
dual specificity phosphatase 5	<i>DUSP5</i>	receptor-signal transduction	2.5	2.1
carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	<i>CEACAM1</i>	cell adhesion/architecture	2.5	1.6
claudin 4	<i>CLDN4</i> *	cell adhesion/architecture	2.4	2.4
core promoter element binding protein	<i>KLF6</i>	nucleus-transcription-translation	2.2	2.4
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial)	<i>HMGCS2</i> *	lipid metabolism	2.2	2.1
integrin, alpha 6	<i>ITGA6</i> *	cell adhesion/architecture	2.2	2.0
transmembrane 4 superfamily member 1	<i>TM4SF1</i>	unclassified	2.1	2.0
coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	<i>F2LR1</i>	receptor-signal transduction	2.0	2.0
uropod 1B	<i>UPK1B</i>	unclassified	2.0	1.5
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	<i>HMGCS1</i>	lipid metabolism	1.8	3.8
insulin induced gene 1	<i>INSIG1</i>	lipid metabolism	1.8	2.1
syndecan binding protein (syntenin)	<i>SDCBP</i>	cell adhesion/architecture	1.6	2.2
annexin A13	<i>ANXA13</i> *	cell adhesion/architecture	1.5	2.1
jun D proto-oncogene	<i>JUND</i>	nucleus-transcription-translation	1.9	1.7
plasminogen activator, urokinase receptor	<i>PLAUR</i>	receptor-signal transduction	1.9	1.5
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	<i>CDKN1C</i>	cell cycle-cell proliferation	1.9	1.5
retinoic acid induced 3	<i>GPRC5A</i>	receptor-signal transduction	1.8	1.9
prostate differentiation factor	<i>GDF15</i> *	cell cycle-cell proliferation	1.8	1.8
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	<i>YWHAH</i>	receptor-signal transduction	1.8	1.7
microsomal triglyceride transfer protein (large polypeptide, 88kDa)	<i>MTTP</i> *	lipid metabolism	1.8	1.7
keratin 20	<i>KRT20</i>	cell adhesion/architecture	1.8	1.6
thymosin, beta 10	<i>TMSB10</i> *	cell adhesion/architecture	1.8	1.5
low density lipoprotein receptor	<i>LDLR</i>	lipid metabolism	1.7	1.8
adipose differentiation-related protein	<i>ADFP</i>	lipid metabolism	1.7	1.6
apolipoprotein C-III	<i>APOC3</i> *	lipid metabolism	1.7	1.5
claudin 3	<i>CLDN3</i> *	cell adhesion/architecture	1.7	1.4
cellular retinoic acid binding protein 2	<i>CRABP2</i>	receptor-signal transduction	1.6	1.5
sequestosome 1	<i>SQSTM1</i>	protease-proteasome	1.5	1.6
<b>GENES REPRIMES</b>				
aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	<i>ALDH1A1</i> *	unclassified	0.5	0.5
heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)	<i>HSPE1</i> *	protein folding	0.6	0.4
cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)	<i>CCDN1</i>	cell cycle-cell proliferation	0.6	0.4
chromosome 7 open reading frame 24	<i>C7orf24</i>	unclassified	0.6	0.5
aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1	<i>ALDH3B1</i> *	lipid metabolism	0.6	0.6
phosphatidylserine synthase 1	<i>PDTSS1</i>	lipid metabolism	0.6	0.6
activin A receptor, type IB	<i>ACVR1B</i>	receptor-signal transduction	0.6	0.6
ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	<i>ENC1</i> *	cell adhesion/architecture	0.6	0.5
hepatic dihydrodiol dehydrogenase	<i>AKR1C1</i> *	lipid metabolism	0.6	0.6
profilin 2	<i>PFN2</i>	cell adhesion/architecture	0.6	0.5
tumor rejection antigen (gp96) 1	<i>HSP90B1</i> *	protein folding	0.6	0.5
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5	<i>XRCC5</i> *	nucleus-transcription-translation	0.6	0.6
casein kinase 2, beta polypeptide	<i>CSNK2B</i>	receptor-signal transduction	0.7	0.6

**Table 2: Gènes différentiellement modulés par les MPP par rapport aux MIP.** Les micro-arrays ont été réalisés en duplicate pour chaque condition. N'ont été retenus que les gènes pour lesquels on observe un facteur de modulation MPP/MIP supérieur ou égal à 1,6. Ceux pour lesquels ce facteur est supérieur à 2 sont indiqués en rouge. Les gènes ayant un site de fixation prouvé ou putatif pour HNF-4 sont marqués d'une astérisque.

Il est intéressant de noter que 33 gènes voient leur expression induite par les MPP alors que celle de 13 gènes seulement est réprimée.

Parmi les 46 gènes spécifiquement modulés par les MPP, 20 gènes ont des sites de fixation putatifs ou avérés pour HNF-4 ((Odom et coll. 2004), et banque de données DAVID). Ces gènes se retrouvent aussi bien parmi ceux dont l'expression est induite que parmi ceux dont l'expression est réprimée par les MPP.

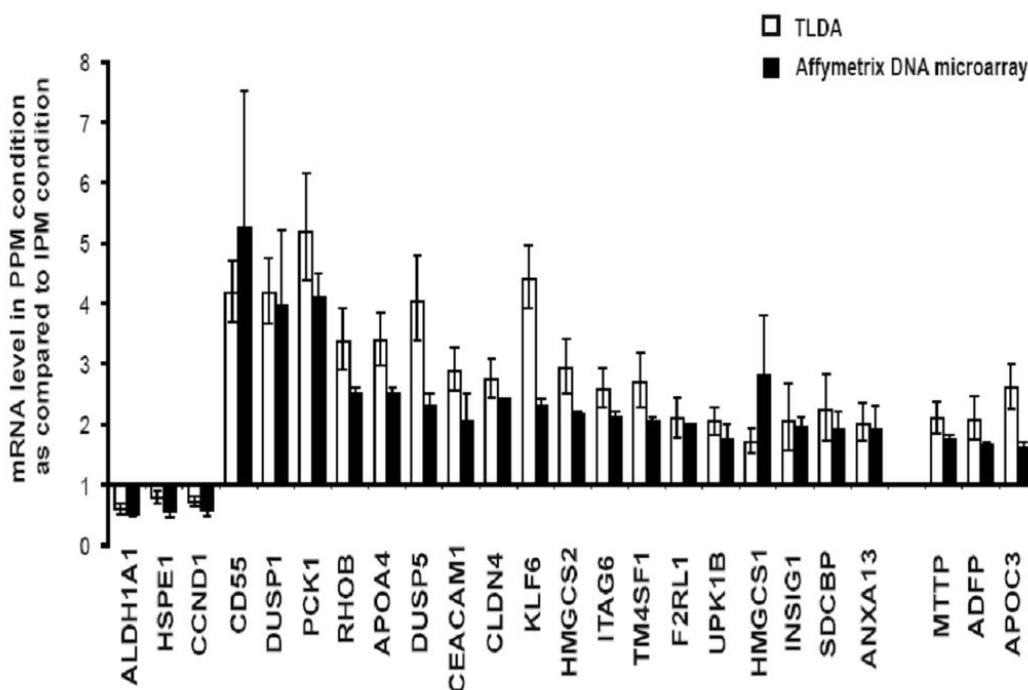
Les 46 gènes spécifiquement modulés par les MPP appartiennent principalement à trois grandes catégories de fonction, qui incluent non seulement le métabolisme lipidique, mais aussi la transduction de signaux, et l'adhésion/architecture cellulaire (Figure 38).



**Figure 38: Classement par catégories de fonction des gènes dont l'expression est différentiellement modulée par les micelles apicales post-prandiales par rapport aux micelles inter-prandiales. Le pourcentage de gènes présents dans chaque catégorie est indiqué.**

J'ai pu valider ces résultats par RT-PCR, en utilisant la technique de TLDA, qui permet de réaliser une PCR à haut débit pour un nombre important de gènes en parallèle. Pour cette validation, nous avons sélectionné les gènes dont le facteur de modulation d'expression par les MPP par rapport aux MIP était d'au moins 2 (en rouge dans la Table 2), auxquels nous avons ajouté les gènes *MTTP*, *ADFP* et *APOC3*, compte tenu de leur implication dans les processus de sécrétion des LRT (Figure 39).

L'ensemble de ces résultats vient souligner l'importance du mode et de la polarité d'apport en lipides sur la régulation d'expression de gènes au niveau des entérocytes. Des effets spécifiques et coordonnés des micelles post-prandiales sur l'expression de gènes entérocytaires impliqués dans la structure et la polarisation de ces cellules et dans leur fonction de transfert de nutriments sont mis en évidence. Ces effets spécifiques des MPP ne peuvent pas être attribués au simple apport d'acides gras puisque ces mêmes acides gras, présents dans le milieu du compartiment basal, soit dans le sérum, soit complexés à l'albumine dans le milieu ITS/L, n'induisent pas ces effets.



**Figure 39: Validation des résultats du micro-array Affymetrix.** Les niveaux d'ARNm des gènes sélectionnés à partir de l'analyse micro-array et sur la base d'un changement d'expression d'un facteur 2 au moins, dans les conditions MPP vs MIP, plus les niveaux d'expression de trois gènes d'intérêt *MTTP*, *ADFP* et *APOC3*, ont été quantifiés par PCR en temps réel, utilisant une approche TLDA (Taqman Low Density Array). Les tests ont été faits en triplicate et les mesures d'expression ont été normalisées au niveau de l'ARNr 18S. La condition MIP a été définie comme condition calibratrice, à laquelle la condition MPP est comparée. Les barres blanches représentent les quantités relatives normalisées (RQ) de l'expression de gènes cibles dans la condition MPP comparées à la condition MIP (fixée à 1), déterminées par l'analyse TLDA. Les barres d'erreur correspondent aux niveaux maximum et minimum d'expression (RQ max et RQ min) pour chaque gène, calculés en utilisant le logiciel SDS 2.3 (Applied Biosystems). Les barres noires représentent les niveaux d'ARNm des gènes dans la condition MPP comparée à la condition MIP (fixée à 1) déterminés par l'analyse Affymetrix DNA micro-array réalisée en duplicate. Les résultats sont exprimés comme des moyennes  $\pm$  SEM.

Parmi les gènes spécifiquement modulés par l'apport de MPP, l'induction de l'apoA-IV et de l'apoC3, deux composants des lipoprotéines, et de la MTP, nécessaire à la fois à la lipidation stabilisatrice de l'apoB et à la formation de la gouttelette luminale de TG au

niveau du RE, est compatible avec l'induction de la sécrétion de LRT qui est observée dans les cellules après l'apport de MPP (Chateau et coll. 2005). En parallèle de cette sécrétion, on observe, *in vivo* (Robertson et coll. 2003) et dans les cellules Caco-2 (Chateau et coll. 2005), un stockage transitoire de gouttelettes cytosoliques de TG, qui peuvent être ensuite mobilisés pour réintégrer la voie sécrétoire. Il est donc intéressant de noter que les MPP induisent également l'expression de l'ADFP, une des protéines majeures de la famille PAT associée aux gouttelettes lipidiques cytosoliques.

La fonction entérocytaire de transfert vectorisé de nutriments dépend étroitement de la différenciation et de la polarisation de ces cellules. Nos résultats montrent que plusieurs gènes impliqués dans la mise en place de l'architecture cellulaire sont induits par les MPP.

Par ailleurs, 25% des gènes modulés spécifiquement par les MPP sont impliqués dans la transduction de signaux. Parmi ceux-ci, on observe une expression accrue de RhoB, une GTPase impliquée dans des processus de signalisation et participant au dialogue actine/adhésion/signalisation/trafic membranaire (Apodaca 2001; Ridley 2001). De plus, un rôle régulateur des protéines de la famille Rho dans le métabolisme lipidique a été rapporté récemment (Utech et coll. 2001). Nous avons également observé une expression accrue de DUSP1 et 5, deux gènes impliqués dans la signalisation MAPK (Kondoh and Nishida 2007), dont nous verrons ultérieurement qu'elle est activée par l'interaction MPP/SR-BI.

Enfin, un point important de nos résultats concerne le rôle coordonnateur que pourrait jouer HNF-4 dans les effets exercés par les MPP sur presque la moitié des gènes dont ils modulent l'expression. Un tel impact de HNF-4 sur l'expression génique intestinale a jusqu'à présent été peu analysé, alors que le rôle de ce facteur transcriptionnel dans la différenciation et la fonction hépatocytaire a été largement démontré. Des études ont montré, dans le foie, que les acides gras et les acyl-CoAs pouvaient moduler l'activité de liaison de HNF-4 (pour revue (Ribeiro et coll. 2007)). Toutefois, un tel mécanisme ne peut pas rendre compte de nos résultats puisque les acides gras présents dans le milieu ITS/L, dans le compartiment basal, n'induisent pas les effets que nous avons observés après l'apport de MPP. Les mécanismes par lesquels les MPP induisent la modulation de ces gènes sensibles à HNF-4 restent donc à déterminer.

## **Article 1:**

Etude transcriptomique des effets des lipides alimentaires sur les cellules Caco-2/TC7: impact sur les gènes du métabolisme, de la signalisation et de l'architecture cellulaire.

"Transcriptome response of enterocytes to dietary lipids: impact on cell architecture, signaling and metabolism genes"

**Olivier Béaslas**, François Torreilles, Pierre Casellas, Dominique Simon, Gérard Fabre, Michel Lacasa, Jean Chambaz, Monique Rousset, Véronique Carrière

*soumis*

**TRANSCRIPTOME RESPONSE OF ENTEROCYTES TO DIETARY LIPIDS: IMPACT ON CELL ARCHITECTURE, SIGNALING AND METABOLISM GENES**

Olivier Béaslas<sup>1,2,3</sup>, François Torrelles<sup>4</sup>, Pierre Casellas<sup>5</sup>, Dominique Simon<sup>5</sup>, Gérard Fabre<sup>4</sup>, Michel Lacasa<sup>1,2,3</sup>, Jean Chambaz<sup>1,2,3</sup>, Monique Rousset<sup>1,2,3</sup>, Véronique Carrière<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, UMR S 872, Les Cordeliers, Paris, F-75006 France ;  
<sup>2</sup>INSERM, U 872, Paris, F-75006 France; <sup>3</sup>Université Paris Descartes, UMR S 872, Paris, F-75006 France; <sup>4</sup>Sanofi-Aventis, DMPK-S, Discovery Metabolism, Pharmacokinetics and Safety Department, Montpellier, F-34184 France; <sup>5</sup>Sanofi-Aventis, Oncology Department, Montpellier, F-34184 France

**RUNNING HEAD:** lipids and expression of enterocyte genes

**CORRESPONDENCE:** Véronique Carrière, Centre de Recherche des Cordeliers UMR S 872 équipe 6, 15 rue de l'école de Médecine, 75006 Paris France; Tel. (33) 1 42 34 69 34; Fax. (33) 1 43 25 16 15; E-mail: [veronique.carriere@crc.jussieu.fr](mailto:veronique.carriere@crc.jussieu.fr)

**ABBREVIATIONS:**

The abbreviations used are: apo, apolipoprotein, BSA, bovine serum albumin, FA, fatty acids; FBS, fetal bovine serum; HNF, hepatic nuclear factor; IPM, inter-prandial micelles; MG, monoglycerides; OA, oleic acid; PPM, postprandial micelles; TG, triglycerides; TRL, triglyceride-rich lipoproteins.

**ABSTRACT**

Intestine contributes to lipid homeostasis through the absorption of dietary lipids, which reach the apical pole of enterocytes as micelles. The present study aimed to identify the specific impact of these dietary lipids-containing micelles on gene expression in enterocytes. We analyzed, by microarray, the modulation of gene expression in Caco-2/TC7 enterocytes in response to different lipid supply conditions that reproduced either the permanent presence of albumin-bound lipids at the basal pole of enterocytes or the physiological delivery, at the apical pole of lipid micelles, which differ in their composition during the inter-prandial (IPM) or the post-prandial (PPM) state. These different conditions led to distinct gene expression profiles. We observed that, contrary to lipids supplied at the basal pole, apical lipid micelles modulated a large number of genes. Moreover, when compared to the apical supply of IPM, PPM specifically impacted 46 genes from 3 major cell function categories: signal transduction, lipid metabolism and cell adhesion/architecture. Results from this first large-scale analysis underline the importance of the mode and polarity of lipid delivery on enterocyte gene expression. They demonstrate specific and coordinated transcriptional effects of dietary lipids-containing micelles that could impact the structure and polarization of enterocytes and their functions in nutrient transfer.

**KEYWORDS:** nutrients, alimentary lipids, mRNA, intestine

## INTRODUCTION

The expansion of metabolic diseases (obesity, metabolic syndrome and diabetes), and the subsequent atherosclerosis and cardiovascular diseases, are linked to the important changes in dietary habits that have occurred during the last decades, among which an increase in fat intake (44). Though this impairment of energy homeostasis has been largely analyzed, little attention has been paid to the role that intestine could play in this process. This organ is the first to face nutrients and may therefore contribute actively to these pathologies through the control of absorption, metabolism and delivery of dietary lipids.

Enterocytes represent the major cell population of the intestinal epithelium. As absorptive cells (31), they ensure the delivery of dietary lipids through a highly polarized process, from absorption at the apical pole of enterocytes to secretion at their basolateral pole towards lymph then general circulation (for review (33)). Dietary lipids, mostly triglycerides (TG), are supplied to enterocytes as complex micelles resulting from their hydrolysis by pancreatic enzymes, into fatty acids (FA) and monoglycerides (MG), and their solubilization by biliary salts and lipids in the intestinal lumen. After absorption of FA and MG, TG must be re-synthesized in enterocytes and associated to the structural apolipoprotein (apo) B48 to produce chylomicrons, the intestinal form of triglyceride-rich lipoproteins (TRL) (12, 33). Chylomicrons also carry apolipoproteins A-I and A-IV, the latter being proposed as relaying satiety signaling (47).

As highly polarized cells, enterocytes integrate specific signals originating both from luminal stimuli at their apical pole and from hormones, growth factors and neurotransmitters at their basal pole (for review (36)). Studies on lipid-induced signals must consider another degree of complexity resulting from the asymmetry in the composition and vehicle of supplied lipids between the apical and basal poles of enterocytes. The basolateral pole of enterocytes faces the permanent presence of circulating FA and cholesterol whereas their apical pole faces micelles made of bile lipids in the inter-prandial period, to which FA and MG resulting from the digestion of TG are periodically added after a meal. The way these various modes of lipid supply could modulate differently the enterocyte function has been poorly investigated. *In vivo*, these simultaneous stimuli are integrated and cannot be discriminated from each other. We thus developed a model for the study of the specific impact exerted by these different modes of lipid delivery in cultured Caco-2/TC7 cells, which reproduce most of the morphological and functional characteristics of enterocytes (8, 56). We previously reported that the trafficking of apoB requires cell polarization and depends on the mode of lipid delivery to the enterocytes. The presence of FA and cholesterol at the basal pole of the cells, supplied as albumin-bound lipids (ITS/L), promotes the targeting of apoB to the apical brush border domain. Conversely, an apical supply of dietary lipids-containing micelles specifically triggers the displacement of the apical apoB towards the secretory compartments (32). This apoB movement is specifically induced by complex micelles that mimic the composition of those found in the intestinal lumen after a lipid-rich meal (post-prandial micelles, PPM), which concomitantly induce the secretion of TG as TRL (9). We have also shown that the lipid-dependent increase of apoA-IV gene expression, observed both *in vivo* and in Caco-2/TC7 enterocytes, resulted from distinct mechanisms depending on the mode of lipid delivery (6). The permanent supply of lipids at the basal pole targets both transcription and mRNA stabilization, whereas an apical supply of PPM induces only apoA-IV transcription, through the hepatocyte nuclear factor HNF-4 (6), a process that was recently also reported *in vivo*, in swine enterocytes (25). Moreover, this PPM-dependent activation of apoA-IV gene transcription was not reproduced by the apical delivery of incomplete combinations of PPM components in Caco-2/TC7 cells. This suggested that complete PPM may induce a specific signaling pathway leading to a peculiar gene expression profile (6).

The purpose of the present study was to analyze the transcriptional variations induced by the different modes of lipid delivery to enterocytes with a particular attention to the effects of an apical supply of alimentary lipids. To achieve this, we compared the effects of an apical supply of postprandial micelles or of inter-prandial micelles devoid of FA and MG, and of a basolateral supply of lipids on the transcriptome of Caco-2/TC7 enterocytes.

## MATERIALS AND METHODS

### *Cell culture*

Caco-2/TC7 cells (8) were seeded at  $6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> on six-well semi-permeable filters (3µm pore size, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), and cultured as already reported (32). In some experiments, serum was replaced by ITS (GibcoBRL; 1x: 10 µg/ml insulin, 0.55 µg/ml transferrin, 6.7 ng/ml selenium) 48 hours after seeding. From the confluence, serum or ITS was added only to the medium of the basal compartment to fit with the physiological asymmetry of intestinal epithelium environment *in vivo*. All experiments were performed after 15 days of culture.

### *Preparation of micelles and of lipid-supplemented media*

The preparation of lipids-containing media and of lipid micelles was performed as previously described (6, 32). The composition of postprandial lipid micelles (PPM) was similar to that resulting from lipid digestion in the human duodenum lumen (0.6 mM oleic acid, 0.2 mM L- $\alpha$ -lysophosphatidylcholine, 0.05 mM cholesterol, 0.2 mM 2-monooleoylglycerol, 2 mM taurocholic acid). Inter-prandial lipid micelles (IPM) were prepared as PPM but are devoid of oleic acid and 2-monooleoylglycerol. PPM or IPM were added to the medium of the upper compartment for the last 24 hours of culture, a time necessary to obtain the maximal effect of PPM on apoA-IV gene expression (6).

In some experiments, the ITS medium of the lower compartment was supplemented with lipids (0.4 mM oleic acid, 0.2 mM palmitic acid, 0.04 mM cholesterol; ITS/L medium) combined with 1% (w/v) FA-free bovine serum albumin (FAF-BSA, Sigma), with a 4:1 molar ratio of FA to albumin. Caco-2/TC7 cells were cultured in the presence of ITS/L medium from the confluence.

### *RNA extraction, hybridization on Affymetrix Chips and micro-array analysis*

Total RNA was extracted by the guanidium isothiocyanate method (10). After ultracentrifugation through CsCl gradient and precipitation, RNAs were checked for purity and integrity. RNA targets (biotin-labeled RNA fragments) were produced from 5 µg of total RNAs by synthesizing double-stranded cDNA followed by *in vitro* transcription and fragmentation reactions. Hybridization mixture, containing the cRNA fragments, probe array controls (Affymetrix Inc.), BSA, and herring sperm DNA, was prepared and hybridized to Human Genome U95Av2 arrays, representing approximately 10,000 full-length genes (Affymetrix Inc.), at 45°C for 16 h. Each RNA preparation was hybridized to duplicate chips. After washing, bound biotin-labeled cRNA was detected with a streptavidin phycoerythrin conjugate. Subsequent signal amplification was performed with a biotinylated anti-streptavidin antibody. Washing and staining procedures were automated using Affymetrix fluidics station and arrays were scanned using a Hewlett-Packard GeneArray Scanner. Low level data analysis was performed using MAS 5.0 software (Affymetrix Inc.) by running absolute analyses on each array and comparative analyses between pairs of arrays. Detailed descriptions of the analysis algorithms have been published (18, 27). All arrays were scaled to a mean gene expression intensity of 300. Starting from duplicate chips for each experimental condition, duplicate comparative analyses were run to identify differentially expressed genes (Affymetrix Change p-values < 0.003 or > 0.997) and provide estimates of the expression intensity ratios for each gene studied between the two conditions being compared. The ratios, called "Signal log ratios" (SLR), expressed in base 2 logarithmic scale, were then transformed into decimal values representing the fold change between two experimental conditions for an easier reading.

For cluster analysis, only genes differentially expressed in at least one experimental condition were retained, i.e. significant modulations had to be reproduced in the two duplicate comparative analyses and the absolute value of the SLR had to be above 1 in at least one duplicate. Two-dimensional hierarchical clustering was performed on SLR values using Cosine correlation and the average linkage algorithm (UPGMA) using the GeneMaths software package (Applied Maths Inc.). Classification of genes by cell function category was based on Gene Ontology (GO) terms included in HG-U95Av2 array annotations (Affymetrix). Differentially expressed genes were analyzed according to predefined pathways and functional categories annotated by KEGG (22), GO terms (2) and according to human genetic association of complex diseases and disorders by Genetic Association Database (3) using the DAVID bioinformatics resource (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) (13)).

## lipids and expression of enterocyte genes

The expression data have been deposited in the EBI's ArrayExpress under the accession number: E-MEXP-1446.

### *Taqman Low-density Array (TLDA) analysis*

Reverse transcription from total RNA was performed as described previously (6). Messenger RNA was quantified by the TaqMan Low Density Array technology (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Pre-designed TaqMan probe and primer sets for target genes were factory loaded into the 384 wells of TLDA configured to contain three replicates per target gene. PCRs were performed using cDNA sample corresponding to 100ng of starting RNA and TaqMan Universal PCR Master mix (Applied Biosystems). PCR conditions were one step of 94.5°C for 10 min followed by 40 cycles at 97°C for 30s and 59.7°C for 1 min. Gene expression values were determined using the calculation of the relative quantitation (RQ) of target genes normalized to a calibrator corresponding to one chosen culture condition through which all other conditions were analyzed. RQ calculation was performed using SDS 2.3 software package (Applied Biosystems) and was based on the  $\Delta\Delta C_t$  method using 18S RNA as endogenous control gene. SDS 2.3 software package calculates the error bars based on the maximum (RQMax) and the minimum (RQMin) expression levels for each gene, defining the region of expression within which the true expression level value is likely to occur with a confidence level of 95%.

## RESULTS

### *Gene expression pattern in Caco-2/TC7 cells under different conditions of lipid supply*

We first analyzed the respective influence on gene expression of lipids supplied at the apical or the basal pole of Caco-2/TC7 cells (**Table 1**), in conditions reproducing the physiological asymmetry of lipid supply to enterocytes. The effect of lipids supplied at the basal pole was analyzed in cells permanently cultured in the presence of defined ITS medium supplemented with albumin-bound oleic acid, palmitic acid and cholesterol (ITS/L) or in the presence of fetal bovine serum (FBS) providing both lipids and growth factors. The effect of apically supplied lipids was analyzed after the addition for 24 hours of postprandial (PPM) or inter-prandial (IPM) micelles (see Methods). These different conditions were compared with cultures in a minimal serum-free/lipid-free ITS medium, which allows Caco-2/TC7 cells to grow and differentiate normally (21, 32).

The DNA micro-array analysis of Caco-2/TC7 cells under these different conditions revealed a significant 2-fold modulation of the expression of 412 genes in at least one condition of lipid supply, as compared to ITS condition (**Fig.1A**). The hierarchical clustering of modulated genes, with duplicates of each lipid supply condition grouped together, demonstrated that the two conditions of lipid supply at the basal pole (FBS and ITS/L) were closely related and clustered in a same sub-branch. This observation is consistent with our previous results showing that ITS/L condition reproduced the effect of FBS supply on the targeting of apoB to the apical domain of Caco-2 cells (32) and on apoA-IV gene expression (6). The vertical cluster formed by the two conditions of lipid supply at the basal pole differed from that obtained in the two conditions of lipid supply at the apical pole as postprandial (PPM) or inter-prandial (IPM) micelles. These results pointed out that the different modes of lipid delivery at the apical or basal pole of enterocytes lead to distinct gene expression profiles.

We further analyzed the differential effects of lipids when supplied at the apical or basal pole. To achieve this, we combined the PPM and IPM conditions and calculated the mean value of the modulation of gene expression observed in these conditions to obtain values corresponding to the "apical" lipid micelle supply condition. This "apical" condition was then compared to the ITS/L condition. FBS condition was not included in this comparison since FBS also comprises growth factors that could modulate the expression of genes independently of lipids. We identified 319 genes that displayed, in at least one condition of lipid supply, a significant 1.6-fold modulation of their expression when compared to ITS condition, i.e. in the absence of lipids. Among them, 141 genes were equally modulated by lipids when supplied at the apical or basal pole (apical/basal ratio <1.6). The apical supply of lipid micelles specifically (118 genes, without effect of basal lipids) or preferentially (29 genes, apical/basal ratio >1.6) modulated 147 genes as compared to ITS/L condition, while 20 genes were preferentially modulated by basal lipids (apical/basal ratio <0.6). Eleven genes were found inversely modulated by apical micelles versus basal lipids (**Fig 1B**).

## lipids and expression of enterocyte genes

Among the 141 genes that were equally modulated by apical lipid micelles and basal albumin-bound lipids (**Fig.1B # 3**), 62 genes were up-regulated (**supplementary Table S1**). Their classification, according to their cellular function and functional annotation using DAVID tools, revealed that the main cell function category grouped 10 genes involved in glucose metabolism and more particularly in glycolysis pathway (*PFK*, *PKM2*, *GPI*, *PGK1*, *ALDOA*, *PGAM*, *TP11* and *LDHA*). The cell adhesion/architecture and the lipid metabolism categories were also important, with an over-representation of genes involved in collagen synthesis, and in cholesterol and lipoprotein metabolism respectively. Seventy-nine genes were equally down-regulated in both basal and apical lipid supply conditions (**supplementary Table S2**). Their classification showed that they are equally distributed in several cell function categories. However, DAVID analysis revealed that several genes, from different cell function categories, were also associated with biological processes related to various stress responses (such as defense response, wounding...) (see **Table S2**).

Some genes were inversely modulated by apical micelles and basal lipids. All these genes, except for *APOD* gene that encodes a multifunction lipid carrier protein (39), were up-regulated by apical lipid micelles and down-regulated in the presence of basal lipids (**Fig.1B #5** and **Table 2**). These genes were essentially from two cell function categories: cell adhesion/architecture category, including two components of intermediate filaments (*KRT8* and *KRT18*) and of microtubules (*TUBB2A* and *TUBA1B*), and lipid metabolism category, with genes related to cholesterol metabolism (*LDLR*, *INSIG1* and *NSDHL* genes).

Our analysis revealed that 20 genes are preferentially modulated by basal albumin-bound lipids (**Fig. 1B #4**). These genes (**Table 3**) were equally distributed in several cell function categories and were essentially down-regulated in the presence of albumin-bound lipids. Only five genes were up-regulated by basal lipids: *ZG16* gene, encoding a recently discovered secreted protein involved in glycoprotein secretion (54), *GABRA2* gene, involved in the signaling effects of the major inhibitory neurotransmitter gamma-aminobutyric acid and associated with alcohol dependence (11), *SLC36A1* and *SLC1A1* genes, implicated in amino acid transport (46), and *S100G* gene encoding calbindin D9K, an intracellular calcium-binding protein involved in calcium homeostasis (5).

The apical lipid micelles preferentially (**Fig. 1B #2** and **supplementary Table S3**) or specifically (**Fig. 1B #1** and **supplementary Table S4**) modulated a large number of genes (29 and 118 respectively). Among genes preferentially modulated by apical lipid micelles (**Table S3**), the up-regulated ones (14 genes) were mainly from two cell function categories corresponding to lipid metabolism and cell adhesion/architecture, while the amino acid metabolism and nucleus-transcription-translation categories were the most represented categories among the down-regulated genes. Among the 118 genes specifically modulated by the apical lipid micelles, 83 genes were up-regulated and 35 genes were down-regulated (**Table S4**). These genes were mainly from the same four top cell function categories: cell adhesion/architecture, receptor-signal transduction, nucleus-transcription-translation and lipid metabolism (**Table 4**). We identified several KEGG pathways that were enriched in the up-regulated genes as compared to the down-regulated genes. Four KEGG pathways were related to cell-matrix and cell-cell interactions: focal adhesion, regulation of actin cytoskeleton, tight junction and cell communication. The steroid biosynthesis KEGG pathway was also well represented.

### *Identification of changes in gene expression specifically induced by micellar dietary lipids*

We then focused on the identification of genes specifically modulated by alimentary lipids through the comparison between the apical supply of PPM and the apical supply of IPM devoid of FA and MG. Analysis of the micro-array data revealed 46 genes that were differentially modulated between PPM and IPM conditions with a significant change of more than 1.6-fold (**Table 5**), among which 21 genes displayed a more than 2-fold change. A majority of the PPM-modulated genes (33/46) was up-regulated in PPM versus IPM condition. Classification of genes by cell function showed that three top cell function categories were over-represented: lipid metabolism, signal transduction, and cell adhesion/architecture (26%, 24% and 24 % respectively) (**Table 6**).

The lipid metabolism category included 11 genes, among which 8 are up-regulated in PPM condition as compared to IPM condition (**Table 6**). Four genes are involved in lipoprotein homeostasis, namely *APOA4*, which exhibited the highest up-regulation in this category (2.6-2.4 fold change), *APOC3*, *MTTP* and *LDR* genes (**Table 5**). Using the Genetic Association Database

## lipids and expression of enterocyte genes

through DAVID tools, the functional analysis revealed a genetic association between *PCK1*, *APOA4*, *APOC3*, *LDLR* and *MTTP* and type 2 diabetes and between *APOA4*, *APOC3* and *LDLR* genes and obesity. Concerning the other genes, the cytosolic *HMGCS1* and *INSIG1* genes are involved in cholesterol homeostasis (16, 17), *HMGCS2* in the synthesis of ketone bodies (17), and *ADFP* gene encodes an intrinsic protein of cytosolic lipid droplets (7). The three down-regulated genes present in the lipid metabolism category were: *ALDH3B1*, a member of a superfamily that metabolizes a wide variety of endogenous and exogenous aldehydes and ensures lipid peroxidation (30), *PDTSSI* implicated in phospholipid biosynthesis (51), and *AKR1C1* that plays a role in steroid hormone activation and in the biosynthesis of bile acid intermediates (38).

The signal transduction category displayed a set of 11 genes, among which 8 genes were up-regulated by PPM as compared to IPM (**Table 6**), including highly up-regulated genes (> 2-fold, bold in **Table 5**), such as *DUSP1* and *DUSP5*, which encode phosphatases involved in the MAPK signaling pathways (23). Two G proteins were also present in this cell function category: the coagulation factor II (thrombin) receptor like 1 (*F2LR1*) implicated in ion transport and/or cell proliferation in intestinal cells (29), and the ras homolog gene family member B (*RHOB*) that is involved in cytoskeleton architecture and endocytosis traffic (14).

The third top cell function category, i.e. cell adhesion/architecture, grouped a set of 9 genes, of which 8 were up-regulated after an apical supply of PPM as compared to IPM (**Table 6**). Some of them are involved in cell-cell interactions such as claudins 3 and 4 that are components of tight junctions (50), syntenin, a component of adherens junctions that is involved in the traffic of plasma membrane-associated proteins (55), and CEACAM1, an adhesion molecule that is also involved in a number of distinct physiological processes (24). Other genes of this category are involved in cell-matrix interactions, such as integrin alpha 6 (28) and/or in the maintenance of cell structure, such as ectodermal-neutral cortex (52) and thymosin beta 10 (19) that are both implicated in actin dynamics. Keratin 20 is a component of intermediate filaments (53) and annexin A13 is involved in apical and basolateral vesicular transport (48).

Using BIND database through DAVID tools, the functional annotation analysis of the 46 genes differentially expressed between PPM and IPM conditions revealed that 43% (20/46, see **Table 5**) of these genes were putative or known targets of HNF-4 (35).

The modulation of the expression of the 21 genes differentially expressed in PPM versus IPM conditions, with at least a 2-fold change in their expression (**Table 5**, genes in bold), was then confirmed by quantitative RT-PCR assays, using a TaqMan Low Density Array approach (TLDA). According to their role in lipid metabolism, we also included in this analysis *MTTP*, *ADFP* and *APOC3* genes that are differentially expressed in PPM versus IPM conditions, though to a lower extent (1.8-1.7; 1.7-1.6; 1.7-1.5 respectively, **Table 5**). As shown in **Figure 2**, the modulation of gene expression determined using TLDA closely fits with that obtained from the initial affymetrix DNA micro-array analysis (**Table 5**).

## DISCUSSION

The importance of micellar solubilization of lipid digestion products for their uptake by enterocytes is well documented (for review (34)). However, only few studies have taken into account this physiological form of dietary lipids in the analysis of the specific molecular mechanisms involved in their polarized transfer, from the intestinal lumen to the lymph, through triglyceride synthesis and lipoprotein assembly and secretion.

Using a transcriptomic approach in Caco-2/TC7 enterocytes, we demonstrate for the first time that 1) the specificity of the signals induced by lipids are dependent on the polarity and the mode of their physiological delivery, since distinct gene expression profiles were obtained after their basolateral supply as albumin-bound components (ITS/L and FBS conditions) or their apical delivery as micelles in the postprandial or inter-prandial state (PPM and IPM conditions); 2) micelles comprising lipid digestion products (PPM) specifically modulate the expression of genes involved in three major cell function categories, i.e. lipid metabolism, as could be expected, but also signal transduction and cell adhesion/ architecture.

Among genes specifically modulated by the supply of PPM as compared to IPM, the induction of apoA-IV, apoC3, two components of lipoproteins and of MTP, necessary to the transfer of lipid to apoB for the stabilization of this structural component of TRL, was consistent with the induction of TRL secretion that we previously observed in Caco-2/TC7 cells after PPM

supply (9). Concomitantly to TRL secretion, PPM supply was reported to induce in enterocytes, *in vivo* (42) and in Caco-2 cells (9), a transient storage of TG as cytosolic droplets, which can be further mobilized and re-directed towards ER lumen for TRL secretion. It is thus of interest to note that PPM supply induced the expression of the PAT family protein ADFP, a major cytosolic lipid droplet-associated protein (7).

The intestinal function of nutrient absorption, which is ensured by enterocytes, closely depends on the maintenance of cell differentiation and polarity that occurs through the regulation of the expression of components of cell-matrix and cell-cell adhesion. These components are also required for multiple cellular events including endocytosis, polarized targeting of newly synthesized or recycled proteins to the apical or basolateral plasma membranes, and secretion (see for review (1)). A crosstalk between cell-cell and cell-matrix adhesion pathways and intestinal lipid metabolism has been reported in Caco-2 enterocytes, in which the integrin-dependent adhesion to the extracellular matrix strengthened the formation of E-cadherin-actin complexes and increased the expression of apoA-IV gene (43) through the control of nuclear HNF-4 $\alpha$  abundance (37). We have previously demonstrated that the PPM-induced activation of *APOA4* gene transcription was under the control of the transcription factor HNF-4 (6). In the present study, among the 46 genes that are differentially modulated by PPM as compared with IPM, 20 genes are known or putative targets for HNF-4. Such an impact of HNF-4 on intestinal gene expression is poorly documented while a key role of HNF-4 in hepatocyte differentiation and function has been largely demonstrated (see for review (40)). In recent transcriptome, metabolome and bioinformatics analyses of mouse small intestine, authors hypothesized that HNF-4 was involved in the regulation of genes involved in the differentiation process and in lipid metabolism in enterocytes (26, 45). Studies, mainly performed in the liver, have reported that FA or acyl-CoAs were able to modulate HNF-4-DNA binding activity (see for review (40)). However, we previously demonstrated, in Caco-2/TC7 enterocytes, that distinct molecular mechanisms were involved in the lipid-dependent induction of apoA-IV gene expression by albumin-bound FA added at the basal pole of enterocytes or by FA-containing lipid micelles (PPM) at the apical pole. It so appears that supply of FA cannot account by itself for the HNF-4-dependent induction of lipid metabolism-related gene expression by dietary lipids (6).

We showed that one fourth of the genes that are specifically modulated by PPM as compared to IPM were involved in signal transduction pathways. This observation is consistent with our hypothesis that dietary lipids under the form of lipid micelles could induce specific signaling pathways leading to the mobilization of the apical apoB and to its transfer to intracellular secretory compartments (32), a process necessary for the fusion of this structural protein to TG for the assembly of TRL. Among these genes, we observed an increased expression of RhoB, a GTPase protein involved in signaling events and participating to the cross-talk between actin dynamics, cell-cell adhesion, signaling and membrane trafficking (1, 41). Moreover, a regulatory role of Rho family protein in lipid metabolism, and particularly in cholesterol efflux, has been recently suggested (49). We also observed an increased expression of *DUSP1* and *DUSP5*, two genes that are involved in MAPK signaling pathway (23). Interestingly, in fructose-fed hamster, an animal model of insulin resistance characterized by an overproduction of hepatic VLDL and intestinal apoB-containing lipoproteins, Federico et al. (15) showed increased basal levels of phosphorylated ERK1/2 in enterocytes and decreased intestinal apoB48 synthesis and secretion after the inhibition of ERK pathway *in vivo*.

Among the genes specifically induced by PPM, we also observed a 2-fold increase in the expression of *TM4SF1* gene, a member of transmembrane-4 superfamily, which, despite a still unknown biological function, shares topological features with tetraspanin superfamily that is involved in cell proliferation and adhesion as well as in protein trafficking and signal transduction (4). The potential implication of TM4SF1 in lipid metabolism is highlighted by a recent report showing that this protein is markedly expressed in large adipocytes as compared to small adipocytes from human adipose tissues (20).

In conclusion, our results emphasize a specific and coordinated impact of dietary lipids, when supplied under their physiological micellar form, on the expression of genes involved not only in energy metabolism, but also in cell polarization, trafficking and signaling processes in enterocytes that could enhance the vectorial nutrient transfer capacity in these intestinal absorptive cells, a process in which HNF-4 could act as a major coordinator.

**ACKNOWLEDGMENTS:**

We thank T. Pédrón (Institut Pasteur, INSERM U786, Paris, France) and D.M. Mutch (Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM UMRS U872 team 7, Paris, France) for helpful discussions.

**GRANT SUPPORT:**

O.B. is recipient of a fellowship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

## REFERENCES

1. **Apodaca G.** Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* 2: 149-159, 2001.
2. **Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, and Sherlock G.** Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics* 25: 25-29, 2000.
3. **Becker KG, Barnes KC, Bright TJ, and Wang SA.** The genetic association database. *Nature genetics* 36: 431-432, 2004.
4. **Berditchevski F, and Odintsova E.** Tetraspanins as regulators of protein trafficking. *Traffic* 8: 89-96, 2007.
5. **Bronner F.** Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis. *TheScientificWorldJournal* 1: 919-925, 2001.
6. **Carriere V, Vidal R, Lazou K, Lacasa M, Delers F, Ribeiro A, Rousset M, Chambaz J, and Lacorte JM.** 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, 2005.
7. **Chang BH, and Chan L.** Emerging Role of Lipid Droplet Protein ADFP in Health and Disease. *American journal of physiology* 2006.
8. **Chantret I, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Brot-Laroche E, Zweibaum A, and Rousset M.** Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J Cell Sci* 107 ( Pt 1): 213-225, 1994.
9. **Chateau D, Pauquai T, Delers F, Rousset M, Chambaz J, and Demignot S.** Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells. *J Cell Physiol* 202: 767-776, 2005.
10. **Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, and Rutter WJ.** Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299, 1979.
11. **Da Settimo F, Taliani S, Trincavelli ML, Montali M, and Martini C.** GABA A/Bz receptor subtypes as targets for selective drugs. *Current medicinal chemistry* 14: 2680-2701, 2007.
12. **Davidson NO, and Shelness GS.** APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu Rev Nutr* 20: 169-193, 2000.
13. **Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, and Lempicki RA.** DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome biology* 4: P3, 2003.
14. **Ellis S, and Mellor H.** Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases. *Trends Cell Biol* 10: 85-88, 2000.
15. **Federico LM, Naples M, Taylor D, and Adeli K.** 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, 2006.
16. **Heemers HV, Verhoeven G, and Swinnen JV.** Androgen activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway: Current insights. *Mol Endocrinol* 20: 2265-2277, 2006.
17. **Hegardt FG.** Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Biochem J* 338 ( Pt 3): 569-582, 1999.
18. **Hubbell E, Liu WM, and Mei R.** Robust estimators for expression analysis. *Bioinformatics* 18: 1585-1592, 2002.
19. **Huff T, Muller CS, Otto AM, Netzker R, and Hannappel E.** beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 205-220, 2001.
20. **Jernas M, Palming J, Sjöholm K, Jennische E, Svensson PA, Gabrielsson BG, Levin M, Sjögren A, Rudemo M, Lystig TC, Carlsson B, Carlsson LM, and Lonn M.** Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *Faseb J* 20: 1540-1542, 2006.
21. **Jumarie C, and Malo C.** Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J Cell Physiol* 149: 24-33, 1991.
22. **Kanehisa M, and Goto S.** KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* 28: 27-30, 2000.

23. **Kondoh K, and Nishida E.** Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochimica et biophysica acta* 1773: 1227-1237, 2007.
24. **Kuespert K, Pils S, and Hauck CR.** CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Current Opinion in Cell Biology* 18: 565-571, 2006.
25. **Leng S, Lu S, Yao Y, Kan Z, Morris GS, Stair BR, Cherny MA, and Black DD.** Hepatocyte nuclear factor-4 mediates apolipoprotein A-IV transcriptional regulation by fatty acid in newborn swine enterocytes. *American journal of physiology* 293: G475-483, 2007.
26. **Li X, Madison BB, Zacharias W, Kolterud A, States D, and Gumucio DL.** Deconvoluting the intestine: molecular evidence for a major role of the mesenchyme in the modulation of signaling cross talk. *Physiol Genomics* 29: 290-301, 2007.
27. **Liu WM, Mei R, Di X, Ryder TB, Hubbell E, Dee S, Webster TA, Harrington CA, Ho MH, Baid J, and Smeekens SP.** Analysis of high density expression microarrays with signed-rank call algorithms. *Bioinformatics* 18: 1593-1599, 2002.
28. **Lussier C, Basora N, Bouatrouss Y, and Beaulieu JF.** Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interactions in the human small intestinal mucosa. *Microsc Res Tech* 51: 169-178, 2000.
29. **Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, and Plevin R.** Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53: 245-282, 2001.
30. **Marchitti SA, Orlicky DJ, and Vasiliou V.** Expression and initial characterization of human ALDH3B1. *Biochemical and biophysical research communications* 356: 792-798, 2007.
31. **Massey-Harroche D.** Epithelial cell polarity as reflected in enterocytes. *Microsc Res Tech* 49: 353-362, 2000.
32. **Morel E, Demignot S, Chateau D, Chambaz J, Rousset M, and Delers F.** Lipid-dependent bidirectional traffic of apolipoprotein B in polarized enterocytes. *Mol Biol Cell* 15: 132-141, 2004.
33. **Mu H, and Hoy C-E.** The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research* 43: 105-133, 2004.
34. **Nordskog BK, Phan CT, Nutting DF, and Tso P.** An examination of the factors affecting intestinal lymphatic transport of dietary lipids. *Adv Drug Deliv Rev* 50: 21-44, 2001.
35. **Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, Fraenkel E, Bell GI, and Young RA.** Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303: 1378-1381, 2004.
36. **Pacha J.** Development of intestinal transport function in mammals. *Physiological reviews* 80: 1633-1667, 2000.
37. **Peignon G, Thenet S, Schreider C, Fouquet S, Ribeiro A, Dussaulx E, Chambaz J, Cardot P, Pinçon-Raymond M, and Le Beyec J.** E-cadherin-dependent transcriptional control of apolipoprotein A-IV gene expression in intestinal epithelial cells: a role for the hepatic nuclear factor 4. *J Biol Chem* 281: 3560-3568, 2006.
38. **Penning TM, Jin Y, Heredia VV, and Lewis M.** Structure-function relationships in 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenases: a comparison of the rat and human isoforms. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85: 247-255, 2003.
39. **Rassart E, Bedirian A, Do Carmo S, Guinard O, Sirois J, Terrisse L, and Milne R.** Apolipoprotein D. *Biochimica et biophysica acta* 1482: 185-198, 2000.
40. **Ribeiro A, Archer A, Le Beyec J, Cattin A-L, Saint-Just S, Pinçon Raymond M, Chambaz J, Lacasa M, and Cardot P.** Hepatic Nuclear Factor-4, a Key Transcription Factor at the Crossroads Between Architecture and Function of Epithelia. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 1: 166-175, 2007.
41. **Ridley AJ.** Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic* 2: 303-310, 2001.
42. **Robertson MD, Parkes M, Warren BF, Ferguson DJ, Jackson KG, Jewell DP, and Frayn KN.** Mobilisation of enterocyte fat stores by oral glucose in humans. *Gut* 52: 834-839, 2003.
43. **Schreider C, Peignon G, Thenet S, Chambaz J, and Pinçon-Raymond M.** Integrin-mediated functional polarization of Caco-2 cells through E-cadherin-actin complexes. *J Cell Sci* 115: 543-552, 2002.
44. **Shikany JM, and White GL, Jr.** Dietary guidelines for chronic disease prevention. *South Med J* 93: 1138-1151, 2000.
45. **Stegmann A, Hansen M, Wang Y, Larsen JB, Lund LR, Ritie L, Nicholson JK, Quistorff B, Simon-Assmann P, Troelsen JT, and Olsen J.** Metabolome, transcriptome, and

bioinformatic cis-element analyses point to HNF-4 as a central regulator of gene expression during enterocyte differentiation. *Physiol Genomics* 27: 141-155, 2006.

46. **Thwaites DT, and Anderson CM.** H<sup>+</sup>-coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine. *Experimental physiology* 92: 603-619, 2007.

47. **Tso P, Sun W, and Liu M.** Gastrointestinal satiety signals IV. Apolipoprotein A-IV. *American journal of physiology* 286: G885-890, 2004.

48. **Turnay J, Lecona E, Fernandez-Lizarbe S, Guzman-Aranguez A, Fernandez MP, Olmo N, and Lizarbe MA.** Structure-function relationship in annexin A13, the founder member of the vertebrate family of annexins. *Biochem J* 389: 899-911, 2005.

49. **Utech M, Hobbel G, Rust S, Reinecke H, Assmann G, and Walter M.** Accumulation of RhoA, RhoB, RhoG, and Rac1 in fibroblasts from Tangier disease subjects suggests a regulatory role of Rho family proteins in cholesterol efflux. *Biochemical and biophysical research communications* 280: 229-236, 2001.

50. **Van Itallie CM, and Anderson JM.** Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 68: 403-429, 2006.

51. **Vance JE, and Vance DE.** Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochem Cell Biol* 82: 113-128, 2004.

52. **Zhao L, Gregoire F, and Sul HS.** Transient induction of ENC-1, a Kelch-related actin-binding protein, is required for adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 275: 16845-16850, 2000.

53. **Zhou Q, Toivola DM, Feng N, Greenberg HB, Franke WW, and Omary MB.** Keratin 20 helps maintain intermediate filament organization in intestinal epithelia. *Mol Biol Cell* 14: 2959-2971, 2003.

54. **Zhou YB, Cao JB, Yang HM, Zhu H, Xu ZG, Wang KS, Zhang X, Wang ZQ, and Han ZG.** hZG16, a novel human secreted protein expressed in liver, was down-regulated in hepatocellular carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications* 355: 679-686, 2007.

55. **Zimmermann P, Tomatis D, Rosas M, Grootjans J, Leenaerts I, Degeest G, Reekmans G, Coomans C, and David G.** Characterization of syntenin, a syndecan-binding PDZ protein, as a component of cell adhesion sites and microfilaments. *Mol Biol Cell* 12: 339-350, 2001.

56. **Zucco F, Batto AF, Bises G, Chambaz J, Chiusolo A, Consalvo R, Cross H, Dal Negro G, de Angelis I, Fabre G, Guillou F, Hoffman S, Laplanche L, Morel E, Pincon-Raymond M, Prieto P, Turco L, Ranaldi G, Rousset M, Sambuy Y, Scarino ML, Torreilles F, and Stamatii A.** An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of Caco-2 cell lines. *Altern Lab Anim* 33: 603-618, 2005.

**LEGENDS OF FIGURES**

**Figure 1: Transcriptome analysis of enterocytes according to the mode of lipid delivery. A)** Hierarchical clustering of the 412 genes that are modulated in the different conditions of lipid supply in Caco-2/TC7 cells. Rows represent the 412 genes with a modulation of expression ratio over a cut-off value of 2, as compared to ITS, in at least one lipid supply condition. Columns represent the 8 arrays corresponding to 4 different conditions (analyzed in duplicate) of lipid supply (see Table 1) compared to ITS condition. Red and green indicate up- and down-regulated expression, respectively. PPM: post-prandial micelles; IPM: inter-prandial micelles; ITS insulin/transferrin/selenium-containing medium; ITS/L: ITS medium supplemented with albumin-bound lipids; FBS: fetal bovine serum. **B)** Schematic representation of gene expression modulation under an apical or a basal supply of lipids to Caco-2/TC7 cells. The mean value of the modulation of gene expression observed in PPM and IPM conditions was calculated to obtain the apical lipid supply condition that was then compared to the values obtained in ITS/L condition corresponding to the supply of lipids at the basal pole. The apical or basal supply of lipids significantly modulated the expression of 319 genes (with at least a 1.6 factor as compared to ITS condition). Among them, 118 genes were modulated only by the apical lipid micelles (#1); 29 genes were preferentially modulated by apical lipid micelles (#2, apical/basal ratio >1.6); 141 genes were equally modulated by both apical lipid micelles and basal lipids (#3, apical/basal ratio <1.6); 20 genes were preferentially modulated by basal lipids (#4, apical/basal ratio <0.6); 11 genes were inversely modulated by apical lipid micelles or basal lipids (#5).

**Figure 2: Validation of results from affymetrix DNA micro-array.** The mRNA levels of genes selected from DNA micro-array analysis on the basis of at least a two-fold changed expression in PPM condition versus IPM condition, and the mRNA levels of *MTTP*, *ADFP* and *APOC3* genes, were quantified by real-time PCR analysis, using TLDA approach. Assays were performed in triplicate and expression measurements were normalized to 18S rRNA level. IPM condition was defined as the calibrator condition, to which PPM condition was compared. Open bars represent the normalized relative quantities (RQ) of target gene expression in PPM condition as compared to IPM condition (set at 1), determined by TLDA analysis. Error bars were based on the maximum and the minimum expression levels (RQmax and RQmin) for each gene calculated by using the SDS 2.3 software package. Black bars represent the mRNA level of genes in PPM condition as compared to IPM condition (set at 1), determined by Affymetrix DNA micro-array analysis and performed in duplicate. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

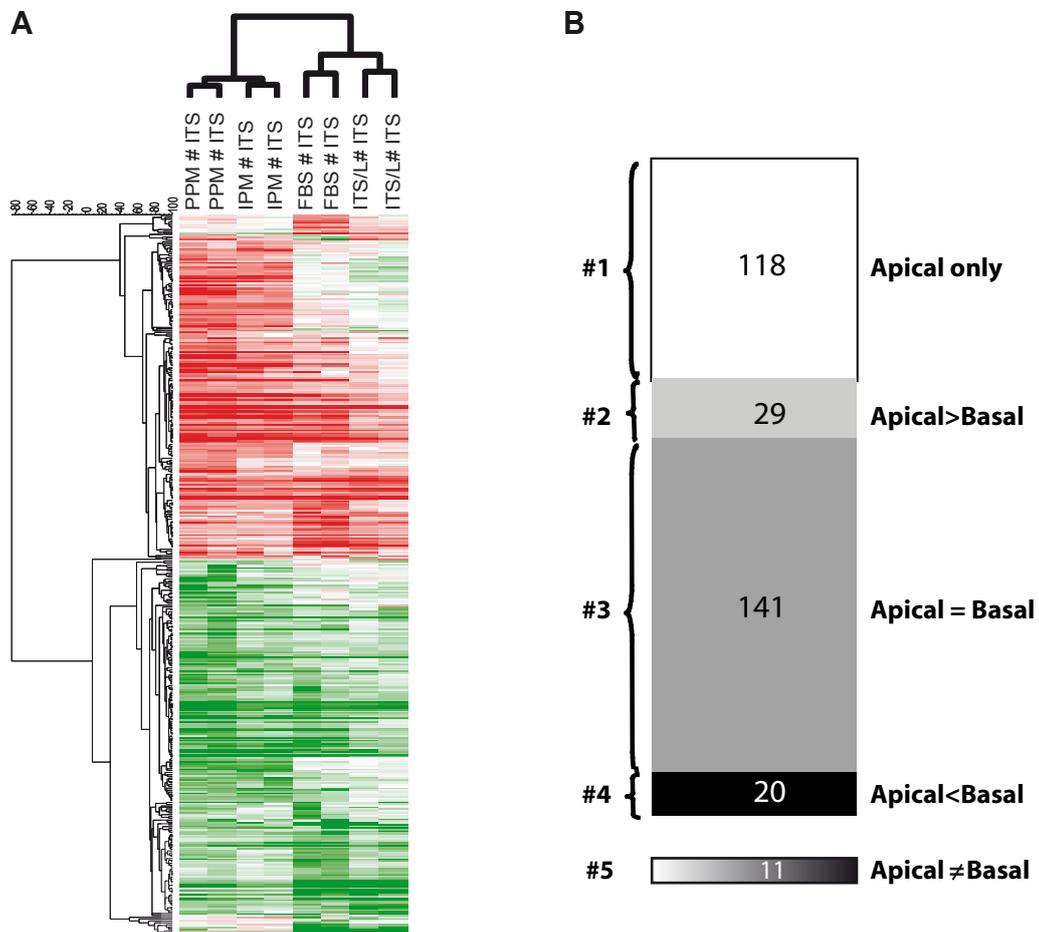


Figure 1

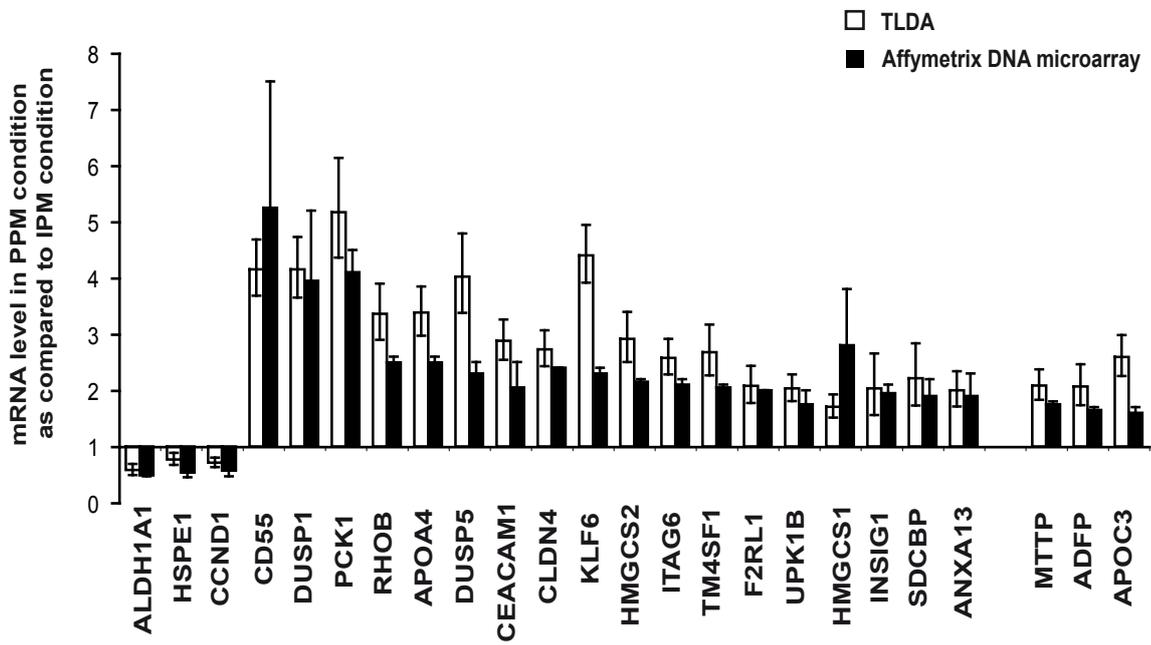


Figure 2

<b>condition</b>	<b>PPM</b>	<b>IPM</b>	<b>FBS</b>	<b>ITS/L</b>	<b>ITS</b>
<b>compartment</b>					
<b>apical</b>	PPM	IPM	DMEM	DMEM	DMEM
<b>basal</b>	ITS	ITS	FBS	ITS/L	ITS

**Table 1: Lipid supply conditions in Caco-2/TC7 cell cultures**

Caco-2/TC7 cells were cultured either in the presence of a minimum medium (ITS condition), or in the permanent presence of albumin-bound lipids in the basal compartement (ITS/L or FBS conditions) or in the presence for 24hrs, in the apical compartement, of lipid micelles mimicking the intestinal lumen content in inter-prandial period (IPM condition) or postprandial period (PPM condition). DMEM : Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium; ITS: Insulin transferrin selenium; FBS: fetal bovine serum; ITS/L: ITS medium supplemented with lipids (0.4 mM oleic acid, 0.2 mM palmitic acid and 0.04 mM cholesterol) combined with 1% (w/v) fatty acid-free bovine serum albumin; IPM : inter-prandial micelles ( 0.2 mM L- $\alpha$ -lysophosphatidylcholine, 0.05 mM cholesterol and 2 mM taurocholic acid); PPM : postprandial micelles (same composition as IPM plus 0.6 mM oleic acid and 0.2 mM 2-monooleoylglycerol)

Protein name	ID	Gene name	cellular function category	fold change / ITS	
				apical	basal
tubulin beta	296_at	<i>TUBB2A</i>	cell adhesion/architecture	3.7	0.6
keratin 18	35766_at	<i>KRT18</i>	cell adhesion/architecture	3.4	0.6
low density lipoprotein receptor	32855_at	<i>LDLR</i>	lipid metabolism	3.3	0.6
insulin induced gene 1	35303_at	<i>INSIG1</i>	lipid metabolism	2.3	0.6
anterior gradient 2 homolog (Xenopus laevis)	38827_at	<i>AGR2</i>	unclassified	2.2	0.4
keratin 8	33824_at	<i>KRT8</i>	cell adhesion/architecture	2.2	0.6
NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	36500_at	<i>NSDHL</i>	lipid metabolism	2.0	0.6
tubulin, alpha, ubiquitous	32272_at	<i>TUBA1B</i>	cell adhesion/architecture	2.0	0.6
fatty acid synthase	38429_at	<i>FASN</i>	lipid metabolism	1.9	0.6
inhibitor of DNA binding 1	36617_at	<i>ID1</i>	nucleus-transcription-translation	1.9	0.6
alpha-2-HS-glycoprotein	36621_at	<i>AHSG</i>	receptor-signal transduction	1.7	0.2
apolipoprotein D	36681_at	<i>APOD</i>	unclassified	0.6	3.0

**Table 2: Genes inversely modulated by apical lipid micelles and basal albumin-bound lipids**

For each gene is indicated the fold change in mRNA level after the apical supply of lipid micelles or the basal supply of albumin-bound lipids as compared to ITS condition. Cellular function categories are indicated. ID: affymetrix identification number  
unclassified: corresponds to genes of unknown or multiple cell function categories

Protein name	ID	Gene name	cellular function category	fold change / ITS	
				apical	basal
<b>up-regulated genes:</b>					
zymogen granule protein 16	38848_at	<i>ZG16</i>	unclassified	1.8	2.9
gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 2	37062_at	<i>GABRA2</i>	receptor-signal transduction	1.5	2.8
solute carrier family 36 member 1	40923_at	<i>SLC36A1</i>	amino acid metabolism	1.6	2.5
calbindin D9K	34612_at	<i>S100G</i>	calcium metabolism-ions transport	0.7	2.3
solute carrier family 1 member 1	38268_at	<i>SLC1A1</i>	amino acid metabolism	0.9	1.6
<b>down-regulated genes :</b>					
alpha-fetoprotein	40114_at	<i>AFP</i>	unclassified	0.5	0.1
apolipoprotein H	39393_r_at	<i>APOH</i>	lipid metabolism	0.4	0.1
fibrinogen, gamma polypeptide	36622_at	<i>FGG</i>	cell adhesion/architecture	0.7	0.2
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 6	37833_at	<i>SERPINA6</i>	protease-proteasome	0.6	0.2
transthyretin	32252_at	<i>TTR</i>	unclassified	0.4	0.2
vitronectin	33377_at	<i>VTN</i>	cell adhesion/architecture	0.7	0.3
inter-alpha (globulin) inhibitor, H2 polypeptide	36584_at	<i>ITI1H2</i>	protease-proteasome	0.7	0.3
retinol binding protein 4	32552_at	<i>RBP4</i>	unclassified	0.7	0.3
metallothionein 1F	41446_f_at	<i>MT1F</i>	calcium metabolism-ions transport	0.6	0.3
glypican 3	39350_at	<i>GPC3</i>	cell adhesion/architecture	0.5	0.3
ornithine decarboxylase 1	36203_at	<i>ODC1</i>	amino acid metabolism	0.9	0.4
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	35916_s_at	<i>HNRPA3</i>	nucleus-transcription-translation	1.2	0.5
human hepatic dihydrodiol dehydrogenase	32805_at	<i>AKR1C1</i>	lipid metabolism	1.2	0.5
lipopolysaccharide-induced TNF factor	37024_at	<i>LITAF</i>	unclassified	1.0	0.5
hypothetical protein MAC30	32791_at	<i>TMEM97</i>	unclassified	0.9	0.5

**Table 3: Genes preferentially modulated by basal albumin-bound lipids**

For each gene, the fold change in mRNA level in the presence of basal albumin-bound lipids as compared to ITS condition, is indicated. Cellular function categories are indicated. ID: affymetrix identification number; unclassified: corresponds to genes of unknown or multiple cell function categories.

Gene Ontology	up-regulated genes		down-regulated genes	
	%	number	%	number
amino acid metabolism	0	0	3	1
apoptosis-cell death	8	6	0	0
calcium metabolism-ions transport	1	1	3	1
cell adhesion/architecture	25	18	16	5
cell cycle-cell proliferation	4	3	9	3
detoxification	1	1	0	0
energetic metabolism	3	2	6	2
glucid metabolism	4	3	9	3
immune-related	3	2	0	0
lipid metabolism	10	7	13	4
nucleus-transcription-translation	10	7	22	7
protease-proteasome	1	1	0	0
protein folding	6	4	0	0
receptor–signal transduction	21	15	19	6
traffic	1	1	0	0
unclassified		12		3
total	100	83	100	35

**Table 4 : Gene ontology of the genes specifically modulated by the apical supply of lipid micelles**  
unclassified: corresponds to genes of unknown or multiple cell function categories

Protein name	ID	gene name	cellular function category	fold change (duplicate)	
<b>up-regulated genes:</b>					
decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)	39695_at	<i>CD55</i> *	immune-related	7.5	3.0
dual specificity phosphatase 1	1005_at	<i>DUSP1</i>	receptor-signal transduction	5.2	2.7
phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	33702_f_at	<i>PCK1</i> *	glucid metabolism	4.5	3.7
ras homolog gene family, member B	1826_at	<i>RHOB</i>	receptor-signal transduction	2.6	2.4
apolipoprotein A-IV	34523_at	<i>APOA4</i> *	lipid metabolism	2.6	2.4
dual specificity phosphatase 5	529_at	<i>DUSP5</i>	receptor-signal transduction	2.5	2.1
carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)	36082_at	<i>CEACAM1</i> *	cell adhesion/architecture	2.5	1.6
claudin 4	35276_at	<i>CLDN4</i> *	cell adhesion/architecture	2.4	2.4
core promoter element binding protein	37026_at	<i>KLF6</i>	nucleus-transcription-translation	2.2	2.4
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial)	35345_at	<i>HMGCS2</i> *	lipid metabolism	2.2	2.1
integrin, alpha 6	33411_g_at	<i>ITGA6</i> *	cell adhesion/architecture	2.2	2.0
transmembrane 4 superfamily member 1	892_at	<i>TM4SF1</i>	unclassified	2.1	2.0
coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	36344_at	<i>F2LR1</i>	receptor-signal transduction	2.0	2.0
uroplakin 1B	32382_at	<i>UPK1B</i>	unclassified	2.0	1.5
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	34517_at	<i>HMGCS1</i>	lipid metabolism	1.8	3.8
insulin induced gene 1	35303_at	<i>INSIG1</i>	lipid metabolism	1.8	2.1
syndecan binding protein (syntenin)	38110_at	<i>SDCBP</i>	cell adhesion/architecture	1.6	2.2
annexin A13	32320_at	<i>ANXA13</i> *	cell adhesion/architecture	1.5	2.1
jun D proto-oncogene	41483_s_at	<i>JUND</i>	nucleus-transcription-translation	1.9	1.7
plasminogen activator, urokinase receptor	41169_at	<i>PLAUR</i>	receptor-signal transduction	1.9	1.5
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	39545_at	<i>CDKN1C</i>	cell cycle-cell proliferation	1.9	1.5
retinoic acid induced 3	40079_at	<i>GPRC5A</i>	receptor-signal transduction	1.8	1.9
prostate differentiation factor	1890_at	<i>GDF15</i> *	cell cycle-cell proliferation	1.8	1.8
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	1424_s_at	<i>YWHAH</i>	receptor-signal transduction	1.8	1.7
microsomal triglyceride transfer protein (large polypeptide, 88kDa)	38891_at	<i>MTTP</i> *	lipid metabolism	1.8	1.7
keratin 20	40694_at	<i>KRT20</i>	cell adhesion/architecture	1.8	1.6
thymosin, beta 10	31481_s_at	<i>TMSB10</i> *	cell adhesion/architecture	1.8	1.5
low density lipoprotein receptor	32855_at	<i>LDLR</i>	lipid metabolism	1.7	1.8
adipose differentiation-related protein	34378_at	<i>ADFP</i>	lipid metabolism	1.7	1.6
apolipoprotein C-III	36106_at	<i>APOC3</i> *	lipid metabolism	1.7	1.5
claudin 3	33904_at	<i>CLDN3</i> *	cell adhesion/architecture	1.7	1.4
cellular retinoic acid binding protein 2	1057_at	<i>CRABP2</i>	receptor-signal transduction	1.6	1.5
sequestosome 1	40898_at	<i>SQSTM1</i>	protease-proteasome	1.5	1.6
<b>down-regulated genes :</b>					
aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	37015_at	<i>ALDH1A1</i> *	unclassified	0.5	0.5
heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)	39353_at	<i>HSPE1</i> *	protein folding	0.6	0.4
cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)	38418_at	<i>CCDN1</i>	cell cycle-cell proliferation	0.6	0.4
chromosome 7 open reading frame 24	41696_at	<i>C7orf24</i>	unclassified	0.6	0.5
aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1	40685_at	<i>ALDH3B1</i> *	lipid metabolism	0.6	0.6
phosphatidylserine synthase 1	37320_at	<i>PDTSS1</i>	lipid metabolism	0.6	0.6
activin A receptor, type IB	36451_at	<i>ACVR1B</i>	receptor-signal transduction	0.6	0.6
ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	39542_at	<i>ENC1</i> *	cell adhesion/architecture	0.6	0.5
hepatic dihydrodiol dehydrogenase	32805_at	<i>AKR1C1</i> *	lipid metabolism	0.6	0.6
profilin 2	38839_at	<i>PFN2</i>	cell adhesion/architecture	0.6	0.5
tumor rejection antigen (gp96) 1	442_at	<i>HSP90B1</i> *	protein folding	0.6	0.5
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5	38733_at	<i>XRCC5</i> *	nucleus-transcription-translation	0.6	0.6
casein kinase 2, beta polypeptide	32843_s_at	<i>CSNK2B</i>	receptor-signal transduction	0.7	0.6

**Table 5: Genes differentially expressed in PPM versus IPM condition**

Microarrays are performed in duplicate for each lipid supply condition. Cellular function categories are indicated. Genes with more than 1.6 fold change in mRNA level are indicated, genes with a 2-fold change being indicated in bold. ID: affymetrix identification number; \* genes which are putative or known HNF4-target genes (from Odom et al. (43) and BIND database using DAVID tools); unclassified: corresponds to genes of unknown or multiple cell function categories

Gene Ontology	%	number of genes	
		▲	▼
cell cycle-cell proliferation	7	2	1
<b>cell adhesion/architecture</b>	24	<b>8</b>	<b>2</b>
glucid metabolism	2	1	-
immune-related	2	1	-
<b>lipid metabolism</b>	26	<b>8</b>	<b>3</b>
nucleus-transcription-translation	7	2	1
protease-proteasome	2	1	-
protein folding	4	-	2
<b>receptor-signal transduction</b>	24	<b>8</b>	<b>2</b>
unclassified	-	2	2
total	100	33	13

**Table 6 : Gene ontology of the 46 genes differentially expressed in PPM condition versus IPM condition.**

Genes with more than 1.6 fold change in mRNA level are indicated. Major cell function categories are in bold. unclassified: corresponds to genes of unknown or multiple cell function categories  
▲ : up-regulated genes; ▼ : down-regulated genes

Protein name	ID	gene name	cellular function category	fold change/ITS	
				apical	basal
proline dehydrogenase 1	34110_g_at	<i>PRODH</i>	amino acid metabolism	1.9	1.6
HS1 binding protein	39800_s_at	<i>HAX-1</i>	apoptosis-cell death	2.5	1.9
CGI-146 protein	39379_at	<i>PNAS-4</i>	apoptosis-cell death	2.0	1.6
melanoma antigen, family D, 1	41139_at	<i>MAGED1</i>	apoptosis-cell death	1.9	1.6
BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	39436_at	<i>BNIP3L</i>	apoptosis-cell death	1.7	1.6
solute carrier family 11, member 2	35320_at	<i>SLC11A2</i>	calcium metabolism-ions transport	2.2	2.9
ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 3 polypeptide	32563_at	<i>ATP1B3</i>	calcium metabolism-ions transport	1.7	1.6
solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2	39637_at	<i>SLC26A2</i>	calcium metabolism-ions transport	1.7	2.1
ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide	37669_s_at	<i>ATP1B1</i>	calcium metabolism-ions transport	1.7	1.8
procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase	37037_at	<i>P4HA1</i>	cell adhesion/architecture	2.7	2.2
collagen, type XVII, alpha 1	41618_at	<i>COL17A1</i>	cell adhesion/architecture	2.4	3.0
procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	34795_at	<i>PLOD2</i>	cell adhesion/architecture	2.3	2.6
claudin 7	38482_at	<i>CLDN7</i>	cell adhesion/architecture	2.0	1.6
procollagen-proline,	34390_at	<i>P4HA2</i>	cell adhesion/architecture	1.9	1.8
folliculin-like 3 (secreted glycoprotein)	33900_at	<i>FSTL3</i>	cell adhesion/architecture	1.6	2.0
N-myc downstream regulated gene 1	36933_at	<i>NDRG1</i>	cell cycle-cell proliferation	3.1	3.8
vascular endothelial growth factor	36100_at	<i>VEGFA</i>	cell cycle-cell proliferation	1.8	1.6
cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	1025_g_at	<i>CYP1A1</i>	detoxification	1.8	1.9
creatine kinase, brain	40862_i_at	<i>CKB</i>	energetic metabolism-redox homeostasis	3.1	2.1
solute carrier family 6 (creatine), member 8	40926_at	<i>SLC6A8</i>	energetic metabolism-redox homeostasis	2.0	2.8
thioredoxin reductase 1	39425_at	<i>TXNRD1</i>	energetic metabolism-redox homeostasis	1.9	1.6
glutaredoxin	34311_at	<i>GLRX</i>	energetic metabolism-redox homeostasis	1.8	1.6
glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase)	33931_at	<i>GPX4</i>	energetic metabolism-redox homeostasis	1.6	1.6
phosphofructokinase, platelet	39175_at	<i>PFKP</i>	glucid metabolism	4.5	3.9
solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5	34362_at	<i>SLC2A5</i>	glucid metabolism	3.0	2.9
UDP-glucose pyrophosphorylase 2	37373_at	<i>UGP2</i>	glucid metabolism	2.2	1.6
pyruvate kinase, muscle	32378_at	<i>PKM2</i>	glucid metabolism	2.2	1.7
glucose phosphate isomerase	39122_at	<i>GPI</i>	glucid metabolism	2.1	2.1
phosphoglycerate kinase 1	37677_at	<i>PGK1</i>	glucid metabolism	2.0	1.6
aldolase A, fructose-bisphosphate	32336_at	<i>ALDOA</i>	glucid metabolism	2.0	1.6
phosphoglycerate mutase 1 (brain)	41221_at	<i>PGAM</i>	glucid metabolism	2.0	1.6
triosephosphate isomerase 1	34003_at	<i>TP11</i>	glucid metabolism	1.8	1.6
lactate dehydrogenase A	41485_at	<i>LDHA</i>	glucid metabolism	1.7	1.6
interleukin 32	39119_s_at	<i>IL32</i>	immune-related	2.9	1.9
microsomal triglyceride transfer protein	38891_at	<i>MTTP</i>	lipid metabolism	3.4	2.4
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial)	35345_at	<i>HMGCS2</i>	lipid metabolism	2.2	2.7
apolipoprotein C-III	36106_at	<i>APOC3</i>	lipid metabolism	2.2	1.8
insulin induced gene 2	35833_at	<i>INSIG2</i>	lipid metabolism	2.0	1.6
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	38376_at	<i>ACADVL</i>	lipid metabolism	1.9	1.7
soritin-related receptor, L(DLR class) A repeats-containing	32140_at	<i>SORL1</i>	lipid metabolism	1.6	1.8
MAX interacting protein 1	654_at	<i>MXI1</i>	nucleus-transcription-translation	3.4	3.8
pituitary tumor-transforming 1 interacting protein	39003_at	<i>PTTG1IP</i>	nucleus-transcription-translation	2.1	1.6
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)	41504_s_at	<i>MAF</i>	nucleus-transcription-translation	1.7	1.6
nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 1	38439_at	<i>NFE2L1</i>	nucleus-transcription-translation	1.6	1.7
putative translation initiation factor	40203_at	<i>EIF1</i>	nucleus-transcription-translation	1.6	1.6
serpin peptidase inhibitor, member 6	34789_at	<i>SERPINB6</i>	protease-proteasome	2.2	1.6
ephrin-A1	40425_at	<i>EFNA1</i>	receptor-signal transduction	5.0	3.8
transferrin receptor	37324_at	<i>TFRC</i>	receptor-signal transduction	2.6	2.6
membrane protein, palmitoylated 1, 55kDa	32207_at	<i>MPP1</i>	receptor-signal transduction	1.8	1.6
Rab geranylgeranyltransferase, beta subunit	781_at	<i>RABGGTB</i>	receptor-signal transduction	1.6	1.7
solute carrier family 35, member A3	38208_at	<i>SLC35A3</i>	traffic	2.0	1.6
four and a half LIM domains 2	38422_s_at	<i>FHL2</i>	unclassified	3.0	2.7
KIAA0063 gene product, Josephin domain containing 1	34333_at	<i>JOSD1</i>	unclassified	2.1	1.6
mucin 3A	730_r_at	<i>MUC3A</i>	unclassified	2.0	2.7
carbonic anhydrase XII	35275_at	<i>CA12</i>	unclassified	1.9	2.3
craniofacial development protein 1	38664_at	<i>CFPD1</i>	unclassified	1.9	1.6
TPTE pseudogene	32163_f_at	<i>psiTPTE22</i>	unclassified	1.8	1.7
Homo sapiens transcribed sequence with strong similarity to protein sp:P05023 (H.se	41273_at	<i>MXRA7</i>	unclassified	1.8	1.6
KIAA0779 protein	33251_at	<i>TMCC1</i>	unclassified	1.8	2.0
peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	38465_at	<i>PAM</i>	unclassified	1.7	1.9
transmembrane 4 superfamily member 3	38469_at	<i>TSPAN8</i>	unclassified	1.6	1.6
family with sequence similarity 13, member A1	41145_at	<i>FAM13A1</i>	unclassified	1.6	2.2

**Table S1 : Genes equally up-regulated by apical lipid micelles or basal albumin-bound lipids**

Genes induced by both apical micelles and basal albumin-bound lipids as compared to ITS and that displayed an apical/basal ratio <1.6 are listed, along with their corresponding cellular function category. ID: affymetrix identification number; unclassified: corresponds to genes of unknown or multiple cell function categories

Protein name	ID	gene name	cellular function category	fold change/ITS	
				apical	basal
glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	40522_at	GLUL	amino acid metabolism	0.6	0.6
glutamate dehydrogenase 1	31691_g_at	GLUD1	amino acid metabolism	0.6	0.6
acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member B	38479_at	ANP32B	apoptosis-cell death	0.6	0.6
transmembrane protein 123	40803_at	TMEM123	apoptosis-cell death	0.6	0.6
transglutaminase 2 (C)	38404_at	TGM2	apoptosis-cell death	0.5	0.6
nitrogen fixation cluster-like	39165_at	ISCU	calcium metabolism-ions transport	0.6	0.6
selenophosphate synthetase 2	39078_at	SEPHS2	calcium metabolism-ions transport	0.6	0.6
transmembrane 4 superfamily member 11 (plasmolipin)	41688_at	PLLP	calcium metabolism-ions transport	0.6	0.6
solute carrier family 26, member 3	928_at	SLC26A3	calcium metabolism-ions transport	0.6	0.6
calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)	41143_at	CALM1	calcium metabolism-ions transport	0.5	0.5
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6	39805_at	ABC6	calcium metabolism-ions transport	0.5	0.6
thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)	36123_at	TST	calcium metabolism-ions transport	0.6	0.5
metallothionein 1H	39594_f_at	MT1H	calcium metabolism-ions transport	0.6	0.4
midline 1 (Opitz/BBB syndrome)	34296_at	MID1	cell adhesion/architecture	0.6	0.6
profilin 2	38840_s_at	PFN2	cell adhesion/architecture	0.6	0.6
laminin, alpha 5	41610_at	LAMA5	cell adhesion/architecture	0.6	0.6
fibronectin 1	31720_s_at	FN1*	cell adhesion/architecture	0.6	0.5
fibrinogen, B beta polypeptide	37019_at	FGB*	cell adhesion/architecture	0.5	0.4
periplakin	36890_at	PPL	cell adhesion/architecture	0.5	0.6
collagen, type V, alpha 2	38420_at	COL5A2	cell adhesion/architecture	0.3	0.3
biphenyl hydrolase-like	40912_s_at	BPHL	detoxification	0.6	0.6
glutathione S-transferase A4	40508_at	GSTA4*	detoxification	0.5	0.6
UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B15	33068_f_at	UGT2B15	detoxification	0.4	0.5
glutathione S-transferase A2	1260_s_at	GSTA2*	detoxification	0.3	0.4
UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B17	33672_f_at	UGT2B17	detoxification	0.2	0.2
aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)	38780_at	AKR1A1	energetic metabolism-redox homeostasis	0.6	0.6
peroxiredoxin 3	36631_at	PRDX3	energetic metabolism-redox homeostasis	0.6	0.6
isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	39023_at	IDH1	energetic metabolism-redox homeostasis	0.5	0.6
glycogenin 2	35334_at	GYG2	glucid metabolism	0.5	0.6
sucrase-isomaltase	33491_at	SI	glucid metabolism	0.3	0.4
complement component 4 binding protein, beta	38367_s_at	C4BPB*	immune-related	0.6	0.6
B-factor, properdin	35822_at	CFB*	immune-related	0.6	0.6
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F , member 2	32103_at	SERPINF2*	immune-related	0.5	0.6
chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	823_at	CX3CL1*	immune-related	0.5	0.6
attractin	33427_s_at	ATRN*	immune-related	0.5	0.6
interferon, gamma-inducible protein 30	925_at	IFI30*	immune-related	0.6	0.6
phytanoyl-CoA hydroxylase (Refsum disease)	32724_at	PHYH	lipid metabolism	0.6	0.6
paraoxonase 2	40504_at	PON2	lipid metabolism	0.5	0.6
solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	37485_at	SLC27A2	lipid metabolism	0.5	0.6
aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1	40685_at	ALDH3B1	lipid metabolism	0.5	0.6
alpha-methylacyl-CoA racemase	41706_at	AMACR	lipid metabolism	0.5	0.6
chromobox homolog 3 (HP1 gamma homolog, Drosophila)	38084_at	CBX3	nucleus-transcription-translation	0.6	0.6
Ac-like transposable element	39168_at	ZBED1	nucleus-transcription-translation	0.6	0.6
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon	32576_at	EIF3S5	nucleus-transcription-translation	0.6	0.6
cold inducible RNA binding protein	39864_at	CIRBP*	nucleus-transcription-translation	0.6	0.6
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	36654_s_at	HNRPA2B1	nucleus-transcription-translation	0.6	0.6
lamin B receptor	288_s_at	LBR	nucleus-transcription-translation	0.5	0.6
nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	39397_at	NR2F2	nucleus-transcription-translation	0.5	0.6
APEX nuclease 1	2025_s_at	APEX1*	nucleus-transcription-translation	0.5	0.6
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	40211_at	HNRPA1	nucleus-transcription-translation	0.6	0.5
protease inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	41469_at	PI3	protease-proteasome	0.6	0.6
ubiquitin B	32153_s_at	UBB	protease-proteasome	0.6	0.5
cathepsin C	133_at	CTSC*	protease-proteasome	0.6	0.5
TYRO3 protein tyrosine kinase	2086_s_at	TYRO3	receptor-signal transduction	0.6	0.6
ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3	33229_at	RPS6KA3	receptor-signal transduction	0.6	0.6
dual specificity phosphatase 9	40186_at	DUSP9	receptor-signal transduction	0.6	0.6
G protein-coupled receptor 126	36014_at	GPR126	receptor-signal transduction	0.6	0.5
growth arrest-specific 6	1598_g_at	GAS6	receptor-signal transduction	0.5	0.6
fibroblast growth factor receptor 3	31805_at	FGFR3	receptor-signal transduction	0.5	0.6
insulin receptor substrate 1	41049_at	IRS1	receptor-signal transduction	0.5	0.5
activin A receptor, type IB	36451_at	ACVR1B	receptor-signal transduction	0.4	0.6
PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	34745_at	RAPGEF2	receptor-signal transduction	0.6	0.6
S100 calcium binding protein A10 (annexin II ligand)	39338_at	S100A10	receptor-signal transduction	0.6	0.5
RAB13, member RAS oncogene family	40210_at	RAB13	traffic	0.6	0.6
hypothetical protein MGC5576	38655_at	TMEM106C	unclassified	0.6	0.6
DKFZP564B167 protein	37000_at	BRP44	unclassified	0.6	0.6
likely ortholog of mouse Ia related protein	41829_at	LARP1	unclassified	0.6	0.6
selenium binding protein 1	37405_at	SELENBP1	unclassified	0.6	0.6
aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	37015_at	ALDH1A1	unclassified	0.6	0.6
leukotriene A4 hydrolase	38081_at	LTA4H*	unclassified	0.5	0.6
semaphorin 3C	376_at	SEMA3C*	unclassified	0.5	0.6
zinc finger protein 36, C3H type-like 2	32587_at	ZFP36L2	unclassified	0.5	0.6
SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like	39714_at	SH3BGRL	unclassified	0.5	0.5
hypothetical protein LOC257407	39394_at	LOC257407	unclassified	0.4	0.5
breast carcinoma amplified sequence 1	37821_at	BCAS1	unclassified	0.4	0.3
KIAA0931 protein	32735_at	PHLPL	unclassified	0.4	0.4
polyposis locus protein 1	1252_at	REEP5	unclassified	0.6	0.6
carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)	37203_at	CES1	unclassified	0.6	0.6
clusterin (apolipoprotein J)	36780_at	CLU*	unclassified	0.6	0.5

**Table S2 : Genes equally down-regulated by apical lipid micelles or basal albumin-bound lipids**

Genes repressed by both apical micelles and basal albumin-bound lipids as compared to ITS and that displayed an apical/basal ratio <1.6 are listed. ID: affymetrix identification number; unclassified: corresponds to genes of unknown or multiple cell function categories; \*genes which present a GOTERM\_BP annotation related to stress response (underlining by DAVID tools) such as defense response and wounding.

Protein name	ID	Gene name	cellular function category	fold change/ITS		ratio
				apical	basal	apical/basal
<b>up-regulated genes :</b>						
thymosin, beta 10	31481_s_at	<i>TMSB10</i>	cell adhesion/architecture	4.7	1.9	2.4
integrin, alpha 6	41266_at	<i>ITGA6</i>	cell adhesion/architecture	4.2	1.7	2.4
lysyl oxidase	38637_at	<i>LOX</i>	cell adhesion/architecture	5.0	2.9	1.7
phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	33702_f_at	<i>PCK1</i>	glucid metabolism	4.4	1.7	2.5
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	36979_at	<i>SLC2A3</i>	glucid metabolism	4.7	2.0	2.4
glycoprotein A33 (transmembrane)	37875_at	<i>GPA33</i>	immune-related	4.4	1.9	2.4
apolipoprotein A-IV	34523_at	<i>APOA4</i>	lipid metabolism	25.6	5.9	4.4
adipose differentiation-related protein	34378_at	<i>ADFP</i>	lipid metabolism	10.8	3.8	2.8
lysophosphatidic acid acyltransferase, beta	32837_at	<i>AGPAT2</i>	lipid metabolism	4.6	1.8	2.5
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	38178_at	<i>HSD17B2</i>	lipid metabolism	4.6	2.2	2.1
basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	40790_at	<i>BHLHB2</i>	nucleus-transcription-translation	4.7	2.6	1.8
dual specificity phosphatase 6	41193_at	<i>DUSP6</i>	receptor-signal transduction	6.0	1.8	3.4
transmembrane 4 superfamily member 1	41531_at	<i>TM4SF1</i>	unclassified	11.1	2.0	5.1
adrenomedullin	34777_at	<i>ADM</i>	unclassified	7.2	4.5	1.6
<b>down-regulated genes :</b>						
dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)	40201_at	<i>DDC</i>	amino acid metabolism	0.3	0.7	0.5
ornithine aminotransferase	36636_at	<i>OAT</i>	amino acid metabolism	0.2	0.4	0.5
aldehyde dehydrogenase 5 family , member A1	41790_at	<i>ALDH5A1</i>	amino acid metabolism	0.3	0.5	0.6
putative lymphocyte G0/G1 switch gene	38326_at	<i>GOS2</i>	cell cycle-proliferation	0.1	0.3	0.3
N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase)-like	33382_at	<i>ASAH1</i>	lipid metabolism	0.4	0.6	0.6
AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)	41690_at	<i>ARID5B</i>	nucleus-transcription-translation	0.2	0.4	0.5
folate receptor 1	821_s_at	<i>FOLR1</i>	nucleus-transcription-translation	0.4	0.6	0.6
transcription factor EC	34470_at	<i>TFEC</i>	nucleus-transcription-translation	0.4	0.7	0.6
kininogen 1	37234_at	<i>KNG1</i>	protease-proteasome	0.2	0.5	0.4
sialyltransferase 1	41352_at	<i>ST6GAL1</i>	traffic	0.2	0.6	0.4
paternally expressed 10	39696_at	<i>PEG10</i>	unclassified	0.2	0.4	0.4
aquaporin 3	39248_at	<i>AQP3</i>	unclassified	0.2	0.5	0.4
HEG homolog 1 (Zebrafish)	33328_at	<i>HEG1</i>	unclassified	0.3	0.6	0.5
methyltransferase like 7A	38717_at	<i>METTL7A</i>	unclassified	0.2	0.3	0.5
aldo-keto reductase family 1, member C3	37399_at	<i>AKR1C3</i>	unclassified	0.4	0.6	0.6

**Table S3 : Genes preferentially modulated by apical lipid micelles**

Genes with a fold change of mRNA level >1.6 (up-regulated) or <0.6 (down-regulated) as compared to ITS and an apical/basal ratio >1.6 or <0.6 are listed.

ID: Affymetrix identification number; unclassified: corresponds to genes of unknown or multiple cell function categories

Protein name	ID	gene name	cellular function category	fold change/ITS	
				apical	basal
<b>up-regulated genes :</b>					
carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	988_at	CEACAM1	cell adhesion/architecture	10.2	1.0
retinoic acid induced 3	40079_at	GPRC5A	receptor-signal transduction	6.7	1.3
zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	40448_at	ZFP36	nucleus-transcription-translation	6.2	1.3
heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein, 78kD)	36614_at	HSPA5	protein folding	3.7	0.8
tumor suppressing substrate candidate 3	31888_s_at	PHLDA2	apoptosis-cell death	4.0	0.9
tubulin, beta, 2	33678_i	TUBB2C	cell adhesion/architecture	3.0	0.8
flavoprotein oxidoreductase MICAL2	40848_q	MICAL2	energetic metabolism	3.3	0.9
heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	442_at	HSP90B1	protein folding	2.8	0.9
oxygen regulated protein 1 (50kD)	33863_at	HYOU1	unclassified	3.1	1.0
coagulation factor 11 (thrombin) receptor-like 1	32247_at	F2RL1	receptor-signal transduction	3.7	1.3
sterol-C4-methyl oxidase-like	33369_at	SC4MOL <sup>5</sup>	lipid metabolism	2.2	0.8
integrin, beta 4	406_at	ITGB4 <sup>1,2,4</sup>	cell adhesion/architecture	2.1	0.7
Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	40164_at	ARHGDI <sup>1A</sup>	receptor-signal transduction	2.4	0.8
tubulin, beta, 3	471_f_at	TUBB3	cell adhesion/architecture	2.1	0.8
annexin A2	757_at	ANXA2	cell adhesion/architecture	2.1	0.8
prostate differentiation factor	1890_at	PLAB	cell cycle-cell proliferation	2.6	1.0
BCL2-like 1	34742_at	BCL2L1	apoptosis-cell death	2.0	0.8
peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	35823_at	PP1B	protein folding	1.9	0.7
topoisomerase (DNA) I pseudogene 2	31680_at	TOP1P2	nucleus-transcription-translation	2.4	1.0
actin, beta	32318_s_at	ACTB <sup>1,5,4</sup>	cell adhesion/architecture	2.0	0.8
UDP-Gal-beta-GlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 4	39432_at	B4GALT4	traffic	1.8	0.8
inositol polyphosphate-1-phosphatase	656_at	INPP1	receptor-signal transduction	2.1	0.9
tubulin, beta, 2B	429_f_at	TUBB2B	cell adhesion/architecture	2.3	1.0
farnesyl diphosphate synthase	37325_at	FDPF <sup>5</sup>	lipid metabolism	2.4	1.1
interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)	1506_at	IL2RG <sup>5</sup>	immune-related	3.2	1.4
syndecan binding protein (syntenin)	38110_at	SDCBP	cell adhesion/architecture	2.7	1.2
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	1424_s_at	YWHAH	receptor-signal transduction	2.3	1.0
chloride intracellular channel 1	36131_at	CLIC1	calcium metabolism-ions transport	1.7	0.7
claudin 4	35276_at	CLDN4 <sup>2</sup>	cell adhesion/architecture	3.4	1.5
profilin 1	36675_f	PFN1 <sup>2</sup>	cell adhesion/architecture	1.9	0.9
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	1563_s	TNFRSF1A	receptor-signal transduction	2.2	1.0
topoisomerase (DNA) I	1030_s_at	TOP1	nucleus-transcription-translation	2.1	1.0
fatty acid binding protein 1, liver	38586_at	FABP1	lipid metabolism	2.2	1.0
lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)	35367_at	LGALS3	cell cycle-cell proliferation	2.9	1.4
isopentenyl-diphosphate delta isomerase	36985_at	IDH1 <sup>5</sup>	lipid metabolism	2.7	1.3
7-dehydrocholesterol reductase	39059_at	DHCR7 <sup>5</sup>	lipid metabolism	2.5	1.2
TGFB1-induced anti-apoptotic factor 1	36940_at	TIAF1	apoptosis-cell death	1.9	0.9
sterol-C5-desaturase (ERG3 delta-5-desaturase homolog, fungal)-like	33421_s_at	SC5DL <sup>5</sup>	lipid metabolism	2.2	1.1
solute carrier family 16, member 3	33143_s_at	SLC16A3	unclassified	2.5	1.3
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 11	38412_at	PPP1R11	receptor-signal transduction	1.8	1.1
alutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1	32626_at	GFPT1	glucid metabolism	1.6	1.0
RAP1B, member of RAS oncogene family	40146_at	RAP1B <sup>1</sup>	receptor-signal transduction	1.6	1.0
mosasin, light polypeptide, regulatory, non-sarcomeric	33447_at	MRC1 <sup>3,2,3</sup>	unclassified	2.0	1.0
actin related protein 2/3 complex, subunit 2	1718_at	ARPC2 <sup>2</sup>	cell adhesion/architecture	1.9	1.0
SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1	38118_at	SHC1 <sup>1</sup>	receptor-signal transduction	1.7	0.9
lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1	34387_at	LPGAT1	lipid metabolism	2.3	1.2
villin 2 (ezrin)	40103_at	VIL2 <sup>1</sup>	cell adhesion/architecture	2.1	1.1
calcium and integrin binding 1 (calmyrin)	1020_s_at	CIB1	unclassified	2.0	1.1
annexin A2 pseudogene 3	31444_s_at	ANXA2P3	cell adhesion/architecture	1.7	0.9
calpain, small subunit 1	36130_at	CALP1 <sup>1</sup>	unclassified	1.6	0.9
adiponectin receptor 2	39045_at	ADIPOR2	receptor-signal transduction	1.8	1.0
GTP cyclohydrolase 1	37944_at	GCH1	unclassified	2.0	1.1
FKBP6 binding protein 2 (13kD)	33409_at	FKBP2	protein folding	1.7	0.9
myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	33146_at	MCL1	apoptosis-cell death	1.7	0.9
actin, gamma 1	34160_at	ACTG1 <sup>1,3,4</sup>	cell adhesion/architecture	1.8	1.0
insulin like growth factor 2	1664_at	IGF2	unclassified	2.2	1.2
jun D proto-oncogene	41483_s_at	JUND	nucleus-transcription-translation	1.7	0.9
integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide)	32806_at	ITGB1 <sup>1,2</sup>	cell adhesion/architecture	1.7	0.9
integrin beta 4 binding protein	35252_at	ITGB4BP	nucleus-transcription-translation	1.8	1.0
interferon gamma receptor 1	1038_s_at	IFNGR1	immune-related	1.7	1.0
keratin 19	40899_at	KRT19 <sup>1</sup>	cell adhesion/architecture	2.3	1.3
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	40507_at	SLC2A1	glucid metabolism	2.6	1.5
Rho-specific guanine nucleotide exchange factor p114	36537_at	ARHGEF18	receptor-signal transduction	2.1	1.2
malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	837_s_at	ME1	energetic metabolism	1.8	1.0
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	39545_at	CDKN1C	cell cycle-cell proliferation	2.0	1.2
mvosin	33994_at	MYL6	unclassified	1.7	1.0
protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform	924_s	PPP2CB <sup>3</sup>	receptor-signal transduction	2.0	1.2
phosphotidylinositol transfer protein	352_at	PIPTN	unclassified	2.0	1.2
RanBP-type and C3HC4-type zinc finger containing 1	32203_at	RBCK1	unclassified	2.6	1.5
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1	36988_at	TNFAIP1	unclassified	1.8	1.1
adenylyl cyclase-associated protein	935_at	CAP	receptor-signal transduction	1.7	1.0
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	1235_at	YWHAZ	receptor-signal transduction	1.7	1.0
polymerase (DNA-directed), delta 4	38397_at	POLD4	nucleus-transcription-translation	1.7	1.0
enolase 1, (alpha)	2035_s_at	ENO1	glucid metabolism	2.1	1.3
thymosin, beta 4, X chromosome	31557_at	TM6SB4 <sup>6</sup>	cell adhesion/architecture	2.0	1.2
cytochrome c, somatic pseudogene	35818_at	CYCS	apoptosis-cell death	1.7	1.1
filamin A, alpha (actin binding protein 280)	32749_s	FLNA <sup>1</sup>	cell adhesion/architecture	2.2	1.4
caspace recruitment domain protein 10	41817_q	CARD10	apoptosis-cell death	1.7	1.1
UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A4	32392_s_at	UGT1A4	detoxification	1.7	1.1
liver-specific bHLH-Zip transcription factor	38324_at	LSR	nucleus-transcription-translation	1.6	1.0
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	34892_at	TNFRSF10B	receptor-signal transduction	2.2	1.4
sequestosome 1	40898_at	SQSTM1	protease-proteasome	1.6	1.0
interleukin 27	38969_at	IL27	unclassified	1.7	1.1
<b>down-regulated genes :</b>					
H2B histone family, member B	38576_at	H2BFB	nucleus-transcription-translation	0.1	0.8
nebulin	38461_at	NEB	cell adhesion/architecture	0.3	1.4
lectin, galactoside-binding, soluble, 2 (galectin 2)	37456_at	LGALS2	cell cycle-cell proliferation	0.3	0.9
glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase	36263_q	GNS	cell adhesion/architecture	0.4	1.0
aniomotin	38286_at	AMOT	cell adhesion/architecture	0.4	0.9
ITS beta protein	33263_at	HSP179BETA	unclassified	0.5	1.1
eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3	33934_at	EIF2S3	nucleus-transcription-translation	0.5	1.0
selenoprotein P, plasma, 1	34363_at	SEPP1	unclassified	0.4	0.8
translational inhibitor protein p14.5	32173_at	UK114	nucleus-transcription-translation	0.5	1.0
extra spindle poles like 1 (S. cerevisiae)	38158_at	ESPL1	cell cycle-cell proliferation	0.4	0.8
ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	36965_at	ANK3	cell adhesion/architecture	0.6	1.2
cytochrome P450, subfamily XXVIIA	999_at	CYP27A1	lipid metabolism	0.5	1.0
phosphotriesterase, muscle	36196_at	PFKM	glucid metabolism	0.4	0.7
v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	33218_at	ERBB2	receptor-signal transduction	0.4	0.8
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 7	33731_at	SLC7A7	amino acid metabolism	0.5	0.9
quantal cytochrome 2C (heat stable enterotoxin receptor)	34450_at	GUICY2C	receptor-signal transduction	0.5	1.0
prostatic binding protein	32611_at	PBP	receptor-signal transduction	0.5	1.0
general transcription factor II, i	35450_s_at	GTF2I	nucleus-transcription-translation	0.4	0.8
putative c-Myc-responsive	39817_s_at	RCL	cell cycle-cell proliferation	0.6	1.0
v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	32787_at	ERBB3	receptor-signal transduction	0.5	0.8
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain	37532_at	ACADM	lipid metabolism	0.5	0.9
thyroid hormone receptor interactor 7	37348_s_at	TRIP7	nucleus-transcription-translation	0.4	0.7
CD36 antigen (collagen type 1 receptor, thrombospondin receptor)-like 2	33823_at	CD36L2	lipid metabolism	0.5	0.8
aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	32676_at	ALDH6A1	energetic metabolism	0.5	0.9
phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type II, beta	35741_at	PIP5K2B	receptor-signal transduction	0.6	1.0
uncharacterized hypothalamus protein HT012	41058_q_at	HT012	glucid metabolism	0.4	0.7
DNA segment, single copy, probe pH4 (transforming sequence)	37162_at	D10S170	cell adhesion/architecture	0.5	0.8
inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	41215_s	ID2	nucleus-transcription-translation	0.6	0.9
glucose-6-phosphatase, transport (glucose-6-phosphate) protein 1	33921_at	G6PT1	glucid metabolism	0.5	0.8
HYA22 protein	40196_at	HYA22	unclassified	0.6	0.9
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 18	33453_at	PTPN18	receptor-signal transduction	0.5	0.8
chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A	38732_at	CLNS1A	calcium metabolism-ions transport	0.6	0.9
cytochrome P450, subfamily IVF, polypeptide 3	1305_s_at	CYP4F3	lipid metabolism	0.6	0.9
spinocerebellar ataxia 2	36998_s_at	SCA2	nucleus-transcription-translation	0.5	0.8
crystallin, zeta	37902_at	CRYZ	energetic metabolism	0.6	0.9

**Table S4: Genes specifically modulated by apical lipid micelles**  
Genes with a fold change of mRNA level <1.6 or >0.6 in the presence of basal albumin-bound lipids but >1.6 or <0.6 after the apical supply of lipid micelles as compared to ITS condition are listed. ID: Affymetrix identification number; unclassified: corresponds to genes of unknown or multiple cell function categories; superscripted numerals indicate genes belonging to (1) focal adhesion, (2) regulation of actin cytoskeleton, (3) tight junction, (4) cell communication and (5) biosynthesis of steroids KEGG pathways.

## **Etude des événements précoces de la détection des micelles post-prandiales par les entérocytes**

Les résultats de l'analyse transcriptomique, en plus de ceux préalablement obtenus dans l'équipe sur des effets spécifiques des micelles post-prandiales dans les cellules Caco-2/TC7, nous ont conduits à formuler l'hypothèse de l'existence, au niveau de la membrane apicale des entérocytes, d'un système de détection de "la micelle lipidique post-prandiale", comportant les produits de digestion des TG.

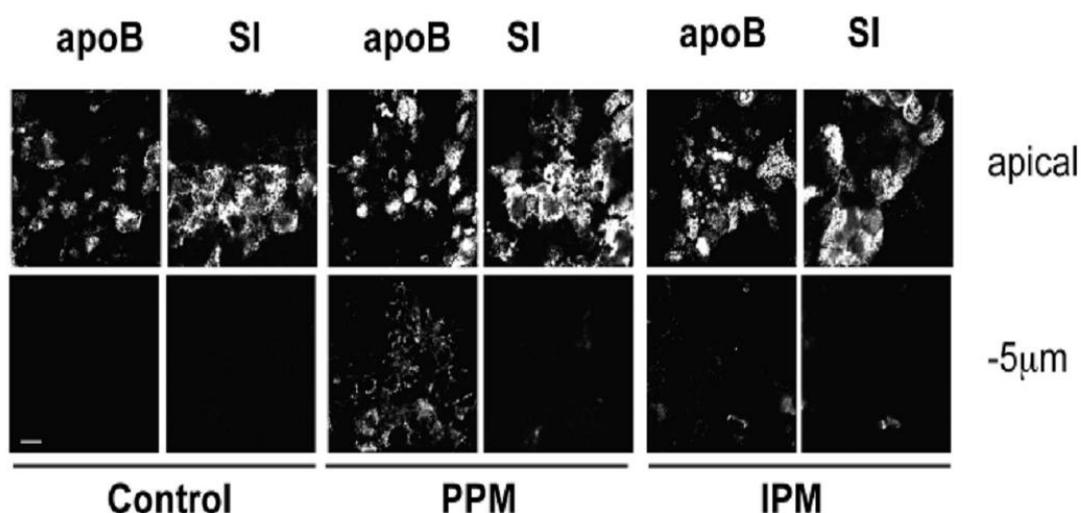
En effet, l'équipe avait montré que dans les conditions d'apport permanent de lipides par le sérum, l'apolipoprotéine B, composante structurale des futures lipoprotéines enrichies en triglycérides, se trouve localisée, "prête à l'emploi", au niveau de la bordure en brosse. L'apport apical de micelles post-prandiales (MPP) induit, en quelques minutes, la mobilisation de cette apoB apicale, et son transfert vers des compartiments intracellulaires (Morel et coll. 2004). De plus, les MPP, sous leur forme complète, sont les plus efficaces à stimuler la néo-synthèse intracellulaire de triglycérides et la sécrétion de lipoprotéines enrichies en triglycérides à apoB48 (Chateau et coll. 2005). Enfin, comme je l'ai rappelé plus haut, les MPP induisent spécifiquement la transcription du gène de l'apo A-IV, *via* HNF-4 (Carriere et coll. 2005), facteur transcriptionnel potentiellement impliqué également dans l'activation d'une majorité des gènes dont nous avons montré qu'ils étaient spécifiquement modulés par les MPP dans notre analyse transcriptomique.

L'ensemble de ces effets spécifiques des MPP n'est reproduit ni par les acides gras présents dans le compartiment basal, ni par les composants individuels ou en combinaison incomplète des MPP, venant ainsi étayer l'hypothèse qu'il existerait une détection apicale des MPP. Dans cette optique, il est particulièrement intéressant que ces micelles exercent des effets spécifiques sur l'expression de gènes impliqués dans la signalisation et l'architecture cellulaire. Ainsi, l'interaction des micelles avec un détecteur déclencherait des événements intracellulaires de signalisation, de trafic de protéines, et de modulation de l'expression génique concourant à une mise en place optimale des conditions nécessaires au transfert intestinal des lipides, première étape de leur mise à disposition pour l'organisme.

**Nous nous sommes donc intéressés aux mécanismes impliqués dans cette détection intestinale des lipides alimentaires sous forme micellaire. Notre stratégie a consisté à comparer les effets de structures micellaires contenant des lipides**

**alimentaires, les MPP, à des structures micellaires dépourvues de lipides alimentaires, les MIP, mais dont les constituants biliaries sont communs.**

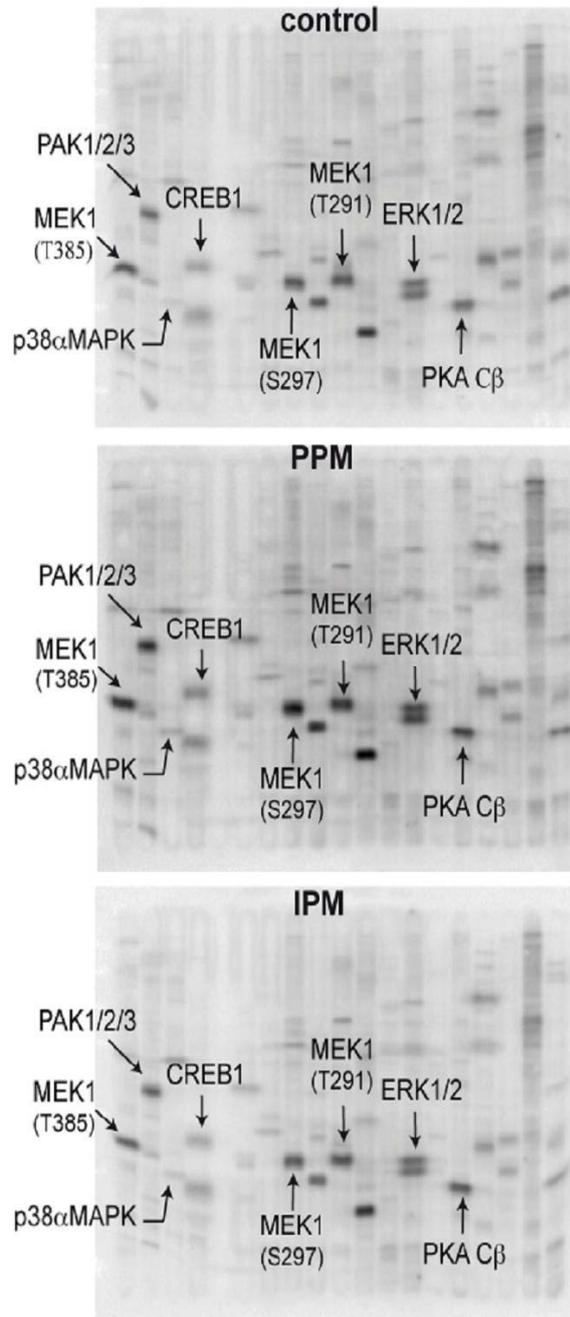
Avant même d'envisager de caractériser le détecteur de ces micelles au niveau de la membrane apicale des entérocytes, j'ai voulu vérifier si notre crible différentiel MPP vs MIP était judicieux. Pour ce faire, j'ai étudié, en microscopie confocale, le trafic de l'apoB à des temps courts de 10, 20 et 30 minutes après un apport de micelles, MPP ou MIP, en présence de sérum dans le milieu basal, sur les cellules Caco-2/TC7 cultivées sur filtre. Les temps de réponse concernant le trafic de l'apoB pouvant varier de quelques minutes d'une expérience à l'autre, cette "fourchette" de temps de 10 à 30 minutes permet de cerner l'évènement. Les résultats présentés ont été obtenus après 20 minutes d'incubation en absence (control) ou en présence de micelles post prandiales (PPM) ou inter prandiales (IPM) (Figure 40)



**Figure 40: Le trafic de l'apoB est spécifiquement induit par les micelles contenant les lipides alimentaires.** Analyse en microscopie confocale de la localisation de l'apolipoprotéine B (apoB) et de la saccharase-isomaltase (SI) (utilisée comme marqueur de la bordure en brosse), dans des cellules Caco-2/TC7 différenciées, en absence (control) ou en présence de micelles post prandiales (PPM) ou de micelles inter-prandiales (IPM) ajoutées au pôle apical des cellules pendant 20 minutes. Les panneaux du haut représentent les acquisitions en XY (horizontal) au niveau apical des cellules et 5 µm en dessous (panneaux du bas). (barre= 20µm)

En absence de micelles dans le compartiment apical, l'apoB est distribuée dans la bordure en brosse, dont la localisation est caractérisée par la présence de la saccharase isomaltase (SI). L'apport apical de MPP provoque le trafic de l'apoB vers les compartiments intracellulaires, ce qui n'est pas observé par l'apport de MIP, indiquant que la mobilisation du pool apical d'apoB dépend spécifiquement de l'apport de lipides alimentaires micellaires. L'analyse différentielle MPP vs MIP est donc un crible que je peux utiliser pour la suite des expériences.

La notion de détection des micelles post-prandiales signifie qu'un signal est déclenché par la "perception" de l'apport en lipides. J'ai donc choisi d'analyser si des protéines classiquement impliquées dans des voies de signalisation étaient sollicitées spécifiquement par les MPP. Pour ce faire, j'ai préparé des lysats cellulaires après incubation sur des temps très courts, 5, 10, 15 minutes, supposant qu'une signalisation pourrait précéder le trafic de l'apoB déclenché par les MPP. Ces lysats ont été envoyés à une société canadienne, Kinexus ©, qui analyse par western blot un large panel de protéines, des kinases pour la plupart, phosphorylées en réponse aux stimulations apportées. L'avantage de cette prestation est essentiellement de voir rapidement s'il se dégage une voie de signalisation particulière. Elle permet également d'éviter le test d'une trentaine d'anticorps différents sur mes échantillons, avec le coût inhérent et l'incertitude sur le fait qu'ils fonctionnent convenablement. Les résultats présentés correspondent au temps 5 minutes. (Figure 41).

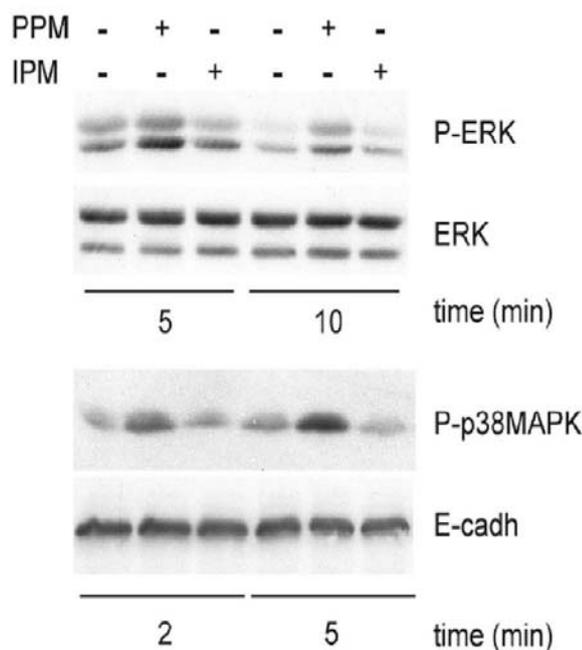


**Figure 41: Voies de signalisation spécifiquement induites par les micelles post-prandiales.**

Immunoblots des protéines phosphorylées de lysats de cellules Caco-2/TC7 cultivées sur filtres en absence (Control) ou présence de MPP ou MIP pendant 5 minutes. Les western blot utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre les protéines phosphorylées et le crible de phosphorylation KPSS-9.0 ont été réalisés et analysés par Kinexus©. Les bandes correspondant aux phosphoprotéines spécifiquement activées par les MPP sont indiquées par des flèches pour comparaison. Les anticorps dirigés contre les protéines phosphorylées reconnaissent les sites de phosphorylation suivants: (S144/S141/S154) pour PAK12/3, (T180/Y182) pour p38αMAPK, (S129/S133) pour CREB1, (T202/Y204) pour ERK1, (T185/Y187) pour ERK2 et (S338) pour PKA Cβ. Les sites de phosphorylation analysés pour MEK1 sont indiqués dans la figure.

Le criblage des protéines phosphorylées a révélé deux informations essentielles: les MPP sont capables d'activer spécifiquement des protéines kinases par rapport à la situation contrôle, en absence de lipides apicaux, ou par rapport aux MIP ; les MPP activent plusieurs protéines de la famille des MAP Kinases.

C'est donc parmi celles-ci que j'ai choisi de poursuivre la caractérisation des effets des MPP. Sur des expériences indépendantes, j'ai testé l'activation des protéines ERK1/2 et p38MAPK par les MPP par rapport aux MIP sur des cinétiques de temps encore un peu plus précises, 2, 5, 10, 15 et jusqu'à 30 minutes (Figure 42).



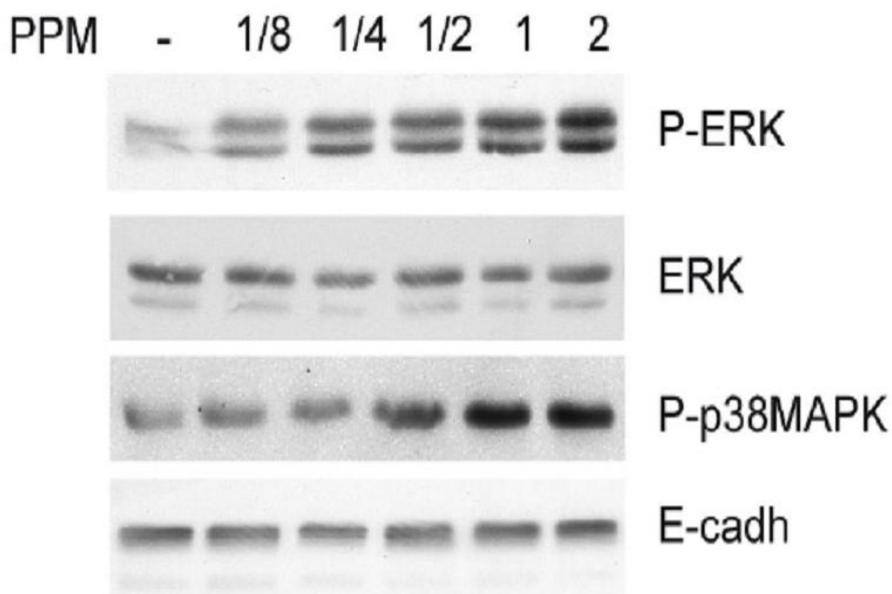
**Figure 42: Activation spécifique de ERK et p38MAPK par les MPP.**

Les cellules Caco-2/TC7 ont été cultivées sur filtres semi-perméables et incubées en absence ou en présence de micelles post-prandiales (PPM) ou de micelles inter-prandiales (IPM) dans le compartiment apical. Après les temps d'incubation indiqués, les lysats cellulaires ont été analysés en western blot. L'immunodétection a été réalisée avec des anticorps spécifiques dirigés contre phospho-ERK1/2 (P-ERK), et phospho-p38MAPK (P-p38 MAPK). ERK total et la E-cadhérine (E-cadh), marqueur spécifique des jonctions *adherens*, ont été utilisés comme témoins de dépôt.

Outre la confirmation des résultats obtenus par l'analyse Kinexus®, j'ai pu ainsi préciser la fenêtre de temps nécessaire à l'activation des ces deux protéines kinases. Dès 2 minutes, p38 MAPK est activé spécifiquement par les MPP, et non par les MIP. L'activation est maintenue à 5 minutes. Pour ERK, l'activation s'effectue dès 5 minutes, et se maintient à 10 minutes. Cette activation est spécifique des MPP, les MIP ne l'induisant pas.

Pour préciser la réponse induite par les MPP sur les kinases ERK et p38MAPK, j'ai choisi de tester différentes concentrations de micelles. J'ai donc analysé une gamme de concentration de micelles, allant de 2 fois la concentration utilisée habituellement à 1/8 de celle-ci. Les cellules ont été incubées en présence de ces micelles pendant 10 minutes et la

phosphorylation de ERK et p38MAPK a été analysée en western blot. Les résultats sont présentés dans la Figure 43.



**Figure 43: Effet dose-dépendant de l'activation de ERK et p38MAPK par les micelles post-prandiales.** Les cellules Caco-2/TC7 ont été cultivées en présence de concentrations croissantes de micelles post-prandiales dans le compartiment apical pendant 10 minutes. Les lysats cellulaires sont analysés en western blot avec les mêmes anticorps que ceux utilisés précédemment.

L'effet spécifique d'activation par les MPP des kinases ERK et p38MAPK est dépendant de la quantité de MPP ajoutée dans le compartiment apical. Une concentration croissante de MPP augmente l'activation de ces protéines kinases, ce qui renforce la notion de spécificité de l'effet. Contrairement au MIP, les MPP sont donc capables d'activer, dans des temps courts, différentes protéines kinases de la famille des MAP Kinases, dont les effets pléiotropes pourraient participer aux événements que nous avons déjà décrits comme étant induits par les micelles post-prandiales.

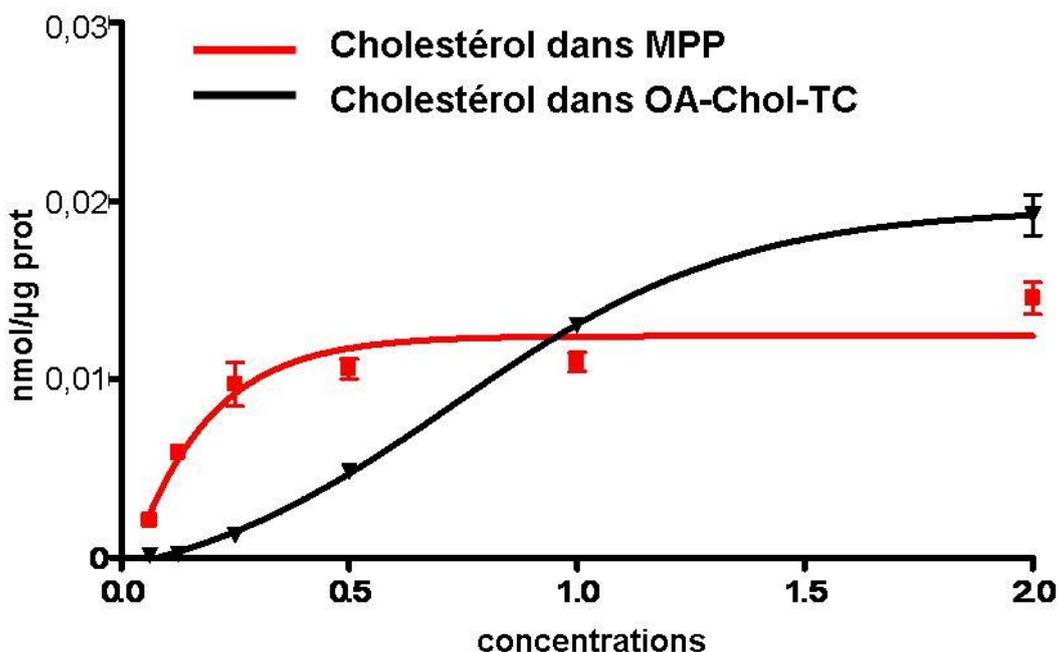
J'ai alors tenté de relier les voies de signalisation déclenchées aux effets des MPP, en particulier le trafic de l'apoB, en inhibant pharmacologiquement l'activation de ERK. L'inhibition de l'activation de ERK par les inhibiteurs commerciaux U0126 ou PD98059, n'empêche pas la délocalisation de l'apoB apicale induite par les MPP. Ceci indique que l'activation de ERK et le trafic de l'apoB vers les compartiments sécrétoires, bien que tous deux induits par les MPP, sont soit totalement indépendants, soit dépendants d'un même signal mais qui serait situé en amont de ces deux processus.

Une autre stratégie consiste à bloquer l'intermédiaire qui génère le signal. En effet, si les micelles sont capables de déclencher l'activation des voies de signalisation, et ce,

spécifiquement, il doit y avoir un événement déclencheur dès la surface cellulaire, car la micelle n'entre pas dans la cellule en tant qu'entité propre : ses constituants entrent individuellement. L'hypothèse d'un détecteur de micelles post-prandiales à la membrane apicale des entérocytes, étayée par les résultats précédemment obtenus dans l'équipe et par mes premiers résultats de thèse, implique l'existence d'une protéine membranaire apicale, capable de reconnaître les structures micellaires et de déclencher des signaux en aval.

Pour étudier l'interaction des micelles à la membrane apicale, j'ai tout d'abord réalisé des expériences de liaison à froid de composants radiomarqués des micelles lipidiques à la membrane apicale des cellules Caco-2/TC7 cultivées sur filtre. Cette température permet d'inhiber l'internalisation de ces composants, et de ne garder que ce qui s'est lié à la surface membranaire. Le problème de cette méthode réside dans le fait que les micelles que j'utilise ne sont pas un élément, mais une entité à 5 éléments. Même dans des conditions de température supposées bloquer les échanges, les structures micellaires ne sont pas si stables une fois en contact avec la membrane apicale. Il est d'autre part difficile d'utiliser 5 radioéléments différents pour suivre les 5 composants des micelles tous ensemble. Alors j'ai fait le choix d'utiliser le cholestérol, l'élément commun à l'ensemble des conditions d'apport en lipides. J'ai donc étudié la liaison de cholestérol marqué, apporté à l'état de traceur au pôle apical des cellules Caco-2/TC7 soit au sein de MPP soit au sein de micelles incomplètes contenant uniquement de l'acide oléique, du taurocholate et du cholestérol (non marqué) dans les mêmes conditions de molarité que dans les MPP. La liaison du cholestérol a été étudiée en fonction d'un apport croissant de MPP ou du mélange OA-Chol-TC et après une incubation de 2 heures à 4°C. Après l'incubation des cellules avec les MPP ou le mélange OA-Chol-TC contenant du cholestérol radiomarqué, les cellules sont lavées puis lysées avec de la soude. La radioactivité contenue dans le lysat est ensuite mesurée. (Figure 44).

Les résultats montrent que la liaison du cholestérol apporté au sein des MPP suit un profil différent de celui obtenu par sa liaison lorsqu'il est au sein d'un mélange incomplet. Cette courbe de liaison (en rouge, Figure 44) correspond à une liaison à un récepteur saturable. Le fait que les conditions d'apport du cholestérol conditionnent ses caractéristiques de liaison, et qu'il présente une liaison saturable lorsqu'il est apporté au sein de micelles post-prandiales, nous amène à concevoir la liaison de la micelle post-prandiale comme spécifique d'un récepteur, que nous avons alors entrepris d'identifier.



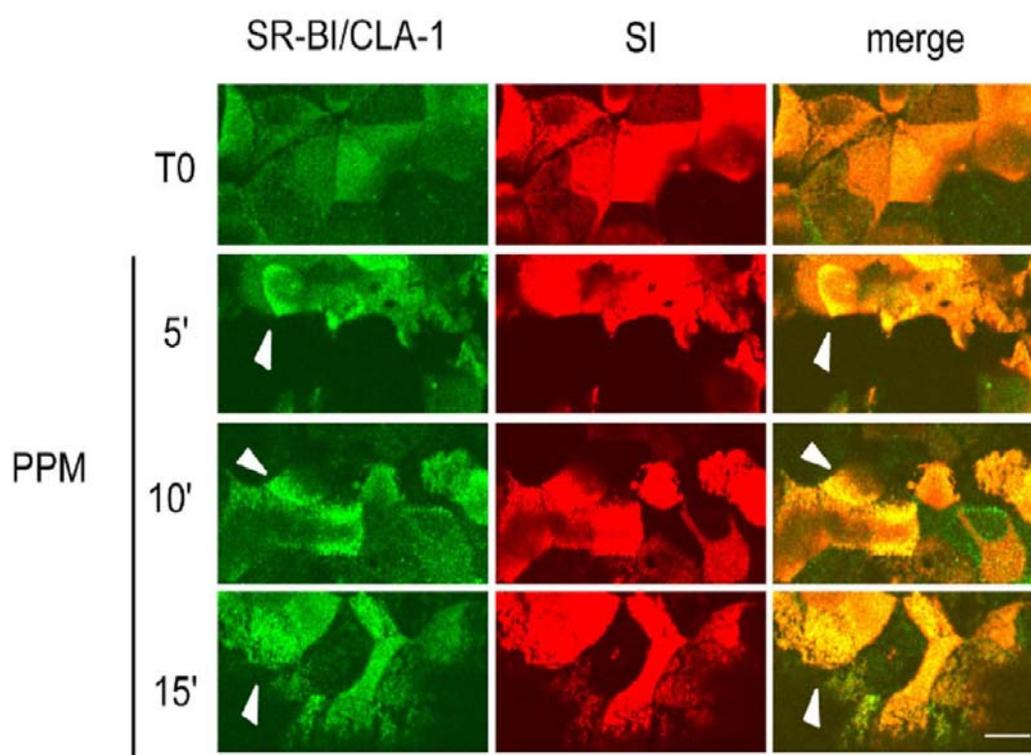
**Figure 44: Liaison du cholestérol radiomarqué à la membrane apicale des entérocytes Caco-2/TC7.** La courbe de liaison du cholestérol au sein du mélange micellaire de type post-prandial correspond à une liaison vis-à-vis d'un récepteur saturable, et est différente de celle observée dans le cas du cholestérol présent au sein d'un autre mélange micellaire incomplet.

Par une autre approche technique de "ligand-blotting" François Delers, dans l'équipe, a voulu déterminer la liaison différentielle des MPP et des MIP sur des lysats cellulaires après électrophorèse. Ces résultats ont été intégrés dans l'article 2 et nous ont apporté l'information d'une liaison spécifique des MPP sur une protéine dont le poids moléculaire est proche de 75 kDa.

Je me suis donc particulièrement intéressé au rôle que le récepteur scavenger SR-BI, dont le poids moléculaire est proche de 75 kDa dans l'intestin, pouvait jouer dans la détection des MPP. En effet, SR-BI est exprimé à la membrane apicale des entérocytes et dans les cellules Caco-2/TC7; c'est un récepteur à multiple ligands et il reconnaît des structures lipidiques dépourvues de protéines, comme le sont les MPP; la structure tridimensionnelle des ligands de SR-BI est importante pour son activité (pour revue (Rhains and Brissette 2004)); enfin, il a été montré que SR-BI induisait des voies de signalisation dans d'autres types cellulaires (Grewal et coll. 2003; Mineo and Shaul 2007).

J'ai tout d'abord étudié la localisation de SR-BI dans les cellules Caco-2/TC7 cultivées sur filtre en présence de MPP pendant des temps courts de 5, 10 et 15 minutes, (Figure 45). En situation contrôle, SR-BI est localisé majoritairement au niveau de la bordure en brosse, caractérisée par l'expression de la saccharase-isomaltase, marqueur

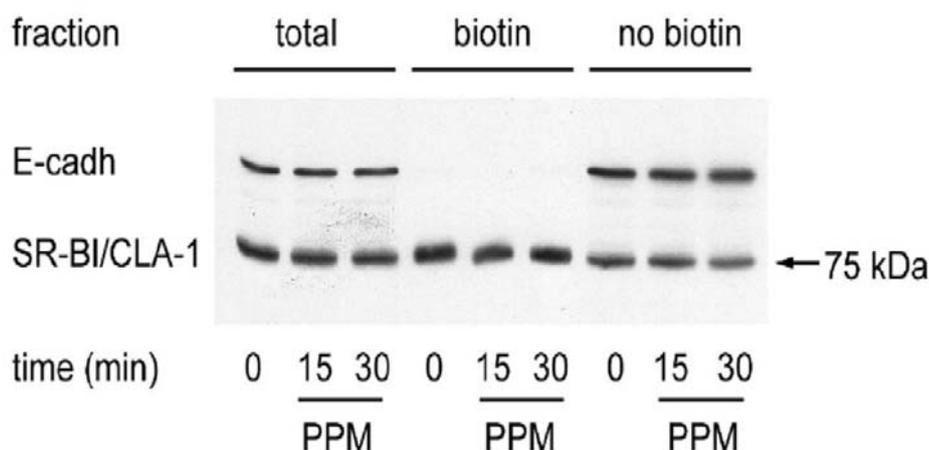
résident de la bordure en brosse des entérocytes. Dès 5 minutes d'incubation avec les MPP, j'ai observé un regroupement de SR-BI dans certaines zones de la membrane de la bordure en brosse; cette "clusterisation" perdure après 10 et 15 minutes d'incubation avec les MPP. La localisation dans la bordure en brosse nous est confirmée par la colocalisation avec la saccharase-isomaltase. L'incubation en présence de MPP induit donc un remaniement de la localisation de SR-BI. Toutefois, cette expérience ne permet pas, à elle seule, de préciser s'il s'agit d'un réarrangement des protéines SR-BI déjà présentes à la membrane ou s'il s'agit d'une augmentation de l'adressage de SR-BI à la membrane, comme cela a pu être décrit dans d'autres modèles, en réponse à une stimulation (Tondu et coll. 2005).



**Figure 45: Localisation subcellulaire de SR-BI après incubation avec des micelles post-prandiales.** Immunolocalisation du récepteur scavenger de classe B type I (SR-BI, canal vert) et de la saccharase isomaltase (SI, canal rouge) dans des cellules différenciées Caco-2/TC7 cultivées sur filtres, avant ( $T_0$ ) et après 5, 10 et 15 min d'apport apical en MPP. Les panneaux représentent des acquisitions en XY au niveau apical (barre = 10 $\mu$ m). Les flèches montrent les "clusters" de SR-BI.

Pour répondre à la question concernant une augmentation potentielle de la quantité de SR-BI à la membrane apicale des entérocytes en réponse à l'apport en MPP, j'ai, par une approche biochimique, déterminé de façon semi-quantitative l'expression de SR-BI à la membrane apicale des cellules Caco-2/TC7. Il s'agit de marquer à la biotine les protéines exprimées à la membrane apicale des entérocytes. La biotine réagit alors avec les résidus amines des protéines et forme un complexe stable, qui sera précipité par l'interaction de la

biotine avec la Neutravidin, un dérivé de l'avidine, permettant ainsi la récupération de différentes fractions : la fraction comportant les protéines biotinylées et la fraction des protéines non-biotinylées. La présence de la E-Cadhérine, marqueur des membranes basolatérales, uniquement dans la fraction des protéines non biotinylées. Cela confirme que le tapis cellulaire est resté jointif et que les micelles n'ayant pas perturbé les jonctions serrées (Figure 46).

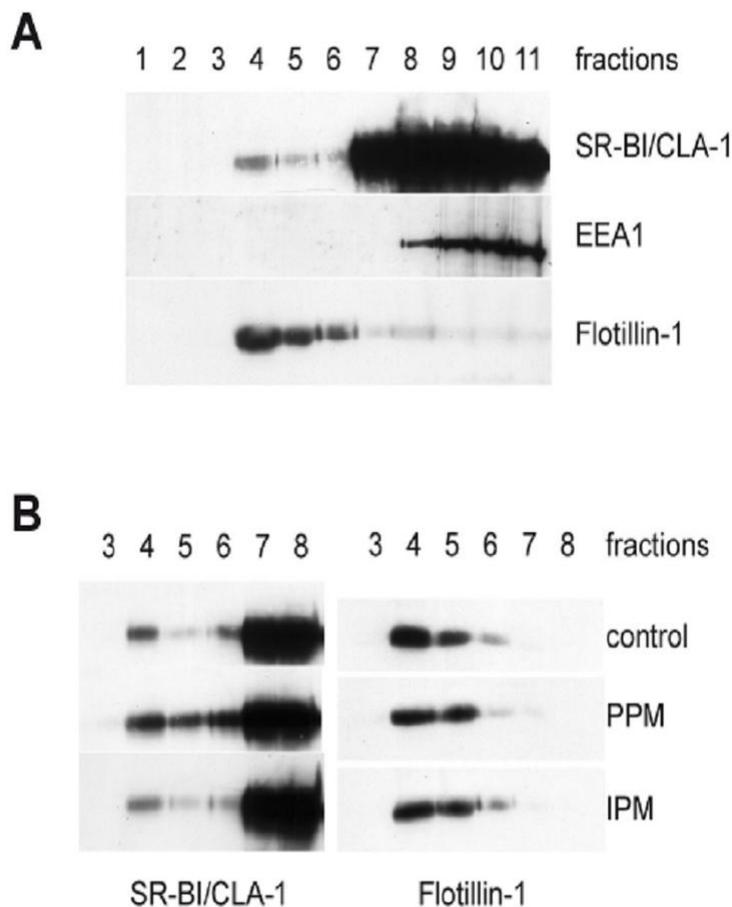


**Figure 46: Quantité relative de SR-BI à la membrane apicale des cellules Caco-2/TC7 en réponse à l'apport apical de micelles post-prandiales.** Les cellules Caco-2/TC7 ont été cultivées sur filtres semi-perméables en absence (0) ou en présence de micelles post-prandiales (PPM) pendant les temps indiqués. Les cellules ont été ensuite incubées à 4°C avec de la biotine apportée dans le compartiment apical puis rincées. Les lysats cellulaires ont été immunoprécipités par la streptavidine-sépharose permettant la récupération spécifique des protéines biotinylées de la membrane apicale. Les lysats cellulaires totaux obtenus avant immunoprécipitation (total), les fractions immunoprécipitées contenant les protéines apicales biotinylées (biotin) et les fractions non-immunoprécipitées contenant les protéines non marquées (no biotin), ont été analysés par western blot avec des anticorps anti-SR-BI et anti-E-cadhérine (E-cadh, utilisé comme un marqueur de la membrane basolatérale).

Dans la fraction totale, on ne voit pas de modification de la quantité totale de SR-BI après 15 ou 30 minutes d'incubation en présence de micelles post-prandiales (PPM) par rapport à la condition contrôle, i.e. en absence de micelles post-prandiales. Nous n'observons pas non plus de modification de la quantité de SR-BI dans la fraction correspondant aux protéines biotinylées. Les micelles post-prandiales ne modifient donc pas la proportion de SR-BI adressé à la membrane apicale des entérocytes.

Les micelles post-prandiales modifient donc la répartition de SR-BI dans la membrane apicale des entérocytes, sans modifier son adressage à la membrane apicale. Je me suis alors interrogé sur la nature des mouvements de SR-BI au sein de ces membranes, d'autant que la localisation d'un détecteur au sein de la membrane doit certainement jouer sur sa fonctionnalité : les domaines de plateformes de signalisation tels que les rafts en sont

un parfait exemple. Nous avons réalisé un fractionnement cellulaire sur gradient de sucrose après traitement des cellules au détergent Triton X-100 à froid. La présence de SR-BI dans les différentes fractions, caractérisées par l'expression de marqueurs associés aux endosomes (fractions solubles au détergent) ou aux rafts (fractions résistantes au détergent) a été analysée dans les cellules contrôles (Figure 47A) et comparée aux cellules incubées en présence de MPP ou de MIP (Figure 47B).



**Figure 47: L'apport de MPP induit des mouvements de SR-BI vers les domaines rafts.**

(A) Les cellules Caco-2/TC7 cultivées sur filtres en condition contrôle de culture ont été lysées en présence de triton à froid puis soumises à un gradient de sucrose (5-40%). Onze fractions ont été collectées pour l'analyse par WB et immunodétection de SR-BI, de EEA1 (early endosome antigen 1) et de la flotilline-1 (marqueur de raft). (B) Les cellules Caco-2/TC7 ont été cultivées sur filtres en absence (control) ou en présence de MPP ou MIP pendant 10 minutes, puis lysées en présence de triton. Les lysats cellulaires ont été soumis au gradient de sucrose (5-40%), et parmi les 11 fractions collectées, les fractions 3 à 8 ont été analysées par WB pour l'immunodétection de SR-BI (panneau de gauche) et de la flotilline-1 (panneau de droite).

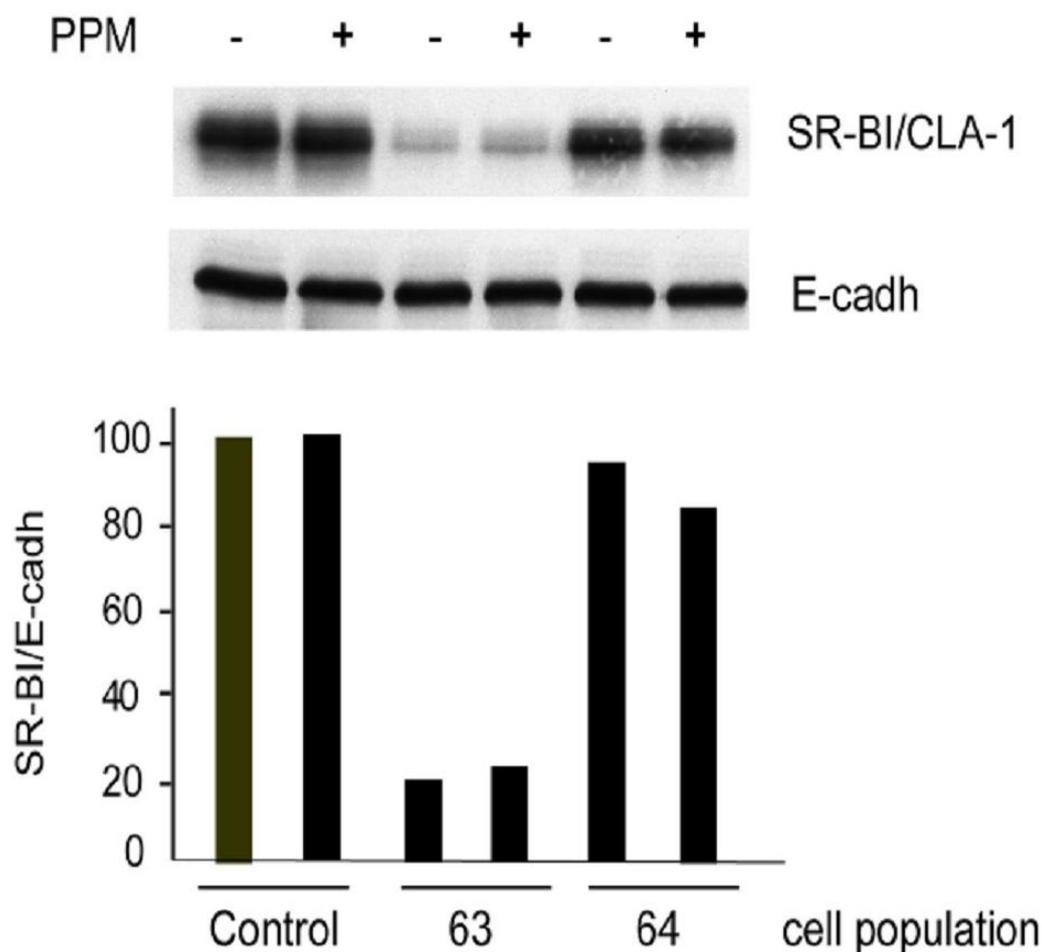
En absence de micelles dans le milieu apical (Figure 47A), SR-BI est majoritairement exprimé dans les fractions solubles au détergent, où l'on retrouve notamment le marqueur d'endosome précoce, EEA1. On trouve également une petite quantité de SR-BI dans les fractions de faible densité en sucrose (fractions 4-6), correspondant aux microdomaines rafts, résistants au détergent, identifiés ici à l'aide de la

flottiline-1. L'apport de micelles post-prandiales induit une augmentation de la quantité de SR-BI dans les fractions correspondant aux rafts (4-6). Les MIP n'induisent pas ce mouvement et sont tout à fait comparables à la situation contrôle sans lipides. Les MPP induisent donc très spécifiquement un recrutement de SR-BI vers les domaines de la membrane correspondant aux rafts. Le traitement par les lipides n'altère pas les propriétés du gradient, comme nous le montre le panneau de droite de la Figure 47B par l'immunodétection de la flottiline-1, marqueur de rafts, identique dans toutes les conditions de traitement.

J'ai ensuite cherché à invalider SR-BI afin d'analyser son implication directe dans les effets spécifiques des micelles post-prandiales. La stratégie consistait à utiliser l'ARN interférence pour obtenir une diminution forte de l'expression de SR-BI. L'ARN interférence ne permet pas d'invalider totalement la protéine, ce n'est pas un "knock-out", mais un "knock-down". Cependant, une forte inhibition de l'expression devait suffire à montrer son implication ou non dans les effets obtenus. J'ai commencé classiquement en utilisant des siRNA, séquences d'oligos de 19 bases, choisis pour cibler l'ARNm de SR-BI. La difficulté, avec les cellules Caco-2/TC7 est leur résistance à la transfection quand elles ne sont plus en phase exponentielle. Or nous cultivons ces cellules pendant trois semaines pour atteindre une fonctionnalité optimale. La transfection transitoire des cellules en phase exponentielle ne permet pas une invalidation se maintenant à aussi long terme. De plus, les résultats obtenus avec les différentes constructions de siRNA n'ont pas dépassé 50 % d'invalidation. Nous avons alors testé des transfactions stables avec des vecteurs exprimant des shRNA dirigés contre SR-BI, co-transfectés avec vecteur adénoviral pour augmenter l'efficacité de la transfection. Les séquences utilisées dans mes expériences, avaient été testées avec succès dans d'autres laboratoires (Voisset et coll. 2005; Huby et coll. 2006). Le problème majeur avec les cellules Caco-2/TC7 reste l'efficacité de transfection. Après plus d'un an de tentatives nombreuses et infructueuses, nous avons orienté notre approche vers des lentivirus exprimant des shRNA dirigés contre SR-BI (Sigma). Ces constructions expriment également un gène de résistance à la puromycine. Des cinq constructions testées, trois d'entre elles ont invalidé de façon très importante (environ 80%) l'expression de SR-BI. Pour la suite des expériences, je n'ai gardé qu'une construction positive (population 63) et une construction qui n'a pas fonctionné (population 64), qui servira donc de population contrôle négative. Les résultats sont présentés dans la Figure 48.

La population 63 montre une diminution de 80 % d'expression de SR-BI, tandis que la population 64 présente des niveaux d'expression comparables à la population contrôle

non transfectée, dans laquelle nous avons seulement ajouté l'agent de transfection. L'ajout de micelles post-prandiales ne modifie pas l'expression de SR-BI dans ces différentes populations.



**Figure 48: Invalidation de SR-BI dans les cellules Caco-2/TC7.** Les cellules Caco-2/TC7 non transfectées et les populations 63 et 64 exprimant des séquences shRNA dans un vecteur lentiviral, ont été cultivées sur filtres dans des conditions classiques de culture. Les populations 63 et 64 ont été analysées au passage 4 après la transfection en absence de MPP ou après 10 minutes d'incubation avec les MPP. Les lysats cellulaires ont été analysés en WB avec des anticorps anti-SR-BI et anti-E-cadhérine (E-cadh, utilisée comme contrôle de dépôt). Le panneau du bas représente l'analyse semi-quantitative par densitométrie de l'expression de SR-BI normalisée à l'expression de la E-cadhérine et fixée à 100% pour les Caco-2/TC7 non transfectées. Les résultats proviennent de deux expériences indépendantes.

Après plusieurs passages en culture, nous avons pu observer que la population 63 exprimait SR-BI à un niveau plus élevé que lors des premiers passages qui suivaient la sélection des cellules transfectées. Ce phénomène n'a pas été observé pour la population 64. Après une trentaine de passages, la population 63 présente un niveau d'expression intermédiaire de SR-BI équivalent à 60% du taux d'expression observé dans les cellules Caco-2/TC7 non transfectées. Pourtant ces cellules possèdent toujours la capacité à résister

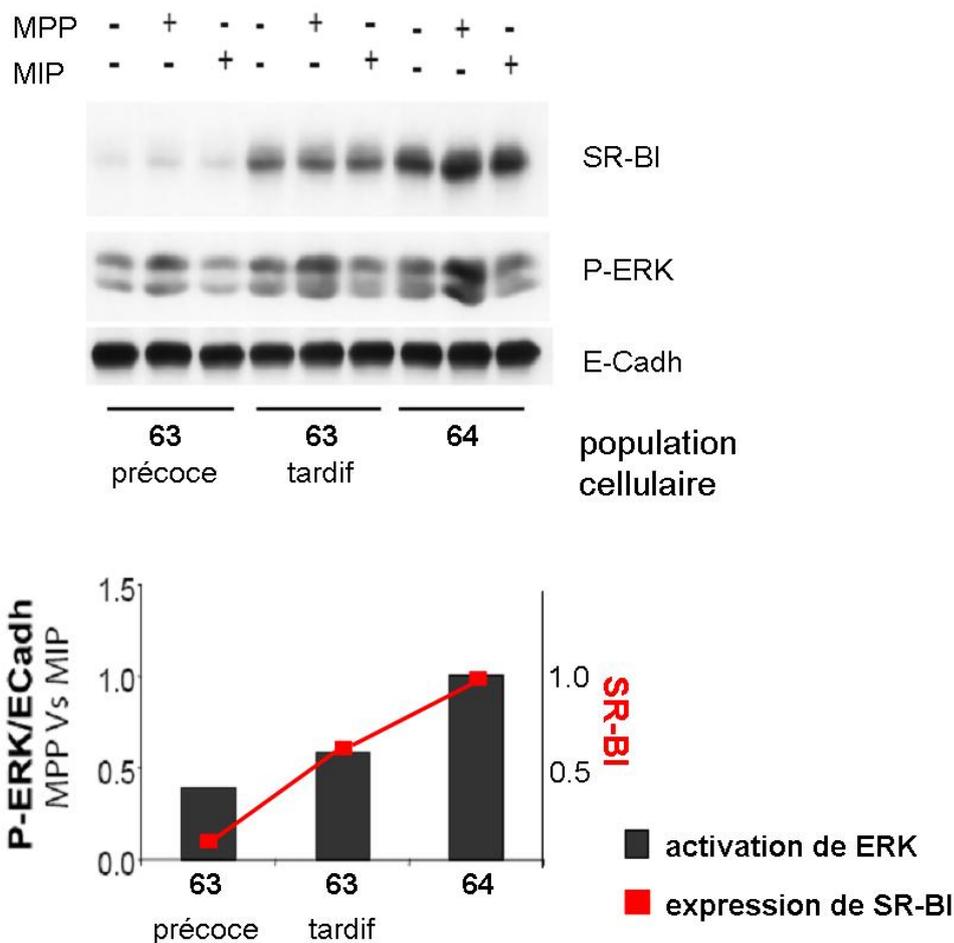
à la puromycine suggérant que la construction shRNA est donc toujours présente dans cette population. La ré-expression de SR-BI dans cette population au cours des passages peut s'expliquer par le fait que j'ai analysé la population cellulaire totale et non des clones isolés. Cette population pourrait contenir des cellules exprimant des niveaux différents de SR-BI et un enrichissement en cellules l'exprimant le plus serait survenu au cours des passages. Ainsi, en utilisant la population 63 à des passages précoces (moins de 10 passages après la transfection, population 63P) et à des passages tardifs (une trentaine de passages après la transfection, population 63T), en comparaison avec la population 64, j'ai pu comparer des cellules Caco-2/TC7 exprimant des niveaux d'expression de SR-BI croissants, comme cela est illustré ci-dessous.



**Figure 49: Niveaux d'expression de SR-BI au cours des passages de cellules Caco-2/TC7 transfectées par des constructions shRNA.** 63P : population 63 à des passages précoces (passage 6) et 63T à des passages plus tardifs (passage 28). La population 64 a été analysée au passage 28.

Pour relier à SR-BI les événements induits par les MPP, nous avons alors testé sur ces différentes populations l'activation de ERK en réponse à l'apport de MPP.

Les résultats que nous avons obtenus (Figure 50), ont permis de corrélérer les niveaux d'expression de SR-BI à l'activation de ERK par les MPP. Plus les cellules expriment SR-BI, plus la quantité de P-ERK est importante en réponse aux micelles post-prandiales.



**Figure 50: L'inactivation de SR-BI dans les cellules Caco-2/TC7 affecte la phosphorylation de ERK1/2 induite par les MPP.** Les populations cellulaires 63 précoce (passage 6), 63 tardive (passage 28) et 64 (passage 28) ont été cultivées sur filtres semi-perméables et incubées en absence ou en présence de micelles post-prandiales (MPP) ou inter-prandiales (MIP) dans le compartiment apical pendant 10 minutes. Les lysats cellulaires ont été soumis à électrophorèse et immunodétection pour SR-BI, phospho-ERK1/2 (P-ERK) et E-cadhérine (E-cadh, utilisées comme contrôle de dépôt). Le panneau du bas représente le rapport de la quantification par densitométrie de l'expression de P-ERK normalisée à celle de la E-cadhérine, obtenue après incubation avec des MPP par rapport à des MIP. Les résultats représentent la moyenne de deux expériences indépendantes.

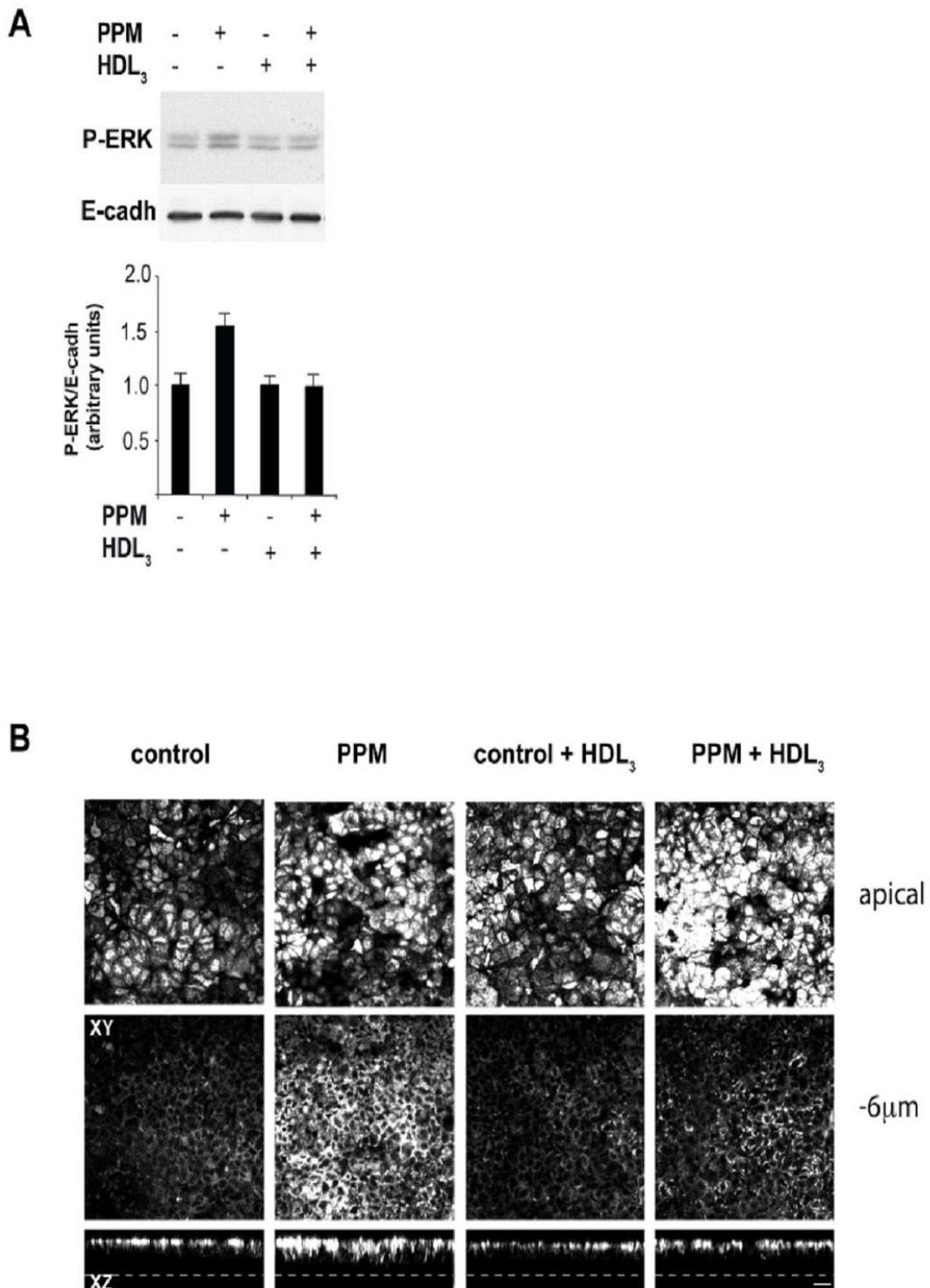
J'ai voulu tester sur ces populations l'effet des MPP sur la délocalisation du pool d'apoB apicale. Une délocalisation de l'apoB plus moins prononcée a été observée dans ces populations en réponse aux micelles, mais il s'est avéré difficile de quantifier l'importance de la délocalisation de l'apoB dans ces différentes populations cellulaires. Il est d'autre part possible que l'expression résiduelle de SR-BI, notamment les 20% restant dans la population 63P, suffise pour que le trafic de l'apoB ait lieu en réponse aux MPP.

J'ai alors utilisé une autre stratégie pour impliquer SR-BI dans la détection des MPP. Cette stratégie consiste à utiliser un ligand connu de SR-BI comme compétiteur, en faisant l'hypothèse que ce ligand pourrait altérer les effets spécifiques des MPP. Les HDL<sub>3</sub>, lipoprotéines de haute densité, sont un des nombreux ligands du récepteur scavenger SR-BI. Si, physiologiquement, les lipoprotéines ne sont pas présentes dans la lumière intestinale, les HDL<sub>3</sub> sont cependant capables d'agir comme compétiteur pour SR-BI sur les cellules intestinales (Schulthess et coll. 2000). Avant d'utiliser ces HDL<sub>3</sub> sur les cellules comme compétiteur des MPP pour suivre le trafic de l'apoB, j'ai testé leur effet sur la phosphorylation de ERK (Figure 51A).

Les HDL<sub>3</sub> apportées seules dans le milieu apical des cellules Caco-2/TC7 n'induisent pas, dans nos conditions de culture, l'activation de ERK, mais, les HDL<sub>3</sub> empêchent l'induction spécifique par les MPP de l'activation de ERK (Figure 51A). Cet outil est donc pertinent pour tester l'effet du blocage de SR-BI sur le trafic de l'apoB qu'induisent spécifiquement les MPP. Les résultats rapportés dans la Figure 51B rappellent le trafic de l'apoB apicale vers les compartiments intracellulaires après l'incubation en présence de MPP par rapport aux cellules contrôles (deux panneaux de gauche). Les HDL<sub>3</sub> apportées seules dans le milieu apical n'ont pas d'effet sur la localisation de l'apoB dans les cellules Caco-2/TC7, qui reste associée à la bordure en brosse apicale. En revanche, la présence simultanée de HDL<sub>3</sub> et de MPP inhibe l'effet induit par ces micelles sur le trafic de l'apoB, (Figure 51B, les deux panneaux de droite).

**Ces résultats montrent que SR-BI est impliqué dans les événements précoces de signalisation induits par l'apport apical de lipides alimentaires au sein de micelles post-prandiales. Ces événements précoces concernent l'activation de kinases impliquées dans la voie des MAPK et la mobilisation de l'apoB apicale qui est alors dirigée vers des compartiments intracellulaires, une étape indispensable à l'assemblage des LRT et à leur sécrétion.**

**L'ensemble de ces résultats permet donc de considérer à présent le récepteur "scavenger" SR-BI comme un acteur de la détection des lipides alimentaires par les entérocytes. L'interaction des MPP avec SR-BI déclencherait des événements intracellulaires permettant ainsi à la cellule de faire face à l'apport luminal de lipides alimentaires, sous leur forme micellaire en période post-prandiale, et d'exercer sa fonction de transfert de ces lipides vers l'organisme.**



**Figure 51: Les effets spécifiques des MPP sont affectés par la présence de HDL<sub>3</sub>, un ligand de forte affinité de SR-BI.** (A) Les cellules Caco-2/TC7 ont été cultivées sur filtres et analysées avant ou après 10 minutes d'incubation avec les MPP (PPM), en présence ou non de HDL<sub>3</sub> (100µg/ml) ajouté dans le milieu apical en même temps que les MPP. Les lysats cellulaires ont été analysés en WB pour phospho-ERK1/2 (P-ERK). La E-cadhérine (E-cadh) a été utilisée comme contrôle de dépôt. Le panneau du bas représente la quantification par densitométrie de l'expression de P-ERK. (B) Les cellules Caco-2/TC7 ont été cultivées sur filtres. Avant (Control) ou après 10 minutes d'incubation avec les MPP, en présence ou non d' HDL<sub>3</sub> (100µg/ml) ajouté en même temps que les MPP au niveau apical, la distribution de l'apoB a été analysée par microscopie confocale. Les deux panneaux du haut représentent les acquisitions XY d'un plan de la bordure en brosse et d'un plan 6 µm en dessous. Les panneaux du bas correspondent à des projections XZ. Les pointillés délimitent le plan basal des cellules (barre = 20 µm).

## **Article 2:**

Implication du récepteur SR-BI dans les événements précoces de la détection entérocytaire des lipides alimentaires sous forme micellaires à la membrane apicale des cellules Caco-2/TC7.

"Sensing of micellar alimentary lipids by enterocytes: a new role for the Scavenger receptor class B type 1?"

**Olivier Béaslas**, Carine Cueille, François Delers, Jean Chambaz, Monique Rousset, Véronique Carrière

*soumis*

## **Sensing of dietary lipids by enterocytes: a new role for SR-BI/CLA-1**

Olivier Béaslas<sup>1,2,3</sup>, Carine Cueille<sup>1,2,3</sup>, François Delers<sup>1,2,3</sup>, Jean Chambaz<sup>1,2,3</sup>,  
Monique Rousset<sup>1,2,3</sup> and Véronique Carrière<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, UMR S 872, Les Cordeliers, Paris, F-75006 France ;

<sup>2</sup>INSERM, U 872, Paris, F-75006 France ;

<sup>3</sup>Université Paris Descartes, UMR S 872, Paris, F-75006 France;

\*Correspondence: Centre de Recherche des Cordeliers UMR S 872 équipe 6, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris France; Tel. (33) 1 42 34 69 34; Fax. (33) 1 43 25 16 15; E-mail: [veronique.carriere@crc.jussieu.fr](mailto:veronique.carriere@crc.jussieu.fr)

**Running Title** : SR-BI/CLA-1 and intestinal sensing of dietary lipids

### **SUMMARY**

Enterocytes ensure the transfer of alimentary lipids through a complex process that must be regulated to face variations in lipid loads and composition during postprandial and inter-prandial periods. We show that the apical delivery to Caco-2/TC7 enterocytes of postprandial lipid micelles (PPM), containing triglyceride hydrolysis products, leads to clusterization of SR-BI/CLA-1 at the apical membrane and to its movement from non-raft towards raft domains, inducing cell signaling events that are not reproduced by lipid micelles devoid of alimentary lipids. PPM supply promotes the traffic of apolipoprotein (apo) B, a structural component of triglyceride-rich lipoproteins, from apical towards secretory domains, and a rapid and dose-dependent activation of ERK and p38MAPK. Competition experiments or SR-BI/CLA-1 invalidation impaired PPM-dependent apoB traffic and ERK activation. These results represent the first evidence for a sensing of postprandial alimentary lipids-containing micelles in enterocytes and for a role of SR-BI/CLA-1 in this process.

## INTRODUCTION

Enterocytes, the major cell population of the intestinal epithelium, contribute to energy homeostasis through the transfer of nutrients to the organism. It is thus of importance to characterize the mechanisms involved in the control of nutrient absorption in these cells, and more particularly those modulating the synthesis and secretion of triglyceride-rich lipoproteins (TRL) that occur through a highly polarized process, from the apical membrane of enterocytes towards basolateral secretory domains (Mu and Hoy, 2004).

Dietary lipids, mostly triglycerides (TG), are supplied to enterocytes as postprandial lipid micelles (PPM) resulting from their hydrolysis by pancreatic enzymes, into fatty acids (FA) and monoglycerides (MG), and their solubilization by biliary salts and lipids in the intestinal lumen. After absorption of FA and MG, TG must be re-synthesized in enterocytes and associated to the structural apolipoprotein (apo) B48, and to apoAI and apoA-IV, to produce chylomicrons, the intestinal postprandial form of TRL (Davidson and Shelness, 2000; Mu and Hoy, 2004).

Small intestine must adapt to variations in lipid loads and composition that occur daily in postprandial and inter-prandial periods (for review (Drozdzowski and Thomson, 2006)); it signals to the organism the abundance or deficiency in nutrients and participates to the activation of satiety signals (Cummings and Overduin, 2007; Raybould, 1999). Such an adaptation of enterocyte function has been mainly studied through the impact of dietary lipids on gene expression and the implication of several transcriptional factors (for review (Sanderson and Naik, 2000)). It was also suggested that dietary lipids, such as sphingolipids, participate in signal transduction involving the activation of second messengers or the activation of protein kinases (Hakomori and Igarashi, 1995; Huwiler et al., 2000; Tani et al., 2007). In the same way, it has been observed that chylomicrons and apoA-IV are involved in sensory transduction in the intestine (for review (Raybould, 1999)). However, most of the studies on lipid-induced signals did not consider the physiological mode of delivery of dietary lipids to the apical pole of enterocytes under the form of complex micelles. We have previously reported that the apical supply of PPM to Caco-2/TC7 cells, which reproduce most of the morphological and functional characteristics of enterocytes (Chantret et al., 1994; Zucco et al., 2005), provoked specific effects, namely the rapid displacement of the apical brush-border-associated pool of apoB towards the intracellular secretory compartments (Morel et al., 2004), the concomitant induction of TG secretion as TRL (Chateau et al., 2005), and the activation of apoA-IV transcription, through the hepatocyte nuclear factor HNF-4 (Carriere et al., 2005), this last process being recently reported also *in vivo*, in swine enterocytes (Leng et al., 2007). These effects were obtained neither by the apical delivery of albumin-bound fatty acids or incomplete combinations of PPM components nor by plasma fatty acids supplied at the basal pole of the cells (Carriere et al., 2005; Chateau et al., 2005; Morel et al., 2004). This indicated that the supply of fatty acids was not sufficient by itself to induce the cascade of events leading to the secretion of TRL, and suggested that complex alimentary lipids-containing micelles induce specific signals triggered by a sensor located at the apical membrane of enterocytes.

The purpose of the present study was to analyze the early cell signaling events specifically induced by the apical supply of PPM and to determine the molecular mechanisms of PPM sensing in enterocytes. To achieve this, we compared the effects of the apical supply of postprandial micelles to that of inter-prandial micelles (IPM), i.e. devoid of TG hydrolysis products, on the apoB traffic and the activation of kinases in Caco-2/TC7 cells.

## RESULTS

### *Cell signaling events are specifically induced by postprandial lipid micelles in enterocytes*

We previously showed that PPM provoked a rapid (within 15 min) chase of apoB from the apical brush-border towards basolateral secretory domains in Caco-2 enterocytes. This effect was not reproduced by oleic acid bound to albumin, the plasma

carrier of fatty acids (Morel et al., 2004). To further evaluate the specific effect of postprandial alimentary lipids supplied as physiological complex micellar structures, we compared the effect of the apical supply of PPM to that of IPM (inter-prandial lipid micelles devoid of digested products of TG) on apoB traffic (**Figure 1**). In the absence of lipid micelles in the apical compartment, apoB was apically distributed and colocalized with the brush-border marker sucrase-isomaltase (SI). After the apical delivery of PPM, apoB was localized in intracellular compartments. This delocalization of apoB was not observed after IPM supply (**Figure 1**), indicating that the mobilization of the apical apoB depends specifically on the supply of micellar alimentary lipids. This led us to hypothesize that PPM can induce specific signaling pathways in enterocytes. We therefore analyzed the activation of multiple signaling proteins, essentially kinases, using a specific and semi-quantitative method for their identification through Kinetworks screens. To identify kinases specifically activated by the apical supply of PPM, time-course experiments were performed at 5, 10 and 15 min after the addition of PPM or IPM. As soon as 5 min after PPM supply (**Figure 2A**), we observed an increased phosphorylation of five protein kinases, namely PAK1/2/3, MEK1, p38 $\alpha$ MAPK, ERK1/2 and PKA C $\beta$ . Among them, MEK1, responsible for the activation of ERK1/2 in the canonical ERK pathway, was up-phosphorylated at three phosphosites (T385, S297 and T291). We also observed an increased phosphorylation of CREB1 protein, a target transcription factor of MAPK pathways (for review (Lang et al., 2006)). All these effects were not observed after the supply of IPM (**Figure 2A**), even after 15 min (data not shown). As most of the protein kinases activated after PPM supply belong to MAPK signaling pathway, we focused our study on two downstream kinases of this pathway: ERK1/2 and p38 $\alpha$ MAPK. By immunoblot analysis, we confirmed that PPM supply, and not IPM supply, increased the phosphorylation of ERK1/2 and p38 $\alpha$ MAPK, within 5 and 2 min respectively (**Figure 2B**), the activation of these kinases being dependent on the amount of PPM added at the apical compartment (**Figure 2C**).

#### *The supply of PPM specifically modulates the subcellular distribution of SR-BI/CLA-1*

Since PPM induced specific cell signaling events, we hypothesized that a protein located at the apical membrane of enterocytes could trigger these effects through its interaction with PPM. To identify proteins that specifically interact with PPM, we performed a ligand blotting assay and compared the interaction of labeled phospholipids-containing PPM and IPM with cell extracts. While both types of micelles interacted with several proteins, these interactions were enhanced in PPM condition, and revealed an additional 75 kDa band that was not observed in IPM condition (**Figure 3**). Among the proteins located at the apical membrane of enterocytes, with an electrophoretic gel migration around 75 kDa and potentially interacting with protein-free lipids like PPM, we focused on the scavenger receptor SR-BI (CLA-1 in Human). Indeed, SR-BI/CLA-1 displays a molecular weight near to 75 kDa in the intestine (Voshol et al., 2001) and is expressed at the brush border membrane of enterocytes of duodenum and jejunum and in Caco-2/TC7 cells (Cai et al., 2001; Levy et al., 2004; Lobo et al., 2001). It was reported that SR-BI/CLA-1 binds not only high-density lipoproteins but also lipid structures devoid of apolipoproteins, and that the tri-dimensional structure of SR-BI/CLA-1 ligands are of importance to modulate its activity (Rhainds and Brissette, 2004). Finally, various SR-BI/CLA-1 ligands have been reported to trigger MAPK (Baranova et al., 2005; Grewal et al., 2003) and PI3K/Akt (Mineo and Shaul, 2003) signaling pathways. SR-BI/CLA-1 might thus act as a sensor of complex postprandial micelles at the apical pole of enterocytes.

We analyzed the effects of PPM supply on SR-BI/CLA-1 localization in Caco-2/TC7 cells using confocal immunofluorescence analysis. In control cells, SR-BI/CLA-1 was expressed in the brush border membrane, where it colocalized with sucrase-isomaltase (**Figure 4A**). As soon as 5 min after PPM supply, a clusterization of SR-BI/CLA-1, which was maintained after 15 min, was observed at the apical membrane of enterocytes. To determine whether this clusterization was due to an increase in the amount of SR-BI/CLA-1 recruited at the apical membrane, we performed a cell surface biotinylation assay (**Figure 4B**). Caco-2/TC7 cells were cultured with or without PPM for 15 or 30 min and then apical proteins were isolated using a non-permeant biotin-

streptavidin complex. The amount of SR-BI/CLA-1 was analyzed by immunoblotting of total cell homogenate, apical biotinylated fraction and non-apical fraction (containing unbiotinylated proteins and characterized by the presence of E-cadherin, a basolateral membrane marker). As shown in **Figure 4B**, we did not observe an increase in the apical amount of SR-BI/CLA-1 within 30 min after PPM supply, indicating that PPM does not modify the targeting of SR-BI/CLA-1 to the apical membrane of enterocytes.

It has been reported that the functionality of SR-BI may depend on its localisation in lipid raft microdomains (Babitt et al., 1997; Hansen et al., 2003; Orłowski et al., 2007). We thus analyzed the impact of PPM or IPM supply on the association of SR-BI/CLA-1 to lipid rafts in Caco-2/TC7 cells, after cell fractionation in a discontinuous 5-40% sucrose gradient (**Figure 5**). In the absence of lipid micelles in the apical medium, SR-BI/CLA-1 was partially localized in the low-sucrose density fractions (fractions 4-6), in raft microdomains identified by the expression of flotillin-1, a known raft-associated protein (Bickel et al., 1997; Lambert et al., 2005) (**Figure 5A**). However, we also observed a large amount of SR-BI/CLA-1 localized in non-raft high-sucrose density fractions (fractions 7-11), which contained the early endosome marker, EEA1. After PPM supply, an increased amount of SR-BI/CLA-1 was observed in raft fractions (fractions 4-6) without obvious change in non-raft fractions (**Figure 5B**). No modification in the repartition of SR-BI/CLA-1 was observed after IPM supply as compared to the control condition. PPM and IPM supplies did not modify the subcellular distribution of flotillin-1, indicating that the delivery of lipids to the apical pole of enterocytes did not alter the sucrose gradient properties.

#### *SR-BI/CLA-1 is involved in the PPM-induced cell signaling in enterocytes*

To determine the implication of SR-BI/CLA-1 in the PPM-induced cell signaling in enterocytes, we first analyzed the effect of SR-BI/CLA-1 invalidation in Caco-2/TC7 cells. Stably invalidated cells for SR-BI/CLA-1 were obtained by lentivirus-mediated shRNA transfection experiments. Two cell populations transfected with different shRNA sequences were obtained: the expression of SR-BI/CLA-1 protein was reduced by 80% in the cell population 63 as compared to control Caco-2/TC7 cells, while the cell population 64 expressed nearly the same SR-BI/CLA-1 protein level as Caco-2/TC7 cells and was thus used as negative control cell population in the subsequent experiments (**Figure 6A**). No modification of the SR-BI amount was observed after PPM supply in all cell populations analyzed. After several passages of cell population 63, we observed a partial rescue of SR-BI/CLA-1 expression up to 60% of control cells without any change in SR-BI/CLA-1 amount in cell population 64 during the same time-dependent cell culture experiment (**Figure 6B**). We thus analyzed the PPM-dependent ERK1/2 phosphorylation in these three cell populations expressing different amounts of SR-BI/CLA-1 protein. Early and late passages of cell population 63, which expressed 20% and 60% of SR-BI/CLA-1 amounts of control cells respectively, were compared to the negative control cell population 64. As shown in **Figure 6B**, the PPM-induced ERK1/2 phosphorylation level was correlated with the amount of SR-BI/CLA-1, the lowest ERK1/2 activation being observed in the lowest SR-BI/CLA-1 expressing cell population.

To confirm the implication of SR-BI/CLA-1 in the cell signaling events specifically induced by PPM supply, we checked whether a ligand of SR-BI/CLA-1 could compete with PPM and thus interfere with their downstream effects, namely MAPK phosphorylation and apoB traffic. Competition experiments were performed by using the strong SR-BI/CLA-1 ligand HDL<sub>3</sub> lipoproteins, which have already been utilized as competitor in other studies (Baranova et al., 2005), including those using purified brush-border membrane vesicles of enterocytes (Schulthess et al., 2000). As shown in **Figure 7A**, the PPM-induced ERK1/2 phosphorylation was impaired in the presence of HDL<sub>3</sub> at the apical pole of Caco-2/TC7 cells. The apical addition of HDL<sub>3</sub> in the absence of PPM had no effect on ERK1/2 phosphorylation. As previously observed, PPM induced a rapid delocalization of the apical pool of apoB towards the intracellular compartments (**Figure 7B**), a process impaired in the concomitant presence of HDL<sub>3</sub>. The addition of HDL<sub>3</sub> alone, in the absence of PPM, had no effect on the localization of apoB as compared to control cells.

## DISCUSSION

SR-BI/CLA-1 was extensively studied for its involvement in cholesterol transport (Van Eck et al., 2005), a role that remains controversial in intestine (Bietrix et al., 2006; Hui and Howles, 2005; Labonte et al., 2007; Levy et al., 2007). It was previously considered that SR-BI/CLA-1 was responsible for the absorption of micellar cholesterol from intestinal lumen (Rhainds and Brissette, 2004). However, the lack of intestinal cholesterol absorption deficiency observed in SR-BI/CLA-1 knock-out mice (Mardones et al., 2001), associated with the discovery of NPC1L1 as the major intestinal transporter of cholesterol (Altmann et al., 2004), suggested that SR-BI/CLA-1 could have another role in enterocytes. Results obtained from our previous studies had led us to hypothesize a sensing of dietary lipids under their physiological form of postprandial micelles (PPM) in enterocytes (Carriere et al., 2005; Chateau et al., 2005; Morel et al., 2004). In the present study we show that such a sensing process exists and involves the scavenger receptor class B type 1. Indeed, contrary to inter-prandial lipid micelles (IPM), devoid of TG hydrolysis products, PPM induced specific cell signaling events, namely a rapid activation of ERK and p38MAPK, which correlates with the amount of supplied PPM, along with a delocalization of apoB, the structural protein necessary for the assembly of TRL, from the apical domain towards intracellular compartments. These effects, observed within 20min after PPM supply, were impaired by competition experiments using a strong SR-BI/CLA-1 ligand or through invalidation of SR-BI/CLA-1 by lentiviral shRNA. Altogether, these results reveal a role for SR-BI/CLA-1 in the sensing of postprandial alimentary lipids-containing micelles by enterocytes.

It was recently reported, in vascular endothelial cells, that SR-BI acts as cholesterol sensor at the plasma membrane. In these cells, HDL binding to SR-BI led to the sequential activation of Src tyrosine kinase, PI3 kinase, Akt and MAP kinases that provoked the stimulation of eNOS enzymatic activity (Assanasen et al., 2005; Mineo and Shaul, 2003). Similarly, the same sequential activation of these kinases, triggered by SR-BI, was implicated in the HDL-induced Rac GTPase activation and in the resulting alterations in the actin cytoskeleton promoting endothelial cell migration (Seetharam et al., 2006). In our study, while competing with PPM for SR-BI-mediated effects, HDL<sub>3</sub> alone did not induce ERK phosphorylation in Caco-2/TC7 enterocytes. As HDL<sub>3</sub> are physiologically absent from the intestinal lumen, it may be suggested that the signaling pathways triggered by SR-BI/CLA-1 depend on its physiological ligands and on a cell-specific machinery. Moreover, SR-BI/CLA-1-mediated sensing of PPM at the apical membrane of enterocytes appears independent of cholesterol since the signaling events were not provoked by IPM, which contain the same amount of cholesterol as PPM.

We observed that PPM provokes the clusterization of SR-BI/CLA-1 in peculiar domains of the apical brush-border membrane. Such clusters have been associated with the function of SR-BI/CLA-1 upon ligand interaction in other cell models (Peng et al., 2004). This observation, associated to the PPM-dependent movements of SR-BI/CLA-1 from non-raft towards raft microdomains, which contain various signaling molecules, including MAP kinases (Pike, 2003), suggest that PPM induce the establishment of a signaling platform in the brush border membrane of enterocytes characterized by the recruitment of SR-BI/CLA-1 and the activation of MAPK, which lead to the delocalization of the apical pool of apoB. A link between apoB secretion and MAP kinase activation has been recently observed *in vivo*. In fructose-fed hamster, an animal model of insulin resistance displaying an overproduction of hepatic VLDL and intestinal apoB-containing lipoproteins, Federico et al. (Federico et al., 2006) showed an increase in basal levels of phosphorylated ERK1/2 in enterocytes and a decrease of intestinal apoB48 synthesis and secretion after an inhibition of ERK pathway *in vivo*. The same group has recently shown that the TNF- $\alpha$ -dependent overproduction of intestinal apoB-containing lipoproteins was mediated by p38MAPK pathway in enterocytes of hamster (Qin et al., 2007). The mechanism through which PPM sensing by SR-BI/CLA-1 leads to apoB delocalization and MAP kinase activation may also implicate SR-BI/CLA-1 partners through protein-protein interactions. The C-terminal cytoplasmic domain of SR-BI/CLA-1 contains a PDZ-interacting domain. PDZK1 has been shown involved in the hepatic maintenance of SR-BI/CLA-1 expression (Yesilaltay et al., 2006) and its invalidation in mouse models resulted

in a decrease of SR-BI expression in liver and in intestine (Kocher et al., 2003). PDZK1 could thus mediate signaling events triggered by SR-BI/CLA-1.

Our results show that SR-BI/CLA-1 is involved in the early step of PPM sensing at the apical membrane of enterocytes. One could suggest its implication in further intracellular events leading to TRL secretion in postprandial periods. Indeed, Hansen et al. (Hansen et al., 2003) showed that, three hours after incubation of pig intestinal explants with a lipid mixture containing corn oil, cholesterol, bile and pancreatin, SR-BI/CLA-1 was endocytosed from the brush border membrane of enterocytes and accumulated in newly formed cytosolic lipid droplets but not in secreted lipoproteins. During the postprandial period, newly synthesized TG accumulate within the phospholipid bilayer of the ER membrane (Murphy and Vance, 1999). The resulting droplet will then bud either towards the ER lumen to form TRL, or towards the cytosol for a transient storage in lipid droplets. These lipid droplets are dynamic cytoplasmic organelles. It has been observed, in human enterocytes *in vivo* (Robertson et al., 2003) and in Caco-2/TC7 cells (Chateau et al., 2005), that TG previously accumulated into cytosolic lipid droplets were mobilized and re-directed towards ER lumen to be secreted as TRL during the postprandial period.

In conclusion, our results provide evidence for a sensing of alimentary lipids-containing micelles by enterocytes. This process involves the participation of SR-BI/CLA-1, which thus appears as a new early target for the control of the intestinal transfer of dietary lipids.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Chemicals and antibodies

Unless indicated, all chemicals were purchased from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). The antibodies used were: mouse polyclonal anti-Cla-1 (SR-BI/CLA-1) (BD Transduction Laboratories), rabbit polyclonal anti-P-ERK (Thr202/Tyr204, Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-P-P38 MAPK (Thr180/Tyr182, Cell Signaling), mouse monoclonal anti-E-cadh (clone 36, BD transduction laboratories), goat polyclonal anti-EEA1 (N-19, Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-flotillin-1 (clone 18, BD transduction laboratories), mouse monoclonal anti-sucrase-isomaltase (provided by Dr. D. Swallow, University College London) and goat polyclonal anti-apoB (Immuno France, Illkirch, France). Secondary CY2-, CY3-, and CY5-labeled antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (WestGrove, CA). Peroxidase-conjugated immunoglobulins were from Biosys (Compiègne, France).

### Cell culture and stable invalidation of SR-BI/CLA-1 expression by shRNA

Caco-2/TC7 cells (Chantret et al., 1994) were seeded at  $6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> on six-well semi-permeable filters (3 $\mu$ m pore size; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium/Glutamax-1 (DMEM 25mM glucose) supplemented with 1% non-essential amino acids (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and 20% heat-inactivated (30min, 56°C) fetal bovine serum (Abcys, France) (DMEM-FBS). The medium was changed 48h after seeding and daily thereafter. All experiments were performed after 21 days of culture.

For stable SR-BI/CLA-1 invalidation experiments, lentiviral particles containing short hairpin RNA (shRNA) sequences targeted to human SR-BI/CLA-1 (GenBank accession number NM\_005505) were purchased from Sigma MISSION™ Lentiviral Transduction Particles. Two lentiviral vectors containing shRNA sequences identified in The RNAi Consortium shRNA library as TRCN0000056963 (shRNA 63) and TRCN0000056964 (shRNA 64) were used and their transfection in Caco-2/TC7 gave the cell populations 63 and 64, respectively. Caco-2/TC7 cells were seeded at  $3.75 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> on 24-well culture plates (Corning, Avon, France). One day after seeding, cells were incubated overnight with 8 $\mu$ g/ml hexadimethrine bromide and 200 $\mu$ l of shRNA lentiviral particles containing  $10^6$  lentiviral transducing particles/ml in DMEM-FBS. The medium was then changed daily. Stable-transfected cells were selected with 10 $\mu$ g/ml puromycin. Total puromycin-resistant cell populations were analyzed. A 6-day passage frequency was used. All experiments were performed in six-well semi-permeable filters, after 21 days of culture and under normal culture condition without puromycin.

### **Preparation of lipid micelles-containing media**

The preparation of lipid micelles was performed as previously described (Carriere et al., 2005; Chateau et al., 2005; Morel et al., 2004). The composition of postprandial lipid micelles (PPM) was similar to that resulting from lipid digestion in the human duodenum lumen (Hernell et al., 1990) after a lipid-rich meal, i.e. 0.6 mM oleic acid, 0.2 mM L- $\alpha$ -lysophosphatidylcholine, 0.05 mM cholesterol, 0.2 mM 2-monooleoylglycerol and 2 mM taurocholic acid. Inter-prandial lipid micelles were prepared as PPM but, according to the physiological conditions, they contained biliary salts and lipids but were devoid of oleic acid and 2-monooleoylglycerol. PPM or IPM were added to the medium of the upper compartment for the last day of culture for the indicated times. In some experiments, PPM were diluted in DMEM medium before use.

### **HDL<sub>3</sub> isolation**

EDTA-plasma obtained from human volunteers was supplemented with 0.005% gentamycin, 0.04% sodium azide and protease inhibitors, adjusted with solid potassium bromide (KBr) to density 1.125 g/ml and ultracentrifuged (40h, 100,000 x g, 10°C) to eliminate VLDL, LDL and HDL<sub>2</sub>. The density of the infranatant was raised to 1.21 g/ml with KBr and HDL<sub>3</sub> were then obtained after ultracentrifugation (40h, 100,000 x g, 10°C). HDL<sub>3</sub> were extensively dialyzed against phosphate-buffered saline and their protein content was measured (Lowry et al., 1951). In cell culture experiments, HDL<sub>3</sub> (100 $\mu$ g/ml) were added in the apical medium at the same time as postprandial lipid micelles.

### **Confocal Fluorescence Microscopy**

Immunofluorescence and confocal analyses were performed as previously described (Morel et al., 2004). Briefly, cells were fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde (wt/vol) at 4°C, extensively washed in 150 mM glycine in phosphate-buffered saline (PBS) (2.7 mM KCl, 137 mM NaCl in 10 mM phosphate buffer, pH 7.5), (PBS-glycine). They are then permeabilized by incubation for 30 min with 0.2% Triton X-100 for apoB or 0.01% saponin for SR-BI (then maintained at 0.005% in all the following steps) in PBS and washed in PBS-glycine followed by PBS plus 1% BSA (PBS-BSA). Cells were incubated for 60 min with primary antibodies in PBS-BSA at room temperature and then washed with PBS (4 x 10 min) and stained with secondary antibodies in PBS-BSA for 60 min at room temperature in the dark. After extensive washing in PBS, cells were fixed again in 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min, washed twice in PBS, mounted in Fluoprep (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), and examined by confocal fluorescence microscopy (LSM 510 microscope; Carl Zeiss, Jena, Germany).

### **Cell surface biotinylation assay**

Apical membrane expression of SR-BI/CLA-1 was analyzed by biotin labeling of surface proteins with EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin followed by immunoprecipitation with immobilized streptavidin using the Cell Surface Protein Biotinylation and Purification Kit (Pierce). Caco-2/TC7 cells cultured on filters were incubated without or with PPM for 15 or 30 min and then washed twice with ice-cold PBS containing 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>. The cells were then incubated twice (30 min, 4°C) with 0.9 mg/ml sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce), added only to the apical compartment of the filter. The reaction was quenched by the addition of 500 $\mu$ l of quenching solution (Pierce) to the apical compartment. Cells were washed three times with ice-cold Tris-buffered saline (TBS: 0.025 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.2) and scrapped with 500  $\mu$ l of ice-cold TBS containing 2% protease inhibitor cocktail. After centrifugation (3 min, 500 x g), the pellets containing intact cells were resuspended with 500 $\mu$ l lysis buffer (Pierce) containing 2% protease inhibitor cocktail, subjected to a short sonication and incubated for 30 min at 4°C to ensure a complete lysis. Cell lysates were centrifuged (2 min, 10,000 x g, 4°C). An aliquot of the supernatant, corresponding to the "total fraction", was stored at -20°C until use. Supernatants were incubated with 500 $\mu$ l Immobilized NeutrAvidin™ Gel (Pierce) at room temperature for 60 min with continuous mixing and then centrifuged (1,000 x g, 1 min). Supernatants corresponding to the "unbiotinylated-proteins fraction" were stored at -20°C

until use. Pellets were washed three times with 1 ml wash buffer (Pierce) containing 2% protease inhibitor cocktail, and then biotinylated proteins were eluted by incubating the Immobilized NeutrAvidin™ Gel in 400 µl SDS-PAGE sample buffer containing 50 mM DTT (Pierce), for 60 min at room temperature with continuous mixing. Final "biotinylated-proteins fraction" was spun down to be extracted from the gel. All recovered fractions were analyzed by western blotting.

### **Sucrose gradient**

For sucrose density gradients, 10<sup>8</sup> Caco-2/TC7 cells were homogenized on ice in 2 ml of a 10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl buffer (TBS) containing 1% Triton X-100, 2% protease inhibitor cocktail and 2 mM orthovanadate and 40mM β-glycerophosphate. The homogenate was adjusted to 40% sucrose by the addition of 2 ml of 80% sucrose in TBS. The resulting 4 ml were covered with 4 ml of 30% sucrose and 4 ml of 5% sucrose and centrifuged (18 h, 39,000 rpm, 4 °C) in a SW-41 rotor (Beckman Instruments, Gagny, France). Sequential 1-ml fractions were then collected from the top of the tube. Eleven fractions were obtained, to which was added Nonidet P-40 to a final concentration of 1% and 160 µl were used for western blot analysis.

### **Ligand blotting assay using lipid micelles**

Cell homogenates were prepared from differentiated Caco-2/TC7 cells in Tris/mannitol buffer (2 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM mannitol plus 2% of a protease inhibitor cocktail) and centrifuged for 15 min (5,000 rpm, 4°C) to eliminate nucleus and mitochondria. Supernatant were then subjected to SDS-PAGE. Proteins were transferred onto Bio-Rad nitrocellulose membranes, which were then saturated 30 min with 6% defatted milk in PBS containing 0.25 M NaCl (PBS/NaCl). For lipid blotting, 0.05 mM biotinylated phosphatidylethanolamine was incorporated to the preparation of PPM or IPM with a 1/200 molar ratio toward L-α-lysophosphatidylcholine. Lipid micelles (1ml in PBS/NaCl) were then mixed with coupled horseradish-streptavidin peroxidase (1 µg/ml, Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, England) and incubated 10 min at room temperature with gentle stirring. This solution was diluted (ten fold) in PBS/NaCl and incubated 2 hours at room temperature with membranes containing blotted proteins. Membranes were washed (4x) with PBS/NaCl and revealed using ECL system.

### **Western blot analysis**

Caco-2/TC7 cell lysates were obtained by scraping the cells into 0.5 ml lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.15M NaCl, 1% (vol/vol) Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate) containing 2% of a protease inhibitor cocktail, 2 mM orthovanadate and 40mM β-glycerophosphate and stored at -20°C until analysis. Protein concentrations were determined with the DC protein assay (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Aliquots of cell lysates (40-80 µg) were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions in a 7.5% polyacrylamide gel. Proteins were transferred onto Bio-Rad nitrocellulose membranes, which were probed with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins, developed using ECL Western blotting reagents according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences, Orsay, France) and quantified using Image J software.

### **Phosphoprotein screens**

Duplicate cell lysate protein samples (750 µg) from Caco-2/TC7 cells cultured on filter support before (control) and after 5, 10 and 15 min of PPM or IPM supply, were analyzed by Kinetworks™ KPSS-9.0 phosphorylation screens (Kinexus Bioinformatics Corp. Vancouver, British Columbia, Canada) as described by the manufacturer. Briefly, the kinetworks analysis, which was performed by kinexus, involved resolution of a single lysate sample by SDS-PAGE with 20-lane multi-immunoblotters and subsequent immunoblotting using specific antibodies against 37 phosphoproteins. Kinexus performed all the normalization and statistical analyses on the data.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Danièle Pastier for HDL<sub>3</sub> isolation. O.B. is recipient of a fellowship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and from Fondation pour la Recherche Médicale. C.C. is recipient of a fellowship from Le Conseil Régional d'Ile de France. This work was supported in part by a grant from Groupe Lipides Nutrition. Confocal microscopy analyses have benefit from facilities of the Cordeliers Research Centre. No conflicts of interest exist.

## REFERENCES

- Altmann, S.W., Davis, H.R., Jr., Zhu, L.J., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Iyer, S.P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N., and Graziano, M.P. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* (New York, N.Y. 303, 1201-1204.
- Assanasen, C., Mineo, C., Seetharam, D., Yuhanna, I.S., Marcel, Y.L., Connelly, M.A., Williams, D.L., de la Llera-Moya, M., Shaul, P.W., and Silver, D.L. (2005). Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling. *The Journal of clinical investigation* 115, 969-977.
- Babitt, J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E.J., Anderson, R.G., Xu, S., and Krieger, M. (1997). Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *The Journal of biological chemistry* 272, 13242-13249.
- Baranova, I.N., Vishnyakova, T.G., Bocharov, A.V., Kurlander, R., Chen, Z., Kimelman, M.L., Remaley, A.T., Csako, G., Thomas, F., Eggerman, T.L., and Patterson, A.P. (2005). Serum amyloid A binding to CLA-1 (CD36 and LIMPII analogous-1) mediates serum amyloid A protein-induced activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 280, 8031-8040.
- Bickel, P.E., Scherer, P.E., Schnitzer, J.E., Oh, P., Lisanti, M.P., and Lodish, H.F. (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *The Journal of biological chemistry* 272, 13793-13802.
- Bietrix, F., Yan, D., Nauze, M., Rolland, C., Bertrand-Michel, J., Comera, C., Schaak, S., Barbaras, R., Groen, A.K., Perret, B., Terce, F., and Collet, X. (2006). Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *The Journal of biological chemistry* 281, 7214-7219.
- Cai, S.F., Kirby, R.J., Howles, P.N., and Hui, D.Y. (2001). Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine. *Journal of lipid research* 42, 902-909.
- Carriere, V., Vidal, R., Lazou, K., Lacasa, M., Delers, F., Ribeiro, A., Rousset, M., Chambaz, J., and Lacorte, J.M. (2005). HNF-4-dependent induction of apolipoprotein A-IV gene transcription by an apical supply of lipid micelles in intestinal cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 5406-5413.
- Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A., and Rousset, M. (1994). Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *Journal of cell science* 107 ( Pt 1), 213-225.

Chateau, D., Pauquai, T., Delers, F., Rousset, M., Chambaz, J., and Demignot, S. (2005). Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells. *Journal of cellular physiology* 202, 767-776.

Cummings, D.E., and Overduin, J. (2007). Gastrointestinal regulation of food intake. *The Journal of clinical investigation* 117, 13-23.

Davidson, N.O., and Shelness, G.S. (2000). APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annual review of nutrition* 20, 169-193.

Drozdzowski, L., and Thomson, A.B. (2006). Intestinal mucosal adaptation. *World J Gastroenterol* 12, 4614-4627.

Federico, L.M., Naples, M., Taylor, D., and 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.

Grewal, T., de Diego, I., Kirchhoff, M.F., Tebar, F., Heeren, J., Rinninger, F., and Enrich, C. (2003). High density lipoprotein-induced signaling of the MAPK pathway involves scavenger receptor type BI-mediated activation of Ras. *The Journal of biological chemistry* 278, 16478-16481.

Hakomori, S., and Igarashi, Y. (1995). Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. *Journal of biochemistry* 118, 1091-1103.

Hansen, G.H., Niels-Christiansen, L.L., Immerdal, L., and Danielsen, E.M. (2003). Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in pig enterocytes: trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption. *Gut* 52, 1424-1431.

Hernell, O., Staggars, J.E., and Carey, M.C. (1990). Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 2. Phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat digestion in healthy adult human beings. *Biochemistry* 29, 2041-2056.

Hui, D.Y., and Howles, P.N. (2005). Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Seminars in cell & developmental biology* 16, 183-192.

Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J., and Sandhoff, K. (2000). Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochimica et biophysica acta* 1485, 63-99.

Kocher, O., Yesilaltay, A., Cirovic, C., Pal, R., Rigotti, A., and Krieger, M. (2003). Targeted disruption of the PDZK1 gene in mice causes tissue-specific depletion of the high density lipoprotein receptor scavenger receptor class B type I and altered lipoprotein metabolism. *The Journal of biological chemistry* 278, 52820-52825.

Labonte, E.D., Howles, P.N., Granholm, N.A., Rojas, J.C., Davies, J.P., Ioannou, Y.A., and Hui, D.Y. (2007). Class B type I scavenger receptor is responsible for the high affinity cholesterol binding activity of intestinal brush border membrane vesicles. *Biochimica et biophysica acta* 1771, 1132-1139.

Lambert, D., O'Neill, C.A., and Padfield, P.J. (2005). Depletion of Caco-2 cell cholesterol disrupts barrier function by altering the detergent solubility and distribution of specific tight-junction proteins. *The Biochemical journal* 387, 553-560.

- Lang, R., Hammer, M., and Mages, J. (2006). DUSP meet immunology: dual specificity MAPK phosphatases in control of the inflammatory response. *J Immunol* 177, 7497-7504.
- Leng, S., Lu, S., Yao, Y., Kan, Z., Morris, G.S., Stair, B.R., Cherny, M.A., and Black, D.D. (2007). Hepatocyte nuclear factor-4 mediates apolipoprotein A-IV transcriptional regulation by fatty acid in newborn swine enterocytes. *American journal of physiology* 293, G475-483.
- Levy, E., Menard, D., Suc, I., Delvin, E., Marcil, V., Brissette, L., Thibault, L., and Bendayan, M. (2004). Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. *Journal of cell science* 117, 327-337.
- Levy, E., Spahis, S., Sinnott, D., Peretti, N., Maupas-Schwalm, F., Delvin, E., Lambert, M., and Lavoie, M.A. (2007). Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Current opinion in lipidology* 18, 310-318.
- Lobo, M.V., Huerta, L., Ruiz-Velasco, N., Teixeira, E., de la Cueva, P., Celdran, A., Martin-Hidalgo, A., Vega, M.A., and 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.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193, 265-275.
- Mardones, P., Quinones, V., Amigo, L., Moreno, M., Miquel, J.F., Schwarz, M., Miettinen, H.E., Trigatti, B., Krieger, M., VanPatten, S., Cohen, D.E., and 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.
- Mineo, C., and Shaul, P.W. (2003). HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase: a novel mechanism of HDL action. *Trends in cardiovascular medicine* 13, 226-231.
- Morel, E., Demignot, S., Chateau, D., Chambaz, J., Rousset, M., and Delers, F. (2004). Lipid-dependent bidirectional traffic of apolipoprotein B in polarized enterocytes. *Molecular biology of the cell* 15, 132-141.
- Mu, H., and Hoy, C.-E. (2004). The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research* 43, 105-133.
- Murphy, D.J., and Vance, J. (1999). Mechanisms of lipid-body formation. *Trends in biochemical sciences* 24, 109-115.
- Orlowski, S., Comera, C., Terce, F., and Collet, X. (2007). Lipid rafts: dream or reality for cholesterol transporters? *Eur Biophys J* 36, 869-885.
- Peng, Y., Akmentin, W., Connelly, M.A., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., and Williams, D.L. (2004). Scavenger receptor BI (SR-BI) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domain is a way station for cholesterol trafficking between cells and high-density lipoprotein. *Molecular biology of the cell* 15, 384-396.
- Pike, L.J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of lipid research* 44, 655-667.
- Qin, B., Qiu, W., Avramoglu, R.K., and Adeli, K. (2007). Tumor necrosis factor-alpha induces intestinal insulin resistance and stimulates the overproduction of intestinal apolipoprotein B48-containing lipoproteins. *Diabetes* 56, 450-461.

- Raybould, H.E. (1999). Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. I. Sensing of lipid by the intestinal mucosa. *The American journal of physiology* 277, G751-755.
- Rhainds, D., and Brissette, L. (2004). The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36, 39-77.
- Robertson, M.D., Parkes, M., Warren, B.F., Ferguson, D.J., Jackson, K.G., Jewell, D.P., and Frayn, K.N. (2003). Mobilisation of enterocyte fat stores by oral glucose in humans. *Gut* 52, 834-839.
- Sanderson, I.R., and Naik, S. (2000). Dietary regulation of intestinal gene expression. *Annual review of nutrition* 20, 311-338.
- Schulthess, G., Compassi, S., Werder, M., Han, C.H., Phillips, M.C., and Hauser, H. (2000). Intestinal sterol absorption mediated by scavenger receptors is competitively inhibited by amphipathic peptides and proteins. *Biochemistry* 39, 12623-12631.
- Seetharam, D., Mineo, C., Gormley, A.K., Gibson, L.L., Vongpatanasin, W., Chambliss, K.L., Hahner, L.D., Cummings, M.L., Kitchens, R.L., Marcel, Y.L., Rader, D.J., and Shaul, P.W. (2006). High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circulation research* 98, 63-72.
- Tani, M., Ito, M., and Igarashi, Y. (2007). Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. *Cellular signalling* 19, 229-237.
- Van Eck, M., Pennings, M., Hoekstra, M., Out, R., and Van Berkel, T.J. (2005). Scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter A1 in reverse cholesterol transport and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* 16, 307-315.
- Voshol, P.J., Schwarz, M., Rigotti, A., Krieger, M., Groen, A.K., and Kuipers, F. (2001). Down-regulation of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) expression in rodents under conditions of deficient bile delivery to the intestine. *The Biochemical journal* 356, 317-325.
- Yesilaltay, A., Kocher, O., Pal, R., Leiva, A., Quinones, V., Rigotti, A., and Krieger, M. (2006). PDZK1 is required for maintaining hepatic scavenger receptor, class B, type I (SR-BI) steady state levels but not its surface localization or function. *The Journal of biological chemistry* 281, 28975-28980.
- Zucco, F., Batto, A.F., Bises, G., Chambaz, J., Chiusolo, A., Consalvo, R., Cross, H., Dal Negro, G., de Angelis, I., Fabre, G., Guillou, F., Hoffman, S., Laplanche, L., Morel, E., Pincon-Raymond, M., Prieto, P., Turco, L., Ranaldi, G., Rousset, M., Sambuy, Y., Scarino, M.L., Torreilles, F., and Stamatii, A. (2005). An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of Caco-2 cell lines. *Altern Lab Anim* 33, 603-618.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Traffic of apoB is specifically induced by alimentary lipids-containing micelles.** Confocal analysis of apolipoprotein B (apoB) and of sucrase-isomaltase (SI) (used as a brush-border marker) localizations, in differentiated Caco-2/TC7 cells cultured in the absence (control) or presence of postprandial (PPM) or inter-prandial micelles (IPM) added at the apical pole of the cells for 20 min. Top panels represent XY acquisitions at the apical level. Bottom panels represent XY acquisitions 5µm below the apical level. (bar, 20 µm).

**Figure 2: Signaling pathways specifically induced by postprandial micelles.**

(A) Kinetworks<sup>TM</sup> phosphoprotein immunoblots of lysates of Caco-2/TC7 cells cultured on filters in the absence (control) or presence of PPM or IPM for 5 min. Western blot experiments using specific antibodies directed against phosphoproteins and KPSS-9.0 phosphorylation screens were performed and analyzed by Kinexus. Bands corresponding to phosphoproteins specifically up-regulated by PPM were indicated by arrows for comparison. The antibodies directed against the phosphorylated proteins recognized the phosphosites: (S144/S141/S154) for PAK12/3, (T180/Y182) for p38 $\alpha$ MAPK, (S129/S133) for CREB1, (T202/Y204) for ERK1, (T185/Y187) for ERK2 and (S338) for PKA C $\beta$ . The phosphosites analyzed for MEK1 were indicated in the figure. (B) Caco-2/TC7 cells were cultured on semi-permeable filters and incubated in the absence or presence of postprandial (PPM) or inter-prandial micelles (IPM) in the apical compartment for the indicated times. Cell lysates were subjected to immunoblot analyses with specific antibodies against phospho-ERK1/2 (P-ERK), and phospho-p38MAPK (P-p38 MAPK). Anti-ERK and anti-E-cadherin (E-cadh) antibodies were used for loading controls. (C) Caco-2/TC7 cells were cultured in the presence of various amount of PPM that were supplied in the apical compartment for 10 min. Cell lysates were subjected to immunoblot analyses with the same antibodies as in (B).

**Figure 3: Specific interaction of PPM with Caco-2/TC7 homogenates analyzed by ligand blotting assay.**

Caco-2/TC7 cell homogenates (150µg) were subjected to SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated with PPM or IPM containing biotinylated-phospholipids coupled with horseradish-streptavidin peroxydase and revealed using ECL system. Lower panel represents results from a longer exposure.

**Figure 4: Subcellular localisation of SR-BI/CLA-1 after the supply of postprandial lipid micelles.**

(A) Immunolocalization of the scavenger receptor class B type I (SR-BI/CLA-1, green channel) and sucrase isomaltase (SI, red channel) in differentiated Caco-2/TC7 cells cultured on filters, before (T0) and after 5, 10 and 15 min of apical PPM supply. Panels represent XY acquisitions at the apical level (bar, 10µm). Arrows show clusters of SR-BI/CLA-1. (B) Analysis of the apical amount of SR-BI/CLA-1 by cell surface biotinylation assay. Caco-2/TC7 cells were cultured on semi-permeable filters in the absence (0) or presence of postprandial lipid micelles (PPM) for the indicated times. Cells were then selectively labeled with biotin on the apical surface and harvested. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation by streptavidin-sepharose allowing the selective extraction of biotinylated-proteins of the apical membrane. Total cell lysates obtained before immunoprecipitation (total), immunoprecipitated fractions containing apical biotinylated proteins (biotin) and non-immunoprecipitated fractions containing unlabeled proteins (no biotin), were subjected to immunoblot analyses with anti-SR-BI/CLA-1 and anti-E-cadherin (E-cadh, used as a basolateral membrane marker) antibodies.

**Figure 5: PPM supply induces movements of SR-BI/CLA-1 towards raft domains.**

(A) Caco-2/TC7 cells cultured on filters under control culture condition were harvested in the presence of triton and submitted to a 5-40% sucrose gradient. Eleven fractions were collected for immunoblot analyses with anti-SR-BI/CLA-1, anti-EEA1 (early endosome

antigen 1) and anti-flottilin-1 (raft marker) antibodies. (B) Caco-2/TC7 cells were cultured on filters in the absence (control) or presence of PPM or IPM for 10 min and then harvested in the presence of triton. Cell lysates were submitted to a 5-40% sucrose gradient, and among the eleven fractions collected, the fractions 3 to 8 were subjected to immunoblot analyses with anti-SR-BI/CLA-1 (left panel) and anti-flottilin-1 (right panel) antibodies.

**Figure 6: Invalidation of SR-BI/CLA-1 in Caco-2/TC7 cells impairs the PPM-induced ERK1/2 phosphorylation.** (A) Caco-2/TC7 cells and the Caco-2/TC7 cell populations 63 and 64, expressing lentiviral shRNA 63 and 64 respectively, were cultured on filters under normal culture condition. The cell populations 63 and 64 were analyzed, at passage 4 after transfection, in the absence of PPM or after PPM supply for 10 min. Cell lysates were subjected to immunoblot analyses with antibodies against SR-BI/CLA-1 and E-cadherin (E-cadh, used as loading control). The lower panel represents the quantification of SR-BI/CLA-1 expression normalized to E-cadherin expression and set at 100% for control Caco-2/TC7 cells. Results are from two independent sets of experiments. (B) Cell populations 63 and 64 were cultured on semi-permeable filters and incubated in the absence or presence of postprandial (PPM) or inter-prandial micelles (IPM) in the apical compartment for the indicated times. The cell population 63 was analyzed at two different passages, namely an early passage (63E) and a late passage (63L) corresponding respectively to passages 6 and 28 after transfection. These early and late passages from cell population 63 were compared to the cell population 64 analyzed at passage 28. Cell lysates were subjected to immunoblot analyses with specific antibodies against SR-BI/CLA-1, phospho-ERK1/2 (P-ERK) and E-cadherin (E-cadh, used as loading control). The lower panel represents the ratio of the quantification of P-ERK expression normalized to E-cadherin expression obtained in PPM condition versus IPM condition. Results are from two independent sets of experiments.

**Figure 7: The specific PPM-induced effects are impaired in the presence of HDL<sub>3</sub>, a strong SR-BI/CLA-1 ligand.** (A) Caco-2/TC7 cells were cultured on filters and analyzed before or after 10 min incubation with PPM, in the presence or not of apical HDL<sub>3</sub> (100µg/ml) added at the same time as PPM. Cell lysates were subjected to immunoblot analyses with specific antibodies against phospho-ERK1/2 (P-ERK). Anti-E-cadherin antibody (E-cadh) was used as loading control. The lower panel represents the quantification of P-ERK expression from immunoblots. (B) Caco-2/TC7 cells were cultured on filters and analyzed before (control) or after 10 min incubation with PPM, in the absence or presence of apical HDL<sub>3</sub> (100µg/ml) added at the same time as PPM. ApoB distribution was analyzed by confocal microscopy. The two upper panels represent XY acquisitions at the apical brush-border (BB) level and 6µm below the apical plane. The bottom panels show the corresponding XZ projections. Dotted lines delimit the basal level of the cells (bar, 20 µm).

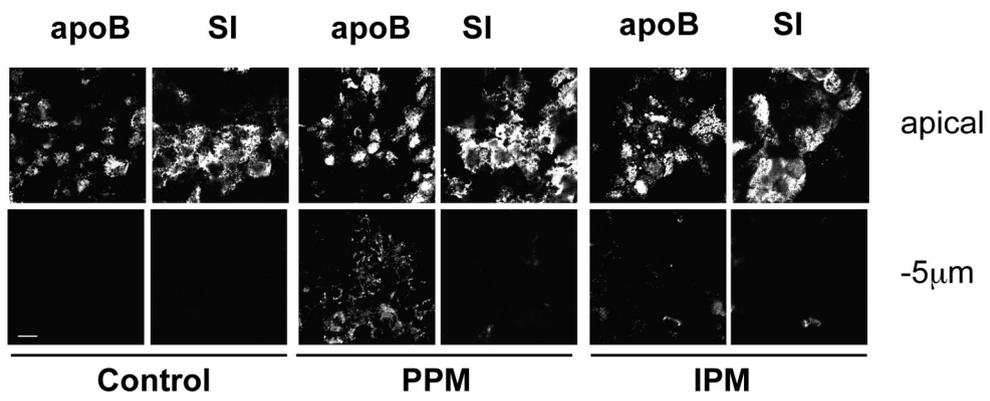


Figure 1

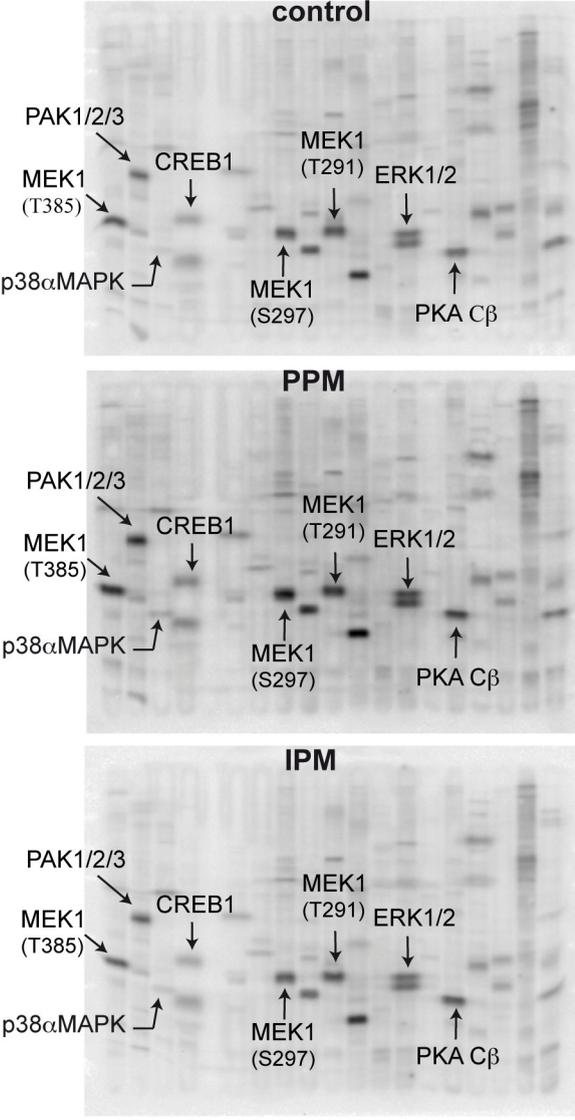
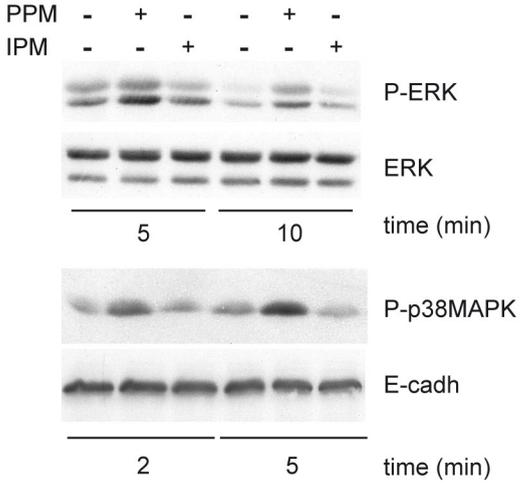
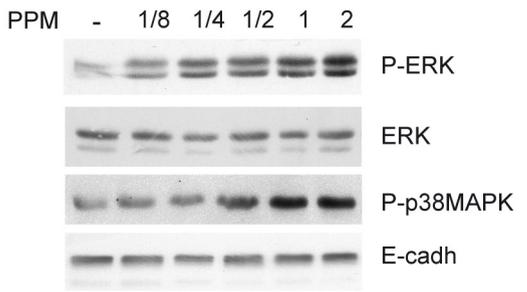
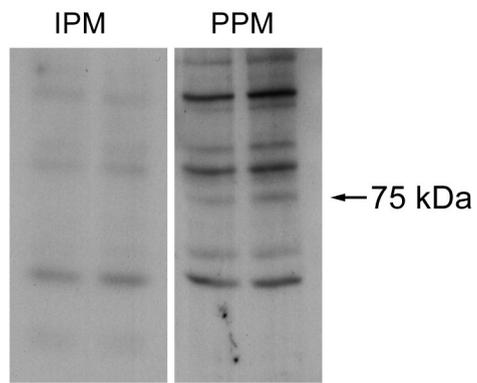
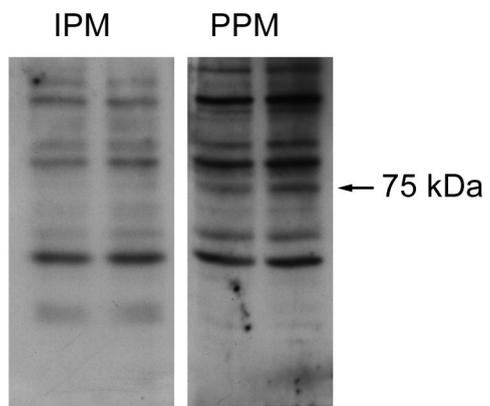
**A****B****C**

Figure 2



wb: biotinylated-micelles



wb: biotinylated-micelles  
(longer exposure)

Figure 3

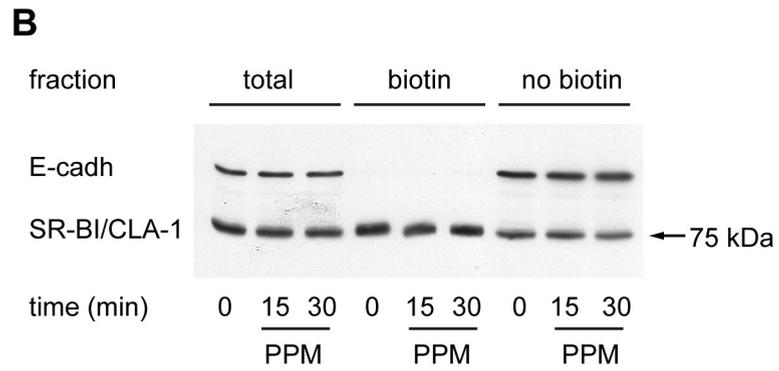
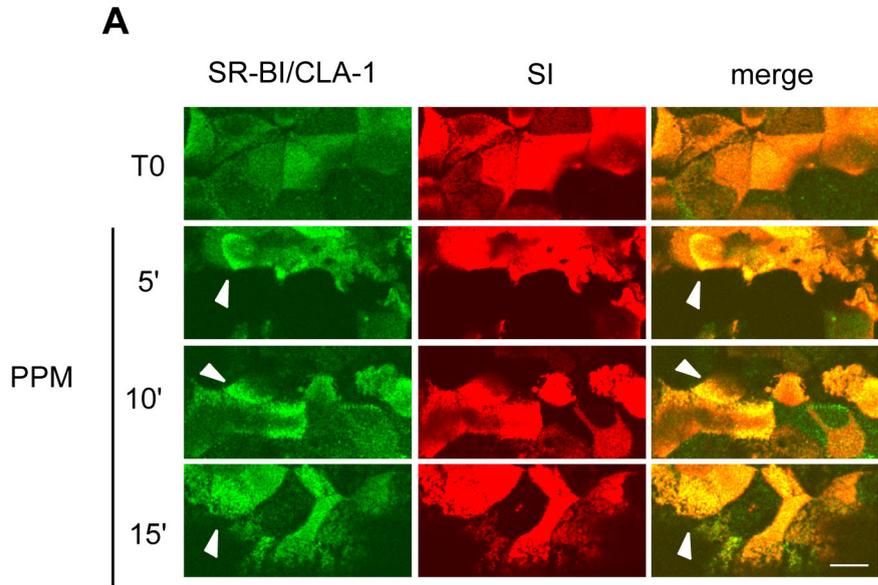


Figure 4

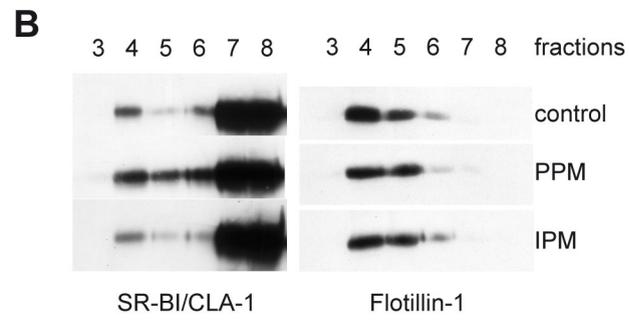
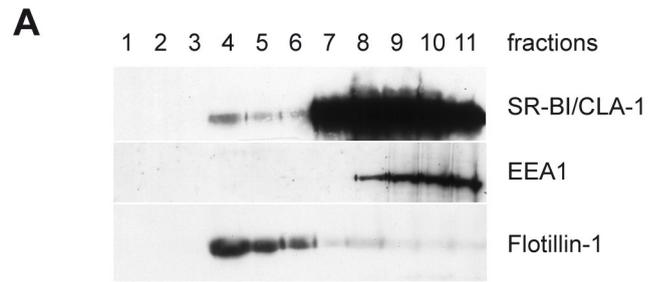


Figure 5

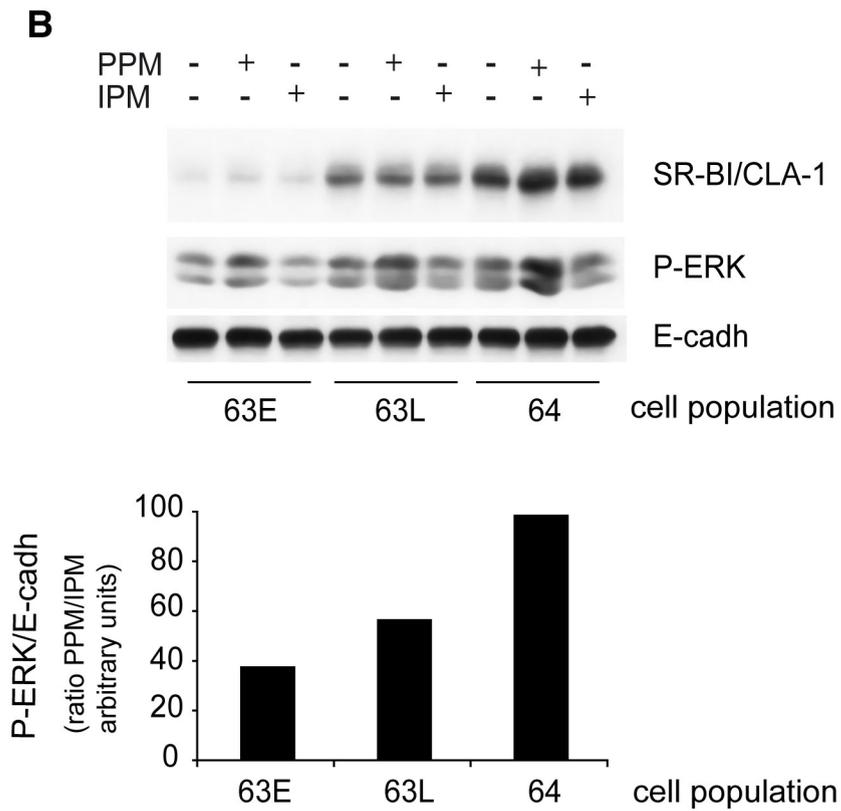
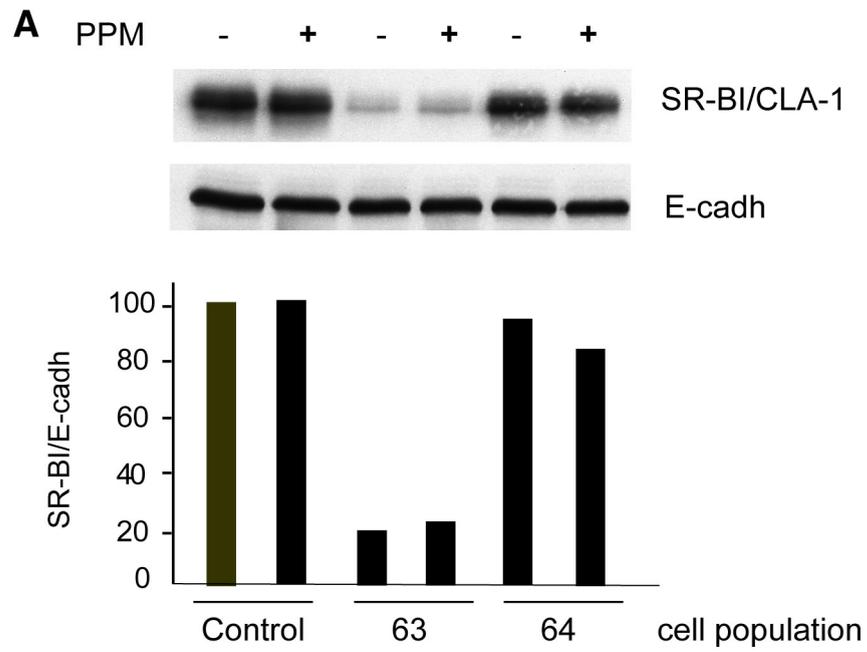


Figure 6

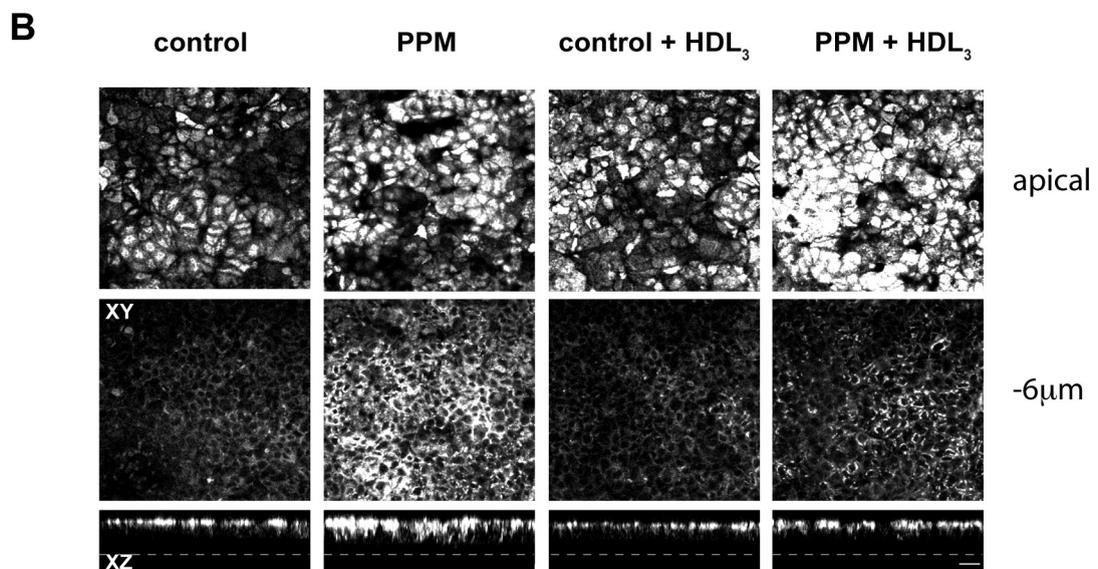
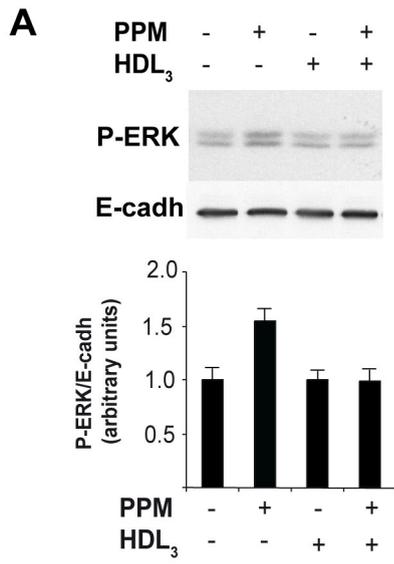


Figure 7

# **CONCLUSION GÉNÉRALE**

L'hypothèse de la détection des micelles post-prandiales par les cellules entérocytaires est née des résultats précédemment obtenus par le laboratoire lors d'études menées pour décrypter les mécanismes moléculaires contrôlant le transfert transépithélial des lipides par les entérocytes. Ces études, qu'il me semble important de rappeler, ont été réalisées grâce à l'établissement d'un modèle original d'apport de lipides aux cellules Caco-2/TC7 cultivées sur filtre, permettant de se rapprocher au mieux des apports asymétriques en lipides qui existent *in vivo*, selon qu'ils se situent au pôle apical ou au pôle basal des entérocytes. En effet, le pôle basolatéral se voit exposé de façon permanente aux lipides sériques qui sont présentés liés à l'albumine ou associés aux lipoprotéines, tandis que le pôle apical, qui fait face à la lumière intestinale, reçoit en alternance des micelles lipidiques constituées essentiellement des sécrétions biliaires en période inter-prandiale, auxquelles s'ajoutent les produits de digestion des triglycérides en période post-prandiale. L'originalité de ces conditions de culture repose également sur le fait que la plupart des études réalisées jusqu'alors sur le métabolisme lipidique intestinal portaient sur l'effet d'un seul lipide, le plus souvent un acide gras couplé à de l'albumine ou à un acide biliaire, ce qui est peu physiologique.

La culture sur filtre permet aux cellules Caco-2 d'augmenter l'expression de gènes spécifiquement exprimés par les entérocytes comme les gènes codants la forme intestinale de la FABP (Fatty acid-binding protein-I) et l'apolipoprotéine A-IV (Le Beyec et coll. 1997). Elle améliore également la polarisation fonctionnelle de ces cellules, illustrée par une sécrétion d'apoB au pôle basal. Dans l'équipe, l'apport apical de micelles lipidiques post-prandiales (MPP) proches de celles présentes dans la lumière intestinale après un repas (Hernell et coll. 1990), c'est à dire des micelles composées d'acides gras, de monoglycérides, de lysophospholipides, de cholestérol et d'acides biliaires, a permis de mettre en évidence des effets spécifiques des MPP, qui ne sont pas reproduits par l'apport de micelles incomplètes ou par l'apport d'acides gras couplés à l'albumine. Ainsi, l'équipe a montré que l'apport apical de MPP augmente la sécrétion de lipoprotéines riches en triglycérides (LRT; chylomicrons et VLDL) comportant l'apoB48, protéine de structure de ces LRT, tandis que les cellules sécrètent des lipoprotéines de densité plus élevée (HDL, LDL) lorsque des micelles dépourvues d'un ou plusieurs de ces constituants sont apportées aux cellules (Chateau et coll. 2005).

Pour pouvoir s'associer aux LRT et être sécrétée, l'apoB48 doit subir une étape stabilisatrice de lipidation. L'apoB a été trouvée dans l'appareil de Golgi dans des cellules intestinales absorptives humaines après un repas riche en graisses (Christensen et coll.

1983), mais la présence d'apoB dans ce même compartiment sécrétoire a aussi été montrée chez le rat à jeûn (Levy et coll. 2002). Notre équipe s'est donc interrogée sur la sensibilité de l'apoB48 aux fluctuations du contenu luminal en lipides. L'utilisation des cellules Caco-2 cultivées sur filtre a permis d'avoir une vision dynamique de l'effet des lipides sur le trafic de l'apoB dans les entérocytes (Morel et coll. 2004). Il a ainsi été montré que dans un milieu défini sans aucun apport de lipides, l'apoB est retenue dans le réticulum endoplasmique. L'apport de lipides sériques au pôle basal des cellules permet l'adressage de l'apoB vers la bordure en brosse apicale. Dans ces conditions, un apport apical de MPP déclenche alors une mobilisation de l'apoB apicale, qui est adressée vers les compartiments latéraux intracellulaires, représentant son engagement dans le système sécrétoire. Un apport apical d'acide oléique seul, couplé à l'albumine, n'induit pas ce trafic de l'apoB. D'autre part, en absence de lipides sériques, l'apport apical de MPP permet de reproduire, à lui seul, l'ensemble du trafic de l'apoB en déclenchant, dans un premier temps, l'adressage de l'apoB au domaine apical, puis sa délocalisation vers les domaines latéraux intracellulaires (Morel et coll. 2004).

Si les cellules sont capables de sécréter des LRT à apoB48, il avait été observé au laboratoire une accumulation de larges gouttelettes lipidiques cytosoliques après l'apport de lipides alimentaires (Chateau et coll. 2005), suggérant que l'adressage vers la lumière du RE des TG néosynthétisés au sein de la bicouche membranaire du RE est une étape clé de la sécrétion de LRT. Des données *in vivo* font état d'une accumulation transitoire de gouttelettes lipidiques cytosoliques dans les entérocytes en période post-prandiale (Hamilton et coll. 1998; Cartwright et coll. 2000), qui pourrait résulter d'un dépassement de la capacité du RE à relarguer des gouttelettes lipidiques dans sa lumière. Les mécanismes moléculaires gouvernant la répartition des TG entre la voie de sécrétion et le stockage sont peu connus et les travaux du laboratoire ont permis de montrer que cette répartition est sensible à l'environnement, et notamment aux concentrations de glucose extracellulaire (Pauquai et coll. 2006). Les cellules Caco-2 adaptées à de faibles concentrations de glucose sécrètent plus de LRT que les cellules cultivées en présence de fortes concentrations en glucose, car une plus forte proportion de TG est disponible pour l'assemblage des lipoprotéines dans la lumière du RE (Pauquai et coll. 2006). Les cellules adaptent donc leur sécrétion de LRT aux conditions d'apport en sucres et en lipides, illustrant une fois encore le dialogue permanent entre métabolisme glucidique et métabolisme lipidique. Les cellules sont aussi capables de moduler l'expression de leurs gènes en réponse à l'apport de MPP. D'autres apolipoprotéines que l'apoB, en l'occurrence l'apoA-IV, jouent aussi un rôle dans le contrôle de l'homéostasie lipidique (Tso and Liu

2004). De nombreuses études avaient décrit l'induction de l'expression du gène de l'apoA-IV par les lipides mais sans données précises sur les mécanismes moléculaires impliqués. Au laboratoire a été démontré qu'un bolus lipidique induit la transcription du gène de l'apoA-IV *in vivo* (Carriere et coll. 2005). Dans les cellules Caco-2/TC7, un apport permanent de lipides au pôle basal induit la transcription du gène de l'apoA-IV et la stabilisation de son ARN messager (Carriere et coll. 2005). La transcription du gène de l'apoA-IV et la sécrétion de la protéine sont induits encore plus efficacement par un apport apical de MPP, et cet effet n'est pas reproduit par l'apport apical des composants individuels des micelles, ou en combinaisons incomplètes (Carriere et coll. 2005). D'autre part, seule l'induction du gène de l'apoA-IV par les MPP implique la participation du récepteur nucléaire HNF-4 (Carriere et coll. 2005). Ces résultats mettent en avant l'importance de l'apport physiologique des lipides alimentaires sur l'expression du gène de l'apoA-IV et l'implication de HNF-4 dans cette régulation.

**Les résultats que je viens de rappeler ont tous été obtenus dans des expériences où un soin particulier a été apporté à la forme physiologique micellaire d'apport des lipides alimentaires; les effets spécifiques observés après l'apport apical des MPP ne sont reproduits ni par l'ajout isolé d'un composant de ces micelles, ni par les lipides sériques. L'ensemble de ces résultats, qui montrait que l'apport d'acide gras ne suffit pas, à lui seul, à induire la cascade d'évènements qui conduira à la sécrétion des LRT, mettait en lumière l'importance de la forme micellaire complexe d'apport des lipides alimentaires, et suggérait une détection de l'entité «MPP» par les entérocytes. Ces résultats ont constitué les bases expérimentales de mon propre projet de recherche qui visait à répondre à ces deux questions: - existe-t-il une détection entérocytaire des micelles lipidiques post-prandiales? - quel candidat pourrait remplir cette fonction de détecteur au pôle apical des entérocytes?**

Pour conforter notre hypothèse d'une détection entérocytaire des MPP, il était important de déterminer si les effets des différents modes d'apport en lipides, et en particulier des MPP, étaient limités à la modulation de la sécrétion de LRT, au trafic de l'apoB et à la régulation de l'expression de l'apoA-IV où s'ils pouvaient également avoir un impact plus global sur la fonction entérocytaire. Nous avons donc entrepris de comparer l'impact transcriptionnel de différents modes d'apport en lipides en considérant cinq conditions : une condition sans lipides (celle qui a permis de mettre en évidence la rétention de l'apoB dans le RE), deux conditions d'apport de lipides au pôle basal des

cellules (soit par la présence de sérum soit par l'ajout d'acides gras et de cholestérol à un milieu minimum défini sans lipides) et deux conditions d'apport apical de micelles lipides, les micelles post-prandiales (MPP) et les micelles inter-prandiales (MIP).

Par l'approche transcriptomique, nous avons mis en évidence l'importance de la polarité et du mode d'apport en lipides pour la modulation de l'expression des gènes entérocytaires. Les apports de lipides sériques ou liés à l'albumine dans le compartiment basal, et les apports de micelles lipidiques, post-prandiales ou inter-prandiales, dans le compartiment apical, modulent différemment l'expression de gènes de plusieurs catégories de fonction, et pas exclusivement des gènes du métabolisme lipidique. De plus, l'analyse des effets différentiels entre les deux types de micelles lipidiques lumineales, post-prandiales ou inter-prandiales, met en évidence une spécificité d'effet des lipides alimentaires micellaires sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, mais également l'architecture cellulaire et la transduction de signaux. Parmi ces gènes, 43% sont des gènes cibles, putatifs ou avérés, pour le facteur transcriptionnel HNF-4.

Cette dernière observation, associée aux résultats précédemment acquis dans le laboratoire sur l'induction de l'expression du gène de l'apoA-IV (Carriere et coll. 2005), impliquant le récepteur nucléaire HNF-4 $\alpha$  dans l'effet des MPP, nous font dire que **les entérocytes sont capables de percevoir spécifiquement l'apport de micelles lipidiques post-prandiales, et de relayer un signal qui aboutira, via HNF-4, à la régulation de la transcription de nombreux gènes.**

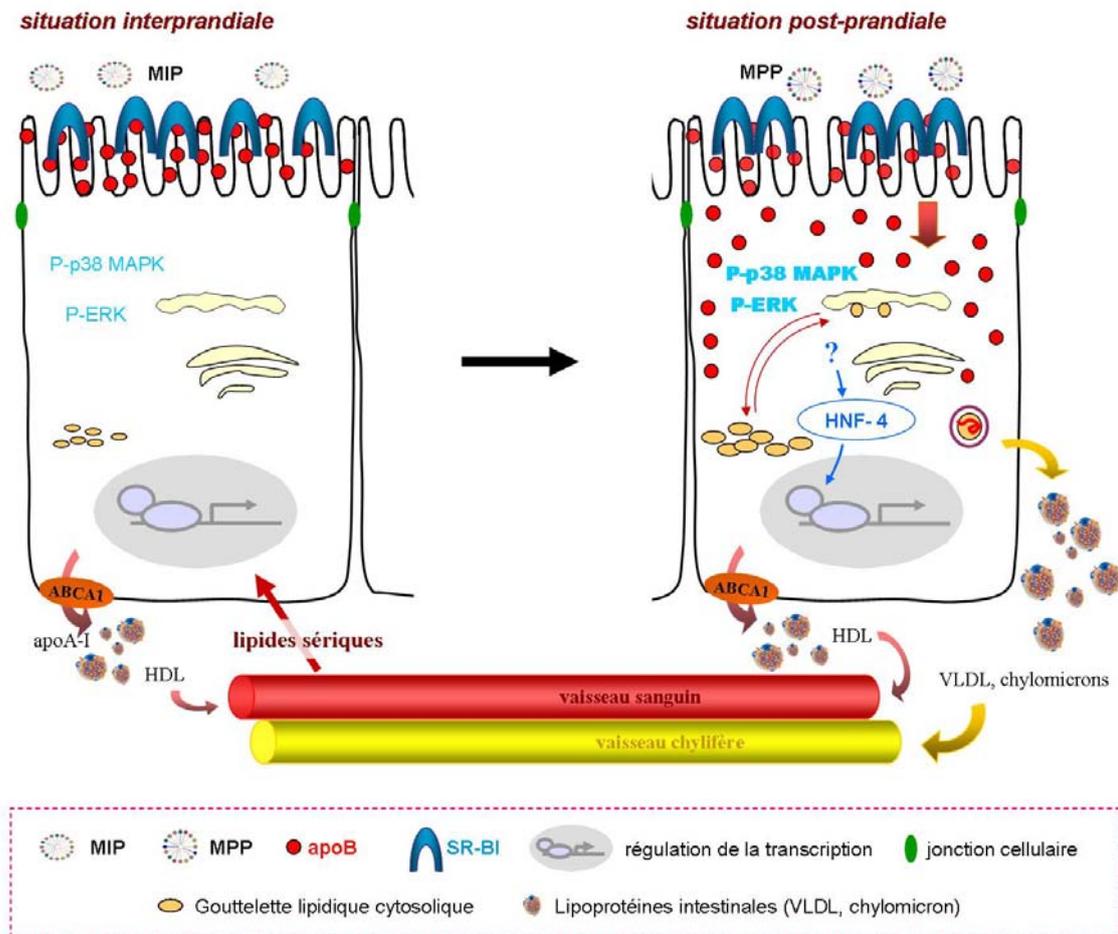
Ces résultats confortaient l'hypothèse d'une détection apicale des micelles lumineales post-prandiales. Nous avons donc tenté de décrypter les étapes précoces de cette détection. L'étape la plus précoce que nous avons mise en évidence consiste en une liaison spécifique des micelles post-prandiales à la membrane des cellules Caco-2/TC7, par rapport à des micelles lipidiques constituées uniquement d'un acide gras, de cholestérol et d'un lipide biliaire (Figure 36). Nous avons alors observé que les MPP interagissent spécifiquement avec une protéine de masse moléculaire d'environ 75kDa. Ces données nous ont amenés à nous intéresser au rôle de détecteur que pourrait jouer le récepteur "scavenger" SR-BI, exprimé au niveau de la bordure en brosse des cellules Caco-2/TC7. Un faisceau d'arguments était en faveur du choix de ce récepteur: parmi les transporteurs et/ou récepteurs de lipides exprimés au pôle apical des cellules intestinales, SR-BI, connu pour son rôle dans le transport inverse du cholestérol et qui lie des lipoprotéines, absentes de la lumière intestinale, est aussi capable de reconnaître des structures lipidiques sans

apolipoprotéines, donc semblables aux micelles que nous utilisons, et de participer ainsi à l'absorption de l'ensemble des lipides (Thuahnai et coll. 2001). D'autre part, des études ont montré l'importance de la structure tridimensionnelle des ligands de SR-BI dans la fonctionnalité de ce récepteur (pour revue (Rhainds and Brissette 2004)). Sa fonction de transporteur intestinal de cholestérol étant remise en cause par la découverte du récepteur NPC1L1, responsable du transport de la quasi-totalité du cholestérol présent dans la lumière intestinale (Altmann et coll. 2004), il était intéressant de se questionner sur le rôle potentiel de SR-BI à la membrane apicale des entérocytes. Nous l'avons ainsi envisagé comme le détecteur de micelles lipidiques post-prandiales, capable de percevoir précocement un apport massif de lipides alimentaires.

Dans nos études, nous avons pu mettre en évidence l'activation des protéines kinases ERK et p38MAPK dans les minutes qui suivent l'apport de MPP. L'activation de ces kinases a été décrite dans d'autres types cellulaires lors de l'interaction entre SR-BI et ses ligands (Osada et coll. 2006). Nous avons également mis en évidence des mouvements de SR-BI au sein de la membrane apicale des entérocytes ainsi que des regroupements de SR-BI dans certaines zones de la membrane, un phénomène décrit dans d'autres modèles cellulaires (Peng et coll. 2004). Si SR-BI est majoritairement localisé dans les domaines non-rafts de la membrane apicale, corroborant les résultats de la littérature (Connelly and Williams 2004; Peng et coll. 2004), il est recruté au niveau des rafts après l'apport de MPP. Cette augmentation de SR-BI dans les domaines "rafts" après l'apport de MPP est particulièrement pertinente, car les rafts sont connus pour être des plateformes de signalisation dans lesquelles sont notamment retrouvés les membres de la famille des MAP kinases. Il est également intéressant de noter que l'activation des voies de signalisation en aval, en réponse à cet apport de lipides alimentaires, a lieu dans des temps compatibles avec les mouvements de SR-BI dans la membrane. Ces événements de signalisation provoqués par l'apport de MPP ne sont pas reproduits par l'apport de MIP. L'inactivation de l'expression de SR-BI par ARN interférence, ou l'utilisation de ligands de haute affinité pour SR-BI que sont les HDL<sub>3</sub>, ayant pour but d'empêcher l'interaction de SR-BI avec les MPP, ont bloqué la délocalisation du stock apical d'apoB et l'activation de ERK.

**L'ensemble de ces résultats nous a permis de considérer SR-BI comme un acteur important de la détection des lipides alimentaires micellaires et des événements intracellulaires précoces survenant en réponse à l'apport apical de ces micelles post-prandiales.**

Les résultats que j'ai obtenus sur la détection des lipides alimentaires, associés à ceux de l'équipe, sont résumés dans la Figure 52 qui vise à schématiser les événements cellulaires se produisant au niveau des entérocytes lors du passage d'une situation inter-prandiale à une situation post-prandiale.



**Figure 52: Effets spécifiques des micelles post-prandiales sur les entérocytes et implication de SR-BI dans la détection des lipides alimentaires par les entérocytes.** Les micelles post-prandiales (MPP), se lient à SR-BI, induisent son regroupement dans des domaines particuliers de la membrane de la bordure en brosse, activent les kinases ERK et p38MAPK et déclenchent le trafic de l'apoB vers les compartiments sécrétoires. Les effets transcriptionnels des MPP sont relayés par le récepteur nucléaire HNF-4, pour un grand nombre de gènes cibles. Ces événements ne sont pas reproduits par l'apport de micelles inter-prandiale (MIP). En réponse à l'apport de MPP, les entérocytes stockent une partie des triglycérides (TG) sous forme de gouttelettes lipidiques cytosoliques, et sécrètent une partie des TG sous forme de lipoprotéines riches en triglycérides à apoB, les VLDL et les chylomicrons. Les TG stockés sous formes de gouttelettes cytosoliques sont capables d'être mobilisés et ré-engagés dans la voie sécrétoire.

# **DISCUSSION**

Comment peut-on intégrer cette nouvelle fonction intestinale de SR-BI dans les données de la littérature? La majorité des études portant sur SR-BI au niveau intestinal a essentiellement concerné sa fonction de transporteur de cholestérol. Pourtant l'invalidation complète de SR-BI *in vivo* le définit comme non essentiel à l'absorption intestinale de cholestérol (Mardones et coll. 2001; Altmann et coll. 2002). Ces résultats, obtenus sur des modèles animaux, sont opposés à ceux obtenus dans les cellules Caco-2, invalidées par ARN antisens pour SR-BI, et qui présentent une baisse du captage de cholestérol en lien avec le niveau d'expression de SR-BI (Levy et coll. 2004). Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les études *in vivo* ont été menées sur des invalidations totales de SR-BI provoquant des perturbations métaboliques importantes pouvant modifier la fonction et le métabolisme intestinal. De plus, l'invalidation constitutive chez les animaux conduit souvent à la mise en place de mécanismes de compensation fonctionnelle par l'augmentation de l'expression d'un autre gène. Pour l'absorption de cholestérol, la protéine NPC1L1 assurant majoritairement son transport intestinal peut sans doute compenser l'absence de SR-BI (Altmann et coll. 2004). Récemment, des souris surexprimant SR-BI spécifiquement au niveau intestinal ont été établies (Bietrix et coll. 2006). Le transgène exprime le gène murin de SR-BI sous le contrôle de "l'enhancer de l'apoCIII couplé au promoteur de l'apoA-IV", donc spécifiquement au niveau intestinal (Le Beyec et coll. 1999), et en accord avec le niveau d'expression naturelle de SR-BI le long de l'axe céphalo-caudal et crypto-villositaire. Ces souris présentent des augmentations de l'absorption intestinale de cholestérol et de triglycérides, qui ne sont pas dues à un défaut de clairance des chylomicrons ou à un problème de flux biliaire (Bietrix et coll. 2006). Ces travaux présentent pour la première fois une preuve *in vivo* d'un rôle de SR-BI dans le métabolisme intestinal des TG. En 1998, Hauser *et coll.* montrent que SR-BI, présent dans la bordure en brosse de l'intestin grêle, facilite le captage de cholestérol à partir de micelles de sels biliaires ainsi que de vésicules de phospholipides (Hauser et coll. 1998). Dans ces vésicules de phospholipides peuvent être transportés des acides gras, des monoglycérides et du cholestérol qui sont transférés à la membrane de la bordure en brosse par un mécanisme protéique (Hauser et coll. 1998). Donc, l'idée que SR-BI puisse lier des micelles de type post-prandial est tout à fait crédible, en particulier compte tenu de son caractère de "récepteur scavenger".

A ce jour, les modèles animaux d'invalidation de SR-BI établis, correspondent à des invalidations totales ou spécifiques au niveau du foie et illustrent une fonction importante de SR-BI dans le métabolisme des HDL (Rigotti et coll. 1997; Varban et coll. 1998) et le captage des esters de cholestérol au niveau du foie. En situation normale, les niveaux

plasmatiques de HDL sont inversement corrélés au développement de l'athérosclérose; paradoxalement, les souris invalidées pour SR-BI développent plus d'athérosclérose en dépit des niveaux élevés de HDL-cholestérol, suggérant un rôle athéroprotecteur à SR-BI. L'efflux de cholestérol des tissus périphériques, notamment des macrophages, la première étape du transport inverse du cholestérol (RCT: reverse cholesterol transport), est un élément à prendre en compte dans l'athérosclérose. En effet, le flux de cholestérol retournant au foie pour être sécrété dans la bile, relargué dans la lumière intestinale et réabsorbé en partie par l'intestin, contribue au niveau de cholestérol circulant. Ainsi SR-BI fait face, au niveau apical des entérocytes, à cet apport luminal de cholestérol provenant soit du cycle entéro-hépatique, soit de l'apport exogène au sein de micelles post-prandiales. Dans l'intestin, SR-BI par ses propriétés de détecteur de micelles post-prandiales pourrait *via* la sécrétion de cholestérol dans les LRT, influencer sur le métabolisme inverse du cholestérol et donc sur l'athérogenèse.

Il est également intéressant de concevoir une signalisation spécifique de l'apport alimentaire, discriminant du cycle entéro-hépatique par lequel l'intestin reçoit en permanence des lipides biliaries. Les acides biliaries sont connus pour contrôler l'activité transcriptionnelle de plusieurs récepteurs nucléaires, RXR, PPAR, LRH-1, HNF-4 (Hirokane et coll. 2004). Dans un modèle hépatocytaire, les cellules HepG2, les acides biliaries réduisent la sécrétion de VLDL en réprimant l'expression du gène de la MTP, par un mécanisme faisant intervenir HNF-4 (Hirokane et coll. 2004). Une des enzymes clés de la biosynthèse des acides biliaries est la 7 $\alpha$  hydroxylase dont l'expression est contrôlée par HNF-4 $\alpha$ . Les acides biliaries peuvent réprimer l'activité du promoteur de la 7 $\alpha$  hydroxylase en réduisant l'activité transcriptionnelle d'HNF-4 $\alpha$ , *via* la cascade de signalisation des MAP Kinases ERK (De Fabiani et coll. 2001) et p38 MAPK (Xu et coll. 2007). Les auteurs montrent au niveau hépatique que HNF-4, en combinaison avec la voie de signalisation MAPK, agit comme détecteur d'acides biliaries (De Fabiani et coll. 2001). Ces données posent la question de l'existence, comme nous le montrons pour la détection des lipides alimentaires, d'une régulation spécifique ou d'une détection des lipides biliaries par les entérocytes en période inter-prandiale. Notre approche sur le modèle cellulaire Caco-2/TC7 en modulant les apports de lipides alimentaires et de lipides biliaries au sein des MPP et des MIP permettrait de mimer ce différentiel d'apport entre lipides alimentaires et lipides biliaries. Il est intéressant de noter que l'analyse transcriptomique que nous avons réalisée a révélé que les MIP sont capables de moduler spécifiquement l'expression de gènes dans les entérocytes. D'autres études devront être réalisées pour déterminer s'il existe une détection des lipides biliaries par les entérocytes en période inter-prandiale. Le facteur

HNF-4 pourrait être un relais commun des effets des lipides alimentaires micellaires et des effets des lipides biliaires en période inter-prandiale.

Nos résultats montrent que la détection des micelles post-prandiales par SR-BI provoque des événements de signalisation cellulaire qui pourraient être relayés par HNF-4. Plusieurs travaux montrent qu'HNF-4 est impliqué également dans la régulation de l'expression de SR-BI. Chez la souris, l'absence d'HNF-4 $\alpha$  au niveau du foie augmente l'accumulation hépatique de lipides, diminue les niveaux sériques de cholestérol et de triglycérides, notamment par l'augmentation du captage hépatique de cholestérol due à l'augmentation de l'expression de SR-BI, et augmente les concentrations d'acides biliaires dans le sérum (Hayhurst et coll. 2001). D'autres auteurs suggèrent que HNF-4 $\alpha$  favorise l'effet stimulateur de PPAR $\gamma$  sur la transcription de SR-BI (Malerod et coll. 2003). On ne sait pas exactement actuellement la contribution relative d'HNF-4 $\alpha$  sur la transcription de SR-BI ni au niveau hépatique ni au niveau intestinal, et donc sa participation en tant qu'acteur central de la régulation de l'homéostasie glucido-lipidique; cependant, des résultats récents sur l'intestin de porcs nouveaux-nés présentent HNF-4 $\alpha$  comme le chef d'orchestre de l'absorption des lipides (Leng et coll. 2007).

La modulation de la détection des lipides alimentaires micellaires pourrait être sensible à tout événement conduisant à une modification d'expression ou d'activité de SR-BI. Il a été montré que l'expression de SR-BI au niveau hépatique est sensible aux concentrations de glucose (Murao et coll. 2007): des concentrations croissantes de glucose diminuent l'expression de SR-BI, par une voie impliquant la participation de p38 MAPK et du facteur de transcription Sp1 (Murao et coll. 2007). L'activation des voies de signalisation en lien avec SR-BI a été décrite dans l'introduction (partie III.6.4C), mais on peut revenir sur ces différents aspects, car nous venons de le voir, les voies des MAP Kinases participent à la régulation de l'expression de SR-BI, et on sait aussi que la liaison de HDL sur SR-BI, décrite dans certains types cellulaires, déclenche l'activation de voies de signalisation intracellulaires. La PI3 Kinase notamment, décrite pour participer à la réparation du tissu endothélial (Mineo and Shaul 2007), est impliquée dans la localisation subcellulaire de SR-BI au niveau des hépatocytes (Shetty et coll. 2006). L'activité PI3K hépatocytaire, diminuée chez les sujets atteints de diabète de type 2, d'obésité ou du syndrome métabolique, pourrait contribuer au mauvais fonctionnement du transport inverse du cholestérol en diminuant l'expression de SR-BI à la surface cellulaire (Shetty et coll. 2006).

Il est certain que la localisation cellulaire de SR-BI à la membrane plasmique est importante pour sa fonction de transporteur. Mais sa distribution au sein de la membrane l'est tout autant pour sa fonction de "signalisateur". Le groupe de Hansen a montré que SR-BI est principalement localisé dans la membrane villositaire des entérocytes à jeûn et peut être endocyté pendant la phase d'absorption des lipides alimentaires, et associé aux gouttelettes lipidiques (Hansen et coll. 2003a). Nous avons observé une quantité équivalente de SR-BI dans la bordure en brosse dans les minutes suivant l'apport de MPP aux cellules Caco-2/TC7, signifiant qu'il n'y a pas eu d'endocytose massive, détectable, de SR-BI. Cependant, l'absence d'endocytose de SR-BI en réponse aux MPP n'exclut pas, au contraire, qu'il puisse être mobilisé au sein de la membrane plasmique, comme nous avons pu l'observer en microscopie confocale, et qu'une proportion de SR-BI soit adressée vers des domaines rafts. D'ailleurs, les résultats obtenus par le groupe de Hansen sur les entérocytes de porc montrant SR-BI quasi-totalement en dehors des domaines rafts n'excluent pas qu'une partie de SR-BI puisse être dans les rafts, à un moment donné de son trafic, et que l'adressage final aux gouttelettes puisse être un mécanisme impliquant les rafts (Hansen et coll. 2003a). Il existe peut être deux pools de protéines membranaires, capables d'évoluer de l'une à l'autre localisation, se retrouvant soit dans un système de machinerie d'endocytose soit au sein de plateformes de signalisation au niveau des rafts.

D'autre part, les gouttelettes lipidiques cytosoliques sont actuellement considérées, au niveau adipocytaire, comme "senseurs" du stockage de lipides neutres (Dugail and Hajduch 2007). Au niveau des entérocytes on sait qu'il y a formation de deux pools de lipides neutres après un apport de lipides alimentaires: un pool adressé vers la lumière du RE pour la sécrétion de lipoprotéines riches en TG, et un pool stocké transitoirement sous forme de gouttelettes cytosoliques qui pourra être ultérieurement mobilisé pour réintégrer la voie de sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides. Les mécanismes de l'adressage de ces lipides neutres vers le stockage cytosolique ou vers la lumière du RE sont très mal connus; l'accumulation de SR-BI au niveau des gouttelettes cytosoliques après un apport lipidique, associé à d'autres partenaires protéiques, notamment les protéines de la famille PAT (Pénilipine, ADRP, TIP47), pourrait être un signal d'information sur le statut en lipides de l'entérocyte et ainsi participer à la détection des lipides alimentaires et au maintien de l'homéostasie en distribuant de façon contrôlée et adaptée les lipoprotéines riches en triglycéride dans la circulation.

C'est la notion d'une nouvelle fonction intestinale que notre travail apporte. En effet, jusqu'à présent la fonction entérocytaire était vue comme le transfert des nutriments, entre

autre le transfert des lipides. Après avoir longtemps considéré que ces lipides passaient librement à travers les membranes, de nombreuses études ont impliqué des transporteurs spécifiques de tel ou tel composé lipidique. Nous en sommes maintenant à dire que non seulement ces entérocytes assurent le transfert des lipides, et le font avec toute une machinerie spécifique des espèces lipidiques, mais en plus les entérocytes ont la capacité de percevoir spécifiquement cet apport apical de lipides alimentaires micellaires. Les entérocytes, type cellulaire le plus abondant de l'épithélium intestinal, joue donc un rôle de "senseur" des micelles lipidiques post-prandiales.

Ce travail apporte également une nouvelle fonction au récepteur "scavenger" SR-BI. Si son rôle est encore discuté pour le captage de cholestérol au niveau luminal intestinal, particulièrement face au rôle majeur de NPC1L1 dans cette absorption (Altmann et coll. 2004), nous apportons ici une fonction de détection à SR-BI, qui est peut-être LA fonction de ce récepteur dans l'intestin.

Pourquoi est ce que tout ceci est d'une importance primordiale? Dans les pays industrialisés, l'Homme passe la plupart de son "temps éveillé" en situation post-prandiale. Le niveau de la lipémie post-prandiale est connu pour être un facteur de risque des maladies cardiovasculaires associées aux maladies métaboliques. Les sources alimentaires de lipides dépassent généralement les besoins réels et les tissus doivent composer avec un excès de gras. De nombreuses études sont menées chez l'Homme, et il faut conjuguer de nombreux paramètres, autres que nutritionnels, pour envisager toutes les causes des pathologies métaboliques (style de vie, genre, age, exercice physique, ...) (pour revue (Paglialunga and Cianflone 2007)).

S'il est évident que les apports alimentaires ne sont pas exclusivement lipidiques, il est intéressant de noter que les sucres et les protéines ont aussi des effets sur la lipémie post-prandiale. Chez la femme saine, un régime très bas en sucre, comparé à un régime très bas en lipides, augmente le cholestérol total, LDL et HDL, mais diminue la triglycéridémie à jeûn et la lipémie post prandiale (Volek et coll. 2003). Un régime riche en sucre par rapport à un régime riche en protéines, avec le même contenu en gras, entraîne une augmentation post-prandiale des lipoprotéines à apoB48 (chylomicrons et VDL) (Mamo et coll. 2005). Dans le laboratoire avaient été démontrés les effets des concentrations en sucre sur la sécrétion des LRT par les cellules Caco-2 (Pauquai et coll. 2006). Les auteurs parlent aujourd'hui volontiers du dysmétabolisme post-prandial (hyperglycémie et hyperlipidémie

post-prandiales) comme un facteur de risque de maladies cardiovasculaires (pour revue (O'Keefe and Bell 2007)).

La composition en lipides joue aussi énormément sur les facteurs de risques de maladies métaboliques. Dans notre travail sur modèle cellulaire, nous avons abordé les questions visant à décrypter les mécanismes fondamentaux de la détection et du transfert transépithélial des lipides alimentaires avec un seul type de micelles post-prandiales, en utilisant les composants les plus retrouvés dans les produits alimentaires. Il sera nécessaire d'appréhender ces mécanismes avec d'autres types de micelles post-prandiales, essentiellement en modifiant la composition en acides gras. Les acides gras alimentaires font l'objet de très nombreuses études, les ratios d'acides gras saturés par rapport aux acides gras mono- ou poly-insaturés étant modifiés au profit de ces derniers (pour revue (Getz and Reardon 2007)). L'acide linoléique est l'acide gras n-6 majoritaire dans l'alimentation. Mais si l'on sait aujourd'hui que l'effet à long terme de la consommation de régimes riches en acides gras poly-insaturés n-6 consiste en une baisse du cholestérol plasmatique et des maladies cardiovasculaires, on ne sait toujours pas de façon très claire quels en sont les mécanismes. L'acide linoléique est un précurseur de l'acide arachidonique, et l'acide arachidonique en position 2 des phospholipides est une source de leucotriènes et de prostanoïdes, qui ont de nombreux effets, bénéfiques (prostacycline) ou non (thromboxane), sur le système cardiovasculaire (Dogne et coll. 2005). Les acides poly-insaturés n-3, principalement dérivés des huiles de poissons, font aussi l'objet de nombreuses études, et partagent des effets avec les acides gras n-6. L'American Heart Association recommande aux patients à risque cardiovasculaire de consommer 35 grammes d'huile de poisson deux fois par semaine (Lichtenstein et coll. 2006).

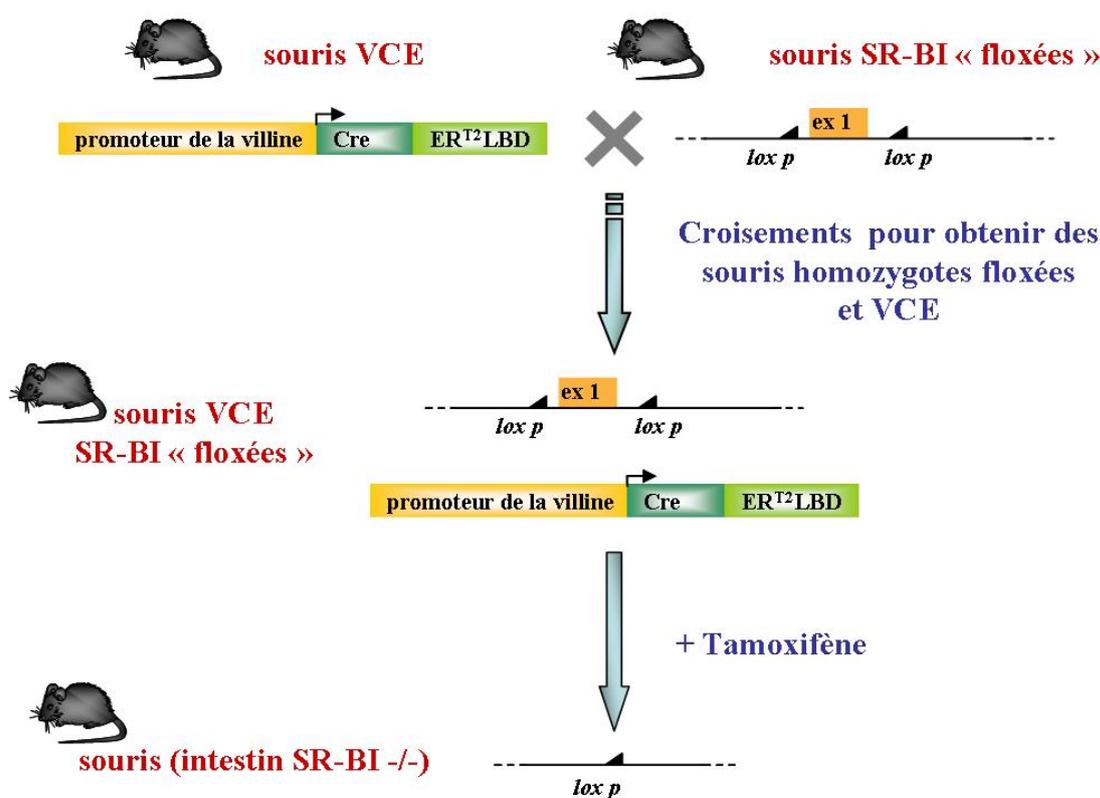
Les entités qui viennent d'être décrites sont des acides gras naturellement insaturés et sont tous des acides gras cis. Dans la production alimentaire, on retrouve également des acides gras trans. La présence en grande quantité de ces acides gras trans dans les régimes modernes provient principalement des procédés industriels, notamment l'hydrogénation des huiles insaturées pour faciliter le conditionnement et le stockage. Ces acides gras ont des propriétés physiques intermédiaires entre les acides gras saturés et les insaturés. Mais leurs effets sur les risques cardiovasculaires sont plutôt défavorables, en diminuant le cholestérol HDL au profit des LDL (Mozaffarian et coll. 2006). L'effet de ces acides gras au niveau intestinal devra être évalué.

Notre travail inscrit l'intestin comme un élément majeur de la perception par l'organisme de la situation post-prandiale. Les niveaux d'acides gras et de cholestérol

circulants en situation post-prandiale permettent leur distribution aux tissus périphériques. Dans la circulation sanguine, l'accumulation, même transitoire, de lipides peut conduire au développement de pathologies cardiovasculaires. La capacité de l'intestin à distinguer les situations inter-prandiales des situations post-prandiales en fait un organe capable d'adapter sa propre fonction à ces changements permanents d'apport en nutriments, ce qui aura un impact sur l'homéostasie énergétique de l'organisme tout entier.

# **PERSPECTIVES**

Le modèle entérocytaire Caco-2/TC7 nous a permis d'analyser les effets spécifiques des MPP et de mettre en évidence des mécanismes impliqués dans la détection des lipides alimentaires sous forme micellaire. Pour valider *in vivo* les résultats que nous avons obtenus dans ce modèle cellulaire, nous établissons une lignée transgénique de souris invalidées, de façon inductible, pour SR-BI au niveau intestinal. La restriction de l'extinction de l'expression de SR-BI à l'intestin est apportée par le promoteur du gène de la villine, et inductible par le contrôle de l'expression de la recombinaison C (Cre) par le Tamoxifène, permettant la recombinaison des sites Lox P flanquant l'exon 1 du gène de SR-BI, et ainsi son invalidation fonctionnelle (el Marjou et coll. 2004; Huby et coll. 2006) (Figure 53).



**Figure 53: Construction de souris transgéniques invalidées pour SR-BI au niveau intestinal et de façon inductible.** Les souris VCE expriment la Cre sous le contrôle du promoteur de la villine, après induction par des oestrogènes de synthèse (Tamoxifène), grâce au domaine de liaison du récepteur aux oestrogènes pour ces ligands (ER<sup>T2</sup>LBD). Ces souris nous ont été données par Sylvie Robine (Institut Curie, Paris). Les souris SR-BI "floxées" (homozygotes) nous ont été données par Thierry Huby (INSERM U551, la pitié-salpêtrière, Paris). Après croisements des deux lignées, et obtention de souris homozygotes pour SR-BI "floxé" et VCE, le traitement par le Tamoxifène permettra la recombinaison des sites lox p et l'excision de l'exon 1 du gène de SR-BI, délétion suffisante pour invalider SR-BI.

Ce modèle murin permettra d'évaluer l'impact de SR-BI sur le métabolisme lipidique entérocytaire et ses répercussions sur l'homéostasie lipidique et apportera la preuve de concept *in vivo* de la détection entérocytaire des lipides alimentaires sous forme micellaire.

Comment l'intestin assure-t-il sa fonction d'absorption des lipides alimentaires en l'absence de SR-BI? Cette question devra être abordée avec des souris dont l'inactivation de SR-BI est inductible, afin de limiter des mécanismes de compensation. En effet, l'inactivation constitutive d'un transporteur peut, souvent, être compensée par un transporteur homologue, ou proche fonctionnellement.

Afin de caractériser l'impact de l'inactivation intestinale de SR-BI sur l'homéostasie lipidique, les paramètres plasmatiques (cholestérolémie, triglycéridémie, insulïnémie, glycémie...) et le profil des lipoprotéines sécrétées après un bolus d'huile ou un régime enrichi en lipides seront analysés; Les répercussions sur le métabolisme inverse du cholestérol seront également étudiées. La preuve de concept *in vivo* de la détection intestinale des lipides alimentaires sera abordée par la mise en culture d'explants d'intestin de souris invalidées ou non pour SR-BI dans l'intestin. Ces explants, dont on sait qu'ils gardent pendant quelques heures leurs caractéristiques fonctionnelles, seront incubés en présence de MPP, afin de déterminer si les micelles post-prandiales sont capables d'activer des cascades de signalisation. L'existence d'effets différentiels des MPP par rapport aux MIP sera déterminée; l'activation des kinases ERK 1/2 et p38MAPK sera plus particulièrement étudiée. Le trafic de l'apoB pourrait également être suivi, avec les difficultés techniques que cela soulève sur le tissu entier, l'apoB en trafic pour son adressage permanent vers la bordure en brosse apicale pouvant être difficile à distinguer de l'apoB apicale adressée vers les compartiments intracellulaires par l'apport de MPP.

L'inactivation de SR-BI au niveau intestinal peut toucher les cellules souches des cryptes, et donc atteindre les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal. L'interprétation des résultats sur le tissu entier devra prendre en compte le fait que d'autres systèmes de détection des lipides alimentaires existent, notamment au niveau des cellules entéroendocrines (pour revue (McLaughlin 2007)). Nous avons déjà pu mettre en évidence que les cellules entéroendocrines de la lignée murine STC-1 expriment SR-BI. L'expression de SR-BI au niveau des cellules entéroendocrines *in vivo* sera analysée en immunofluorescence en étudiant le co-marquage entre la chromogranine et SR-BI.

Si l'intestin est capable d'absorber efficacement les lipides alimentaires, ce processus n'est pas un phénomène passif, et la capacité de l'intestin à détecter la présence d'acides gras a été aussi décrite au niveau des cellules entéroendocrines. Le meilleur exemple en est la détection du « gras » par les cellules I, sécrétant la CCK, principalement situées dans le duodénum. La CCK agit comme une hormone classique et aussi au niveau des fibres afférentes vagues. Les effets du « gras » sur l'intestin *via* la CCK sont spécifiques de la longueur des chaînes des acides gras. Les mécanismes moléculaires de ce système de

détection commencent à être étudiés sur la lignée cellulaire murine STC-1. Parmi les voies de signalisation décrites, le calcium intracellulaire joue un rôle clé avec mobilisation des pools intra- et extra-cellulaires (pour revue (McLaughlin 2007)). Il a été décrit récemment un lien entre le calcium et les kinases ERK. Les variations de concentration de calcium modifient le répertoire des protéines interagissant avec ERK2 et sa localisation (Chuderland et coll. 2008). Si le calcium régule la localisation de ERK, il régule de fait la spécificité de la signalisation qui en découle. Par rapport à nos résultats sur les MAP kinases activées par les MPP, il sera intéressant de regarder si le niveau de calcium dans les entérocytes participe, comme dans les cellules entéroendocrines, à la signalisation, et s'il y a un lien entre les concentrations calciques intracellulaires et la localisation de ERK activé, en réponse aux MPP.

Il sera également intéressant d'étudier l'effet de l'apport physiologique de lipides aux cellules entéroendocrines, car les mécanismes moléculaires déjà décrits l'ont été avec des acides gras seuls et non des micelles, et l'intérêt s'est principalement porté sur le rôle de la longueur de la chaîne des acides gras et sur les conséquences au niveau de la prise alimentaire (McLaughlin 2007). La sécrétion de peptides (CCK), d'incrétines (GLP-1, GIP) et de facteurs de satiété (PYY, apo A-IV) sera analysée après apports lipidiques chez les souris invalidées pour SR-BI au niveau intestinal par rapport à des souris contrôles. S'il s'avérait que les cellules entéroendocrines expriment SR-BI *in vivo*, il sera important de prendre en compte les durées de vie différentes entre les cellules entérocytaires (3-4 jours) et entéroendocrines (plusieurs semaines) dans l'analyse des résultats chez les souris invalidées pour SR-BI au niveau intestinal .

Ainsi, *in vivo*, nous pouvons envisager un dialogue entre les cellules entérocytaires et les cellules entéroendocrines. Si les cellules entéroendocrines, population très minoritaire de l'épithélium intestinal, sont capables de détecter l'apport de lipides alimentaires micellaires, on peut aussi envisager que les cellules entérocytaires, largement majoritaires, qui reçoivent des lipides alimentaires, déclenchent des signaux intracellulaires et sécrètent des lipoprotéines riches en triglycérides, peuvent transmettre des informations aux cellules entéroendocrines qui alors enverront des messages aux relais centraux.

# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abumrad, N. A.** (2005). CD36 may determine our desire for dietary fats. *J Clin Invest* **115**(11): 2965-7.
- Abumrad, N. A., M. R. el-Maghrabi, E. Z. Amri, E. Lopez and P. A. Grimaldi** (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**(24): 17665-8.
- Acton, S., D. Osgood, M. Donoghue, D. Corella, M. Pocovi, A. Cinarro, P. Mozas, J. Keilty, S. Squazzo, E. A. Woolf and J. M. Ordovas** (1999). Association of polymorphisms at the SR-BI gene locus with plasma lipid levels and body mass index in a white population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(7): 1734-43.
- Acton, S. L., P. E. Scherer, H. F. Lodish and M. Krieger** (1994). Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem* **269**(33): 21003-9.
- Altmann, S. W., H. R. Davis, Jr., X. Yao, M. Laverty, D. S. Compton, L. J. Zhu, J. H. Crona, M. A. Caplen, L. M. Hoos, G. Tetzloff, T. Priestley, D. A. Burnett, C. D. Strader and M. P. Graziano** (2002). The identification of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) by expression cloning and its role in cholesterol absorption. *Biochim Biophys Acta* **1580**(1): 77-93.
- Altmann, S. W., H. R. Davis, Jr., L. J. Zhu, X. Yao, L. M. Hoos, G. Tetzloff, S. P. Iyer, M. Maguire, A. Golovko, M. Zeng, L. Wang, N. Murgolo and M. P. Graziano** (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* **303**(5661): 1201-4.
- Andersson, U., K. Filipsson, C. R. Abbott, A. Woods, K. Smith, S. R. Bloom, D. Carling and C. J. Small** (2004). AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* **279**(13): 12005-8.
- Apodaca, G.** (2001). Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* **2**(3): 149-59.
- Archer, A., D. Sauvaget, V. Chauffeton, P. E. Bouchet, J. Chambaz, M. Pincon-Raymond, P. Cardot, A. Ribeiro and M. Lacasa** (2005). Intestinal apolipoprotein A-IV gene transcription is controlled by two hormone-responsive elements: a role for hepatic nuclear factor-4 isoforms. *Mol Endocrinol* **19**(9): 2320-34.
- Assanasen, C., C. Mineo, D. Seetharam, I. S. Yuhanna, Y. L. Marcel, M. A. Connelly, D. L. Williams, M. de la Llera-Moya, P. W. Shaul and D. L. Silver** (2005). Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling. *J Clin Invest* **115**(4): 969-977.
- Auwerx, J., T. A. Cock and C. Knouff** (2003). PPAR-gamma: a thrifty transcription factor. *Nucl Recept Signal* **1**: e006.
- Babitt, J., B. Trigatti, A. Rigotti, E. J. Smart, R. G. Anderson, S. Xu and M. Krieger** (1997). Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J Biol Chem* **272**(20): 13242-9.
- Bader, A., T. Hansen, G. Kirchner, C. Allmeling, A. Haverich and J. T. Borlak** (2000). Primary porcine enterocyte and hepatocyte cultures to study drug oxidation reactions. *Br J Pharmacol* **129**(2): 331-42.
- Baillie, A. G., C. T. Coburn and N. A. Abumrad** (1996). Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J Membr Biol* **153**(1): 75-81.
- Basciano, H., L. Federico and K. Adeli** (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)* **2**(1): 5.
- Batterham, R. L., M. A. Cohen, S. M. Ellis, C. W. Le Roux, D. J. Withers, G. S. Frost, M. A. Ghatei and S. R. Bloom** (2003). Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med* **349**(10): 941-8.

- Batterham, R. L., M. A. Cowley, C. J. Small, H. Herzog, M. A. Cohen, C. L. Dakin, A. M. Wren, A. E. Brynes, M. J. Low, M. A. Ghatti, R. D. Cone and S. R. Bloom** (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* **418**(6898): 650-4.
- Battle, M. A., G. Konopka, F. Parviz, A. L. Gaggl, C. Yang, F. M. Sladek and S. A. Duncan** (2006). Hepatocyte nuclear factor 4alpha orchestrates expression of cell adhesion proteins during the epithelial transformation of the developing liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(22): 8419-24.
- Beglinger, C. and L. Degen** (2006). Gastrointestinal satiety signals in humans--physiologic roles for GLP-1 and PYY? *Physiol Behav* **89**(4): 460-4.
- Berk, P. D., H. Wada, Y. Horio, B. J. Potter, D. Sorrentino, S. L. Zhou, L. M. Isola, D. Stump, C. L. Kiang and S. Thung** (1990). Plasma membrane fatty acid-binding protein and mitochondrial glutamic-oxaloacetic transaminase of rat liver are related. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(9): 3484-8.
- Berriot-Varoqueaux, N., A. H. Dannoura, A. Moreau, N. Verthier, A. Sassolas, G. Cadiot, A. Lachaux, A. Munck, J. Schmitz, L. P. Aggerbeck and M. E. Samson-Bouma** (2001). Apolipoprotein B48 glycosylation in abetalipoproteinemia and Anderson's disease. *Gastroenterology* **121**(5): 1101-8.
- Bezencon, C., J. le Coutre and S. Damak** (2007). Taste-signaling proteins are coexpressed in solitary intestinal epithelial cells. *Chem Senses* **32**(1): 41-9.
- Bietrix, F., D. Yan, M. Nauze, C. Rolland, J. Bertrand-Michel, C. Comera, S. Schaak, R. Barbaras, A. K. Groen, B. Perret, F. Terce and X. Collet** (2006). Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *J Biol Chem* **281**(11): 7214-9.
- Black, D. D.** (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**(3): G519-24.
- Boggiano, M. M., P. C. Chandler, K. D. Oswald, R. J. Rodgers, J. E. Blundell, Y. Ishii, A. H. Beattie, P. Holch, D. B. Allison, M. Schindler, K. Arndt, K. Rudolf, M. Mark, C. Schoelch, H. G. Joost, S. Klaus, C. Thone-Reineke, S. C. Benoit, R. J. Seeley, A. G. Beck-Sickinger, N. Koglin, K. Raun, K. Madsen, B. S. Wulff, C. E. Stidsen, M. Birringer, O. J. Kreuzer, X. Y. Deng, D. C. Whitcomb, H. Halem, J. Taylor, J. Dong, R. Datta, M. Culler, S. Ortmann, T. R. Castaneda and M. Tschop** (2005). PYY3-36 as an anti-obesity drug target. *Obes Rev* **6**(4): 307-22.
- Borgstrom, B.** (1975). On the interactions between pancreatic lipase and colipase and the substrate, and the importance of bile salts. *J Lipid Res* **16**(6): 411-7.
- Borgstrom, B., A. Dahlqvist, G. Lundh and J. Sjovall** (1957). Studies of intestinal digestion and absorption in the human. *J Clin Invest* **36**(10): 1521-36.
- Brown, J. M., L. L. Rudel and L. Yu** (2007). Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) mediates sterol-specific unidirectional transport of unesterified cholesterol in McArdle-RH7777 hepatoma cells. *Biochem J*.
- Buhman, K. K., M. Accad, S. Novak, R. S. Choi, J. S. Wong, R. L. Hamilton, S. Turley and R. V. Farese, Jr.** (2000). Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat Med* **6**(12): 1341-7.
- Burgos, V., C. Klattenhoff, E. De La Fuente, A. Rigotti and A. Gonzalez** (2004). Cholesterol depletion induces PKA-mediated basolateral-to-apical transcytosis of the scavenger receptor class B type I in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

- Cai, L., E. R. Eckhardt, W. Shi, Z. Zhao, M. Nasser, W. J. de Villiers and D. R. van der Westhuyzen** (2004). Scavenger receptor class B type I reduces cholesterol absorption in cultured enterocyte CaCo-2 cells. *J Lipid Res* **45**(2): 253-62.
- Cai, S. F., R. J. Kirby, P. N. Howles and D. Y. Hui** (2001). Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine. *J Lipid Res* **42**(6): 902-9.
- Calvo, D., J. Dopazo and M. A. Vega** (1995). The CD36, CLA-1 (CD36L1), and LIMPII (CD36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution. *Genomics* **25**(1): 100-6.
- Calvo, D., D. Gomez-Coronado, Y. Suarez, M. A. Lasuncion and M. A. Vega** (1998). Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res* **39**(4): 777-88.
- Calvo, D. and M. A. Vega** (1993). Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J Biol Chem* **268**(25): 18929-35.
- Cao, G., C. K. Garcia, K. L. Wyne, R. A. Schultz, K. L. Parker and H. H. Hobbs** (1997). Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. *J Biol Chem* **272**(52): 33068-76.
- Carriere, V., R. Vidal, K. Lazou, M. Lacasa, F. Delers, A. Ribeiro, M. Rousset, J. Chambaz and J. M. Lacorte** (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**(7): 5406-13.
- Cartwright, I. J. and J. A. Higgins** (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**(51): 48048-57.
- Cartwright, I. J., D. Plonne and J. A. Higgins** (2000). Intracellular events in the assembly of chylomicrons in rabbit enterocytes. *J Lipid Res* **41**(11): 1728-39.
- Chandrashekar, J., M. A. Hoon, N. J. Ryba and C. S. Zuker** (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* **444**(7117): 288-94.
- Chang, C. C., H. Y. Huh, K. M. Cadigan and T. Y. Chang** (1993). Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **268**(28): 20747-55.
- Chantret, I., A. Rodolose, A. Barbat, E. Dussaulx, E. Brot-Laroche, A. Zweibaum and M. Rousset** (1994). Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J Cell Sci* **107** ( Pt 1): 213-25.
- Chateau, D., T. Pauquai, F. Delers, M. Rousset, J. Chambaz and S. Demignot** (2005). Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells. *J Cell Physiol* **202**(3): 767-76.
- Chen, M., Y. Yang, E. Braunstein, K. E. Georgeson and C. M. Harmon** (2001). Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**(5): E916-23.
- Choi, M. Y., A. I. Romer, M. Hu, M. Lepourcelet, A. Mechoor, A. Yesilaltay, M. Krieger, P. A. Gray and R. A. Shivdasani** (2006). A dynamic expression survey identifies transcription factors relevant in mouse digestive tract development. *Development* **133**(20): 4119-29.
- Chow, S. L. and D. Hollander** (1979). A dual, concentration-dependent absorption mechanism of linoleic acid by rat jejunum in vitro. *J Lipid Res* **20**(3): 349-56.
- Christensen, N. J., C. E. Rubin, M. C. Cheung and J. J. Albers** (1983). Ultrastructural immunolocalization of apolipoprotein B within human jejunal absorptive cells. *J Lipid Res* **24**(9): 1229-42.

- Chuderland, D., G. Marmor, A. Shainskaya and R. Seger** (2008). Calcium-mediated interactions regulate the subcellular localization of extracellular signal-regulated kinases (ERKs). *J Biol Chem*.
- Clarke, S. D. and D. B. Jump** (1994). Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu Rev Nutr* **14**: 83-98.
- Clement, L., C. Cruciani-Guglielmacci, C. Magnan, M. Vincent, L. Douared, M. Orosco, F. Assimacopoulos-Jeannet, L. Penicaud and A. Ktorza** (2002). Intracerebroventricular infusion of a triglyceride emulsion leads to both altered insulin secretion and hepatic glucose production in rats. *Pflugers Arch* **445**(3): 375-80.
- Coleman, R. A. and D. P. Lee** (2004). Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* **43**(2): 134-76.
- Connelly, M. A. and D. L. Williams** (2004). Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids. *Curr Opin Lipidol* **15**(3): 287-95.
- Craddock, A. L., M. W. Love, R. W. Daniel, L. C. Kirby, H. C. Walters, M. H. Wong and P. A. Dawson** (1998). Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol* **274**(1 Pt 1): G157-69.
- Crandall, W. V. and M. E. Lowe** (2001). Colipase residues Glu64 and Arg65 are essential for normal lipase-mediated fat digestion in the presence of bile salt micelles. *J Biol Chem* **276**(16): 12505-12.
- Cruciani-Guglielmacci, C., S. Migrenne, L. Clement and C. Magnan** (2006). [Fatty acid sensors and neurologic control of energetic homeostasis]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*: 13-23.
- Cummins, C. L. and D. J. Mangelsdorf** (2006). Liver X receptors and cholesterol homeostasis: spotlight on the adrenal gland. *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 6): 1110-3.
- Cunliffe, R. N. and Y. R. Mahida** (2004). Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J Leukoc Biol* **75**(1): 49-58.
- Damak, S., M. Rong, K. Yasumatsu, Z. Kokrashvili, V. Varadarajan, S. Zou, P. Jiang, Y. Ninomiya and R. F. Margolskee** (2003). Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science* **301**(5634): 850-3.
- Danielsen, E. M., G. H. Hansen and L. L. Wetterberg** (1991). Morphological and functional changes in the enterocyte induced by fructose. *Biochem J* **280** ( Pt 2): 483-9.
- Dannoura, A. H., N. Berriot-Varoqueaux, P. Amati, V. Abadie, N. Verthier, J. Schmitz, J. R. Wetterau, M. E. Samson-Bouma and L. P. Aggerbeck** (1999). Anderson's disease: exclusion of apolipoprotein and intracellular lipid transport genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(10): 2494-508.
- Davidson, N. O. and G. S. Shelness** (2000). APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu Rev Nutr* **20**: 169-93.
- Davies, J. P., B. Levy and Y. A. Ioannou** (2000). Evidence for a Niemann-pick C (NPC) gene family: identification and characterization of NPC1L1. *Genomics* **65**(2): 137-45.
- Davies, J. P., C. Scott, K. Oishi, A. Liapis and Y. A. Ioannou** (2005). Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. *J Biol Chem*.
- Dawson, P. A., J. Haywood, A. L. Craddock, M. Wilson, M. Tietjen, K. Kluckman, N. Maeda and J. S. Parks** (2003). Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice. *J Biol Chem* **278**(36): 33920-7.

- De Fabiani, E., N. Mitro, A. C. Anzulovich, A. Pinelli, G. Galli and M. Crestani** (2001). The negative effects of bile acids and tumor necrosis factor-alpha on the transcription of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) converge to hepatic nuclear factor-4: a novel mechanism of feedback regulation of bile acid synthesis mediated by nuclear receptors. *J Biol Chem* **276**(33): 30708-16.
- de Villiers, W. J. and E. J. Smart** (1999). Macrophage scavenger receptors and foam cell formation. *J Leukoc Biol* **66**(5): 740-6.
- Delie, F. and W. Rubas** (1997). A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **14**(3): 221-86.
- Desvergne, B., L. Michalik and W. Wahli** (2006). Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev* **86**(2): 465-514.
- Dietzen, D. J., W. R. Hastings and D. M. Lublin** (1995). Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem* **270**(12): 6838-42.
- Dogne, J. M., J. Hanson and D. Pratico** (2005). Thromboxane, prostacyclin and isoprostanes: therapeutic targets in atherogenesis. *Trends Pharmacol Sci* **26**(12): 639-44.
- Doi, T., M. Liu, R. J. Seeley, S. C. Woods and P. Tso** (2001). Effect of leptin on intestinal apolipoprotein AIV in response to lipid feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**(3): R753-9.
- Dowell, P., Z. Hu and M. D. Lane** (2005). Monitoring energy balance: metabolites of fatty acid synthesis as hypothalamic sensors. *Annu Rev Biochem* **74**: 515-34.
- Drover, V. A., M. Ajmal, F. Nassir, N. O. Davidson, A. M. Nauli, D. Sahoo, P. Tso and N. A. Abumrad** (2005). CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J Clin Invest* **115**(5): 1290-7.
- Drucker, D. J.** (2006). The biology of incretin hormones. *Cell Metab* **3**(3): 153-65.
- Du, X., J. D. Stoops, J. R. Mertz, C. M. Stanley and J. L. Dixon** (1998). Identification of two regions in apolipoprotein B100 that are exposed on the cytosolic side of the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **141**(3): 585-99.
- Dugail, I. and E. Hajduch** (2007). A new look at adipocyte lipid droplets: towards a role in the sensing of triacylglycerol stores? *Cell Mol Life Sci* **64**(19-20): 2452-8.
- Duval, C., V. Touche, A. Tailleux, J. C. Fruchart, C. Fievet, V. Clavey, B. Staels and S. Lestavel** (2006). Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem Biophys Res Commun* **340**(4): 1259-63.
- Dyer, J., K. S. Salmon, L. Zibrik and S. P. Shirazi-Beechey** (2005). Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 1): 302-5.
- Edmond, J.** (2001). Essential polyunsaturated fatty acids and the barrier to the brain: the components of a model for transport. *J Mol Neurosci* **16**(2-3): 181-93; discussion 215-21.
- el Marjou, F., K. P. Janssen, B. H. Chang, M. Li, V. Hindie, L. Chan, D. Louvard, P. Chambon, D. Metzger and S. Robine** (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* **39**(3): 186-93.
- Endemann, G., L. W. Stanton, K. S. Madden, C. M. Bryant, R. T. White and A. A. Protter** (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* **268**(16): 11811-6.
- Engelman, J. A., X. Zhang, F. Galbiati, D. Volonte, F. Sotgia, R. G. Pestell, C. Minetti, P. E. Scherer, T. Okamoto and M. P. Lisanti** (1998). Molecular genetics of the caveolin gene family: implications for human cancers, diabetes, Alzheimer disease, and muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* **63**(6): 1578-87.

- Febbraio, M., D. P. Hajjar and R. L. Silverstein** (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* **108**(6): 785-91.
- Field, F. J., K. Watt and S. N. Mathur** (2007). Ezetimibe interferes with cholesterol trafficking from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* **48**(8): 1735-45.
- Fisher, E. A. and H. N. Ginsberg** (2002). Complexity in the secretory pathway: the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J Biol Chem* **277**(20): 17377-80.
- Fisher, E. A., M. Zhou, D. M. Mitchell, X. Wu, S. Omura, H. Wang, A. L. Goldberg and H. N. Ginsberg** (1997). The degradation of apolipoprotein B100 is mediated by the ubiquitin-proteasome pathway and involves heat shock protein 70. *J Biol Chem* **272**(33): 20427-34.
- Fitscher, B. A., H. D. Riedel, K. C. Young and W. Stremmel** (1998). Tissue distribution and cDNA cloning of a human fatty acid transport protein (hsFATP4). *Biochim Biophys Acta* **1443**(3): 381-5.
- Fluiter, K., D. R. van der Westhuijzen and T. J. van Berkel** (1998). In vivo regulation of scavenger receptor BI and the selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J Biol Chem* **273**(14): 8434-8.
- Forsberg, H. and P. O. Ljungdahl** (2001). Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **40**(2): 91-109.
- Fouquet, S., V. H. Lugo-Martinez, A. M. Faussat, F. Renaud, P. Cardot, J. Chambaz, M. Pincon-Raymond and S. Thenet** (2004). Early loss of E-cadherin from cell-cell contacts is involved in the onset of Anoikis in enterocytes. *J Biol Chem* **279**(41): 43061-9.
- Francis, D. and N. G. Halford** (2006). Nutrient sensing in plant meristems. *Plant Mol Biol* **60**(6): 981-93.
- Friedman, J. M. and J. L. Halaas** (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**(6704): 763-70.
- Fujii, S., H. Kawaguchi and H. Yasuda** (1987). Purification of high affinity fatty acid receptors in rat myocardial sarcolemmal membranes. *Lipids* **22**(7): 544-6.
- Fujimoto, K., J. A. Cardelli and P. Tso** (1992). Increased apolipoprotein A-IV in rat mesenteric lymph after lipid meal acts as a physiological signal for satiation. *Am J Physiol* **262**(6 Pt 1): G1002-6.
- Fujimoto, K., K. Fukagawa, T. Sakata and P. Tso** (1993). Suppression of food intake by apolipoprotein A-IV is mediated through the central nervous system in rats. *J Clin Invest* **91**(4): 1830-3.
- Fukuwatari, T., T. Kawada, M. Tsuruta, T. Hiraoka, T. Iwanaga, E. Sugimoto and T. Fushiki** (1997). Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett* **414**(2): 461-4.
- Fukuwatari, T., K. Shibata, K. Iguchi, T. Saeki, A. Iwata, K. Tani, E. Sugimoto and T. Fushiki** (2003). Role of gustation in the recognition of oleate and triolein in anosmic rats. *Physiol Behav* **78**(4-5): 579-83.
- Furukawa, S., N. Sakata, H. N. Ginsberg and J. L. Dixon** (1992). Studies of the sites of intracellular degradation of apolipoprotein B in Hep G2 cells. *J Biol Chem* **267**(31): 22630-8.
- Gaillard, D., P. Passilly-Degrace, F. Laugerette and P. Besnard** (2006). Sur la piste du « goût du gras ». *OCL* **13**(5): 309-314.
- Gallagher, J. W., R. B. Weinberg and G. S. Shelness** (2004). apoA-IV tagged with the ER retention signal KDEL perturbs the intracellular trafficking and secretion of apoB. *J Lipid Res* **45**(10): 1826-34.

- Ganong, W.** (1999). Digestion and absorption. *In Review of Medical Physiology 19th ed, 1999 Appleton & Lange, Stamford Connecticut.*: 447-458.
- Garcia-Calvo, M., J. Lisnock, H. G. Bull, B. E. Hawes, D. A. Burnett, M. P. Braun, J. H. Crona, H. R. Davis, Jr., D. C. Dean, P. A. Detmers, M. P. Graziano, M. Hughes, D. E. Macintyre, A. Ogawa, A. O'Neill K, S. P. Iyer, D. E. Shevell, M. M. Smith, Y. S. Tang, A. M. Makarewicz, F. Ujjainwalla, S. W. Altmann, K. T. Chapman and N. A. Thornberry** (2005). The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(23): 8132-7.
- Gerke, V. and S. E. Moss** (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* **82**(2): 331-71.
- Getz, G. S. and C. A. Reardon** (2007). Nutrition and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(12): 2499-506.
- Gianturco, S. H. and W. A. Bradley** (1999). Pathophysiology of triglyceride-rich lipoproteins in atherothrombosis: cellular aspects. *Clin Cardiol* **22**(6 Suppl): II7-14.
- Gibbs, J., R. C. Young and G. P. Smith** (1973). Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol* **84**(3): 488-95.
- Gimeno, R. E., D. J. Hirsch, S. Punreddy, Y. Sun, A. M. Ortegon, H. Wu, T. Daniels, A. Stricker-Krongrad, H. F. Lodish and A. Stahl** (2003). Targeted deletion of fatty acid transport protein-4 results in early embryonic lethality. *J Biol Chem* **278**(49): 49512-6.
- Glatz, J. F. and M. Lagarde** (2007). Lipid sensing and lipid sensors. *Cell Mol Life Sci* **64**(19-20): 2449-51.
- Glatzle, J., N. Darcel, A. J. Rechs, T. J. Kalogeris, P. Tso and H. E. Raybould** (2004). Apolipoprotein A-IV stimulates duodenal vagal afferent activity to inhibit gastric motility via a CCK1 pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**(2): R354-9.
- Glatzle, J., T. J. Kalogeris, T. T. Zittel, S. Guerrini, P. Tso and H. E. Raybould** (2002). Chylomicron components mediate intestinal lipid-induced inhibition of gastric motor function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**(1): G86-91.
- Glatzle, J., Y. Wang, D. W. Adelson, T. J. Kalogeris, T. T. Zittel, P. Tso, J. Y. Wei and H. E. Raybould** (2003). Chylomicron components activate duodenal vagal afferents via a cholecystokinin A receptor-mediated pathway to inhibit gastric motor function in the rat. *J Physiol* **550**(Pt 2): 657-64.
- Gordon, D. A., H. Jamil, R. E. Gregg, S. O. Olofsson and J. Boren** (1996). Inhibition of the microsomal triglyceride transfer protein blocks the first step of apolipoprotein B lipoprotein assembly but not the addition of bulk core lipids in the second step. *J Biol Chem* **271**(51): 33047-53.
- Graf, G. A., W. P. Li, R. D. Gerard, I. Gelissen, A. White, J. C. Cohen and H. H. Hobbs** (2002). Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest* **110**(5): 659-69.
- Gratton, J. P., P. Bernatchez and W. C. Sessa** (2004). Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *Circ Res* **94**(11): 1408-17.
- Grewal, T., I. de Diego, M. F. Kirchhoff, F. Tebar, J. Heeren, F. Rinnering and C. Enrich** (2003). High density lipoprotein-induced signaling of the MAPK pathway involves scavenger receptor type BI-mediated activation of Ras. *J Biol Chem* **278**(19): 16478-81.
- Grimaldi, P. A.** (2007). Peroxisome proliferator-activated receptors as sensors of fatty acids and derivatives. *Cell Mol Life Sci* **64**(19-20): 2459-64.
- Gruarin, P., R. F. Thorne, D. J. Dorahy, G. F. Burns, R. Sitia and M. Alessio** (2000). CD36 is a ditopic glycoprotein with the N-terminal domain implicated in intracellular transport. *Biochem Biophys Res Commun* **275**(2): 446-54.

- Gu, X., B. Trigatti, S. Xu, S. Acton, J. Babitt and M. Krieger** (1998). The efficient cellular uptake of high density lipoprotein lipids via scavenger receptor class B type I requires not only receptor-mediated surface binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain. *J Biol Chem* **273**(41): 26338-48.
- Guillemain, G., M. Loizeau, M. Pincon-Raymond, J. Girard and A. Leturque** (2000). The large intracytoplasmic loop of the glucose transporter GLUT2 is involved in glucose signaling in hepatic cells. *J Cell Sci* **113** ( Pt 5): 841-7.
- Gusarova, V., J. L. Brodsky and E. A. Fisher** (2003). Apolipoprotein B100 exit from the endoplasmic reticulum (ER) is COPII-dependent, and its lipidation to very low density lipoprotein occurs post-ER. *J Biol Chem* **278**(48): 48051-8.
- Gusarova, V., A. J. Caplan, J. L. Brodsky and E. A. Fisher** (2001). Apoprotein B degradation is promoted by the molecular chaperones hsp90 and hsp70. *J Biol Chem* **276**(27): 24891-900.
- Haidari, M., N. Leung, F. Mahbub, K. D. Uffelman, R. Kohen-Avramoglu, G. F. Lewis and K. Adeli** (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**(35): 31646-55.
- Hall, A. M., B. M. Wiczer, T. Herrmann, W. Stremmel and D. A. Bernlohr** (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**(12): 11948-54.
- Hamilton, R. L., J. S. Wong, C. M. Cham, L. B. Nielsen and S. G. Young** (1998). Chylomicron-sized lipid particles are formed in the setting of apolipoprotein B deficiency. *J Lipid Res* **39**(8): 1543-57.
- Hansen, G. H., L. L. Niels-Christiansen, L. Immerdal and E. M. Danielsen** (2003a). Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in pig enterocytes: trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption. *Gut* **52**(10): 1424-31.
- Hansen, G. H., J. Pedersen, L. L. Niels-Christiansen, L. Immerdal and E. M. Danielsen** (2003b). Deep-apical tubules: dynamic lipid-raft microdomains in the brush-border region of enterocytes. *Biochem J* **373**(Pt 1): 125-32.
- Harder, C. J., A. Meng, P. Rippstein, H. M. McBride and R. McPherson** (2007). SR-BI undergoes cholesterol-stimulated transcytosis to the bile canaliculus in polarized WIF-B cells. *J Biol Chem* **282**(2): 1445-55.
- Hardie, D. G. and D. Carling** (1997). The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* **246**(2): 259-73.
- Hardie, D. G., D. Carling and N. Halford** (1994). Roles of the Snf1/Rkin1/AMP-activated protein kinase family in the response to environmental and nutritional stress. *Semin Cell Biol* **5**(6): 409-16.
- Hauser, H., J. H. Dyer, A. Nandy, M. A. Vega, M. Werder, E. Bieliauskaite, F. E. Weber, S. Compassi, A. Gemperli, D. Boffelli, E. Wehrli, G. Schulthess and M. C. Phillips** (1998). Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine. *Biochemistry* **37**(51): 17843-50.
- Hayashi, H., D. F. Nutting, K. Fujimoto, J. A. Cardelli, D. Black and P. Tso** (1990). Transport of lipid and apolipoproteins A-I and A-IV in intestinal lymph of the rat. *J Lipid Res* **31**(9): 1613-25.
- Hayhurst, G. P., Y. H. Lee, G. Lambert, J. M. Ward and F. J. Gonzalez** (2001). Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* **21**(4): 1393-403.

- Hercberg, S.** (1996). Les aspects historiques de l'alimentation. La nutrition humaine: la recherche au service de la santé, J-F. Desjeux, S. Hercberg eds. Editions INSERM/Nathan.
- Hernell, O., J. E. Stammers and M. C. Carey** (1990). Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 2. Phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat digestion in healthy adult human beings. *Biochemistry* **29**(8): 2041-56.
- Hertz, R., N. Ben-Haim, A. D. Petrescu, B. Kalderon, I. Berman, N. Eldad, F. Schroeder and J. Bar-Tana** (2003). Rescue of MODY-1 by agonist ligands of hepatocyte nuclear factor-4alpha. *J Biol Chem* **278**(25): 22578-85.
- Hertz, R., J. Magenheim, I. Berman and J. Bar-Tana** (1998). Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature* **392**(6675): 512-6.
- Higgins, M. E., J. P. Davies, F. W. Chen and Y. A. Ioannou** (1999). Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. *Mol Genet Metab* **68**(1): 1-13.
- Hira, T., A. C. Elliott, D. G. Thompson, R. M. Case and J. T. McLaughlin** (2004). Multiple fatty acid sensing mechanisms operate in enteroendocrine cells: novel evidence for direct mobilization of stored calcium by cytosolic fatty acid. *J Biol Chem* **279**(25): 26082-9.
- Hirokane, H., M. Nakahara, S. Tachibana, M. Shimizu and R. Sato** (2004). Bile acid reduces the secretion of very low density lipoprotein by repressing microsomal triglyceride transfer protein gene expression mediated by hepatocyte nuclear factor-4. *J Biol Chem* **279**(44): 45685-92.
- Hirsch, D., A. Stahl and H. F. Lodish** (1998). A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8625-9.
- Ho, S. Y. and J. Storch** (2001). Common mechanisms of monoacylglycerol and fatty acid uptake by human intestinal Caco-2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(4): C1106-17.
- Hodis, H. N. and W. J. Mack** (1998). Triglyceride-rich lipoproteins and progression of atherosclerosis. *Eur Heart J* **19 Suppl A**: A40-4.
- Hofer, D., B. Puschel and D. Drenckhahn** (1996). Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6631-4.
- Hofmann, A. F.** (1999). Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol Sci* **14**: 24-29.
- Holsbeeks, I., O. Lagatie, A. Van Nuland, S. Van de Velde and J. M. Thevelein** (2004). The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device. *Trends Biochem Sci* **29**(10): 556-64.
- Holst, D., S. Luquet, V. Nogueira, K. Kristiansen, X. Leverve and P. A. Grimaldi** (2003). Nutritional regulation and role of peroxisome proliferator-activated receptor delta in fatty acid catabolism in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* **1633**(1): 43-50.
- Holzer, H. H., C. M. Turkelson, T. E. Solomon and H. E. Raybould** (1994). Intestinal lipid inhibits gastric emptying via CCK and a vagal capsaicin-sensitive afferent pathway in rats. *Am J Physiol* **267**(4 Pt 1): G625-9.
- Huang, M. M., J. B. Bolen, J. W. Barnwell, S. J. Shattil and J. S. Brugge** (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**(17): 7844-8.
- Hubschle, T., E. Thom, A. Watson, J. Roth, S. Klaus and W. Meyerhof** (2001). Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. *J Neurosci* **21**(7): 2413-24.

- Huby, T., C. Doucet, C. Datchet, B. Ouzilleau, Y. Ueda, V. Afzal, E. Rubin, M. J. Chapman and P. Lesnik** (2006). Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *J Clin Invest* **116**(10): 2767-76.
- Hung, A. Y. and M. Sheng** (2002). PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* **277**(8): 5699-702.
- Hussain, M. M.** (2000). A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis* **148**(1): 1-15.
- Hussain, M. M., S. Fatma, X. Pan and J. Iqbal** (2005). Intestinal lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol* **16**(3): 281-5.
- Jang, H. J., Z. Kokrashvili, M. J. Theodorakis, O. D. Carlson, B. J. Kim, J. Zhou, H. H. Kim, X. Xu, S. L. Chan, M. Juhaszova, M. Bernier, B. Mosinger, R. F. Margolskee and J. M. Egan** (2007). Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(38): 15069-74.
- Johnson, A. E. and N. G. Haigh** (2000). The ER translocon and retrotranslocation: is the shift into reverse manual or automatic? *Cell* **102**(6): 709-12.
- Johnson, M. S., P. A. Svensson, K. Helou, H. Billig, G. Levan, L. M. Carlsson and B. Carlsson** (1998). Characterization and chromosomal localization of rat scavenger receptor class B type I, a high density lipoprotein receptor with a putative leucine zipper domain and peroxisomal targeting sequence. *Endocrinology* **139**(1): 72-80.
- Jones, B., E. L. Jones, S. A. Bonney, H. N. Patel, A. R. Mensenkamp, S. Eichenbaum-Voline, M. Rudling, U. Myrdal, G. Annesi, S. Naik, N. Meadows, A. Quattrone, S. A. Islam, R. P. Naoumova, B. Angelin, R. Infante, E. Levy, C. C. Roy, P. S. Freemont, J. Scott and C. C. Shoulders** (2003). Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet* **34**(1): 29-31.
- Joyce, C. W., G. S. Shelness, M. A. Davis, R. G. Lee, K. Skinner, R. A. Anderson and L. L. Rudel** (2000). ACAT1 and ACAT2 membrane topology segregates a serine residue essential for activity to opposite sides of the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* **11**(11): 3675-87.
- Jump, D. B., S. D. Clarke, A. Thelen, M. Liimatta, B. Ren and M. Badin** (1996). Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Prog Lipid Res* **35**(3): 227-41.
- Kalogeris, T. J., K. Fukagawa and P. Tso** (1994). Synthesis and lymphatic transport of intestinal apolipoprotein A-IV in response to graded doses of triglyceride. *J Lipid Res* **35**(7): 1141-51.
- Kamp, F., D. Zakim, F. Zhang, N. Noy and J. A. Hamilton** (1995). Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. *Biochemistry* **34**(37): 11928-37.
- Karpe, F.** (1999). Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J Intern Med* **246**(4): 341-55.
- Karpe, F., M. L. Hellenius and A. Hamsten** (1999). Differences in postprandial concentrations of very-low-density lipoprotein and chylomicron remnants between normotriglyceridemic and hypertriglyceridemic men with and without coronary heart disease. *Metabolism* **48**(3): 301-7.
- Kawakami, A. and M. Yoshida** (2005). Remnant lipoproteins and atherogenesis. *J Atheroscler Thromb* **12**(2): 73-6.
- Kenny, A. J. and S. Maroux** (1982). Topology of microvillar membrane hydrolases of kidney and intestine. *Physiol Rev* **62**(1): 91-128.
- Kim, E. K., I. Miller, S. Aja, L. E. Landree, M. Pinn, J. McFadden, F. P. Kuhajda, T. H. Moran and G. V. Ronnett** (2004). C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces

- food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* **279**(19): 19970-6.
- Koda, S., Y. Date, N. Murakami, T. Shimbara, T. Hanada, K. Toshinai, A. Nijima, M. Furuya, N. Inomata, K. Osuye and M. Nakazato** (2005). The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats. *Endocrinology* **146**(5): 2369-75.
- Kondoh, K. and E. Nishida** (2007). Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta* **1773**(8): 1227-37.
- Kozarsky, K. F., M. H. Donahee, A. Rigotti, S. N. Iqbal, E. R. Edelman and M. Krieger** (1997). Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* **387**(6631): 414-7.
- Kramer, W., S. Stengelin, K. H. Baringhaus, A. Enhsen, H. Heuer, W. Becker, D. Corsiero, F. Girbig, R. Noll and C. Weyland** (1999). Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na(+)/bile acid cotransporters of the rabbit. I. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters. *J Lipid Res* **40**(9): 1604-17.
- Kumar, N. S. and C. M. Mansbach, 2nd** (1999). Prechylomicron transport vesicle: isolation and partial characterization. *Am J Physiol* **276**(2 Pt 1): G378-86.
- Kusakabe, Y., A. Yasuoka, M. Asano-Miyoshi, K. Iwabuchi, I. Matsumoto, S. Arai, Y. Emori and K. Abe** (2000). Comprehensive study on G protein alpha-subunits in taste bud cells, with special reference to the occurrence of Galphai2 as a major Galpha species. *Chem Senses* **25**(5): 525-31.
- Labonte, E. D., P. N. Howles, N. A. Granholm, J. C. Rojas, J. P. Davies, Y. A. Ioannou and D. Y. Hui** (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*.
- Landree, L. E., A. L. Hanlon, D. W. Strong, G. Rumbaugh, I. M. Miller, J. N. Thupari, E. C. Connolly, R. L. Hukanir, C. Richardson, L. A. Witters, F. P. Kuhajda and G. V. Ronnett** (2004). C75, a fatty acid synthase inhibitor, modulates AMP-activated protein kinase to alter neuronal energy metabolism. *J Biol Chem* **279**(5): 3817-27.
- Laugerette, F., D. Gaillard, P. Passilly-Degrace, I. Niot and P. Besnard** (2007). Do we taste fat? *Biochimie* **89**(2): 265-9.
- Laugerette, F., P. Passilly-Degrace, B. Patris, I. Niot, M. Febbraio, J. P. Montmayeur and P. Besnard** (2005). CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest* **115**(11): 3177-84.
- Lazaridis, K. N., L. Pham, P. Tietz, R. A. Marinelli, P. C. deGroen, S. Levine, P. A. Dawson and N. F. LaRusso** (1997). Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* **100**(11): 2714-21.
- Le Beyec, J., V. Chauffeton, H. Y. Kan, P. L. Janvier, C. Cywiner-Golenzer, F. P. Chatelet, A. D. Kalopissis, V. Zannis, J. Chambaz, M. Pincon-Raymond and P. Cardot** (1999). The -700/-310 fragment of the apolipoprotein A-IV gene combined with the -890/-500 apolipoprotein C-III enhancer is sufficient to direct a pattern of gene expression similar to that for the endogenous apolipoprotein A-IV gene. *J Biol Chem* **274**(8): 4954-61.
- Le Beyec, J., F. Delers, F. Jourdan, C. Schreider, J. Chambaz, P. Cardot and M. Pincon-Raymond** (1997). A complete epithelial organization of Caco-2 cells induces I-FABP and potentializes apolipoprotein gene expression. *Exp Cell Res* **236**(1): 311-20.

- Le Gall, M., V. Tobin, E. Stolarczyk, V. Dalet, A. Leturque and E. Brot-Laroche** (2007). Sugar sensing by enterocytes combines polarity, membrane bound detectors and sugar metabolism. *J Cell Physiol* **213**(3): 834-43.
- Le Kim, D. and H. Betzing** (1976). Intestinal absorption of polyunsaturated phosphatidylcholine in the rat. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **357**(9): 1321-31.
- Lemberger, T., R. Saladin, M. Vazquez, F. Assimacopoulos, B. Staels, B. Desvergne, W. Wahli and J. Auwerx** (1996). Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J Biol Chem* **271**(3): 1764-9.
- Leng, S., S. Lu, Y. Yao, Z. Kan, G. S. Morris, B. R. Stair, M. A. Cherny and D. D. Black** (2007). Hepatocyte nuclear factor-4 mediates apolipoprotein A-IV transcriptional regulation by fatty acid in newborn swine enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**(2): G475-83.
- Levin, B. E.** (2002). Glucosensing neurons: the metabolic sensors of the brain? *Diabetes Nutr Metab* **15**(5): 274-80; discussion 281.
- Levy, E., D. Menard, I. Suc, E. Delvin, V. Marcil, L. Brisette, L. Thibault and M. Bendayan** (2004). Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. *J Cell Sci* **117**(Pt 2): 327-37.
- Levy, E., S. Stan, E. Delvin, D. Menard, C. Shoulders, C. Garofalo, I. Slight, E. Seidman, G. Mayer and M. Bendayan** (2002). Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. *J Biol Chem* **277**(19): 16470-7.
- Li, J., G. Ning and S. A. Duncan** (2000). Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev* **14**(4): 464-74.
- Liao, W. and L. Chan** (2000). Apolipoprotein B, a paradigm for proteins regulated by intracellular degradation, does not undergo intracellular degradation in CaCo2 cells. *J Biol Chem* **275**(6): 3950-6.
- Lichtenstein, A. H., L. J. Appel, M. Brands, M. Carnethon, S. Daniels, H. A. Franch, B. Franklin, P. Kris-Etherton, W. S. Harris, B. Howard, N. Karanja, M. Lefevre, L. Rudel, F. Sacks, L. Van Horn, M. Winston and J. Wylie-Rosett** (2006). Summary of American Heart Association Diet and Lifestyle Recommendations revision 2006. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(10): 2186-91.
- Linnik, K. M. and H. Herscovitz** (1998). Multiple molecular chaperones interact with apolipoprotein B during its maturation. The network of endoplasmic reticulum-resident chaperones (ERp72, GRP94, calreticulin, and BiP) interacts with apolipoprotein b regardless of its lipidation state. *J Biol Chem* **273**(33): 21368-73.
- Liu, M., T. Doi, L. Shen, S. C. Woods, R. J. Seeley, S. Zheng, A. Jackman and P. Tso** (2001). Intestinal satiety protein apolipoprotein AIV is synthesized and regulated in rat hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**(5): R1382-7.
- Lloyd, K. C., H. E. Raybould and J. H. Walsh** (1992). Cholecystokinin inhibits gastric acid secretion through type "A" cholecystokinin receptors and somatostatin in rats. *Am J Physiol* **263**(3 Pt 1): G287-92.
- Lobo, M. V., L. Huerta, N. Ruiz-Velasco, E. Teixeira, P. de la Cueva, A. Celdran, A. Martin-Hidalgo, M. A. Vega and R. Bragado** (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**(10): 1253-60.
- Loison, C., F. Mendy, C. Serougne and C. Lutton** (2002). Dietary myristic acid modifies the HDL-cholesterol concentration and liver scavenger receptor BI expression in the hamster. *Br J Nutr* **87**(3): 199-210.

- Lombardo, D., J. Fauvel and O. Guy** (1980). Studies on the substrate specificity of a carboxyl ester hydrolase from human pancreatic juice. I. Action on carboxyl esters, glycerides and phospholipids. *Biochim Biophys Acta* **611**(1): 136-46.
- Long, Y. C. and J. R. Zierath** (2006). AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest* **116**(7): 1776-83.
- Lopez, D. and M. P. McLean** (1999). Sterol regulatory element-binding protein-1a binds to cis elements in the promoter of the rat high density lipoprotein receptor SR-BI gene. *Endocrinology* **140**(12): 5669-81.
- Lopez, D. and M. P. McLean** (2006). Activation of the rat scavenger receptor class B type I gene by PPARalpha. *Mol Cell Endocrinol* **251**(1-2): 67-77.
- Lu, W. J., Q. Yang, W. Sun, S. C. Woods, D. D'Alessio and P. Tso** (2007). The regulation of the lymphatic secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) by intestinal absorption of fat and carbohydrate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**(5): G963-71.
- Malerod, L., L. K. Juvet, A. Hanssen-Bauer, W. Eskild and T. Berg** (2002). Oxysterol-activated LXRalpha/RXR induces hSR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **299**(5): 916-23.
- Malerod, L., M. Sporstol, L. K. Juvet, A. Mousavi, T. Gjoen and T. Berg** (2003). Hepatic scavenger receptor class B, type I is stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and hepatocyte nuclear factor 4alpha. *Biochem Biophys Res Commun* **305**(3): 557-65.
- Malerod, L., M. Sporstol, L. K. Juvet, S. A. Mousavi, T. Gjoen, T. Berg, N. Roos and W. Eskild** (2005). Bile acids reduce SR-BI expression in hepatocytes by a pathway involving FXR/RXR, SHP, and LRH-1. *Biochem Biophys Res Commun* **336**(4): 1096-105.
- Mamo, J. C., A. P. James, M. J. Soares, D. G. Griffiths, K. Purcell and J. L. Schwenke** (2005). A low-protein diet exacerbates postprandial chylomicron concentration in moderately dyslipidaemic subjects in comparison to a lean red meat protein-enriched diet. *Eur J Clin Nutr* **59**(10): 1142-8.
- Mansbach, C. M., 2nd and S. Parthasarathy** (1982). A re-examination of the fate of glyceride-glycerol in neutral lipid absorption and transport. *J Lipid Res* **23**(7): 1009-19.
- Mardones, P., V. Quinones, L. Amigo, M. Moreno, J. F. Miquel, M. Schwarz, H. E. Miettinen, B. Trigatti, M. Krieger, S. VanPatten, D. E. Cohen and A. Rigotti** (2001). Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res* **42**(2): 170-80.
- Margolskee, R. F., J. Dyer, Z. Kokrashvili, K. S. Salmon, E. Ilegems, K. Daly, E. L. Maillet, Y. Ninomiya, B. Mosinger and S. P. Shirazi-Beechey** (2007). T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(38): 15075-80.
- Mattes, R. D.** (1996). Oral fat exposure alters postprandial lipid metabolism in humans. *Am J Clin Nutr* **63**(6): 911-7.
- Mattes, R. D.** (2001). Oral exposure to butter, but not fat replacers elevates postprandial triacylglycerol concentration in humans. *J Nutr* **131**(5): 1491-6.
- Mattes, R. D.** (2005). Fat taste and lipid metabolism in humans. *Physiol Behav* **86**(5): 691-7.
- May, P., J. Herz and H. H. Bock** (2005). Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling. *Cell Mol Life Sci* **62**(19-20): 2325-38.
- Mazer, N. A., G. B. Benedek and M. C. Carey** (1980). Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Mixed micelle formation in bile salt-lecithin solutions. *Biochemistry* **19**(4): 601-15.

- McLaughlin, J.** (2007). Long-chain fatty acid sensing in the gastrointestinal tract. *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 5): 1199-202.
- McLaughlin, J. T., R. B. Lomax, L. Hall, G. J. Dockray, D. G. Thompson and G. Warhurst** (1998a). Fatty acids stimulate cholecystokinin secretion via an acyl chain length-specific, Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism in the enteroendocrine cell line STC-1. *J Physiol* **513** ( Pt 1): 11-8.
- McLaughlin, J. T., L. E. Troncon, J. Barlow, L. J. Heggie and D. G. Thompson** (1998b). Evidence for a lipid specific effect in nutrient induced human proximal gastric relaxation. *Gut* **43**(2): 248-51.
- Mela, D. J.** (1988). Sensory assessment of fat content in fluid dairy products. *Appetite* **10**(1): 37-44.
- Meyer, J. G.** (1989). Lipolytic enzymes of the human pancreas. II. Purification and properties of cholesterol ester hydrolase. *Biochim Biophys Acta* **1002**(1): 89-92.
- Migrenne, S., C. Magnan and C. Cruciani-Guglielmacci** (2007). Fatty acid sensing and nervous control of energy homeostasis. *Diabetes Metab* **33**(3): 177-82.
- Milger, K., T. Herrmann, C. Becker, D. Gotthardt, J. Zickwolf, R. Ehehalt, P. A. Watkins, W. Stremmel and J. Fullekrug** (2006). Cellular uptake of fatty acids driven by the ER-localized acyl-CoA synthetase FATP4. *J Cell Sci* **119**(Pt 22): 4678-88.
- Mineo, C. and P. W. Shaul** (2007). Role of high-density lipoprotein and scavenger receptor B type I in the promotion of endothelial repair. *Trends Cardiovasc Med* **17**(5): 156-61.
- Minokoshi, Y., T. Alquier, N. Furukawa, Y. B. Kim, A. Lee, B. Xue, J. Mu, F. Foufelle, P. Ferre, M. J. Birnbaum, B. J. Stuck and B. B. Kahn** (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* **428**(6982): 569-74.
- Morabia, A., E. Cayanis, M. C. Costanza, B. M. Ross, M. S. Flaherty, G. B. Alvin, K. Das and T. C. Gilliam** (2003). Association of extreme blood lipid profile phenotypic variation with 11 reverse cholesterol transport genes and 10 non-genetic cardiovascular disease risk factors. *Hum Mol Genet* **12**(21): 2733-43.
- Morabia, A., B. M. Ross, M. C. Costanza, E. Cayanis, M. S. Flaherty, G. B. Alvin, K. Das, R. James, A. S. Yang, O. Evagrafov and T. C. Gilliam** (2004). Population-based study of SR-BI genetic variation and lipid profile. *Atherosclerosis* **175**(1): 159-68.
- Morel, E., S. Demignot, D. Chateau, J. Chambaz, M. Rousset and F. Delers** (2004). Lipid-dependent bidirectional traffic of apolipoprotein B in polarized enterocytes. *Mol Biol Cell* **15**(1): 132-41.
- Morton, N. M., V. Emilsson, Y. L. Liu and M. A. Cawthorne** (1998). Leptin action in intestinal cells. *J Biol Chem* **273**(40): 26194-201.
- Mozaffarian, D., M. B. Katan, A. Ascherio, M. J. Stampfer and W. C. Willett** (2006). Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N Engl J Med* **354**(15): 1601-13.
- Mu, H. and C. E. Hoy** (2004). The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog Lipid Res* **43**(2): 105-33.
- Murao, K., X. Yu, H. Imachi, W. M. Cao, K. Chen, K. Matsumoto, T. Nishiuchi, N. C. Wong and T. Ishida** (2007). Hyperglycemia suppresses hepatic scavenger receptor class B type I expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Murata, M., J. Peranen, R. Schreiner, F. Wieland, T. V. Kurzchalia and K. Simons** (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(22): 10339-43.
- Murota, K. and J. Storch** (2005). Uptake of micellar long-chain fatty acid and sn-2-monoacylglycerol into human intestinal Caco-2 cells exhibits characteristics of protein-mediated transport. *J Nutr* **135**(7): 1626-30.

- Nakamura, T., N. Shibata, T. Nishimoto-Shibata, D. Feng, M. Ikemoto, K. Motojima, O. N. Iso, K. Tsukamoto, M. Tsujimoto and H. Arai** (2005). Regulation of SR-BI protein levels by phosphorylation of its associated protein, PDZK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(38): 13404-9.
- Nassir, F., B. Wilson, X. Han, R. W. Gross and N. A. Abumrad** (2007). CD36 Is Important for Fatty Acid and Cholesterol Uptake by the Proximal but Not Distal Intestine. *J Biol Chem* **282**(27): 19493-501.
- Nauli, A. M., F. Nassir, S. Zheng, Q. Yang, C. M. Lo, S. B. Vonlehmden, D. Lee, R. J. Jandacek, N. A. Abumrad and P. Tso** (2006). CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology* **131**(4): 1197-207.
- Nelson, G., M. A. Hoon, J. Chandrashekar, Y. Zhang, N. J. Ryba and C. S. Zuker** (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell* **106**(3): 381-90.
- Newson, B., H. Ahlman, A. Dahlstrom and L. M. Nyhus** (1982). Ultrastructural observations in the rat ileal mucosa of possible epithelial "taste cells" and submucosal sensory neurons. *Acta Physiol Scand* **114**(2): 161-4.
- Nicholson, A. C., S. Frieda, A. Pearce and R. L. Silverstein** (1995). Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**(2): 269-75.
- Nordskog, B. K., C. T. Phan, D. F. Nutting and P. Tso** (2001). An examination of the factors affecting intestinal lymphatic transport of dietary lipids. *Adv Drug Deliv Rev* **50**(1-2): 21-44.
- Northfield, T. C. and A. F. Hofmann** (1975). Biliary lipid output during three meals and an overnight fast. I. Relationship to bile acid pool size and cholesterol saturation of bile in gallstone and control subjects. *Gut* **16**(1): 1-11.
- Obici, S., Z. Feng, K. Morgan, D. Stein, G. Karkanias and L. Rossetti** (2002). Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* **51**(2): 271-5.
- Odom, D. T., N. Zizlsperger, D. B. Gordon, G. W. Bell, N. J. Rinaldi, H. L. Murray, T. L. Volkert, J. Schreiber, P. A. Rolfe, D. K. Gifford, E. Fraenkel, G. I. Bell and R. A. Young** (2004). Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* **303**(5662): 1378-81.
- Oelkers, P., L. C. Kirby, J. E. Heubi and P. A. Dawson** (1997). Primary bile acid malabsorption caused by mutations in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene (SLC10A2). *J Clin Invest* **99**(8): 1880-7.
- Okamoto, T., A. Schlegel, P. E. Scherer and M. P. Lisanti** (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* **273**(10): 5419-22.
- O'Keefe, J. H. and D. S. Bell** (2007). Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* **100**(5): 899-904.
- Okumura, T., K. Fukagawa, P. Tso, I. L. Taylor and T. N. Pappas** (1994). Intracisternal injection of apolipoprotein A-IV inhibits gastric secretion in pylorus-ligated conscious rats. *Gastroenterology* **107**(6): 1861-4.
- Okumura, T., K. Fukagawa, P. Tso, I. L. Taylor and T. N. Pappas** (1995). Mechanism of action of intracisternal apolipoprotein A-IV in inhibiting gastric acid secretion in rats. *Gastroenterology* **109**(5): 1583-8.
- Okumura, T., K. Fukagawa, P. Tso, I. L. Taylor and T. N. Pappas** (1996). Apolipoprotein A-IV acts in the brain to inhibit gastric emptying in the rat. *Am J Physiol* **270**(1 Pt 1): G49-53.

- Olofsson, S. O., P. Stillemark-Billton and L. Asp** (2000). Intracellular assembly of VLDL: two major steps in separate cell compartments. *Trends Cardiovasc Med* **10**(8): 338-45.
- Oomura, Y., T. Nakamura, M. Sugimori and Y. Yamada** (1975). Effect of free fatty acid on the rat lateral hypothalamic neurons. *Physiol Behav* **14**(04): 483-6.
- Oram, J. F. and A. M. Vaughan** (2006). ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res* **99**(10): 1031-43.
- Osada, Y., A. Shiratsuchi and Y. Nakanishi** (2006). Involvement of mitogen-activated protein kinases in class B scavenger receptor type I-induced phagocytosis of apoptotic cells. *Exp Cell Res* **312**(10): 1820-30.
- Osgood, D., D. Corella, S. Demissie, L. A. Cupples, P. W. Wilson, J. B. Meigs, E. J. Schaefer, O. Coltell and J. M. Ordovas** (2003). Genetic variation at the scavenger receptor class B type I gene locus determines plasma lipoprotein concentrations and particle size and interacts with type 2 diabetes: the framingham study. *J Clin Endocrinol Metab* **88**(6): 2869-79.
- Ozcan, S., J. Dover, A. G. Rosenwald, S. Wolfli and M. Johnston** (1996). Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(22): 12428-32.
- Pagialunga, S. and K. Cianflone** (2007). Regulation of postprandial lipemia: an update on current trends. *Appl Physiol Nutr Metab* **32**(1): 61-75.
- Palmer, R. K.** (2007). The pharmacology and signaling of bitter, sweet, and umami taste sensing. *Mol Interv* **7**(2): 87-98.
- Pan, X. and M. M. Hussain** (2007). Diurnal regulation of microsomal triglyceride transfer protein and plasma lipid levels. *J Biol Chem* **282**(34): 24707-19.
- Parton, R. G. and K. Simons** (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(3): 185-94.
- Parton, R. G., M. Way, N. Zorzi and E. Stang** (1997). Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol* **136**(1): 137-54.
- Patel, S. C., S. Suresh, U. Kumar, C. Y. Hu, A. Cooney, E. J. Blanchette-Mackie, E. B. Neufeld, R. C. Patel, R. O. Brady, Y. C. Patel, P. G. Pentchev and W. Y. Ong** (1999). Localization of Niemann-Pick C1 protein in astrocytes: implications for neuronal degeneration in Niemann- Pick type C disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(4): 1657-62.
- Pauquai, T., J. Bouchoux, D. Chateau, R. Vidal, M. Rousset, J. Chambaz and S. Demignot** (2006). Adaptation of enterocytic Caco-2 cells to glucose modulates triacylglycerol-rich lipoprotein secretion through triacylglycerol targeting into the endoplasmic reticulum lumen. *Biochem J* **395**(2): 393-403.
- Pegorier, J. P., C. Le May and J. Girard** (2004). Control of gene expression by fatty acids. *J Nutr* **134**(9): 2444S-2449S.
- Peignon, G., S. Thenet, C. Schreider, S. Fouquet, A. Ribeiro, E. Dussaulx, J. Chambaz, P. Cardot, M. Pincon-Raymond and J. Le Beyec** (2006). E-cadherin-dependent transcriptional control of apolipoprotein A-IV gene expression in intestinal epithelial cells: a role for the hepatic nuclear factor 4. *J Biol Chem* **281**(6): 3560-8.
- Peng, Y., W. Akmentin, M. A. Connelly, S. Lund-Katz, M. C. Phillips and D. L. Williams** (2004). Scavenger receptor BI (SR-BI) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domain is a way station for cholesterol trafficking between cells and high-density lipoprotein. *Mol Biol Cell* **15**(1): 384-96.
- Penicaud, L., C. Leloup, A. Lorsignol, T. Alquier and E. Guillod** (2002). Brain glucose sensing mechanism and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **5**(5): 539-43.

- Perez, C. A., L. Huang, M. Rong, J. A. Kozak, A. K. Preuss, H. Zhang, M. Max and R. F. Margolskee** (2002). A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci* **5**(11): 1169-76.
- Perez-Martinez, P., J. Lopez-Miranda, J. M. Ordovas, C. Bellido, C. Marin, P. Gomez, J. A. Paniagua, J. A. Moreno, F. Fuentes and F. Perez-Jimenez** (2004). Postprandial lipemia is modified by the presence of the polymorphism present in the exon 1 variant at the SR-BI gene locus. *J Mol Endocrinol* **32**(1): 237-45.
- Perreault, N. and J. F. Beaulieu** (1998). Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* **245**(1): 34-42.
- Petit, V., L. Arnould, P. Martin, M. C. Monnot, T. Pineau, P. Besnard and I. Niot** (2007a). Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. *J Lipid Res* **48**(2): 278-87.
- Petit, V., I. Niot, H. Poirier and P. Besnard** (2007b). Fatty acids intestinal absorption: facts and uncertainties. *Nutrition Clinique et Métabolisme* **21**(1): 38-45.
- Pinto, M., S. Robine-Léon, M.D. Appay, M. Kedinger, N. Triadou, E. Dussaulx, B. Lacroix, P. Simon-Assmann, K. Haffen, J. Fogh, and A. Zweibaum** (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* **47**: 323-330.
- Poirier, H., P. Degrace, I. Niot, A. Bernard and P. Besnard** (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**(2): 368-73.
- Qin, X. and P. Tso** (2005). The role of apolipoprotein AIV on the control of food intake. *Curr Drug Targets* **6**(2): 145-51.
- Rahaman, S. O., D. J. Lennon, M. Febbraio, E. A. Podrez, S. L. Hazen and R. L. Silverstein** (2006). A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab* **4**(3): 211-21.
- Rajas, F., A. Gautier, I. Bady, S. Montano and G. Mithieux** (2002). Polyunsaturated fatty acyl coenzyme A suppress the glucose-6-phosphatase promoter activity by modulating the DNA binding of hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *J Biol Chem* **277**(18): 15736-44.
- Reaven, E., S. Leers-Sucheta, A. Nomoto and S. Azhar** (2001). Expression of scavenger receptor class B type 1 (SR-BI) promotes microvillar channel formation and selective cholesteryl ester transport in a heterologous reconstituted system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1613-8.
- Redinger, R. N.** (2003). The coming of age of our understanding of the enterohepatic circulation of bile salts. *Am J Surg* **185**(2): 168-72.
- Repa, J. J., K. E. Berge, C. Pomajzl, J. A. Richardson, H. Hobbs and D. J. Mangelsdorf** (2002). Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* **277**(21): 18793-800.
- Repa, J. J., S. D. Turley, J. A. Lobaccaro, J. Medina, L. Li, K. Lustig, B. Shan, R. A. Heyman, J. M. Dietschy and D. J. Mangelsdorf** (2000). Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* **289**(5484): 1524-9.
- Rhinds, D. and L. Brissette** (2004). The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. Defining the rules for lipid traders. *Int J Biochem Cell Biol* **36**(1): 39-77.
- Ribeiro, A., A. Archer, J. Le Beyec, A. L. Cattin, S. Saint-Just, M. Pincon-Raymond, J. Chambaz, M. Lacasa and P. Cardot** (2007). Hepatic Nuclear Factor-4, a Key Transcription Factor at the Crossroads Between Architecture and Function of

- Epithelia. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* **1**(2): 166-175.
- Ridley, A. J.** (2001). Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic* **2**(5): 303-10.
- Rigotti, A., S. L. Acton and M. Krieger** (1995). The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* **270**(27): 16221-4.
- Rigotti, A., B. L. Trigatti, M. Penman, H. Rayburn, J. Herz and M. Krieger** (1997). A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12610-5.
- Robertson, M. D., M. Parkes, B. F. Warren, D. J. Ferguson, K. G. Jackson, D. P. Jewell and K. N. Frayn** (2003). Mobilisation of enterocyte fat stores by oral glucose in humans. *Gut* **52**(6): 834-9.
- Roepstorff, C., J. W. Helge, B. Vistisen and B. Kiens** (2004). Studies of plasma membrane fatty acid-binding protein and other lipid-binding proteins in human skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* **63**(2): 239-44.
- Rolland, F., B. Moore and J. Sheen** (2002b). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* **14 Suppl**: S185-205.
- Rolland, F., J. Winderickx and J. M. Thevelein** (2001). Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* **26**(5): 310-7.
- Rolland, F., J. Winderickx and J. M. Thevelein** (2002a). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res* **2**(2): 183-201.
- Rosen, E. D., C. J. Walkey, P. Puigserver and B. M. Spiegelman** (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* **14**(11): 1293-307.
- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, W. C. Donzell, Y. S. Ying, J. R. Glenney and R. G. Anderson** (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**(4): 673-82.
- Rousset, M.** (1986). The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* **68**(9): 1035-40.
- Saeki, T., K. Matoba, H. Furukawa, K. Kirifuji, R. Kanamoto and K. Iwami** (1999). Characterization, cDNA cloning, and functional expression of mouse ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Biochem (Tokyo)* **125**(4): 846-51.
- Sahoo, D., Y. F. Darlington, D. Pop, D. L. Williams and M. A. Connelly** (2007a). Scavenger receptor class B Type I (SR-BI) assembles into detergent-sensitive dimers and tetramers. *Biochim Biophys Acta* **1771**(7): 807-17.
- Sahoo, D., Y. Peng, J. R. Smith, Y. F. Darlington and M. A. Connelly** (2007b). Scavenger receptor class B, type I (SR-BI) homo-dimerizes via its C-terminal region: fluorescence resonance energy transfer analysis. *Biochim Biophys Acta* **1771**(7): 818-29.
- Sane, A. T., D. Sinnett, E. Delvin, M. Bendayan, V. Marcil, D. Menard, J. F. Beaulieu and E. Levy** (2006). Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res* **47**(10): 2112-20.
- Sauvaget, D., V. Chauffeton, D. Citadelle, F. P. Chatelet, C. Cywiner-Golenzer, J. Chambaz, M. Pincon-Raymond, P. Cardot, J. Le Beyec and A. Ribeiro** (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**(37): 34540-8.
- Scherer, P. E., R. Y. Lewis, D. Volonte, J. A. Engelman, F. Galbiati, J. Couet, D. S. Kohtz, E. van Donselaar, P. Peters and M. P. Lisanti** (1997). Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* **272**(46): 29337-46.

- Scherer, P. E., T. Okamoto, M. Chun, I. Nishimoto, H. F. Lodish and M. P. Lisanti** (1996). Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(1): 131-5.
- Scherer, P. E., Z. Tang, M. Chun, M. Sargiacomo, H. F. Lodish and M. P. Lisanti** (1995). Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem* **270**(27): 16395-401.
- Schoonjans, K., J. S. Annicotte, T. Huby, O. A. Botrugno, E. Fayard, Y. Ueda, J. Chapman and J. Auwerx** (2002). Liver receptor homolog 1 controls the expression of the scavenger receptor class B type I. *EMBO Rep* **3**(12): 1181-7.
- Schulthess, G., S. Compassi, M. Werder, C. H. Han, M. C. Phillips and H. Hauser** (2000). Intestinal sterol absorption mediated by scavenger receptors is competitively inhibited by amphipathic peptides and proteins. *Biochemistry* **39**(41): 12623-31.
- Schwieterman, W., D. Sorrentino, B. J. Potter, J. Rand, C. L. Kiang, D. Stump and P. D. Berk** (1988). Uptake of oleate by isolated rat adipocytes is mediated by a 40-kDa plasma membrane fatty acid binding protein closely related to that in liver and gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(2): 359-63.
- Sclafani, A.** (2007). Sweet taste signaling in the gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(38): 14887-8.
- Sclafani, A., K. Ackroff and N. A. Abumrad** (2007a). CD36 gene deletion reduces fat preference and intake but not post-oral fat conditioning in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**(5): R1823-32.
- Sclafani, A., S. Zukerman, J. I. Glendinning and R. F. Margolskee** (2007b). Fat and carbohydrate preferences in mice: the contribution of alpha-gustducin and Trpm5 taste-signaling proteins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**(4): R1504-13.
- Scow, R. O., Y. Stein and O. Stein** (1967). Incorporation of dietary lecithin and lysolecithin into lymph chylomicrons in the rat. *J Biol Chem* **242**(21): 4919-24.
- Segrest, J. P., M. K. Jones, H. De Loof and N. Dashti** (2001). Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res* **42**(9): 1346-67.
- Segrest, J. P., M. K. Jones, V. K. Mishra, V. Pierotti, S. H. Young, J. Boren, T. L. Innerarity and N. Dashti** (1998). Apolipoprotein B-100: conservation of lipid-associating amphipathic secondary structural motifs in nine species of vertebrates. *J Lipid Res* **39**(1): 85-102.
- Sevin, M., G. Lesca, N. Baumann, G. Millat, O. Lyon-Caen, M. T. Vanier and F. Sedel** (2007). The adult form of Niemann-Pick disease type C. *Brain* **130**(Pt 1): 120-33.
- Shelness, G. S. and A. S. Ledford** (2005). Evolution and mechanism of apolipoprotein B-containing lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol* **16**(3): 325-32.
- Shen, L., P. Tso, S. C. Woods, R. R. Sakai, W. S. Davidson and M. Liu** (2007). Hypothalamic apolipoprotein A-IV is regulated by leptin. *Endocrinology* **148**(6): 2681-9.
- Shetty, S., E. R. Eckhardt, S. R. Post and D. R. van der Westhuyzen** (2006). Phosphatidylinositol-3-kinase regulates scavenger receptor class B type I subcellular localization and selective lipid uptake in hepatocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(9): 2125-31.
- Shiau, Y. F., P. Fernandez, M. J. Jackson and S. McMonagle** (1985). Mechanisms maintaining a low-pH microclimate in the intestine. *Am J Physiol* **248**(6 Pt 1): G608-17.

- Shneider, B. L., P. A. Dawson, D. M. Christie, W. Hardikar, M. H. Wong and F. J. Suchy** (1995). Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* **95**(2): 745-54.
- Shoulders, C. C., D. J. Stephens and B. Jones** (2004). The intracellular transport of chylomicrons requires the small GTPase, Sar1b. *Curr Opin Lipidol* **15**(2): 191-7.
- Siddiqi, S. A., F. S. Gorelick, J. T. Mahan and C. M. Mansbach, 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**(Pt 2): 415-27.
- Silver, D. L.** (2002). A carboxyl-terminal PDZ-interacting domain of scavenger receptor B, type I is essential for cell surface expression in liver. *J Biol Chem* **277**(37): 34042-7.
- Smart, E. J., R. A. De Rose and S. A. Farber** (2004). Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(10): 3450-5.
- Smart, E. J., G. A. Graf, M. A. McNiven, W. C. Sessa, J. A. Engelman, P. E. Scherer, T. Okamoto and M. P. Lisanti** (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* **19**(11): 7289-304.
- Song, K. S., P. E. Scherer, Z. Tang, T. Okamoto, S. Li, M. Chafel, C. Chu, D. S. Kohtz and M. P. Lisanti** (1996). Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem* **271**(25): 15160-5.
- Sorrentino, D., D. Stump, B. J. Potter, R. B. Robinson, R. White, C. L. Kiang and P. D. Berk** (1988). Oleate uptake by cardiac myocytes is carrier mediated and involves a 40-kD plasma membrane fatty acid binding protein similar to that in liver, adipose tissue, and gut. *J Clin Invest* **82**(3): 928-35.
- Spady, D. K., D. M. Kearney and H. H. Hobbs** (1999). Polyunsaturated fatty acids up-regulate hepatic scavenger receptor B1 (SR-BI) expression and HDL cholesteryl ester uptake in the hamster. *J Lipid Res* **40**(8): 1384-94.
- Sperry, W. M., H. Waelsch and V. A. Stoyanoff** (1940). Lipid metabolism in brain and other tissues of the rat. *J Biol Chem* **135**: 281-290.
- Stahl, A., D. J. Hirsch, R. E. Gimeno, S. Punreddy, P. Ge, N. Watson, S. Patel, M. Kotler, A. Raimondi, L. A. Tartaglia and H. F. Lodish** (1999). Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol Cell* **4**(3): 299-308.
- Stan, S., E. Delvin, M. Lambert, E. Seidman and E. Levy** (2003). Apo A-IV: an update on regulation and physiologic functions. *Biochim Biophys Acta* **1631**(2): 177-87.
- Stolarczyk, E., M. Le Gall, P. Even, A. Houllier, P. Serradas, E. Brot-Laroche and A. Leturque** (2007). Loss of Sugar Detection by GLUT2 Affects Glucose Homeostasis in Mice. *PLoS ONE* **2**(12): e1288.
- Stremmel, W.** (1988). Uptake of fatty acids by jejunal mucosal cells is mediated by a fatty acid binding membrane protein. *J Clin Invest* **82**(6): 2001-10.
- Stremmel, W., G. Lotz, G. Strohmeyer and P. D. Berk** (1985b). Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. *J Clin Invest* **75**(3): 1068-76.
- Stremmel, W., G. Strohmeyer, F. Borchard, S. Kochwa and P. D. Berk** (1985a). Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(1): 4-8.
- Stuart, L. M., S. A. Bell, C. R. Stewart, J. M. Silver, J. Richard, J. L. Goss, A. A. Tseng, A. Zhang, J. B. El Khoury and K. J. Moore** (2007). CD36 signals to the actin cytoskeleton and regulates microglial migration via a p130Cas complex. *J Biol Chem*.

- Stump, D. D., S. L. Zhou and P. D. Berk** (1993). Comparison of plasma membrane FABP and mitochondrial isoform of aspartate aminotransferase from rat liver. *Am J Physiol* **265**(5 Pt 1): G894-902.
- Swaney, J. B., F. Braithwaite and H. A. Eder** (1977). Characterization of the apolipoproteins of rat plasma lipoproteins. *Biochemistry* **16**(2): 271-8.
- Swift, L. L., M. Y. Zhu, B. Kakkad, A. Jovanovska, M. D. Neely, K. Valyi-Nagy, R. L. Roberts, D. E. Ong and W. G. Jerome** (2003). Subcellular localization of microsomal triglyceride transfer protein. *J Lipid Res* **44**(10): 1841-9.
- Tai, E. S., X. Adiconis, J. M. Ordovas, R. Carmena-Ramon, J. Real, D. Corella, J. Ascaso and R. Carmena** (2003). Polymorphisms at the SRBI locus are associated with lipoprotein levels in subjects with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Clin Genet* **63**(1): 53-8.
- Takeda, M., M. Imaizumi and T. Fushiki** (2000). Preference for vegetable oils in the two-bottle choice test in mice. *Life Sci* **67**(2): 197-204.
- Takeda, M., S. Sawano, M. Imaizumi and T. Fushiki** (2001). Preference for corn oil in olfactory-blocked mice in the conditioned place preference test and the two-bottle choice test. *Life Sci* **69**(7): 847-54.
- Tanaka, T., J. Delgado-Lista, J. Lopez-Miranda, F. Perez-Jimenez, C. Marin, P. Perez-Martinez, P. Gomez and J. M. Ordovas** (2007). Scavenger receptor class B type I (SCARB1) c.1119C>T polymorphism affects postprandial triglyceride metabolism in men. *J Nutr* **137**(3): 578-82.
- Tang, Z., P. E. Scherer, T. Okamoto, K. Song, C. Chu, D. S. Kohtz, I. Nishimoto, H. F. Lodish and M. P. Lisanti** (1996). Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* **271**(4): 2255-61.
- Temel, R. E., W. Tang, Y. Ma, L. L. Rudel, M. C. Willingham, Y. A. Ioannou, J. P. Davies, L. M. Nilsson and L. Yu** (2007). Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *J Clin Invest* **117**(7): 1968-1978.
- Thuahnai, S. T., S. Lund-Katz, D. L. Williams and M. C. Phillips** (2001). Scavenger receptor class B, type I-mediated uptake of various lipids into cells. Influence of the nature of the donor particle interaction with the receptor. *J Biol Chem* **276**(47): 43801-8.
- Todd, J. F. and S. R. Bloom** (2007). Incretins and other peptides in the treatment of diabetes. *Diabet Med* **24**(3): 223-32.
- Tondu, A. L., C. Robichon, L. Yvan-Charvet, N. Donne, X. Le Liepvre, E. Hajdouch, P. Ferre, I. Dugail and G. Dagher** (2005). Insulin and angiotensin II induce the translocation of scavenger receptor class B, type I from intracellular sites to the plasma membrane of adipocytes. *J Biol Chem* **280**(39): 33536-40.
- Tontonoz, P. and D. J. Mangelsdorf** (2003). Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* **17**(6): 985-93.
- Trigatti, B., S. Covey and A. Rizvi** (2004). Scavenger receptor class B type I in high-density lipoprotein metabolism, atherosclerosis and heart disease: lessons from gene-targeted mice. *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 1): 116-20.
- Trigatti, B. L., R. G. Anderson and G. E. Gerber** (1999). Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **255**(1): 34-9.
- Trigatti, B. L., M. Krieger and A. Rigotti** (2003). Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(10): 1732-8.
- Trotter, P. J., S. Y. Ho and J. Storch** (1996). Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. *J Lipid Res* **37**(2): 336-46.

- Tso, P. and M. Liu** (2004). Apolipoprotein A-IV, food intake, and obesity. *Physiol Behav* **83**(4): 631-43.
- Tso, P., M. Liu, T. J. Kalogeris and A. B. Thomson** (2001). The role of apolipoprotein A-IV in the regulation of food intake. *Annu Rev Nutr* **21**: 231-54.
- Tso, P., A. Nauli and C. M. Lo** (2004). Enterocyte fatty acid uptake and intestinal fatty acid-binding protein. *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 1): 75-8.
- Tsuruta, M., T. Kawada, T. Fukuwatari and T. Fushiki** (1999). The orosensory recognition of long-chain fatty acids in rats. *Physiol Behav* **66**(2): 285-8.
- Turley, S. D. and J. M. Dietschy** (2003). Sterol absorption by the small intestine. *Curr Opin Lipidol* **14**(3): 233-40.
- Ueno, H., H. Yamaguchi, M. Mizuta and M. Nakazato** (2008). The role of PYY in feeding regulation. *Regul Pept* **145**(1-3): 12-6.
- Uittenbogaard, A., W. V. Everson, S. V. Matveev and E. J. Smart** (2002). Cholesteryl ester is transported from caveolae to internal membranes as part of a caveolin-annexin II lipid-protein complex. *J Biol Chem* **277**(7): 4925-31.
- Utech, M., G. Hobbel, S. Rust, H. Reinecke, G. Assmann and M. Walter** (2001). Accumulation of RhoA, RhoB, RhoG, and Rac1 in fibroblasts from Tangier disease subjects suggests a regulatory role of Rho family proteins in cholesterol efflux. *Biochem Biophys Res Commun* **280**(1): 229-36.
- Valasek, M. A., J. Weng, P. W. Shaul, R. G. Anderson and J. J. Repa** (2005). Caveolin-1 is not required for murine intestinal cholesterol transport. *J Biol Chem* **280**(30): 28103-9.
- Varban, M. L., F. Rinninger, N. Wang, V. Fairchild-Huntress, J. H. Dunmore, Q. Fang, M. L. Gosselin, K. L. Dixon, J. D. Deeds, S. L. Acton, A. R. Tall and D. Huszar** (1998). Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(8): 4619-24.
- Voisset, C., N. Callens, E. Blanchard, A. Op De Beeck, J. Dubuisson and N. Vu-Dac** (2005). High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *J Biol Chem* **280**(9): 7793-9.
- Volek, J. S., M. J. Sharman, A. L. Gomez, T. P. Scheett and W. J. Kraemer** (2003). An isoenergetic very low carbohydrate diet improves serum HDL cholesterol and triacylglycerol concentrations, the total cholesterol to HDL cholesterol ratio and postprandial lipemic responses compared with a low fat diet in normal weight, normolipidemic women. *J Nutr* **133**(9): 2756-61.
- Wang, D. Q.** (2007). Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu Rev Physiol* **69**: 221-48.
- Wang, R., C. Cruciani-Guglielmacci, S. Migrenne, C. Magnan, V. E. Coterio and V. H. Routh** (2006). Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *J Neurophysiol* **95**(3): 1491-8.
- Watkins, P. A., J. A. Hamilton, A. Leaf, A. A. Spector, S. A. Moore, R. E. Anderson, H. W. Moser, M. J. Noetzel and R. Katz** (2001). Brain uptake and utilization of fatty acids: applications to peroxisomal biogenesis diseases. *J Mol Neurosci* **16**(2-3): 87-92; discussion 151-7.
- Webb, N. R., P. M. Connell, G. A. Graf, E. J. Smart, W. J. de Villiers, F. C. de Beer and D. R. van der Westhuyzen** (1998). SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *J Biol Chem* **273**(24): 15241-8.
- Webb, N. R., W. J. de Villiers, P. M. Connell, F. C. de Beer and D. R. van der Westhuyzen** (1997). Alternative forms of the scavenger receptor BI (SR-BI). *J Lipid Res* **38**(7): 1490-5.

- Weinman, S. A., M. W. Carruth and P. A. Dawson** (1998). Bile acid uptake via the human apical sodium-bile acid cotransporter is electrogenic. *J Biol Chem* **273**(52): 34691-5.
- Werder, M., C. H. Han, E. Wehrli, D. Bimmler, G. Schulthess and H. Hauser** (2001). Role of scavenger receptors SR-BI and CD36 in selective sterol uptake in the small intestine. *Biochemistry* **40**(38): 11643-50.
- Whited, K. L., D. Lu, P. Tso, K. C. Kent Lloyd and H. E. Raybould** (2005). Apolipoprotein A-IV is involved in detection of lipid in the rat intestine. *J Physiol* **569**(Pt 3): 949-58.
- Whited, K. L., P. Tso and H. E. Raybould** (2007). Involvement of apolipoprotein A-IV and cholecystokinin1 receptors in exogenous peptide YY3 36-induced stimulation of intestinal feedback. *Endocrinology* **148**(10): 4695-703.
- Wilson, F. A. and J. M. Dietschy** (1971). Differential diagnostic approach to clinical problems of malabsorption. *Gastroenterology* **61**(6): 911-31.
- Wisely, G. B., A. B. Miller, R. G. Davis, A. D. Thornquest, Jr., R. Johnson, T. Spitzer, A. Seffler, B. Shearer, J. T. Moore, T. M. Willson and S. P. Williams** (2002). Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids. *Structure* **10**(9): 1225-34.
- Witt, W., I. Kolleck, H. Fechner, P. Sinha and B. Rustow** (2000). Regulation by vitamin E of the scavenger receptor BI in rat liver and HepG2 cells. *J Lipid Res* **41**(12): 2009-16.
- Wong, M. H., P. Oelkers, A. L. Craddock and P. A. Dawson** (1994). Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem* **269**(2): 1340-7.
- Wong, M. H., P. Oelkers and P. A. Dawson** (1995). Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity. *J Biol Chem* **270**(45): 27228-34.
- Wu, A. L. and H. G. Windmueller** (1979). Relative contributions by liver and intestine to individual plasma apolipoproteins in the rat. *J Biol Chem* **254**(15): 7316-22.
- Wu, S. V., N. Rozengurt, M. Yang, S. H. Young, J. Sinnott-Smith and E. Rozengurt** (2002). Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 2392-7.
- Xu, Z., O. L. Tavares-Sanchez, Q. Li, J. Fernando, C. M. Rodriguez, E. J. Studer, W. M. Pandak, P. B. Hylemon and G. Gil** (2007). Activation of bile acid biosynthesis by the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK): hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  phosphorylation by the p38 MAPK is required for cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase expression. *J Biol Chem* **282**(34): 24607-14.
- Yesilaltay, A., O. Kocher, R. Pal, A. Leiva, V. Quinones, A. Rigotti and M. Krieger** (2006). PDZK1 is required for maintaining hepatic SR-BI's steady state levels but not its surface localization or function. *J Biol Chem*.
- Yesilaltay, A., O. Kocher, A. Rigotti and M. Krieger** (2005). Regulation of SR-BI-mediated high-density lipoprotein metabolism by the tissue-specific adaptor protein PDZK1. *Curr Opin Lipidol* **16**(2): 147-152.
- Yeung, S. J., S. H. Chen and L. Chan** (1996). Ubiquitin-proteasome pathway mediates intracellular degradation of apolipoprotein B. *Biochemistry* **35**(43): 13843-8.
- Yu, L., S. Bharadwaj, J. M. Brown, Y. Ma, W. Du, M. A. Davis, P. Michaely, P. Liu, M. C. Willingham and L. L. Rudel** (2006). Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake. *J Biol Chem* **281**(10): 6616-24.
- Yu, L., J. Li-Hawkins, R. E. Hammer, K. E. Berge, J. D. Horton, J. C. Cohen and H. H. Hobbs** (2002). Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary

- cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* **110**(5): 671-80.
- Zhang, E. Y., M. A. Phelps, A. Banerjee, C. M. Khantwal, C. Chang, F. Helsper and P. W. Swaan** (2004). Topology scanning and putative three-dimensional structure of the extracellular binding domains of the apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2). *Biochemistry* **43**(36): 11380-92.
- Zhang, J. and H. Herscovitz** (2003). Nascent lipidated apolipoprotein B is transported to the Golgi as an incompletely folded intermediate as probed by its association with network of endoplasmic reticulum molecular chaperones, GRP94, ERp72, BiP, calreticulin, and cyclophilin B. *J Biol Chem* **278**(9): 7459-68.
- Zhao, G. Q., Y. Zhang, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, I. Erlenbach, N. J. Ryba and C. S. Zuker** (2003). The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* **115**(3): 255-66.
- Zittel, T. T., R. De Giorgio, C. Sternini and H. E. Raybould** (1994). Fos protein expression in the nucleus of the solitary tract in response to intestinal nutrients in awake rats. *Brain Res* **663**(2): 266-70.
- Zucco, F., A. F. Batto, G. Bises, J. Chambaz, A. Chiusolo, R. Consalvo, H. Cross, G. Dal Negro, I. de Angelis, G. Fabre, F. Guillou, S. Hoffman, L. Laplanche, E. Morel, M. Pincon-Raymond, P. Prieto, L. Turco, G. Ranaldi, M. Rousset, Y. Sambuy, M. L. Scarino, F. Torreilles and A. Stamatii** (2005). An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of Caco-2 cell lines. *Altern Lab Anim* **33**(6): 603-18.
- Zweibaum, A.** (1986). Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cell lines : negative modulation by D-glucose. In *Ion-Gradient-Coupled Transport. Vol. INSERM Symposium 26. F. Alvarado and C.H. Van Os, editors. Elsevier Science, Amsterdam, New York, Oxford.* 345-352.