



HAL
open science

Rôles des lipides alimentaires sur l'intestin : métabolisme, inflammation et fonction de barrière

Sara Ghezzal

► **To cite this version:**

Sara Ghezzal. Rôles des lipides alimentaires sur l'intestin : métabolisme, inflammation et fonction de barrière. Endocrinologie et métabolisme. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS436 . tel-02963887

HAL Id: tel-02963887

<https://theses.hal.science/tel-02963887>

Submitted on 12 Oct 2020

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale « Physiologie Physiopathologie et Thérapeutique »

Centre de Recherche des Cordeliers

Equipe A. Leturque : « Physiopathologies intestinales : nutrition et fonction de barrière »

Thèse de doctorat

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de Sorbonne Université

Spécialité : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Rôles des lipides alimentaires sur l'intestin : métabolisme, inflammation et fonction de barrière

par

Sara Ghezzal

Dirigée par le Dr Véronique Carrière

Présentée et soutenue publiquement le 10 octobre 2018

Devant un jury composé de :

Pr Philippe Cardot

Pr Isabelle Niot

Pr Giulio G. Muccioli

Dr Anne-Françoise Burnol

Pr Dominique Rainteau

Dr Véronique Carrière

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directrice de thèse

RESUME

L'obésité est associée à un état inflammatoire chronique évoluant à bas bruit, qui contribue aux complications métaboliques observées dans cette pathologie. L'origine de l'inflammation systémique présente à un niveau subclinique chez les sujets obèses, est mal connue. La présence d'une endotoxémie, signant le passage de fragments bactériens à travers la muqueuse intestinale, chez des patients obèses ou des rongeurs soumis à un régime riche en lipides, a permis d'émettre l'hypothèse d'un rôle de l'intestin et des lipides alimentaires dans l'initiation de cette inflammation. Des travaux réalisés sur modèles murins montrent que la composition du régime hyperlipidique module l'inflammation systémique et l'endotoxémie, un régime riche en acides gras saturés étant considéré comme particulièrement délétère. L'objectif de ma thèse a été de déterminer si un apport à court terme de lipides alimentaires, et en particulier d'acides gras saturés, pouvait conduire à des altérations de la barrière intestinale, qui en retour faciliteraient le passage de pathogènes ou de fragments bactériens, activant le système immunitaire localement et en systémique.

J'ai étudié chez la souris l'impact d'un apport aigu ou répété à court terme d'huile de palme, riche en acides gras saturés, sur la perméabilité épithéliale intestinale, l'état des jonctions intercellulaires, l'expression de marqueurs inflammatoires et la composition du microbiote. J'ai observé qu'un apport unique d'huile de palme suffit à augmenter la perméabilité intestinale aux macromolécules et à perturber la localisation des protéines de jonction. L'apport répété d'huile de palme pendant 4 jours exacerbent ces effets et modifie l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (IL-1 β , Gata-3 et Reg-3 γ). Un apport répété d'huile de palme modifie également l'abondance de plusieurs espèces bactériennes du microbiote intestinal. Pour déterminer si les effets observés sur la barrière épithéliale intestinale sont spécifiquement dépendants de l'impact de l'acide palmitique, j'ai étudié les conséquences d'un apport aigu et répété de cet acide gras sur un modèle de cellules épithéliales intestinales humaines: la lignée Caco-2/TC7. J'ai montré que 24h de traitement des cellules Caco-2/TC7 par de l'acide palmitique apporté sous forme de micelles suffisent à altérer la barrière intestinale épithéliale et à augmenter l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-8. Aucun de ces effets n'a été observé lorsque l'acide oléique, un acide gras mono-insaturé est utilisé au lieu de l'acide palmitique. L'étude des mécanismes moléculaires révèle l'implication de la voie de synthèse des céramides dans les effets de l'acide palmitique sur l'expression de l'IL-8 dans les cellules Caco-2/TC7. Mes travaux ont permis de montrer sur modèle murin et sur modèle cellulaire qu'un apport unique d'acides gras saturés suffit à perturber la barrière épithéliale intestinale et à moduler localement l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Les études réalisées dans la lignée cellulaire Caco-2/TC7 montrent que les effets de l'acide palmitique peuvent s'exercer indépendamment du rôle du microbiote et des cellules immunitaires.

J'ai également participé à un travail visant à déterminer les mécanismes précoces mis en place lors de la détection des lipides alimentaires par le récepteur SR-B1 dans les cellules Caco-2/TC7. Nous avons montré un rôle de SR-B1 dans l'homéostasie cellulaire du cholestérol et identifier des partenaires lipidiques et protéiques présents dans les « rafts » impliqués dans la détection des lipides.

L'ensemble de mes résultats ouvre la voie à de nouvelles études qui permettront de préciser les différents processus cellulaires induits précocement en réponse aux lipides alimentaires afin de distinguer ceux qui entraînent des effets transitoires et réversibles, des réponses adaptatrices bénéfiques pour la fonction de barrière, ou enfin des effets délétères à plus long terme impactant l'organisme entier.

Mots-clés : intestin, barrière intestinale, jonctions serrées, inflammation, lipides alimentaires, maladies métaboliques

Abstract

Obesity is associated with chronic low-grade inflammation, which contributes to metabolic disorders. However, the origin of systemic inflammation observed at a subclinical level in obese patients is still unclear. Studies in obese patients and rodents submitted to a high-fat diet reveal an increase of endotoxemia, which is characterized by the translocation through the intestinal mucosa of bacteria wall fragments. This observation suggests an important role of the intestine and dietary lipids in the onset of inflammation. Moreover, the lipid composition of diet modulates systemic inflammation and endotoxemia levels. Indeed, mice fed a high-fat diet enriched with palm oil resulted in the greatest inflammatory outcomes, indicating the deleterious effect of this oil. The aim of my thesis was to determine whether a short-term lipid supply, rich in saturated fatty acid, could compromise the intestinal barrier integrity, which could in turn increase the endotoxin passage through the intestinal mucosa, activate the immune system and trigger local or systemic inflammation.

In mice, I studied the effect of a single or repeated supply of palm oil on intestinal permeability, cell-cell junctions, inflammatory markers and microbiota composition. My results showed that a single supply of palm oil is sufficient to increase intestinal permeability and to alter the subcellular localization of several junctional proteins. A repeated supply during 5 days exacerbates these deleterious effects and modulates the expression of genes involved in inflammatory responses (IL-1 β , Gata-3, Reg-3 γ). This repeated supply of palm oil modifies the abundance of several bacteria species of the intestinal microbiota. To determine if these damaging effects on intestinal barrier are specific to palmitic acid, I studied its impact on a polarized monolayer of the human intestinal epithelial cell line, the Caco-2/TC7 cells. The results indicated that a 24-h exposure to palmitic acid, provided as lipid micelles, is sufficient to alter the epithelial barrier and to increase the IL-8 cytokine mRNA level. By contrast, a treatment with oleic acid, a mono-unsaturated fatty acid did not affect these parameters. The investigation of the molecular mechanisms induced by palmitic acid in the Caco-2/TC7 cells revealed the involvement of the *de novo* ceramide synthesis pathway in the IL-8 cytokine expression. Altogether, these studies conducted on mice and intestinal epithelial cells demonstrated that a single saturated fatty acid supply is sufficient to alter the intestinal epithelial barrier integrity and to increase pro-inflammatory cytokine expression. The studies performed in Caco-2/TC7 cells showed that palmitic acid can exert some deleterious effects independently of microbiota and immune cell interactions.

I also participated in a work aiming to clarify the early molecular events involved in the detection of dietary lipids by the scavenger receptor SR-B1 in Caco-2/TC7 cells. The findings provided new insights into the role of SR-B1 on cellular cholesterol homeostasis and identified new lipids and proteins actors located on lipid rafts domains on the SR-B1-dependent lipid sensing.

Altogether, my results pave the way for further studies aiming at specifying the various early-induced cellular processes in response to dietary lipids in order to distinguish between those that cause transient and reversible effects, adaptive responses that are beneficial for barrier function, or deleterious effects in the longer term impacting the whole organism.

Keywords: intestine, intestinal barrier, tight junctions, inflammation, dietary lipids, metabolic diseases

SOMMAIRE

Table des matières

Remerciements	3
Abréviations	6
Contexte générale	8
Introduction	
I. Organisation anatomique et fonctionnelle de l'intestin	12
1) Anatomie et histologie de l'intestin.....	12
2) L'épithélium intestinal.....	14
3) Tissu lymphoïde associé à l'intestin.....	18
II. Les fonctions majeures de l'intestin	19
1) Fonction d'absorption des nutriments.....	19
2) Fonction endocrine.....	25
3) Fonction de barrière.....	26
III. Modulateurs de l'intégrité de la barrière intestinale	36
1) Cytokines et fonction de barrière.....	37
2) Microbiote et fonction de barrière.....	39
3) Lipides et fonction de barrière.....	41
4) Barrière intestinale altérée : un élément initiateur de l'inflammation intestinale et systémique au cours de l'obésité ?.....	44
Objectifs	46
Résultats	48
I. Effet d'un acide gras saturé sur l'intégrité de la barrière intestinale et sur l'initiation de l'inflammation.....	48
<i>Article 1</i>	
II. Etude des mécanismes précoces mis en jeu dans la détection des lipides par le récepteur scavenger SR-B1 dans la lignée entérocytaire Caco-2/TC7.....	56
<i>Article 2</i>	
Discussion	60
Conclusion et perspectives	74
Références	77
Annexe Article Médecine/Science	93

SOMMAIRE

Table des figures

- Figure 1 :** Pathologies et complications médicales liées à l'obésité
- Figure 2 :** Organes et structures appartenant au tractus gastro-intestinal.
- Figure 3 :** Anatomie et surface d'échange de l'intestin grêle chez l'Homme.
- Figure 4 :** Anatomie du côlon chez l'Homme.
- Figure 5 :** Organisation histologique générale de la paroi intestinale chez l'Homme
- Figure 6 :** Types et structures cellulaires de la muqueuse intestinale.
- Figure 7 :** Principales étapes de la digestion et de l'absorption des lipides alimentaires.
- Figure 8 :** Principales étapes de l'absorption des lipides alimentaires par les entérocytes.
- Figure 9 :** Représentation schématique des jonctions cellulaires reliant les cellules épithéliales intestinales
- Figure 10 :** La perméabilité intestinale régulée principalement par les jonctions intercellulaires.
- Figure 11 :** Graphique représentant l'épaisseur des couches de mucus le long du tractus gastro-intestinal chez le rat.
- Figure 12 :** Arbre phylogénétique des microorganismes composant le microbiote présent dans le côlon chez l'Homme avec les principaux phyla bactériens.
- Figure 13 :** Effet d'un apport aigu ou répété d'huile de palme sur l'endotoxémie
- Figure 14 :** Effet d'un apport aigu ou répété d'huile de palme sur des marqueurs circulants de l'endotoxémie.
- Figure 15 :** Impact d'un apport unique d'huile de palme sur la perméabilité intestinale mesurée *in vivo* chez des souris transgéniques CA-MLCK.
- Figure 16 :** Comparaison des effets d'apports aigus et répétés d'huile de palme et d'huile d'olive sur la perméabilité intestinale mesurée *in vivo* chez la souris.
- Figure 17 :** Description de mécanismes possibles conduisant à l'altération des complexes jonctionnels par les cytokines dans des cellules épithéliales intestinales
- Figure 18 :** Principales voies de synthèses des céramides dans la cellule épithéliale intestinal

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté mon invitation.

Je remercie ma rapportrice Professeure Isabelle Niot de l'université de Bourgogne/AgroSup Dijon qui a également été mon experte scientifique pour ma mi-thèse. Je remercie mon rapporteur Professeur Giulio G. Muccioli de l'université catholique de Louvain d'être venu de si loin pour m'écouter. Je remercie le Docteur Anne-Françoise Burnol de l'institut Cochin d'avoir accepté d'être mon examinatrice ainsi que mon tuteur Docteur Dominique Rainteau de l'hôpital St Antoine d'avoir accepté d'être mon examinateur. Je remercie le Professeur Philippe Cardot de Sorbonne Université d'avoir présidé ce jury. Je ne remercierai jamais assez ma directrice de stage de master 2 et de thèse pour cette belle aventure, Docteur Véronique Carrière (« ma Véro »).

Un grand merci à vous pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, c'est un honneur et un plaisir, recevez ici le témoignage de mon profond respect.

Je tiens à remercier ma tutrice de stage de master 1, Professeure Chantal Bémour du centre de recherche du centre hospitalier de l'université de Montréal de m'avoir donné l'opportunité de découvrir l'environnement de la Recherche en laboratoire. Merci à toute cette merveilleuse équipe ! Merci à vous Chantal et Christopher de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire. Merci à Mélanie, Cristina, Marc-André, Rafaela, Léandro, Cristiane, Fatma, Valérie et ma chère Amani (« Mamani ») !

Merci pour cette chaleureuse (même avec -25°C) et inoubliable aventure !

Merci à toute l'équipe d'Armelle Leturque ! Merci à toi Armelle pour tes conseils avisés, je resterai toujours émerveillée par ta perspicacité et tes idées lumineuses ! Merci de m'avoir permis de participer à des congrès pour présenter mes travaux de thèse et d'y avoir remporté des prix qui sont aussi le fruit d'un travail commun (de tous ces petits détails jusqu'aux couleurs sur les dia des répétés). Merci à toi Véro pour ta confiance, ton encadrement durant plus de trois ans, ta disponibilité, tes conseils, ton aide, ta gentillesse, ta grande générosité, ton soutien et ta compréhension dans ces moments qui ont été pour moi très douloureux. Je n'oublierai jamais ce jour où quand Michel t'a demandé : « Alors tes filles ? », tu as répondu : « La première passe ses exams, la seconde le bac et la troisième le concours de l'école doctorale » j'étais tellement touchée ce jour-là... Sache que tu es pour moi plus qu'une encadrante ! Merci également à toi Sophie pour ton aide, tes conseils, ton œil d'experte pour ces « T_J protéins » au microscope, tes corrections pour ce manuscrit avec Véro bien-sûr ;) pas facile de satisfaire tous les points de vue mais j'ai fait de mon mieux ;)

Merci à toute l'équipe actuelle : Agnès (y'en avait des coquilles dans l'intro), Alex et Patricia (c'est une chance que je vous ai eues en tant que MCU et Professeure, vos conseils m'ont menés jusqu'ici... MERCI), Michèle (tes conseils, nos échanges scientifiques et philosophiques, tes woman-show spectaculaires without improvisation !), Nana (nos déjeuners tardifs), Sylvie (tes retours d'expérience et tes conseils pour mener à bien mes enseignements en tant que chargée de mission enseignement), « Professeur Soula, mes respects » (ton humanisme, tes recettes écolo, et bien sûr tes cours de stat !), Véro D. (ton soutien notamment administratif et ces ordres de mission), les miss Dior Carine et Marielle (votre dynamisme et vos encouragements), Marie (ton sourire et tes bons acras !).

Merci « les djeuns » : Céline (à ma 1^{ère} plaque de PCR ;)), Bárbara et Sami (ce « bureau des jeunes » ne sera bientôt que de beaux souvenirs, à nos woks et resto RU inoubliables, ces matchs « du Braziiil ! »), Ingrid (MERCI pour ton tuto « How to do a summary with Word ? » vraiment un grand merci pour cette précieuse aide et ton soutien !), Doriane (tu nous as régals !), Léa (je te promets prochain objectif ta recette « mignardise au chocolat »), à tous ces bons moments passés ensemble, je vous souhaite une belle poursuite et à notre prochaine sortie (cette fois j'y serai lol) !

Bárbara merci pour tout ! J'ai été heureuse d'avoir partagé plus que des « transwell plates » ;) Je te souhaite une belle fin de thèse et un avenir rempli de joie et de bonheur !

Et merci à tous mes anciens collègues : Monique (notre « médecin » spécialiste des Caco-2/TC7), Kévin (tes conseils d'optimisation de marquage IF : perfect), Lauriane (pour tes encouragements pleins de peps, il m'a porté chance je te garantis que je vais le garder encore un moment), Myriam (nos histoires bien drôles haya ! et toutes nos torsades chez Soubise « Oui docteur » me disait-il, « on going » lui répondais-je), Charlotte (que dire de ton carotte-cake exquis !), Danielle et Edith (vos encouragements et conseils), Béa (je n'oublierai jamais cette 1^{ère} manip au microtome et ce magnifique marquage de l'intestin à l'hématoxyline éosine), et merci à nos nombreux stagiaires (Rami, Claire, Ihab, Léa, Deir Jiun, Atoussa, Adélaïde, Kathleen...)

Merci à l'équipe de Fabienne Foufelle du Centre de Recherche des Cordeliers et en particulier à Isabelle, Mengyue, Frank, Kamel et Cécile pour votre partage lorsque j'étais désespérément à la recherche d'une machine PCR quand le « Sratagene » nous a quitté.

Merci à nos collaborateurs : merci à l'équipe de P. Seksik (hôpital St Antoine, Paris) et en particulier un grand merci à Philippe, Elodie et Loïc pour l'analyse des résultats du microbiote de nos souris, merci à Marie-Caroline Michalski et Fabienne Laugerette (UMR 1060, Lyon) pour le dosage des endotoxines plasmatiques en LAL et à Jean-Paul Pais de Barros (UMR 866, Dijon) pour le dosage par spectrophotométrie de masse du myristate plasmatique, à Valérie Alquier-Blacqué et Laurent Ferrier (INRA TOXALIM, Toulouse) pour la mesure de perméabilité des souris CA-MLCK et à Jerrold Turner (Université de Chicago, USA) pour avoir fourni gracieusement les souris CA-MLCK.

Merci aux équipes des plateformes : du Centre d'Histologie, d'Imagerie et de Cytométrie « CHIC » merci à Christophe, Kévin, et Estelle ; du Centre d'Explorations Fonctionnelles « CEF » merci à Valérie, Sonia, Carole, Sabrina, Georges, Charlotte, et tous les membres du CEF.

Merci à nos souris, oui oui vous y avez contribuées corps et âmes (comme moi) ! A nos Caco et leurs caprices malgré tous nos petits soins quotidiens.

Merci aux membres organisateurs du comité des « Journées de l'Ecole Doctorale » avec qui j'ai eu le plaisir d'organiser ces deux journées de congrès et d'avoir eu l'opportunité de rédiger un article dans la revue

médecine/sciences : Jules, Annaelle, Bárbara, Sami, Ray, Cécile, Elodie, Hélène et Marion. Merci à Dominique Belle et aux directrices de l'école doctorale « Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique » de nous avoir conseillés pour mener à bien ce congrès.

Merci à mes étudiants de Sorbonne Université de L1 pour votre confiance, j'espère que vous trouverez votre voie. Merci à mes étudiants de L2, j'espère vous avoir transmis ma passion pour la Science et la Recherche. Vous aussi vous m'en avez appris. Je vous souhaite la réussite

A mes amis et ma famille, un grand merci !!!

Merci pour votre soutien, mes cousines Israe, Hajar, Nassiba, Soussou (ma Fiona), Mimi plus que des liens de sang ! Merci pour vos encouragements sans faille durant ces trois années (et bien plus !) et merci pour ces bons plats (1 semaine de plus et il aurait fallu refaire toute ma garde-robe) ;)

Mariame, Mamou, Ilhame, Oustadha, Fidèle, tata Menana, toutes mes sœurs et toutes les personnes qui de prêt ou de très loin m'ont soutenue et encouragée, merci !

Merci Abdoul et Mariame !

Merci,

A toi tonton Bwa, tonton Si Mohammed, tata Halima, mes cousins, ma famille,

A ceux et celles qui sont déjà partis, Paix sur votre âme,

A toi que j'ai dû faire attendre,

A toi qui m'a attendue, pour ta patience et tes mots doux qui ont su me redonner sourire et espoir,

A mes bibichettes,

A ma douce sœur Salma et ma belle-sœur Farida,

A mes tendres frères Ayoub et Zouzou, et mon beau-frère Youcef,

A mes parents que je chéris plus que tout, Mama, Papa pour tout vraiment tout merci !

Je crois que je vais m'arrêter là... je ne vois plus clair... trop d'émotions... trop de larmes... de joie !

Papa, Mama cette thèse c'est la vôtre !

A Toi et pour Toi.

ABBREVIATIONS

AGCC	acides gras à courtes chaînes
AGLC	acides gras à longues chaînes
AKK	<i>Akkermansia muciniphila</i>
Apo	apolipoprotéine
CARD	caspase recruitment domain-containing protein
CCK	cholécystokinine
CD	clusters ou classes de différenciation
CEE	cellules entéroendocrines
CHOP	C/EBP homologous protein
CM	chylomicron
DGAT	diacylglycérol acyltransferase
DSS	dextran sulfate de sodium
DTT	dithiothreitol
Erk	extracellular signal-regulated kinases
FABP	fatty acid binding protein
FABPpm	plasma membrane fatty acid binding protein
FAT	fatty acid transporter
FATP	fatty acid-transporter protein
FD4	fluorescein isothiocyanate-dextran 4 kDa
GADD153	growth arrest and DNA damage-inducible protein
GALT	gut-associated lymphoid tissue
GIP	glucose-dependent insulintropic peptide ou gastric inhibitory polypeptide
GLP-1	glucagon-like peptide-1
GLP-2	glucagon-like peptide-2
GPAT	glycérolphosphate acyltransferase
GPR	récepteur couplé aux protéines G
HDL	high density lipoprotein
ICAM	intracellular adhesion molecule
IgA	immunoglobuline de type A
IFN- γ	interféron- γ
IL	interleukine
iNOS	inducible nitric oxide synthase
JAM	junctional adhesion molecule
LDL	low density lipoprotein
LPS	lipopolysaccharides
LBP	lipopolysaccharides-binding protein
MAP	mitogen-activated protein
MG	monoacylglycérol
MGAT	monoacylglycérol acyltransferase
MICI	maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MLC	myosin light chain
MLCK	myosin light chain kinase
MTP	microsomal triglyceride transfert protein
NASH	non alcoholic steatohepatitis
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NK	natural killer
NLR	nucleotide-binding leucine-rich repeat-containing receptors
NOD	nucleotide oligomerization domain
NPC1L1	the Niemann-Pick c1 like 1

ABBREVIATIONS

OMS	organisation mondiale de la santé
PAMP	pathogen associated molecular pattern
p38MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase
PrPc	protéine cellulaire du prion
PRR	pattern recognition receptor
PYY	peptide YY
RE	réticulum endoplasmique
Reg3- β	regenerating islet-derived protein 3-beta
Reg3- γ	regenerating islet-derived protein 3-gamma
RELM- β	resistin-like molecule-beta
SMAD	small mothers against decapentaplegic
SNE	système nerveux entérique
SR-B1	scavenger receptor class B type 1
SR-B2	scavenger receptor class B type 2
Src	src protein
STAT	signal transducer and activator of transcription proteins
TAMPs	tight junction-associated marvel domain-containing proteins
TEER	transepithelial electrical resistance
TGF- β	transforming growth factor-beta
TLR	toll like receptor
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha
VLDL	very low density lipoprotein
ZO	zonula occludens

CONTEXTE GENERAL

CONTEXTE GENERAL

Les maladies métaboliques telles que l'obésité et le diabète sont en constante augmentation. En effet, à l'échelle mondiale la prévalence de l'obésité a presque triplé depuis 1975. Autrefois considérée comme une pathologie n'atteignant que les pays à haut revenu, elle est désormais en augmentation dans les pays à revenu faible ou intermédiaire. De plus, elle affecte non seulement les adultes mais de plus en plus les enfants et adolescents chez lesquels la prévalence est passée de 4% en 1975 à plus de 18% en 2016 (Organisation Mondiale de la Santé (OMS), Obésité et surpoids, Aide-mémoire N°311, Octobre 2017). De multiples causes peuvent expliquer cette inflation : changement de comportement alimentaire et mode de vie avec une alimentation transformée principalement riche en sucres et en lipides, rythme de vie, mondialisation, sédentarité et manque d'activité physique. Selon l'OMS, 35 % des adultes dans le monde sont atteints d'obésité ou de surpoids. En 2016, plus de 1,9 milliard d'adultes étaient en surpoids dont 650 millions étaient obèses (OMS, Obésité et surpoids, Aide-mémoire N°311, Octobre 2017). En 2012, 32,3% des Français de 18 ans et plus sont en surpoids ($25 \leq \text{IMC} < 30 \text{ kg/m}^2$) et 15% présentent une obésité ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (Enquête épidémiologique sur le surpoids et l'obésité « ObEpi-Roche 2012 : enquête nationale sur l'obésité et le surpoids »).

L'obésité est associée à l'apparition d'autres désordres métaboliques qui représentent des facteurs de risques de développement des maladies cardiovasculaires ou de cancers. Parmi ses complications, le diabète de type 2, l'hypertension artérielle, une dyslipidémie, des difficultés respiratoires telles que le syndrome d'apnée du sommeil, sont souvent retrouvés chez les sujets obèses (figure 1). De plus, il est établi que l'obésité est associée à un état inflammatoire chronique évoluant à bas bruit. Cette inflammation chronique, bien que présente à un niveau subclinique, contribuerait aux dysfonctionnements des fonctions cellulaires et aux complications métaboliques associées à l'obésité. Il est donc primordial de comprendre les mécanismes impliqués dans l'initiation et le maintien de cette inflammation de bas grade.

De multiples travaux ont émergé ces dernières années pour caractériser l'inflammation tissulaire et comprendre l'origine de l'inflammation systémique de bas grade qui surviennent au cours de l'obésité.

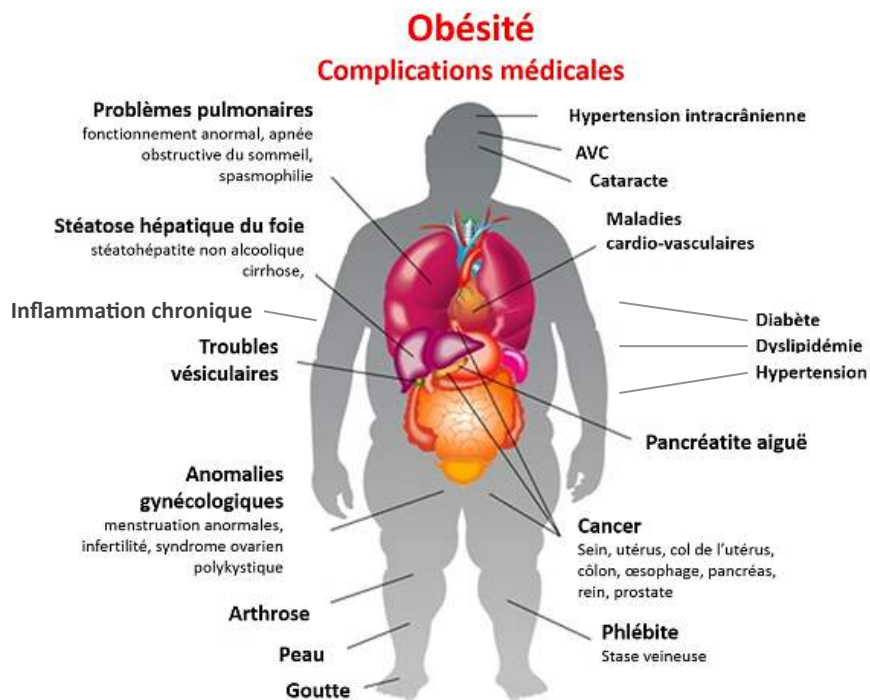


Figure 1: Pathologies et complications médicales liées à l'obésité.

L'obésité est un facteur de risques de développement des maladies cardiovasculaires et métaboliques telles que le diabète de type 2 avec une prédisposition aux cancers notamment colique.

CONTEXTE GENERAL

Le tissu adipeux considéré jusqu'à relativement récemment comme simple réservoir énergétique, a été particulièrement étudié à la fois comme un tissu présentant une inflammation mais aussi comme un tissu pouvant contribuer à l'inflammation systémique de bas grade (Stolarczyk 2017). En effet, les adipocytes, au-delà de stocker les triglycérides, jouent plusieurs rôles métaboliques dans la régulation de certaines fonctions physiologiques de l'organisme. Ils ont en particulier la capacité de sécréter des hormones qui régulent la masse grasse chez les individus sains. Ils sont également capables chez l'obèse de libérer dans le milieu environnant des facteurs chimioattractants permettant le recrutement de cellules immunitaires et le déclenchement d'une inflammation au sein du tissu adipeux (Greenberg and Obin 2006; Ouchi *et al.* 2011). Le tissu adipeux contient également des cellules immunitaires résidentes (lymphocytes Treg, macrophages) qui participeraient en condition physiologique aux fonctions métaboliques de ce tissu (Ferrante 2013). L'activation de ce système immunitaire est considérée comme une étape précoce dans l'installation de l'insulino-résistance qui surviendrait avant l'hypertrophie des adipocytes. Un recrutement de cellules immunitaires, en particulier de macrophages, est de plus observé au cours de l'obésité (pour revue Stolarczyk 2017). Ainsi l'accroissement du tissu adipeux au cours de l'obésité conduit à un déséquilibre dans la production des molécules anti- et pro-inflammatoires en faveur de facteurs pro-inflammatoires qui contribueraient à l'inflammation systémique de bas grade.

Le foie peut aussi être affecté lors de l'obésité qui provoque, suite à l'accumulation de graisse dans ce tissu, une stéatose-hépatite non alcoolique (NASH). La NASH, qui associe stéatose et inflammation, est étroitement associée au syndrome métabolique regroupant l'obésité abdominale, la résistance à l'insuline, la dyslipidémie et l'hypertension artérielle (Asrih and Jornayvaz 2015). La prévalence de cette maladie hépatique est élevée chez les patients obèses (Vernon *et al.* 2011). L'évolution de cette pathologie peut conduire à une cirrhose puis à un hépatocarcinome. Les macrophages résidents du foie (cellules de Kupffer) joueraient un rôle important dans l'apparition de la NASH (Reid *et al.* 2016). Cependant des résultats contradictoires sur leur état d'activation dans l'obésité et la NASH ont été rapportés. En effet, il a été montré dans un modèle murin d'obésité induite par un régime hyperlipidique, que l'accumulation de lipides dans les cellules de Kupffer oriente leur phénotype vers un profil pro-inflammatoire (Leroux *et al.* 2012) mais ceci serait cependant très dépendant du régime alimentaire et des changements du microbiote intestinal (Ferrere *et al.* 2016).

CONTEXTE GENERAL

Le muscle qui joue un rôle important dans l'homéostasie du glucose a été également beaucoup étudié puisque la résistance à l'insuline du muscle squelettique est souvent associée à l'obésité (Wu and Ballantyne 2017). Le muscle squelettique est capable de sécréter des cytokines et myokines qui participent au fonctionnement physiologique de ce tissu. Les cytokines et myokines produites localement agissent *via* un effet autocrine sur les cellules musculaires mais aussi *via* un effet paracrine sur les autres tissus. L'origine de cette inflammation qui survient au cours de l'obésité reste très mal connue mais pourrait être liée à l'augmentation du tissu adipeux à proximité des fibres musculaires (Wu and Ballantyne 2017).

Un travail récent de notre équipe a par ailleurs mis en évidence pour la première fois une inflammation intestinale chez l'Homme obèse (Monteiro-Sepulveda *et al.* 2015). Cette inflammation se caractérise par une infiltration de lymphocytes T dans la muqueuse épithéliale et est corrélée avec plusieurs perturbations métaboliques comme la présence d'une dyslipidémie. Il a été montré que ces cellules immunitaires émettent des cytokines qui inhibent la sensibilité à l'insuline des entérocytes (cellules épithéliales absorbantes de l'intestin) (Monteiro-Sepulveda *et al.* 2015).

Si tous ces tissus, et en particulier le tissu adipeux, contribuent *via* la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires à l'inflammation systémique de bas grade observée au cours de l'obésité, depuis une dizaine d'année le rôle de l'intestin dans l'étiologie de cette inflammation a été avancé. La mise en évidence d'une endotoxémie métabolique, caractérisée par un taux plus élevé que la normale de fragments bactériens dans la circulation, par l'équipe de N. Delzenne (Cani *et al.* 2007) a souligné le rôle de la barrière intestinale et des changements du microbiote dans l'inflammation de bas grade. Bien que la présence d'une endotoxémie chez l'Homme obèse reste controversée, de nombreuses études sur des modèles murins rendus obèses par un régime hyperlipidique étayent l'observation originale (pour revue Araújo *et al.* 2017). Depuis les travaux de P. Cani, d'autres études (Hamilton *et al.* 2015; Johnson *et al.* 2015) ont suggéré qu'un défaut de la barrière intestinale est un événement précoce qui apparait bien avant l'obésité dans des modèles de rongeurs soumis à un régime hyperlipidique. Un rôle direct des lipides a été avancé puisqu'une augmentation de l'endotoxémie et de cytokines pro-inflammatoires ont été observés après une seule charge en lipides chez l'Homme sain (Erridge *et al.* 2007; Laugerette *et al.* 2011; Vors *et al.* 2015) et le rongeur (Ghoshal *et al.* 2009). Une étude récente de notre équipe montre également que si les

CONTEXTE GENERAL

sujets obèses présentent à l'état basal des défauts subtils de la barrière intestinale, ceux-ci sont exacerbés après une charge en lipides (Genser *et al.* 2018).

Dans ce contexte, mon travail de thèse fut d'étudier le rôle des lipides alimentaires dans les perturbations de la barrière intestinale et dans l'initiation de l'inflammation intestinale et systémique. Mon objectif était d'étudier les étapes précoces impliquées dans l'apparition de ces événements bien avant l'apparition de l'obésité. J'ai en particulier recherché, au-delà des relations de cause à effet, les mécanismes moléculaires mis en jeu. Au cours de ma thèse j'ai également participé à un travail sur la détection des lipides par les entérocytes et dont le rôle potentiel dans les défauts de barrière observés au cours de l'obésité sera discuté.

INTRODUCTION

I. Organisation anatomique et fonctionnelle de l'intestin

L'appareil digestif ou tractus gastro-intestinal, débute par la cavité buccale et est suivi du pharynx, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle constitué de trois segments (duodénum, jéjunum et iléon), du côlon et se termine par le rectum et l'anus. Le système digestif est associé à d'autres organes tels que le foie, la vésicule biliaire ou le pancréas qui interviennent également dans les processus physiologiques en particulier lors de la digestion par la sécrétion de différentes hormones et enzymes digestives (figure 2).

1) Anatomie et histologie de l'intestin

Chez l'Homme, l'intestin grêle présente des anses intestinales qui permettent à cet organe long de 6 mètres environ et de 3 à 5cm de diamètre d'être serpenté dans la cavité abdominale. Chez la souris C57BL/6, il mesure entre 35 et 45 cm. Chez l'Homme, des replis de la muqueuse intestinale appelés valvules conniventes d'une hauteur d'un cm environ vont tripler la superficie (1m^2 / valvule connivente). Du point de vue histologique, les villosités intestinales d'un millimètre de haut augmentent d'un facteur 10 la surface d'échange. Enfin d'un point de vue cytogique, sur chaque entérocyte, la présence de microvillosités hautes d'un micron environ va multiplier la surface par 500 (figure 3). Ainsi, la surface d'échange de l'épithélium intestinal, amplifiée par ces différents niveaux de repliements, est estimée à environ 32m^2 , soit l'équivalent d'un terrain de badminton (Helander and Fändriks 2014).

L'intestin grêle est composé de trois segments successifs : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le duodénum, du latin *duodenum digitorum* « douze doigts », s'appelle ainsi en raison de sa longueur comparable à la largeur de douze doigts soient environ 25cm chez l'Homme. Il se situe entre le pylore de l'estomac et l'angle duodéno-jéjunal (angle de Treitz). Les sécrétions pancréatiques contenant les enzymes digestives, et hépatiques contenant les acides biliaires se déversent dans le duodénum au niveau du sphincter d'Oddi *via* le canal de Wirsung et le canal cholédoque respectivement. Le duodénum, comme les autres segments de l'intestin, est également capable de sécréter du mucus pour protéger sa muqueuse des agressions chimiques. Il est suivi du jéjunum d'une longueur de 2 à 3 mètres chez l'adulte et où se fait la majeure partie de l'absorption des nutriments, cette partie anatomique est très vascularisée. L'iléon, d'une longueur d'environ 3 à 4 mètres chez l'Homme, s'étend jusqu'à la valve iléo-cæcale qui assure une protection contre d'éventuelles contaminations

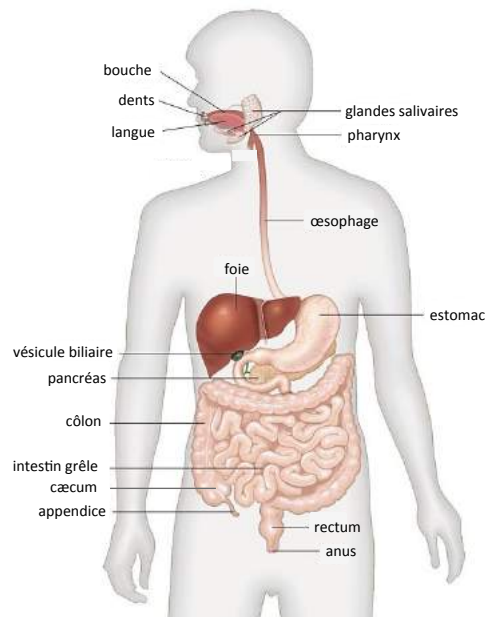


Figure 2 : Organes et structures appartenant au tractus gastro-intestinal.

L'appareil digestif comprend la cavité buccale, suivie directement par le pharynx et l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le cœlon, le rectum et l'anus. Ces organes sont interconnectés et dialoguent entre eux *via* des afférences avec le foie, la vésicule biliaire et le pancréas pour assurer notamment la fonction digestive.

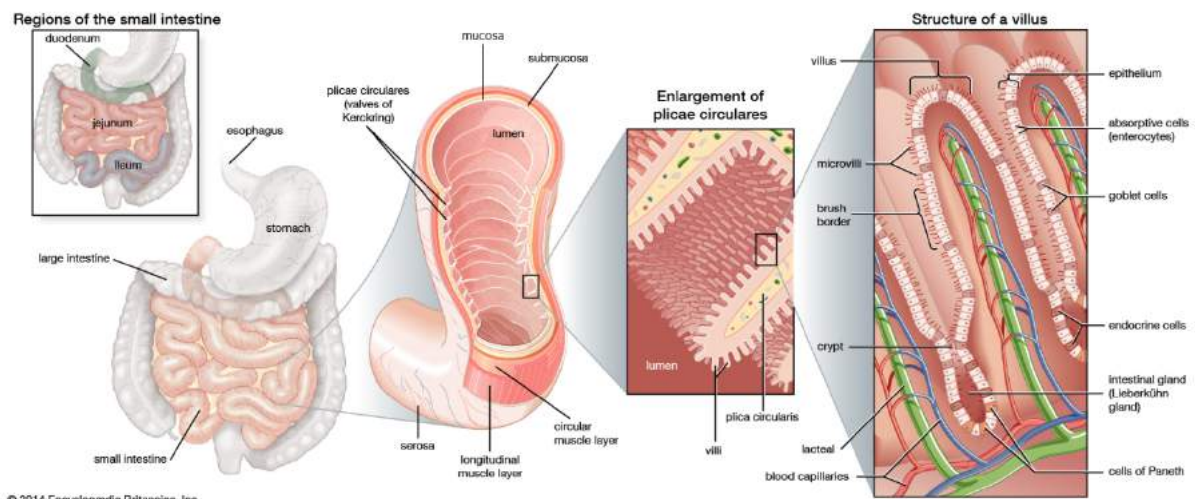


Figure 3 : Anatomie et surface d'échange de l'intestin grêle chez l'Homme.

L'intestin grêle long de 6 mètres environ est enroulé dans la cavité abdominale grâce à des replis formant des anses intestinales. La muqueuse intestinale présente des repliements ou plis circulaires appelés valvules conniventes qui permettent de tripler la surface d'échange entre l'épithélium et la lumière intestinale et forme des villosités qui augmentent cette surface d'un facteur 10. D'un point de vue cytologique, chaque entérocyte contient à sa surface apicale des microvillosités, ces replis de la membrane plasmique vont multiplier la surface par 500. Ainsi, la surface de l'épithélium de l'intestin grêle est estimée à 250m² soit l'équivalent d'un terrain de tennis.

INTRODUCTION

bactériennes provenant du côlon. En effet, cette valve s'ouvre pour laisser passer les produits de la digestion vers le cæcum et se referme pour empêcher le reflux vers l'iléon. C'est également dans cette portion intestinale que se fait la réabsorption des sels biliaires *via* le cycle entéro-hépatique des acides biliaires. L'iléon est aussi caractérisé par la présence de plaques de Peyer qui sont des follicules lymphoïdes, composés en grande partie de lymphocytes B et de lymphocytes T.

Le côlon mesure environ 1,5 m de long pour un diamètre de 4 cm chez l'Homme. Il prend naissance au niveau du cæcum et se termine par le rectum. Il se subdivise en 4 parties anatomiques (partant du cæcum vers le rectum) : le côlon droit ou ascendant, le côlon transverse, le côlon gauche ou descendant et le côlon sigmoïde (figure 4). Chez la souris C57BL/6, le côlon mesure entre 10 et 15 cm.

Chez l'Homme, au stade embryonnaire précoce (E16), le côlon et l'intestin grêle sont constitués de villosités, de cryptes et de tous les types cellulaires à l'exception des cellules de Paneth qui n'apparaissent que tardivement dans l'intestin grêle. Les villosités vont progressivement régresser dans le côlon au profit des cryptes. Chez la souris, la villogenèse ne prend place que dans l'intestin grêle et non dans le côlon et les cryptes de l'intestin grêle ne se forment qu'après la naissance des animaux. A l'âge adulte, le côlon est totalement dépourvu de villosités chez ces deux espèces (Hosoyamada and Sakai 2005; Teller and Beaulieu 2001).

La paroi de l'intestin se compose de la muqueuse, de la sous-muqueuse, de la musculuse et de la séreuse (Figure 5A). La muqueuse, formée d'un épithélium monostratifié reposant sur la *lamina propria*, est en contact directe avec la lumière intestinale. La *lamina propria* est un tissu conjonctif vascularisé riche en collagène, en cellules immunitaires et en capillaires lymphatiques. La sous-muqueuse est quant à elle constituée de tissu conjonctif lâche qui sépare la muqueuse de la musculuse. La musculuse est composée de deux couches de fibres musculaires lisses : la couche externe longitudinale et la couche interne circulaire. Les contractions de ces deux couches musculaires assurent respectivement le raccourcissement et l'étrécissement de l'intestin. Celui-ci est enfin tapissé d'une double membrane : la sous-séreuse et séreuse constituées de tissu conjonctif.

Décrit comme le « second » cerveau de notre organisme, l'intestin possède son propre système nerveux dit entérique (SNE). En effet, l'intestin a une innervation double

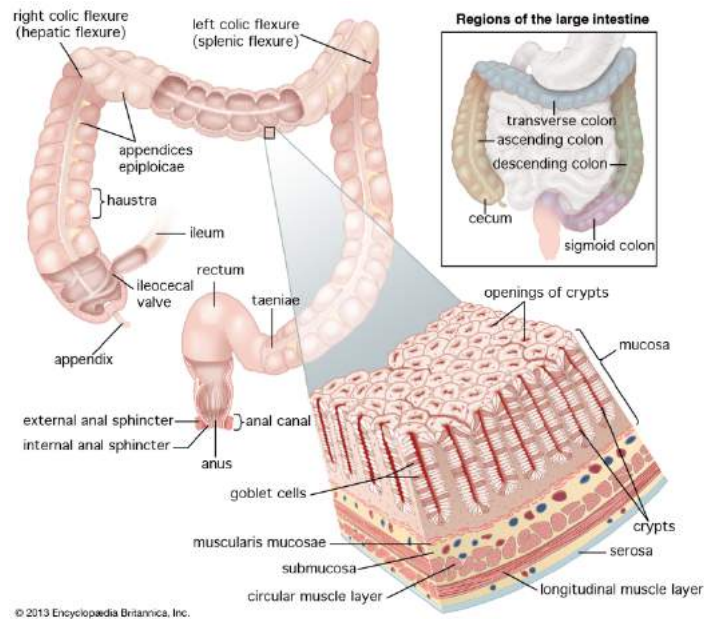


Figure 4 : Anatomie du côlon chez l'Homme.

Le côlon se subdivise en quatre segments : le côlon droit ou ascendant, le côlon transverse, le côlon gauche ou descendant, et le côlon sigmoïde. Il débute à l'embouchure de la valve iléo-cœliaque au niveau du cæcum et se prolonge jusqu'au rectum. Contrairement à l'intestin grêle, le côlon est dépourvu de villosités.

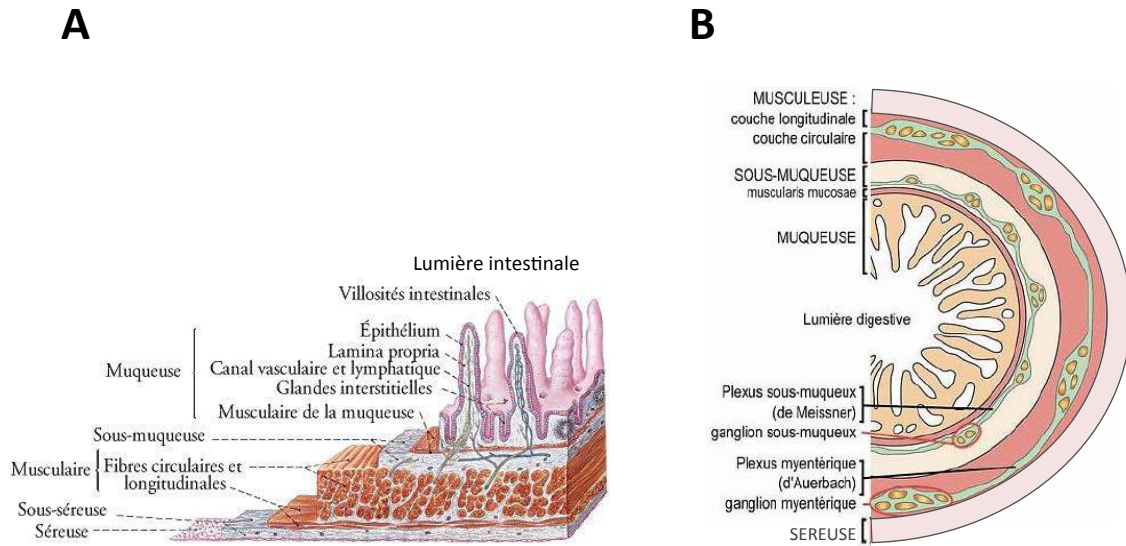


Figure 5 : Organisation histologique générale de la paroi intestinale chez l'Homme.

A/ Représentation schématique d'une coupe de la paroi intestinale. Les différentes tuniques de l'intestin comprennent, en allant de la périphérie du tube digestif vers la lumière intestinale: la séreuse et la sous-séreuse qui tapisse la paroi de l'intestin ; la musculuse formée de fibres musculaires longitudinales et circulaires qui assure la contraction et la motilité intestinale ; la sous-muqueuse située entre la musculuse et la muqueuse qui est constituée d'un tissu conjonctif lâche ; enfin la muqueuse qui est composée d'une monocouche de cellules épithéliales formant l'épithélium reposant sur un tissu conjonctif, la *lamina propria*. La muqueuse de l'intestin grêle forme des villosités (projections dans la lumière) et des cryptes (invaginations). Bien que le côlon soit exempt de villosités, l'organisation globale des différentes couches de sa paroi reste similaire à celle de l'intestin grêle.

B/ Section transversale de la paroi intestinale.

Ce schéma reprend l'organisation des différentes tuniques. Le système nerveux entérique (SNE) représentant l'innervation intrinsèque de l'intestin est composé de deux réseaux ganglionnaires complexes : le plexus myentérique ou plexus d'Auerbach situé entre les muscles longitudinaux et les muscles circulaires et le plexus sous-muqueux ou de Meissner qui se retrouve entre ces derniers et la sous muqueuse intestinale.

INTRODUCTION

interconnectée : intrinsèque et extrinsèque. L'innervation extrinsèque est assurée par les influx moteurs venant du système nerveux central et des afférences sensitives émises par les fibres viscérales afférentes. Ce SNE responsable de fonctions non soumises au contrôle volontaire telles que le péristaltisme ou encore des sécrétions gastriques, contient plus de 100 millions de neurones et de nombreux neurotransmetteurs ce qui égale le nombre de neurones de la moelle épinière. L'innervation intrinsèque ou SNE est composée de deux réseaux ganglionnaires complexes : le plexus myentérique ou d'Auerbach qui se trouve entre les muscles longitudinaux et les muscles circulaires et le plexus sous-muqueux ou de Meissner situé entre la *muscularis mucosae*, fine couche de fibres musculaires lisses, et la sous-muqueuse intestinale (figure 5B).

2) L'épithélium intestinal

Le maintien de l'homéostasie intestinale qui repose essentiellement sur l'intégrité des cellules épithéliales, impliquant des interactions complexes avec le microbiote et le système immunitaire et les nutriments, est assuré par le renouvellement constant de ce tissu. En effet, la muqueuse intestinale se régénère en moyenne tous les 5 jours chez l'Homme et tous les 3 jours chez la souris (Leblond and Messier 1958). Ce renouvellement rapide est assuré par la présence de cellules souches intestinales localisées à la base des cryptes de Lieberkühn constituant le compartiment prolifératif. Ces cellules souches se divisent, se différencient pour donner naissance aux autres types cellulaires présents dans l'épithélium de la villosité. Ce processus dynamique conduit au remplacement des cellules épithéliales *via* leur élimination par anoïkis qui est une forme de mort cellulaire particulière déclenchée par la perte d'adhésion entre la cellule et la matrice extracellulaire à l'apex des villosités (Vachon 2018).

Ainsi l'épithélium de l'intestin grêle est organisé selon un axe crypto-villositaire, caractérisé par deux compartiments bien distincts d'un point de vue cellulaire et fonctionnel. La crypte renferme deux catégories de cellules représentant chacune en moyenne 1% des cellules épithéliales : 1) les cellules souches et 2) les cellules de Paneth. La villosité contient cinq types cellulaires identifiées à ce jour : 1) les entérocytes, 2) les cellules M pour « microfold », 3) les cellules entéroendocrines, 4) les cellules caliciformes ou à mucus ou en gobelet ou « goblet cells » et 5) les cellules « tuft ». Le côlon, dépourvu de villosités et de cellules de Paneth, est principalement constitué de colonocytes représentant l'équivalent des entérocytes de l'intestin grêle, des cellules à mucus et des cellules entéroendocrines. Les

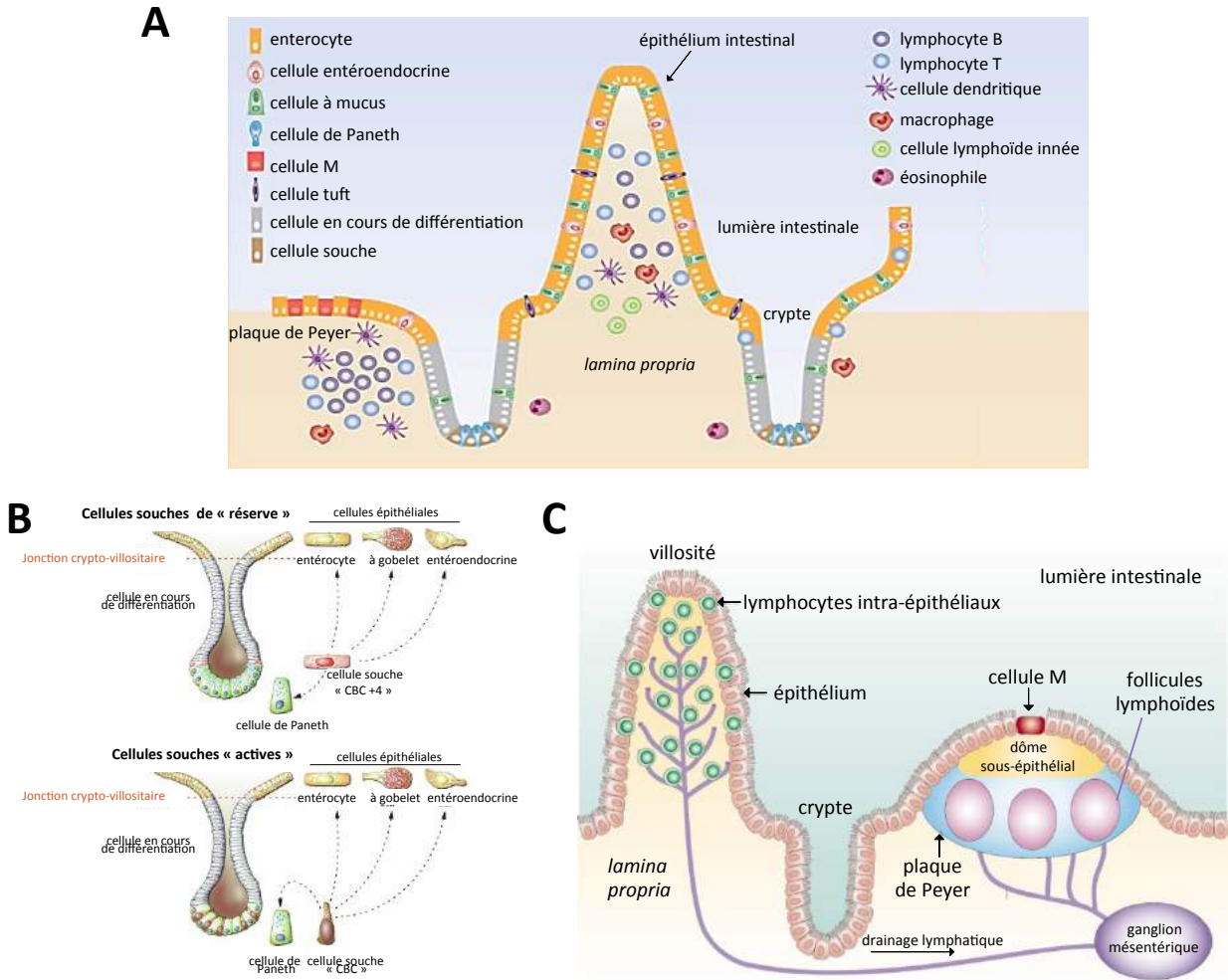


Figure 6 : Types et structures cellulaires de la muqueuse intestinale.

A/ L'épithélium de l'intestin grêle est organisé selon un axe crypto-villositaire. La crypte, qui constitue le compartiment prolifératif, contient les cellules souches et les cellules de Paneth; la villosité comprend les entérocytes, les cellules M (au niveau de l'iléon), les cellules entéroendocrines, les cellules caliciformes sécrétrices de mucus et les cellules « tuft ». L'épithélium colique exempt de villosités et de cellules de Paneth contient les colonocytes, équivalent aux entérocytes de l'intestin grêle, et la plupart des* autres types cellulaires présents dans l'épithélium de l'intestin grêle. L'épithélium intestinal repose sur la *lamina propria* qui est peuplée de cellules immunitaires telles que les macrophages, les lymphocytes B et T et les cellules lymphoïdes innées (ILC). (Modifiée d'après Gerbe *et al.* 2016).

B/ Les deux populations de cellules souches intestinales

(Modifiée d'après la revue de Barker, van de Wetering and Clevers 2008)

C/ Tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT).

L'intestin dispose de cellules immunitaires dispersées dans la *lamina propria* (cf Fig 6A) mais également intercalées entre les cellules épithéliales nommées lymphocytes intraépithéliaux. Il possède aussi des plaques de Peyer formées de follicules lymphoïdes riches en lymphocytes B et T. Le passage de bactéries à travers les cellules M situées au sommet du dôme déclenche une réponse immunitaire.

(Modifiée d'après la revue Mowat 2003).

INTRODUCTION

cellules de la muqueuse intestinale appartiennent à deux lignages cellulaires différents : le lignage absorptif, représenté par les entérocytes, les colonocytes et les cellules M et le lignage sécrétoire, auquel appartiennent les cellules de Paneth, les cellules entéroendocrines, les cellules à mucus et les cellules « tuft » (figure 6A). L'ensemble de ces cellules épithéliales forment une monocouche et peuvent communiquer entre elles notamment grâce aux jonctions communicantes. De plus, les jonctions cellulaires permettent à l'épithélium de former une barrière physique et sélective.

Les **cellules souches intestinales** sont capables d'auto-renouvellement afin de maintenir un « pool » constant dans la crypte. Elles sont également multipotentes puisqu'elles permettent la production de cellules filles capables de générer tous les types de cellules matures. Après une lésion, elles peuvent aussi ralentir leur auto-renouvellement afin de permettre une expansion cellulaire plus importante, elles sont donc clonogéniques (Joubert *et al.* 2009). Les cellules souches se subdivisent principalement en deux populations (figure 6B). Celles situées à la base de la crypte représentent le pool cellulaire actif, identifiées sous l'appellation de CBC pour « crypt base columnar cells ». Elles expriment le marqueur de cellules souches Lgr5. En condition physiologique, elles permettent le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal. La seconde population, proposée comme une population de « réserve », est localisée en position +4 par rapport à la base de la crypte. Ces cellules facilitent la régénération de l'épithélium suite à une lésion. Une interconversion entre ces deux types de cellules souches est possible notamment en situation physiopathologique, les cellules souches de réserve peuvent donner naissance à des CBC (pour revue: (Cui and Chang 2016).

Les **cellules de Paneth** sont capables de sécréter dans la lumière intestinale des substances chimiques de défense. Elles contiennent des granules de sécrétion dont le contenu peut être principalement : 1) le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), cytokine pro-inflammatoire produite en réponse à divers agents infections ou lésions tissulaires, 2) le lysozyme, enzyme protéolytique qui clive les ponts peptidoglycanes présents exclusivement chez les bactéries et entraînant la lyse de celles-ci, et 3) les cryptidines ou défensines telles que Reg3- γ et Reg3- α (Regenerating islet-derived protein 3- γ et - α) chez l'Homme ou leurs homologues respectifs Reg3- β et Reg3- γ chez la souris. Reg3- γ et Reg3- α sont des peptides antimicrobiens qui augmentent la perméabilité membranaire de l'organisme cible en formant des canaux ioniques (Clevers and Bevins 2013). Les cellules de Paneth contribuent donc au

INTRODUCTION

rôle de défense de la barrière épithéliale intestinale. De plus, un rôle de niche pour les cellules souches adjacentes leur a été attribué (Tan and Barker 2014), suggérant que les cellules de Paneth jouent un rôle crucial dans la protection et le maintien de l'épithélium intestinal.

Les **entérocytes** ou cellules absorbatives représentent environ 90% des cellules épithéliales intestinales. C'est à travers ces cellules que le transit sélectif des nutriments s'effectue de la lumière de l'intestin grêle vers le milieu intérieur pour rejoindre la circulation sanguine. Les nutriments traversent la membrane apicale au niveau des microvillosités par diffusion passive ou par des transports actifs. Les nutriments absorbés par les entérocytes atteignent ensuite le compartiment sanguin ou lymphatique. En plus de sa fonction digestive, l'entérocyte est capable de sécréter des cytokines inflammatoires et des peptides antimicrobiens (Miron and Cristea 2012).

Les **cellules M** ne représentent en moyenne que 10% des cellules épithéliales. Bien que l'origine de ces cellules a longuement été débattue (Ohno *et al.* 2012), les cellules M dériveraient d'un précurseur commun et seraient une sous-population d'entérocytes. Elles peuvent être issues de la trans-différentiation des entérocytes sous l'influence de cellules immunitaires principalement des lymphocytes B (Mowat 2003). Elles possèdent cependant des microvillosités irrégulières et plus courtes que celles présentes à la surface apicale des entérocytes voire une absence de microvillosités (Tahoun *et al.* 2012). Les cellules M sont situées au sommet des plaques de Peyer (structure particulière que je décrirai dans la partie « tissu lymphoïde associé à l'intestin ») plus abondantes dans l'iléon. Ces cellules épithéliales jouent le rôle de cellules présentatrices d'antigène puisqu'elles présentent au système immunitaire sous-jacent, les antigènes, molécules ou micro-organismes endocytés. Elles constitueraient également une porte d'entrée aux microorganismes présents dans la lumière puisque l'épaisseur de mucus à l'apex de ces cellules serait plus mince (Lelouard *et al.* 2001).

Les **cellules entéroendocrines (CEE)** dispersées au sein de l'épithélium intestinal ne représentent que 1% de la population cellulaire de cet épithélium. Contrairement au schéma qui a longtemps prévalu, les données actuelles issues d'une analyse métabolique (Svendsen *et al.* 2015) indiquent qu'il n'existe pas de sous-types particuliers de CEE sécrétant de façon spécifique un entéropeptide donné mais que le profil sécrétoire des CEE serait dépendant du segment intestinal considéré. Lors de la progression des nutriments le long du tractus gastro-intestinal, les nutriments stimulent de manière directe ou indirecte les CEE et déclenchent

INTRODUCTION

alors la sécrétion d'entérohormones qui orchestrent la réponse postprandiale. En particulier, les lipides alimentaires via leurs liaisons au récepteur CD36 notamment ou aux récepteurs de la famille des GPCRs tels que GPR120 présents à la membrane apicale des CEE, vont stimuler la sécrétion d'hormone à effet incrétine comme par exemple le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et d'hormones satiétogènes comme la sécrétine et la cholécystokinine (CCK) (Miyachi *et al.* 2010; Niot and Besnard 2017). Les entérohormones sont capables d'agir par voie endocrine, paracrine et autocrine afin de moduler les réponses physiologiques telles que la motilité, la prise alimentaire, la sécrétion d'hormones et enzymes pancréatiques, la prolifération cellulaire et l'immunité (Begg and Woods 2013; Psichas *et al.* 2015).

Les **cellules à mucus**, formant environ 5% des cellules épithéliales de l'intestin grêle et jusqu'à 15% des cellules épithéliales du côlon distal, sont spécialisées dans la synthèse et la sécrétion de mucus. Elles contiennent des granules contenant du mucus composé d'une cinquantaine de mucines dont la principale est MUC2 (Birchenough *et al.* 2015). Elles contribuent de ce fait à la protection et à l'hydratation de l'épithélium grâce à la formation d'une couche de mucus qui tapisse et protège les cellules épithéliales sous-jacentes contre une invasion de bactéries pathogènes. Elles sont directement impliquées dans l'immunité car elles sont capables de sécréter des cytokines telles que RELM- β (resistin-like molecule-beta) et de délivrer aux cellules dendritiques sous-épithéliales les antigènes captés dans la lumière intestinale (Hooper 2015; McDole *et al.* 2012).

Les **cellules « tuft »** ne représentent que 0,4% environ des cellules épithéliales intestinales. Identifiées dans les années 1970, elles ont la capacité de produire et de sécréter des prostanoïdes (prostaglandine-D2) et des opioïdes (β -endorphine) connus pour leur implication dans les processus inflammatoires (Gerbe *et al.* 2011). Ce n'est que très récemment grâce à l'identification de marqueurs spécifiques que les équipes de P. Jay (CNRS, INSERM, , Montpellier) et de N. Taylor (CNRS, Montpellier) ont permis la découverte de la première fonction de ces cellules (Gerbe *et al.* 2016). Elles jouent un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse immunitaire de type 2 lors d'infections parasitaires. Elles sont capables de synthétiser une cytokine particulière, l'IL-25, une « alarmine » responsable de la mise en place de la réponse immunitaire. D'autres fonctions possibles ont été proposées mais ces cellules restent à explorer (Banerjee *et al.* 2018).

3) Tissu lymphoïde associé à l'intestin

L'intestin possède son propre tissu lymphoïde associé à la muqueuse, nommé GALT pour « gut-associated lymphoid tissue ». Il permet une protection contre d'éventuels agents étrangers pathogènes et substances toxiques tout en tolérant les bactéries commensales.

Ce tissu lymphoïde est constitué de cellules dispersées dans la *lamina propria* (plasmocytes, lymphocytes T CD4+, macrophages, mastocytes, éosinophiles) et de lymphocytes intraépithéliaux parmi lesquels des lymphocytes T cytotoxiques CD8+. Outre ces cellules dispersées, le GALT est formé par les plaques de Peyer représentant des groupements de follicules lymphoïdes situés entre la muqueuse et la sous-muqueuse de l'intestin grêle, notamment de l'iléon. Ces structures lymphoïdes sont riches en lymphocytes B et T, et sont recouvertes par un épithélium monostratifié appelé dôme de la plaque de Peyer lui-même recouvert d'une fine couche de mucus (Mowat 2003; Pearson *et al.* 2012). Des formations analogues sont présentes dans le côlon. Ces îlots lymphoïdes permettent le développement d'une réponse immunitaire vis-à-vis d'antigènes pénétrant par les cellules M du dôme jusqu'au contact des lymphocytes et des cellules dendritiques avec production d'anticorps anti-immunoglobuline de type A (IgA). Les cellules dendritiques, ayant capturé les antigènes, et les lymphocytes sensibilisés par ces antigènes migrent alors dans les ganglions mésentériques. Les lymphocytes activés infiltrent alors les sites effecteurs de l'épithélium intestinal et en particulier au niveau des villosités intestinales. Les plaques de Peyer et la *lamina propria* sont toutes deux drainées par des vaisseaux lymphatiques allant aux ganglions lymphatiques mésentériques (Mowat 2003) (figure 6C).

II. Les fonctions majeures de l'intestin

1) **Fonction d'absorption des nutriments**

a) Généralités sur la digestion

La digestion représente les processus mécaniques et biochimiques permettant l'ingestion des aliments suite à leurs transformations en substances nutritives assimilables par l'organisme. L'intestin contribue et joue un rôle majeur dans la digestion mécanique *via* les contractions des fibres musculaires lisses de l'intestin assurant la progression des nutriments, mais surtout dans la digestion chimique *via* l'action conjuguée des sécrétions gastriques, pancréatiques et biliaires.

Dans la cavité aéro-digestive constituée de la bouche et du pharynx, la nourriture est broyée par les dents et la salive. Les glandes salivaires contenant des enzymes digestives telles que l'amylase, facilitent ces étapes de mastication et déglutition. Le bol alimentaire transite ensuite à travers l'œsophage. Ce tube musculaire est capable de propulser le bol alimentaire dans l'estomac en une ou deux secondes *via* des contractions musculaires de péristaltisme. Ces mouvements coordonnés de contraction se produisent tout au long de la voie gastro-intestinale et jouent un rôle important dans la digestion et l'absorption des nutriments. Une fois arrivés dans l'estomac, les aliments sont brassés et imprégnés de sucs gastriques pour former une substance prédigérée, le chyme. C'est également par la distension des mécanorécepteurs se trouvant dans l'estomac que le signal nerveux de rassasiement va être transmis au système nerveux central.

A la sortie de l'estomac, le chyme passe par le sphincter pylorique qui s'ouvre pour ne laisser passer que de petites quantités de nourriture à la fois. Il entre dans le duodénum où il sera transformé en microéléments absorbables grâce aux sécrétions biliaires et pancréatiques au niveau de la grande caroncule ou sphincter d'Oddi. Ces substances chimiques se mêlent au chyme et décomposent ce dernier en chyle constitué des éléments nutritifs absorbables principalement au niveau du jéjunum et de l'iléon. Le chyme poursuit alors sa route le long de l'intestin grêle, passe la valvule iléo-colique et arrive dans le côlon. Le processus de digestion est quasiment terminé lorsque le chyme arrive dans le côlon. La partie non assimilée du chyme poursuit son trajet dans le côlon, où l'eau, les électrolytes et certaines vitamines sont absorbées. Le produit restant forme les matières fécales destinées à être éliminées. Dans le

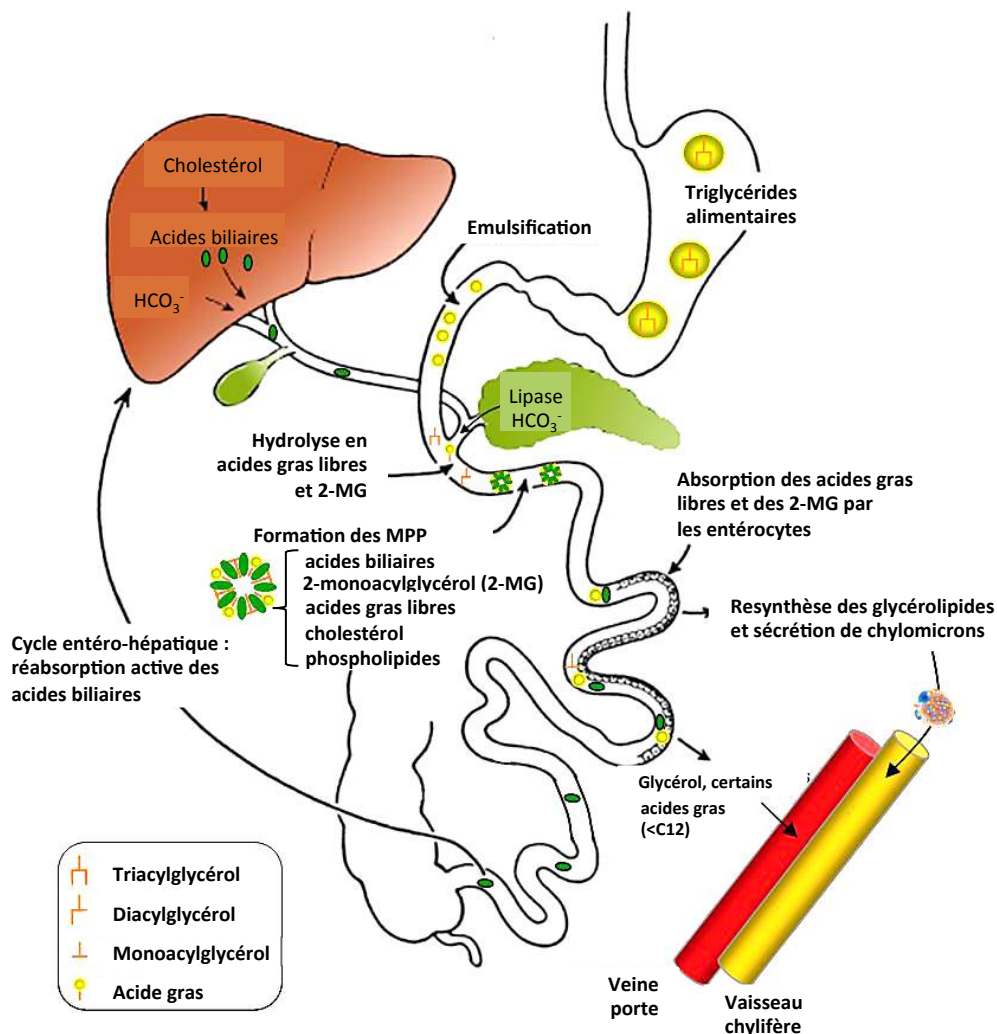


Figure 7: Principales étapes de la digestion et de l'absorption des lipides alimentaires.

Les lipides alimentaires ingérés, majoritairement des triglycérides, arrivent au niveau du duodénum sous forme de grosses gouttelettes lipidiques qui vont être dispersées et fragmentées par les acides biliaries pour former une émulsion accessible à la lipase pancréatique. Le produit d'hydrolyse des triglycérides s'associe aux constituants de la bile pour constituer des micelles lipidiques postprandiales (MPP) pouvant traverser la couche d'eau non agitée et se trouver à proximité immédiate de la bordure en brosse des entérocytes. La présence de pompes à protons à la membrane apicale des entérocytes génère un microenvironnement acide permettant la dissociation des MPP. Le contenu micellaire va être libéré et transféré dans les entérocytes par diffusion simple ou grâce à des transporteurs membranaires. Les triglycérides sont resynthésés dans les entérocytes et sécrétés principalement sous forme de chylomicrons dans les vaisseaux chylifères avant de rejoindre la circulation sanguine et les tissus périphériques. MPP : micelles lipidiques postprandiales (Modifiée d'après Wilson et Dietschy 1971).

INTRODUCTION

contexte de ce travail de thèse, nous nous sommes concentrés sur l'effet des lipides alimentaires dont les étapes de digestion et absorption sont détaillées ci-dessous.

b) Digestion et absorption des lipides alimentaires

Les triglycérides représentent en moyenne 95 % des lipides alimentaires, le pourcentage restant de lipides fait partie de la famille des phospholipides et des stérols. Les lipides alimentaires ingérés arrivent au niveau de la lumière intestinale et sont majoritairement des triglycérides constitués essentiellement d'acides gras à longues chaînes (AGLC : à partir de 16 carbones) et de glycérol (Cuvelier *et al.* 2004). En effet, les triglycérides composés d'acides gras à chaînes courtes (AGCC : entre 6 et 10 carbones) sont hydrolysés au niveau de l'estomac *via* la lipase gastrique.

Les acides gras les plus répandus dans l'alimentation sont selon le degré de saturation (présence ou non de doubles liaisons) : les **acides gras saturés** tels que l'acide laurique (C12:0) constituant essentiel de l'huile de coprah, l'acide palmitique (C16:0) présent dans pratiquement toutes les huiles végétales et graisses animales ou encore l'acide stéarique (C18:0) contenu dans le beurre de cacao. Parmi les **acides gras insaturés** majoritairement trouvés dans l'alimentation, l'acide oléique (C18:1) est présent dans les graisses végétales et animales, l'acide linoléique (C18:2) est un acide gras essentiel présent dans les huiles végétales et l'acide linoléique (C18:3) est en teneur forte dans les huiles végétales hautement insaturées (Cuvelier *et al.* 2004). Les acides gras contenus dans le chyme gastrique vont stimuler la sécrétion duodénale de la CCK ce qui déclenche l'excrétion simultanée des enzymes pancréatiques et des composants contenus dans la bile que sont principalement les sels biliaires issus notamment de la conjugaison d'acides biliaires primaires et de la taurine pour former par exemple du taurocholate. La bile est également constituée de cholestérol et de phospholipides.

Les triglycérides étant hydrophobes, ils ne peuvent pas être directement absorbés et doivent subir plusieurs étapes de digestion avant de pouvoir traverser la bicouche lipidique et être absorbés par les entérocytes principalement au niveau du jéjunum (figure 7).

Au contact de milieux aqueux les triglycérides vont s'agréger entre eux et former de grosses gouttelettes lipidiques. L'action des sels biliaires permet **l'émulsification**, la dispersion et la fragmentation de ces grosses gouttelettes en petites particules accessibles à la lipase pancréatique. Les sels biliaires en solubilisant les lipides permettent à ceux-ci d'être

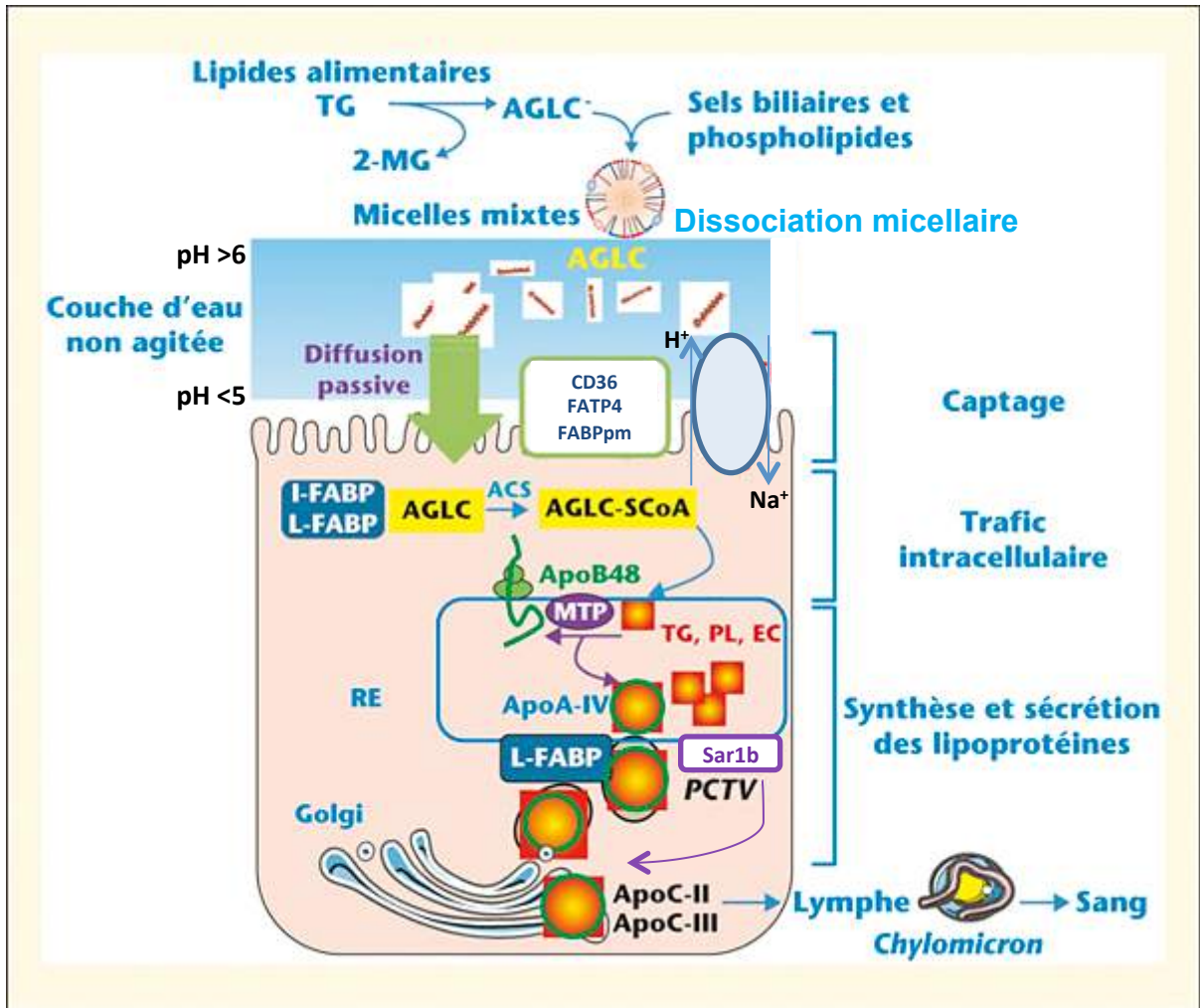


Figure 8 : Principales étapes de l'absorption des lipides alimentaires par les entérocytes.

Une fois dissociés des micelles dans la couche d'eau non agitée, les acides gras vont être captés et transportés au travers la membrane apicale des entérocytes par diffusion passive ou *via* des transporteurs. Ils sont ensuite pris en charge par les protéines de transport I-FABP et L-FABP pour être acheminés vers le réticulum endoplasmique où ils seront ré-estérifiés en triglycérides puis maturés dans l'appareil de Golgi avant d'être sécrétés dans la lymphe sous forme de chylomicrons. Une partie des triglycérides néo-synthétisés sont stockés dans des gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des entérocytes et constitue un réservoir énergétique transitoire pour l'intestin en période inter-prandiale.

AGLC : acide gras à longue chaîne ; MG : monoglycérides ; TG : triglycérides ; PL: phospholipides ; EC : ester de cholestérol ; LBPs : lipid binding protein ; CD36 : fatty acid transporter ; FATP4 : fatty acid transporter protein 4 ; I-FABP : intestinal fatty acid-binding protein ; L-FABP : liver fatty acid-binding protein ; ACS : Acyl CoA synthétase ; AGLC-SCoA : Acyl CoA ; MTP : microsomal triglyceride transfer protein ; ApoB48 : apolipoprotéine B48 ; ApoA-IV : apolipoprotéine A-IV ; RE : réticulum endoplasmique ; PCTV : prechylomicrons transfert vesicules ; Sar1b : Secretion Associated Ras Related GTPase 1B. (Modifiée d'après Tran *et al.* 2012).

INTRODUCTION

accessibles à la lipase pancréatique. Ainsi, l'**hydrolyse** des triglycérides en acides gras libres et 2-monoacylglycérol (2-MG) est rendu possible grâce à l'action rapide et combinée de la lipase pancréatique et de son cofacteur la colipase, activée quant à elle par la trypsine. D'autres enzymes pancréatiques interviennent dans ce processus d'hydrolyse des lipides du chyme telles que la phospholipase et la cholestérol estérase qui hydrolysent les phospholipides et les esters de cholestérol respectivement. Le produit de l'hydrolyse des lipides est constitué d'acides gras, de 2-MG, de cholestérol et de lysophospholipides qui s'associent aux sels biliaires pour former des petites gouttelettes émulsifiées appelées micelles lipidiques. Cette étape de **micellisation** est indispensable à l'absorption optimale des lipides alimentaires par les entérocytes. En effet, les lipides sont maintenus sous forme hydrosoluble dans les micelles ce qui permet de les concentrer dans la couche d'eau non agitée qui constitue une zone aqueuse à renouvellement lent du fait de la présence du glycocalyx et du mucus à la surface des entérocytes. Ainsi à l'approche de la bordure en brosse au niveau des microvillosités les acides gras vont être protonés et dissociés des micelles et en particulier des sels biliaires du fait d'un microenvironnement acide qui est la conséquence de la présence à la membrane apicale de pompes Na^+/H^+ . Les constituants des micelles vont être transférés dans l'entérocyte et les sels biliaires vont être réabsorbés et recyclés dans l'iléon puis transportés par la veine porte jusqu'au foie (figure 8).

A la suite d'un repas, l'**absorption** par les entérocytes des acides gras à longues chaînes se décline en 3 étapes : 1/ le captage, 2/ la ré-estérification en triglycérides et 3/ l'assemblage et la sécrétion de lipoprotéines riches en triglycérides dans les vaisseaux lymphatiques puis la circulation. Les acides gras à chaînes courtes traversent plus facilement l'épithélium intestinal que les acides gras à longues chaînes et peuvent rejoindre la circulation sanguine au niveau de veine porte.

1/Le captage est assuré par deux mécanismes complémentaires : la diffusion simple et le transport actif. La diffusion simple ou passive permet un transport de faible affinité et de haute capacité adaptée à une arrivée massive de lipides alimentaires en condition postprandiale. Elle permet la diffusion à travers la membrane plasmique à la fois du cholestérol libre et des acides gras non chargés selon un mouvement dit « flip-flop » non énergie-dépendant. Ce mécanisme de diffusion serait le résultat d'un gradient de concentration créé par l'abondance de lipides au niveau de la lumière intestinale et de leur faible concentration intracellulaire. Il semble que cette étape de captage des AGLC ne soit pas

INTRODUCTION

limitante pour l'absorption des lipides alimentaires puisqu'elle reste efficace suite à une surcharge en lipides (Petit et al. 2007).

En parallèle, un mécanisme faisant intervenir des transporteurs se met en place. Plusieurs transporteurs membranaires regroupés sous l'appellation de LBP (lipid-binding protein) ont été proposés. La **FABPpm** (plasma membrane fatty acid binding protein) qui lie avec une grande affinité les AGLC, le cholestérol, le 2-MG et les lysophospholipides participerait au captage des AGLC. Les membres protéiques appartenant à la famille des FATP (fatty acid-transporter protein) dont **FATP4** qui a été identifiée initialement à la membrane apicale des entérocytes puis au niveau du réticulum endoplasmique où l'estérification des acides gras a lieu. Elle interviendrait dans le processus de captage des AGLC de manière indirecte puisque sa structure tridimensionnelle ne contiendrait pas de domaine de liaisons aux AGLC mais elle catalyse la transformation des acides gras en acyl-CoA augmentant ainsi la capacité de captage des AGLC par les entérocytes (Cifarelli and Abumrad 2018; Herrmann *et al.* 2001; Stahl 2001). Le récepteur **CD36** (cluster of differentiation 36) initialement décrit comme un transporteur d'acides gras, est considéré actuellement comme étant un détecteur d'AGLC. En effet, son invalidation chez la souris n'affecte pas le captage entérocytaire des AGLC mais entraîne une altération de leur métabolisme intra-entérocytaire en modifiant notamment la composition des lipoprotéines sécrétées (Petit et al. 2007; Niot et Besnard 2017). D'une part, la détection des acides gras par CD36 entraîne l'activation des voies de signalisation impliquant notamment les kinases Erk1/2 (extracellular signal-regulated kinases) et est associée à l'augmentation des protéines de synthèse des chylomicrons (CM) (Tran *et al.* 2011). D'autre part, un phénomène de désensibilisation de ce récepteur semble avoir lieu puisqu'il a été démontré qu'après un challenge lipidique CD36 est rapidement ubiquitinylé et disparaît de la membrane apicale des entérocytes (Tran *et al.* 2011).

Par ailleurs, le cholestérol est quant à lui majoritairement pris en charge par le transporteur **NPC1L1** (the Niemann-Pick c1 like 1) responsable à 70% de l'entrée du cholestérol dans les entérocytes (Altmann 2004). Le récepteur **SR-B1** (scavenger receptor class B type 1) serait également impliqué dans le captage du cholestérol par les entérocytes. Bien que son rôle dans l'entrée du cholestérol reste controversé, il a été montré que sa sur-expression dans l'intestin de souris augmente l'absorption du cholestérol (Bietrix *et al.* 2006). Les travaux de notre équipe ont montré que dans les entérocytes, SR-B1 est un détecteur de lipides lorsqu'ils sont apportés sous leur forme physiologique de micelles (Béaslas *et al.* 2009). En effet, en présence de micelles mimant celles présentes *in vivo* dans la lumière

INTRODUCTION

intestinale après un repas, SR-B1 déclenche, *via* l'activation des voies de signalisation Erk1/2 et p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase), le trafic de la protéine structurale des lipoprotéines riches en triglycérides, l'apoB (apolipoprotéine B), de la membrane apicale des entérocytes vers les compartiments sécrétoires intracellulaires (Béaslas *et al.* 2009). Ainsi, SR-B1 est impliqué dans la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides par les entérocytes *via* son rôle de détecteur. L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans cette détection a mis en évidence l'importance du cholestérol membranaire détecté par la région transmembranaire C-terminale de SR-B1 (Saddar *et al.* 2013).

2/ La ré-estérification en triglycérides. Du fait de leur caractère hydrophobe, les lipides vont être pris en charge par des transporteurs protéiques de la famille des FABP. Les FABP1 et 2 sont celles qui sont principalement exprimées dans l'intestin. La surexpression de l'une ou de l'autre dans des modèles cellulaires entraîne un captage plus important des AGLC. En revanche, l'inactivation chez la souris du gène codant pour la FABP1 ou la FABP2 n'affecte pas l'absorption intestinale des AGLC (Buttet *et al.* 2014). Il semblerait qu'elles soient redondantes bien qu'elles aient quelques spécificités les distinguant, notamment la FABP1 peut lier deux AGLC alors que la FABP2 ayant une poche hydrophobe plus étroite ne peut accueillir qu'un seul AGLC (pour revue Gajda et Storch 2015). De plus, contrairement à la FABP2, la FABP1 lie avec une plus faible affinité les AGLC insaturés (pour revue Gajda et Storch 2015).

Dans les entérocytes les AGLC sont métabolisés en acyl-CoA par les acyl-CoA synthétases. Les acyl-CoA formés vont être pris en charge dans le réticulum endoplasmique et utilisés, en partie, pour la synthèse des triglycérides via deux voies métaboliques possibles : la voie de la MGAT (monoacylglycérol acyltransferase) et la voie de la GPAT (glycérolphosphate acyltransférase). Les acyl-CoA vont préférentiellement être orientés vers la voie de la MGAT en période postprandiale où l'apport en 2-MG est plus importante pour former dans un premier temps du diacylglycérol à partir du 2-MG et d'acyl-CoA *via* l'enzyme MGAT (monoacylglycérol acyltransferase) puis l'ajout par l'enzyme DGAT (diacylglycérol acyltransferase) d'un second acyl-CoA donnera des triglycérides (Iqbal and Hussain 2009). En période interprandiale, où la disponibilité en 2-MG est moindre, la voie de la GPAT prédomine. Elle fait intervenir plusieurs enzymes dont la DGAT pour l'obtention des triglycérides et de phospholipides.

INTRODUCTION

3/ L'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines constituent l'étape qui conduit à la sécrétion des lipoprotéines dans les vaisseaux lymphatiques afin de rejoindre la circulation générale pour atteindre les tissus cibles. Plusieurs types de lipoprotéines sont sécrétés par l'intestin les HDL (high density lipoprotein), les VLDL (very low density lipoprotein) et les CM (chylomicrons). Elles se distinguent notamment par leur densité qui dépend de l'enrichissement en triglycérides, les CM sont plus riches en triglycérides que les VLDL avec en moyenne 80% de triglycérides contre 50% respectivement alors que les HDL sont enrichies en cholestérol. En période postprandiale l'intestin sécrète préférentiellement des CM comportant un cœur hydrophobe constitué de triglycérides (80 à 85%) et d'esters de cholestérol (3%), et entouré d'une monocouche hydrophile composée de phospholipides (8%), de cholestérol non estérifié (2%) et d'une apolipoprotéine spécifique des CM, l'apoB48 (1%). L'apoB, la protéine structurelle des CM, est présente à raison d'une molécule par chylomicron. Son absence ou ses mutations entraîne une rétention des lipides dans les entérocytes et représente une maladie génétique rare chez l'Homme, l'hypobétalipoprotéïnémie (Hooper 2015). D'autres apolipoprotéines dites « échangeables » tels que l'apoA-I, l'apoA-IV, l'apoC-II ou l'apoC-III sont également présentes dans les CM (pour revue Hussain 2014).

La formation des CM requiert l'intervention de l'enzyme MTP (microsomal triglyceride transfert protein) qui au niveau du réticulum endoplasmique rugueux va transférer des triglycérides, des phospholipides et du cholestérol à une lipoprotéine primaire ne contenant, à ce stade, qu'une petite quantité de lipides et une molécule d'apoB48. La fusion au niveau du réticulum endoplasmique lisse de cette lipoprotéine primaire avec des gouttelettes riches en triglycérides et esters de cholestérol et dépourvues d'apolipoprotéines donne naissance à un pré-CM. L'invalidation de la MTP dans l'intestin de souris provoque une malabsorption sévère des lipides alimentaires se traduisant par une diminution importante de la synthèse et de la sécrétion de chylomicrons avec une stéatorrhée marquée (Xie 2006). Il s'agit également du syndrome d'abétalipoprotéïnémie observé chez des patients porteurs de polymorphismes affectant la fonction de cette enzyme. Les pré-CM sont progressivement enrichis en triglycérides puis transférés vers l'appareil de Golgi à travers des vésicules issues du réticulum endoplasmique (les prechylomicrons transfert vesicles ou PCTV) où ils achèvent leur maturation. La protéine Sar1b contribue de façon importante à ce transport vésiculaire. En effet, sa mutation entraîne la maladie d'Anderson qui se caractérise par une rétention anormale des CM au sein des entérocytes (Georges *et al.* 2011). Une fois matures, les CM migrent dans des vésicules de sécrétion dérivées de l'appareil de Golgi vers la

INTRODUCTION

membrane plasmique basolatérale des entérocytes où elles fusionnent et sont ainsi sécrétées par exocytose dans les vaisseaux lymphatiques ou chylifères des villosités avant de rejoindre la circulation sanguine. Une partie des triglycérides néo-synthétisés vont être stockés dans les entérocytes sous forme de gouttelettes lipidiques. Ce réservoir transitoire de lipides fournit à l'intestin une source d'énergie en période inter-prandiale mais peut également être un point de contrôle de la sécrétion des lipoprotéines en période postprandiale (pour revue Demignot, Beilstein, et Morel 2014; Beilstein et al. 2016).

Les CM sont ensuite remodelés dans la circulation, par ajout ou échange d'apolipoprotéines, et les lipides alimentaires sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase. Il résulte du catabolisme des CM, des acides gras libres et des petites particules nommées remnants de CM déplétés en triglycérides et enrichis en cholestérol. Ces remnants vont être captés par différents organes notamment le foie grâce à des récepteurs tels que le récepteur aux LDL (low density lipoprotein). Parallèlement, les acides gras libérés vont être utilisés par les tissus périphériques comme source d'énergie notamment pour le muscle ou être stockés par le tissu adipeux constituant ainsi une réserve énergétique.

2) **Fonction endocrine**

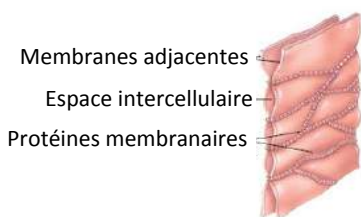
Bien que les CEE ne représentent que 1% de la population totale des cellules épithéliales intestinales, la diversité et le nombre d'hormones sécrétées par ces cellules font de l'intestin un des organes endocrines le plus conséquent de l'organisme.

L'inactivation intestinale du facteur de transcription neurogénine 3, responsable de la différenciation des cellules souches en CEE, a révélé l'importance du rôle joué par les hormones entéroendocrines. En effet, cette inactivation spécifique chez la souris conduit à la perte de la moitié des animaux dès la première semaine de vie. Les animaux survivants présentent un retard de croissance, une malabsorption des graisses, un métabolisme glucidique altéré et une hypertrophie des cryptes avec un renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal accéléré (Mellitzer *et al.* 2010).

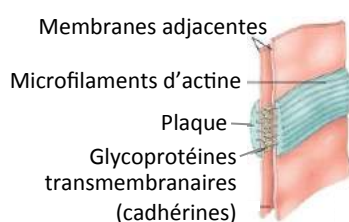
Parmi les entérohormones, le GLP-1 et le glucose-dependent insulintropic peptide ou gastric inhibitory polypeptide (GIP) sont responsables de l'effet incrétine, c'est-à-dire qu'ils potentialisent la sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques en réponse au glucose.

POLE APICAL

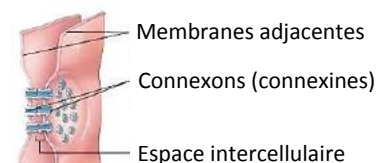
(a) Jonctions serrées



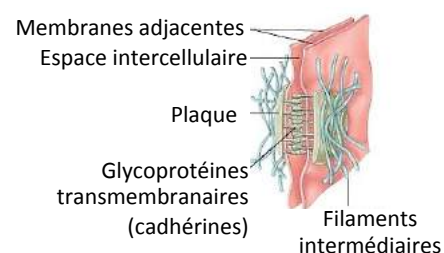
(b) Jonctions adhérentes



(c) Jonctions communicantes



(d) Desmosome



POLE BASOLATERAL

(e) Hémidesmosome

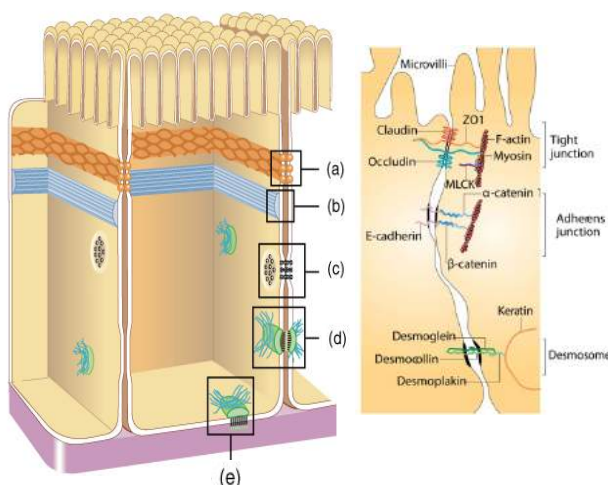
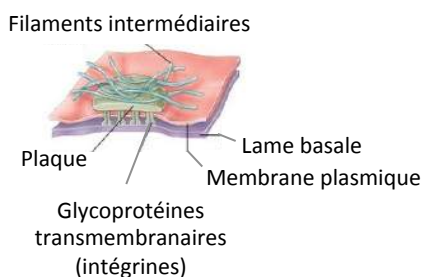


Figure 9 : Représentation schématique des jonctions cellulaires reliant les cellules épithéliales intestinales.

Du pôle apical des cellules au pôle basolatéral sont représentées les jonctions intercellulaires : a) les jonctions serrées garantissant l'étanchéité de l'épithélium tout en assurant une perméabilité paracellulaire aux ions et petites molécules, b) les jonctions adhérentes forment une ceinture entourant la cellule assurant la structure tridimensionnelle des cellules ; elles participent à la régulation et à la stabilité des jonctions serrées, c) les jonctions communicantes constituées de connexines formant des canaux permettent un transit de molécules (<1kDa) entre des cellules voisines, d) les desmosomes contribuent à la résistance mécanique des tissus grâce aux filaments intermédiaires, e) les hémidesmosomes permettent l'ancrage des cellules épithéliales à la lame basale sous-jacente.

NB: les adhésions focales qui sont également des complexes d'interaction avec la matrice extracellulaire situés au pôle basolatéral, mettant en jeu des intégrines et les microfilaments d'actine, ne sont pas représentés sur ce schéma. A noter également que les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes constituent le complexe apical jonctionnel qui est concentré à l'apex de la membrane latérale sur environ 1 µm.

INTRODUCTION

Les lipides alimentaires induisent également une sécrétion d'entérohormones. En effet, une perfusion d'acides gras libres au niveau du duodénum déclenche la sécrétion de GLP-1 et de la CCK (Feinle-Bisset *et al.* 2005). Le GLP-1 et GIP ont également un effet satiétogène et diminuent la production hépatique de glucose ainsi que la vidange gastrique (Nauck and Meier 2018).

Le glucagon-like peptide-2 (GLP-2), co-sécrété avec le GLP-1, est un facteur de croissance pour les entérocytes et confère une protection pour l'épithélium intestinal. Ses actions sur la prolifération et la régénération cellulaires ont été particulièrement étudiées dans un contexte de lésions intestinales (Brubaker 2018). Il renforce la fonction de barrière épithéliale, réduit la perméabilité intestinale et l'inflammation intestinale chez le rongeur (Brubaker 2018).

3) Fonction de barrière

a) Barrière physique et perméabilité

Les cellules épithéliales intestinales forment une barrière physique assurant ainsi une protection de la muqueuse intestinale grâce à une organisation en monocouche. Ces cellules forment un épithélium jointif grâce à différents types de jonctions intercellulaires : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes (figure 9). Cette épithélium représente une barrière sélective pour le passage de molécules de différentes tailles.

Les **jonctions serrées**, situées à l'apex de la membrane plasmique entre deux cellules, limitent très fortement les échanges de macromolécules entre la lumière intestinale et l'intérieur de l'organisme, elles garantissent le maintien d'une perméabilité intestinale équilibrée. Elles contrôlent le flux paracellulaire de l'eau, des ions et celui des molécules en fonction de leur taille de 6 à 60Å du sommet de la villosité vers la base de la crypte au niveau de l'intestin grêle chez la souris (Turner *et al.* 2014). Cette étanchéité est nécessaire pour limiter l'intrusion directe dans l'organisme de molécules présentes dans la lumière intestinale. Ces jonctions permettent un couplage électrique de surface et génèrent une différence de potentiel entre les deux versants apical et baso-latéral mesurable par la technique de « transepithelial electrical resistance » (TEER). Elles participent à la polarité des cellules puisqu'elles empêchent les protéines membranaires spécifiques d'un pôle de diffuser vers l'autre pôle (Balda 1996; Rossi *et al.* 2013).

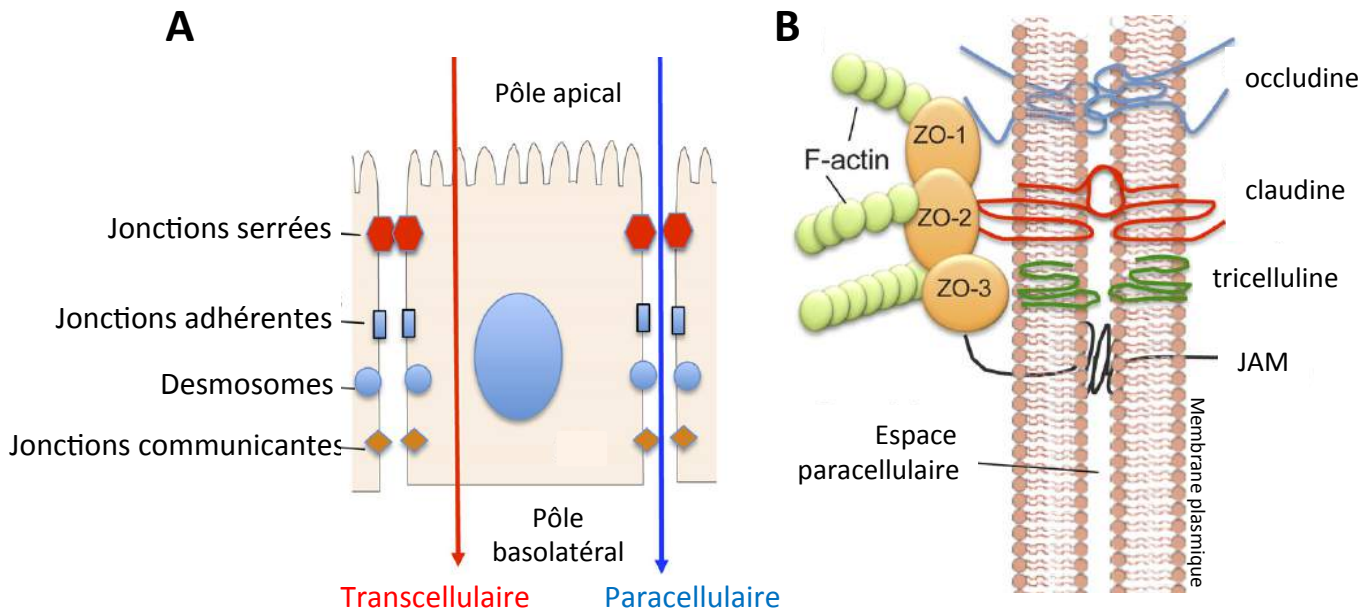


Figure 10 : La perméabilité intestinale régulée principalement par les jonctions intercellulaires.

A/ Les jonctions intercellulaires et plus particulièrement les jonctions serrées situées au niveau le plus apical de la membrane latérale à la jonction entre deux ou trois cellules adjacentes régissent la perméabilité paracellulaire. En situation physiologique, elles contrôlent l'étanchéité de l'épithélium intestinal et empêchent l'intrusion d'antigènes pathogènes au sein de l'organisme. Elles régulent le flux d'électrolytes et permettent le passage de petites molécules à travers l'espace intercellulaire. Le contrôle de la perméabilité paracellulaire est indispensable pour que les fonctions de transport actif transcellulaire de l'épithélium intestinal s'exercent correctement. L'équilibre osmotique nécessaire au bon fonctionnement des cellules épithéliales fait également intervenir la perméabilité transcellulaire. Celle-ci participe à la fonction d'absorption de l'intestin.

B/ La perméabilité paracellulaire est principalement régulée par les protéines de jonctions serrées formant un complexe protéique interconnecté. Il est essentiellement composé des protéines transmembranaires de la famille des TAMPs (occludine et tricelluline), des claudines, et de JAM, qui interagissent avec des protéines intracellulaires de la famille des zonula occludens (ZO-1, -2, -3) reliées au cytosquelette de filaments d'actine.

JAM : junctional adhesion molecule, ZO : zonula-occludens.

(Modifiée d'après Wells *et al.* 2017)

INTRODUCTION

Les jonctions serrées sont constituées de plusieurs familles de protéines transmembranaires dont le domaine intracellulaire interagit avec des protéines d'échafaudage cytosoliques qui, une fois assemblées forment un complexe protéique. Parmi les protéines transmembranaires, l'occludine et la famille des claudines, avec 26 membres identifiés chez l'Homme, sont associées à plusieurs protéines intracellulaires parmi lesquelles les plus étudiées appartiennent à la famille des zonula occludens ZO-1, ZO-2 et ZO-3, elles-mêmes liées aux microfilaments d'actine (Anderson and Van Itallie 2009) (figure 10B). Dans l'intestin, l'expression différentielle des claudines -1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, -12 et -15 le long de l'axe proximo-distal et cryto-villositaire permet de contrôler finement et sélectivement le passage des petites molécules (ions, sucres) qui traversent les pores des jonctions serrées (Lu *et al.* 2013). Ce passage est appelé le "pore-pathway" (Shen *et al.* 2011). La contraction excessive de l'actine régulée par l'activation de la protéine myosin light chain (MLC) par la MLC kinase (MLCK) provoque l'ouverture de la voie paracellulaire (Lee 2015) et permet, notamment en induisant l'endocytose de l'occludine, de générer une voie de passage vis à vis des macromolécules (Shen *et al.* 2011). Cette voie de passage, qui a été appelée "leak pathway" est donc beaucoup moins restrictive vis à vis de la taille des molécules mais elle est très peu présente en situation physiologique. La tricelluline, appartenant à la même famille que l'occludine (TAMPs : *Tight Junction-Associated Marvel domain-containing proteins*), est hautement enrichie dans les jonctions serrées formées au point de contact entre trois cellules voisines et elle est capable d'interagir avec ZO-1 (Ikenouchi *et al.* 2005). Elle serait complexée avec l'occludine au niveau de la jonction bicellulaire ce qui guiderait son assemblage aux jonctions serrées tricellulaires où elle serait séparée de l'occludine une fois le contact tricellulaire établi (Ikenouchi *et al.* 2008; Westphal *et al.* 2010). Les jonctions tricellulaires constituent une voie de passage pour les macromolécules. En effet, elles forment un "tube" d'un diamètre estimé à 10 nm, beaucoup plus important que le diamètre des pores formés par les claudines au niveau des jonctions serrées bicellulaires (maximum estimé 60 Å). L'expression de la tricelluline semble déterminante pour limiter le passage des macromolécules au niveau de ces jonctions tricellulaires (Krug *et al.* 2009). Une autre famille de protéines transmembranaires est présente aux jonctions serrées : les junctional adhesion molecules (JAM), qui font partie de la superfamille des immunoglobulines, JAM-A et JAM-4 exprimées par les cellules épithéliales intestinales sont également impliquées dans la régulation des jonctions serrées (Laukoetter *et al.* 2007). Les microtubules sont également recrutés au niveau des jonctions serrées, par l'intermédiaire en particulier de la cinguline (Zihni *et al.* 2016).

INTRODUCTION

Les **jonctions adhérentes** qui assurent la structure tridimensionnelle de la cellule contiennent plusieurs familles de molécules d'adhérence. La E-cadhérine faisant partie de la famille des cadhérines classiques est exprimée par les cellules épithéliales intestinales. Ces protéines sont dépendantes du calcium et s'associent avec plusieurs protéines de la famille des caténines et avec les microfilaments d'actine du cytosquelette, formant une ceinture qui encercle la cellule. Les jonctions adhérentes participent à la régulation et à la stabilité des autres jonctions dont les jonctions serrées. Elles sont capables d'induire une signalisation intracellulaire et influer les réponses cellulaires (pour revue Buckley et Turner 2018).

Les **desmosomes** retiennent fermement les cellules entre elles de façon à ce qu'elles forment un épithélium résistant aux déformations mécaniques, grâce aux filaments intermédiaires ancrés dans une plaque cytoplasmique dense, un complexe constitué en particulier de protéines membranaires de la famille des cadhérines desmosomales, les desmoglénines et desmocollines (figure 9). A travers l'identification de la protéine cellulaire du prion (PrP^c) comme composant membranaire intrinsèque des desmosomes, notre équipe a démontré l'implication des desmosomes dans la fonction de barrière intestinale. En effet, chez la souris et dans la lignée d'entérocytes humains (cellules Caco-2/TC7), l'invalidation de l'expression de cette protéine desmosomale altère la structure des jonctions serrées, l'adressage des protéines jonctionnelles aux jonctions et augmente la perméabilité paracellulaire (Petit et al. 2013).

Les **jonctions communicantes** (Gap junctions) sont formées par un assemblage de canaux traversant les membranes plasmiques de deux cellules en formant des plaques jonctionnelles constituées de connexines. Les jonctions communicantes permettent l'échange d'ions, d'acides aminés et des petites molécules inférieures à 1kDa (Yeager and Harris 2007).

En conditions physiologiques, la barrière formée par l'épithélium intestinal est relativement poreuse comparée à celle d'autres épithelia comme le rein ou la peau. Elle est néanmoins finement régulée, la perméabilité paracellulaire diminuant dans le côlon par rapport à l'intestin grêle et dans les villosités par rapport aux cryptes. La perméabilité paracellulaire, dite "passive", reflète essentiellement l'état des jonctions serrées, déterminée par la combinaison et la nature des interactions entre les différentes protéines qui les composent. Mais la mort cellulaire contribue également de façon importante à la perméabilité d'un épithélium. Comme on le verra plus loin, plusieurs facteurs de l'environnement luminal

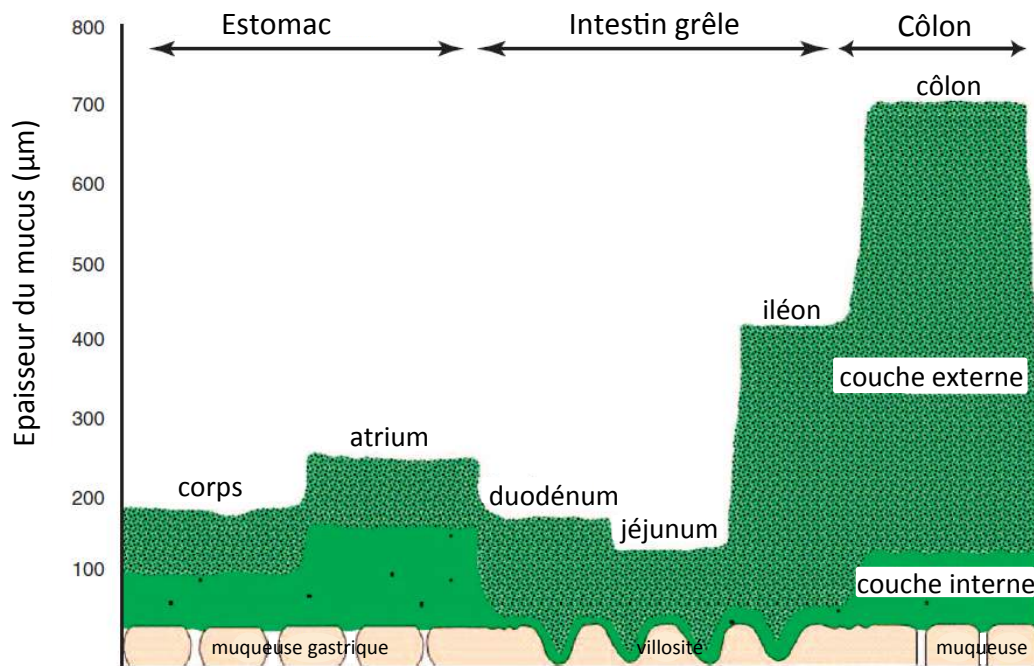


Figure 11 : Graphique représentant l'épaisseur des couches de mucus le long du tractus gastro-intestinal chez le rat.

L'épithélium intestinal est recouvert de deux couches de mucus : la plus interne est fermement attachée à la muqueuse et est pratiquement dépourvue de bactéries; la couche externe plus lâche est potentiellement colonisée par des bactéries commensales.

(Modifiée d'après la revue Juge 2012)

INTRODUCTION

ou basal sont capables de modifier la perméabilité de la barrière intestinale, en situation physiologique ou pathologique.

Le contrôle de la perméabilité paracellulaire est indispensable pour que les fonctions de transport actif transcellulaire de l'épithélium intestinal s'exercent correctement (Figure 10A). La perméabilité transcellulaire se traduit par le passage des nutriments à travers les cellules épithéliales grâce à des transporteurs actifs ou par simple diffusion notamment pour les acides gras libres à courtes chaînes.

La barrière physique est également une barrière mécanique puisque les mouvements péristaltiques des muscles intestinaux empêchent la rétention et la prolifération bactérienne.

b) Barrière chimique

L'épithélium intestinal est recouvert de mucus qui forme un gel semi-perméable, fortement hydraté composé de 95% d'eau, des électrolytes, des lipides, des immunoglobulines, des peptides antimicrobiens et des glycoprotéines nommées mucines. Cette couche de mucus est en constant renouvellement grâce à une sécrétion de mucus par les cellules caliciformes (Johansson and Hansson 2016). En effet, le taux de sécrétion de mucus dans le tractus gastro-intestinal est estimé à une dizaine de litre par jour, il est donc produit puis éliminé en continu afin d'assurer une protection permanente des structures sous-jacentes (Cone 2009).

L'épaisseur du mucus, déterminée par la balance entre le niveau de synthèse/sécrétion et de dégradation/élimination, diffère le long du tractus digestif et est maximale dans le côlon. Contrairement à l'intestin grêle qui ne comporte qu'une couche de mucus, le côlon est constitué de deux couches distinctes : une couche interne adhérente, fermement attachée aux cellules épithéliales, dépourvue de bactéries et dont l'épaisseur est d'environ 50 μm à 100 μm chez le rongeur ; et une couche externe plus lâche potentiellement colonisée par des bactéries commensales d'une épaisseur allant jusqu'à 100 μm et 700 μm chez la souris et le rat respectivement (Atuma *et al.* 2001; Johansson *et al.* 2008) (figure 11). L'épithélium colique est donc en interaction continue avec un microbiote abondant. Différents facteurs comme les hormones, les neuropeptides et les médiateurs inflammatoires tels que la prostaglandine E2 (PGE2) ou l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) peuvent moduler l'épaisseur de la couche de mucus en stimulant la sécrétion des mucines (Phillipson *et al.* 2008).

INTRODUCTION

Le gel de mucus est essentiellement constitué d'eau et de mucines. Il existe plusieurs types de mucines qui sont soit sécrétées et forment ou non un gel, soit transmembranaires ancrées à la membrane apicale des entérocytes pour former le glycocalyx. Le glycocalyx, structure mesurant 1µm d'épaisseur, est dégradé lors d'un sepsis entraînant ainsi une hyperperméabilité endothéliale avec une altération des jonctions serrées (Coquerel *et al.* 2013). Les mucines forment un réseau glycoprotéique empêchant la pénétration en profondeur de micro-organismes pathogènes et fournissant un habitat pour les bactéries commensales grâce à l'interaction entre les adhésines de la surface bactérienne et les glycanes des mucines. Ces résidus glycaniques agissent comme des récepteurs pour les pathogènes qui sont alors piégés dans le mucus puis éliminés *via* le flux de mucus généré par le péristaltisme (Juge 2012).

La mucine MUC2 est une des mucines prépondérante dans l'intestin. Des souris déficientes pour la mucine MUC2 perdent leur couche protectrice de mucus donnant aux bactéries un accès direct aux cellules épithéliales et conduisant au développement d'une inflammation colique (Johansson *et al.* 2008; Kim and Ho 2010; Van der Sluis *et al.* 2006). Ces animaux voient leur perméabilité et leur susceptibilité à développer une colite en réponse au dextran sulfate de sodium (DSS) augmentées (Kim and Ho 2010). L'expression des mucines et en particulier de MUC2 peut être modulée par des facteurs pro-inflammatoires, par des acides gras à courtes chaînes, des pathogènes présents dans la lumière intestinale ou des fragments bactérien comme le LPS (pour revue (Cornick *et al.* 2015)). Des modifications du métabolisme intracellulaire (ER stress, autophagie) des cellules à mucus contrôlent la sécrétion de mucus et modifient l'épaisseur de la couche de mucus (pour revue (Cornick *et al.* 2015)). D'autre part le microbiote peut également stimuler la différenciation des cellules caliciformes (Chung and Kasper 2010).

c) Barrière immunologique

Comme je l'ai évoqué précédemment, l'intestin a développé un système immunitaire qui lui permet de déclencher une réponse immunitaire locale voire systémique pour faire face aux pathogènes ou aux antigènes d'origine alimentaire ou bactérienne. Ce système immunitaire est finement contrôlé et assure le maintien d'un équilibre entre tolérance et protection envers des facteurs environnementaux, nutritionnels et le microbiote. Le système immunitaire intestinal comprend des cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée et adaptative. Ces deux types de réponse immunitaire sont intimement intriquées et partagent des

INTRODUCTION

acteurs communs (pour revue (Kayama et Takeda 2012)).

L'immunité innée, qui constitue une réponse non spécifique et immédiate de l'organisme fait appel à différents types cellulaires dont les cellules épithéliales, les cellules dendritiques, les macrophages, les neutrophiles et les cellules NK. L'initiation de la réponse immunitaire innée résulte de la reconnaissance de motifs associés aux pathogènes bactériens, viraux ou parasitaires (Pathogen Associated Molecular Pattern, PAMP) par les récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor). Il existe plusieurs récepteurs PRR, dont les toll-like receptors (TLR) et les nucleotide-binding leucin-rich repeat-containing receptors (NLR) dont les premiers membres identifiés sont les protéines NOD1 et NOD2/CARD15 (pour revue Claes, Zhou, et Philpott 2015). Les TLR sont des protéines transmembranaires présentes à la surface cellulaire ou sur les endosomes et ont été très étudiés pour leur interaction avec le LPS (pour revue Lu et al. 2018). Les protéines NOD sont plus particulièrement impliquées dans la reconnaissance cytoplasmique de peptidoglycane bactérien. Les TLR et les protéines NOD activent des voies de signalisation conduisant à la sécrétion de cytokines et de chimiokines *via* l'activation de la voie NF- κ B, des MAP kinases et de la caspase-1. Il a également été montré un lien entre NOD2/CARD15 et la protéine ATG16L1 impliquée dans l'autophagie (Travassos *et al.* 2010). Les TLR et NLR sont fortement impliqués dans les maladies inflammatoires de l'intestin. En particulier, il a été montré que NOD2/CARD15 est un gène de susceptibilité à la maladie de Crohn (Hugot *et al.* 2001).

Les cellules épithéliales intestinales participent à la réponse immunitaire innée. Suite à la stimulation des récepteurs TLRs par les PAMPs, les cellules de Paneth et les entérocytes sécrètent des peptides antimicrobiens tels que Reg3- β et Reg3- γ impliqués dans l'immunité innée et qui une fois dans la lumière intestinale vont former des pores puis lyser les parois bactériennes (Mukherjee and Hooper 2015). Reg-3 γ cible spécifiquement les bactéries Gram-positives après s'être lié aux peptidoglycanes bactériens de surface (Abreu 2010). Des travaux récents montrant une sur-expression de Reg3- β et Reg3- γ suite à une infection ou inflammation suggèrent que ces peptides antimicrobiens auraient également une activité anti-inflammatoire (Sovran *et al.* 2015). Les défensines et le lysozyme sécrétés par les cellules de Paneth ainsi que le mucus produit par les cellules caliciformes participent à la réponse immunitaire innée *via* leurs actions sur le microbiote intestinal (Nakamura *et al.* 2016).

L'immunité intestinale adaptative, dotée de mémoire, fait appel à une reconnaissance spécifique des antigènes. Elle fait intervenir l'ensemble des acteurs du GALT,

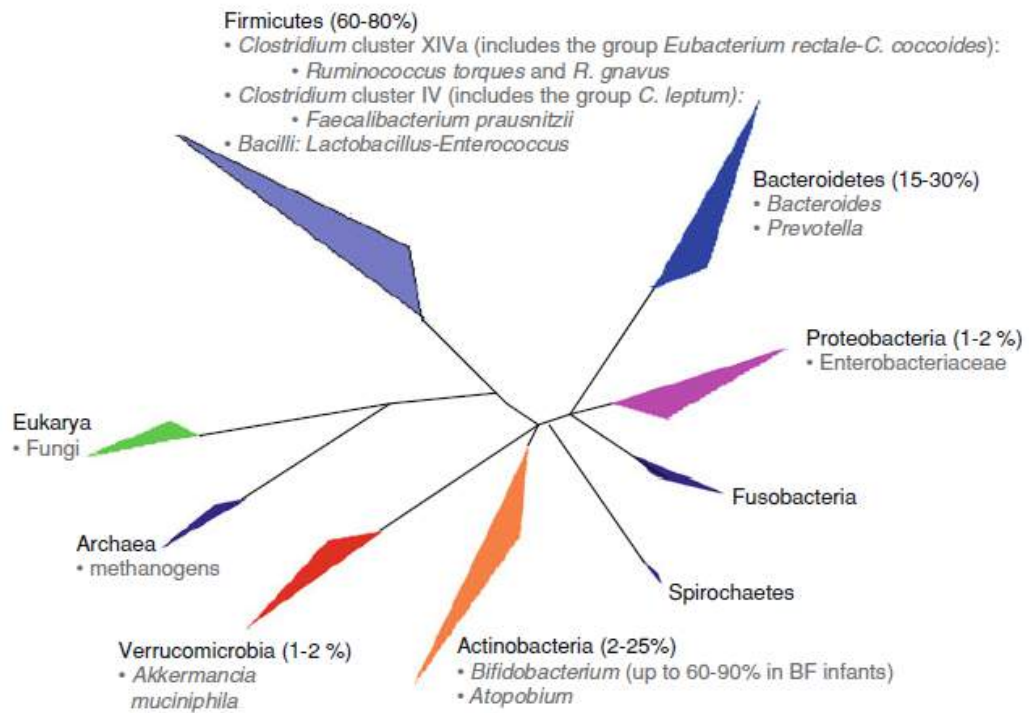


Figure 12: Arbre phylogénétique des microorganismes composant le microbiote présent dans le côlon chez l'Homme avec les principaux phyla bactériens.

L'abondance relative des phyla majoritaires du microbiote intestinal humain est représentée, les proportions sont exprimées en pourcentage. Les groupes, genres et espèces bactériennes qui ont été impliqués dans certaines pathologies humaines figurent dans l'arbre phylogénétique.

(Modifiée d'après Cheng *et al.* 2013)

INTRODUCTION

dont les lymphocytes T helper et B, mais également les cellules dendritiques qui émettent leurs dendrites entre les entérocytes et les cellules M ou à travers les cellules M afin d'échantillonner les antigènes présents dans la lumière intestinale, exerçant ainsi une fonction de sentinelle (Lelouard *et al.* 2012). La réponse immunitaire adaptative implique l'activation des lymphocytes T helper Th1, Th2, Th17 et Th22 et la suppression de l'activité des lymphocytes Treg sécrétant des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 et TGF- β . D'autre part, l'activation des cellules B par des antigènes issus de la lumière intestinale conduit à un changement phénotypique de ces cellules en plasmocytes sécrétant des IgA (pour revue (Lycke and Bemark 2017)). Les IgA protègent la muqueuse contre la digestion des protéines par des enzymes protéolytiques digestives ou bactériennes. Elles limitent aussi la translocation bactérienne, influencent le métabolisme des bactéries présentes dans la lumière et sont impliquées dans les interactions intestin-microbiote (Fagarasan 2008; Suzuki and Nakajima 2014).

Il existe évidemment de multiples échanges entre les acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative. La sécrétion de nombreuses cytokines participe notamment à ces échanges. L'implication de certaines cytokines dans l'inflammation intestinale au cours de l'obésité sera présentée dans la partie discussion.

d) Barrière écologique

Le tractus digestif est peuplé de micro-organismes, principalement des bactéries mais aussi des virus, des levures, des champignons et des archées, avec un gradient de concentration maximal atteint dans le côlon.

L'abondance du microbiote intestinal est estimée à environ 10^{14} micro-organismes comprenant plus de 1000 espèces bactériennes différentes réparties majoritairement en cinq phyla : les Firmicutes, les Bacteroidetes, les Actinobacteria, les Proteobacteria et les Verrucomicrobia (figure 12) (Rajilić-Stojanović and de Vos 2014). Le phylum des Firmicutes est principalement composé de bactéries appartenant au groupe Clostridia des clusters XIVa et IV incluant respectivement les groupes *Eubacterium rectale-Clostridium coccoides* et les *Clostridium leptum*. Le groupe *Eubacterium rectale-C. coccoides* comprend les espèces appartenant aux genres *Clostridium*, *Eubacterium*, *Rhuminococcus* et *Butyrivibrio* alors que le groupe *C. leptum* comprend les espèces *Faecalibacterium prausnitzii* ou encore *Ruminococcus albus* et *R. flavefaciens*. Le second phylum le plus représenté est celui des Bacteroidetes

INTRODUCTION

comprenant plusieurs espèces de Bacteroides : *B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis*, *B. ovatus* et *B. caccae* (Rajilić-Stojanović and de Vos 2014). Plus de 90% des espèces bactériennes intestinales ne sont pas cultivables puisqu'elles vivent pour la majorité dans un environnement physico-chimique particulier et anaérobie. De telles conditions étant difficiles à mettre en place en laboratoire, de nouvelles approches ont été développées pour étudier le microbiome dans un contexte physiologique et physiopathologique notamment grâce à l'outil de séquençage à haut débit du gène bactérien codant l'ARN ribosomal 16S. Ainsi, le microbiote d'un individu contient environ 750 000 gènes, contre 25 000 gènes pour le génome humain, donnant au microbiote toute son importance dans la régulation des fonctions physiologiques (Shreiner *et al.* 2015).

Cet écosystème complexe se met en place chez l'Homme dès la naissance et se stabilise dans le temps vers l'âge de 2 ans. Bien que des épisodes perturbateurs tels que la prise d'antibiotiques peuvent exister, un retour à l'équilibre est possible, il s'agit du phénomène de résilience (Villanueva-Millán *et al.* 2015). De plus, si la composition du microbiote intestinal en terme d'espèces est propre à chaque individu, elle reste néanmoins similaire entre les individus en terme d'abondance des grands groupes phylogénétiques (Shreiner, Kao, et Young 2015).

Le rôle protecteur du microbiote intestinal contre la colonisation par des pathogènes potentiellement délétères pour l'organisme passe par différentes actions. En effet, les bactéries commensales limitent l'accessibilité des bactéries pathogènes aux nutriments par effet de compétition et modulent les réponses des cellules de l'hôte pour inhiber la croissance des pathogènes. Les bactéries communiquent et interagissent à la fois avec les cellules de l'organisme mais également entre elles *via* le *quorum sensing* qui est un mode de communication faisant appel à des substances chimiques sécrétées et captées par les bactéries permettant la coordination de leur métabolisme et autres processus complexes tels que la formation d'un biofilm (Srivastava *et al.* 2017).

En normobiose, une relation mutualiste et symbiotique existe entre le microbiote intestinal et l'organisme hôte. En effet, ce microbiote exerce des effets physiologiques bénéfiques pour l'hôte qui en retour fournit au microbiote une niche écologique et de multiples sources d'énergie. Les bactéries commensales participent au développement et à la maturation du système immunitaire, à la synthèse de certaines vitamines, à la production par

INTRODUCTION

les cellules épithéliales des peptides antimicrobiens, des IgA sécrétoires, de cytokines, de mucus et favorisent l'intégrité de la barrière épithéliale (Duerkop *et al.* 2009; Ihara *et al.* 2017).

Le microbiote contribue également aux fonctions métaboliques de l'hôte par la biotransformation de différents substrats alimentaires permettant d'obtenir de l'énergie pour la survie et la croissance bactérienne et de générer des métabolites absorbables et utilisables par les cellules épithéliales intestinales.

Parmi ces substrats, les fibres alimentaires non digérées par l'hôte vont être prises en charge par les bactéries fournissant ainsi la principale source d'énergie pour le microbiote sous forme de glucides (Makki *et al.* 2018). Les bactéries glycolitiques transforment les glucides en pyruvate *via* la glycolyse puis en acides gras à courtes chaînes (AGCC), produits finaux de la fermentation que sont le butyrate, le propionate et l'acétate. L'acétate et le propionate passent dans le compartiment sanguin, atteignent le foie puis les organes périphériques où ils seront utilisés comme substrats pour la néoglucogenèse et la lipogenèse. Le butyrate, représentant une importante source d'énergie pour les colonocytes, a notamment été décrit comme ayant des propriétés protectrices pour la muqueuse colique (Bedford and Gong 2018). Il inhibe l'inflammation en réduisant l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-8 et en induisant l'IL-10 ou TGF- β cytokines anti-inflammatoires (Bedford and Gong 2018). Le butyrate diminue le stress oxydatif et renforce la barrière épithéliale colique en participant à la formation des jonctions serrées dans l'épithélium colique (Hou *et al.* 2014).

Certaines bactéries ne fermentant pas les glucides utilisent les acides aminés provenant des protéines comme substrats énergétiques et aboutissant également à la formation d'AGCC mais également à d'autres composés pouvant être toxiques pour les cellules hôtes tels que l'ammoniac ou les dérivés indoles. Ces derniers vont être absorbés et détoxifiés par la muqueuse colique puis éliminés dans l'urée.

Concernant les lipides non absorbés par l'intestin grêle ou provenant de lipides bactériens ou encore issus de la desquamation des cellules épithéliales, ils sont également transformés par les bactéries. Le cholestérol est converti en coprostanol qui est non assimilable et sera donc éliminé dans les fèces (Horáčková *et al.* 2018). Les acides biliaires non recyclés (5% environ) arrivent dans le côlon et sont déconjugués pour former des acides biliaires secondaires les rendant ainsi plus hydrophobes et facilitant leur absorption passive (Enright *et al.* 2018; Long *et al.* 2017).

INTRODUCTION

Par ailleurs, le microbiote est capable de bio-convertir et de métaboliser les polyphénols contribuant à leurs actions bénéfiques anti-oxydantes et anti-inflammatoires (Dudek-Wicher *et al.* 2018). Le microbiome peut affecter l'absorption des xénobiotiques tels que les médicaments *via* des réactions de transformation de ces molécules causant alors une réduction de leurs biodisponibilités (Dudek-Wicher *et al.* 2018).

Ainsi, à la vue de ces différentes fonctions physiologiques, le microbiote intestinal est considéré comme un véritable organe à part entière. Un déséquilibre de la richesse et de la diversité des communautés bactériennes est observé dans plusieurs pathologies métaboliques et inflammatoires (Wang *et al.* 2017). Ainsi, une dysbiose du microbiote intestinal pourrait participer au développement de ces maladies.

III. Modulateurs de l'intégrité de la barrière intestinale

Comme décrit précédemment (voir chapitre III-3), la barrière intestinale, formée d'une monocouche de cellules épithéliales jointives assurant une étanchéité et une perméabilité sélective, représente une interface dynamique entre l'organisme et l'environnement « extérieur ». De ce fait, la barrière intestinale est sensible aux changements du microenvironnement de la lumière intestinale (nutriments, microbiote), du compartiment sanguin (cytokines pro-inflammatoires) et des modifications du nombre ou de la fonction des cellules de la muqueuse (recrutement de cellules immunitaires, entérohormones) (König *et al.* 2016). La barrière intestinale assurant une protection contre l'intrusion d'éléments étrangers et potentiellement pathogènes, les altérations de son intégrité observées dans certaines pathologies soulèvent la question de son rôle dans l'étiologie de ces maladies.

Une dérégulation et des anomalies liées à la fonction de barrière intestinale sont associées à de nombreuses pathologies intestinales telles que les MICI, le syndrome de l'intestin irritable, les cancers digestifs ou encore la maladie cœliaque (König *et al.* 2016). L'altération de la barrière épithéliale intestinale a également été décrite dans des pathologies extra-intestinales comme dans le diabète de type 1, la mucoviscidose ou encore l'autisme (De Lisle *et al.* 2011; Sanctuary *et al.* 2018). La contribution possible de la barrière intestinale dans les maladies métaboliques telles que l'obésité a également été mis en évidence, notamment par les travaux de notre équipe (Monteiro-Sepulveda *et al.* 2015; Genser *et al.* 2018).

L'ensemble de ces études a donné naissance au concept dit du « leaky gut syndrome » qui propose que des défauts de la barrière conduisant à une perturbation de la perméabilité intestinale participent au développement de différentes pathologies.

Les effets de différents perturbateurs de la barrière intestinale sont abordés ci-dessous. Bien que l'impact de molécules inflammatoires, des changements de la composition du microbiote, et de l'alimentation (en particulier des lipides alimentaires) soit présenté ici dans des chapitres distincts, un lien très étroit existe entre ces différents éléments tous identifiés comme modulateurs de l'intégrité de la barrière intestinale.

INTRODUCTION

1) Cytokines et fonction de barrière

Parmi les molécules inflammatoires capables de moduler l'intégrité de la barrière intestinale, les cytokines pro- et anti-inflammatoires sont celles qui ont été les plus étudiées (Onyiah and Colgan 2016; Andrews *et al.* 2018). L'impact des cytokines sur la barrière intestinale peut varier selon le modèle d'étude considéré ce qui conduit parfois à des observations contradictoires dans la littérature. Je ne présenterai ici que quelques exemples montrant l'implication de cytokines et des mécanismes moléculaires impliqués dans leurs effets sur la barrière intestinale.

Parmi les cytokines ayant des effets délétères sur la barrière intestinale, le TNF- α a été beaucoup étudié. Cette cytokine est capable d'augmenter la perméabilité intestinale *in vivo* chez la souris (Al-Sadi *et al.* 2016) et dans un modèle de cellules épithéliales intestinales en culture, les cellules Caco-2 (Ma *et al.* 2004). Cette dernière observation indique que le TNF- α est capable d'agir directement sur les cellules épithéliales, sans faire intervenir les cellules immunitaires ou le microbiote. Dans les cellules Caco-2, il a été démontré que le TNF- α active une cascade de signalisation conduisant à la déstabilisation des jonctions serrées et par conséquent à une augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire (Ma *et al.* 2004; Al-Sadi *et al.* 2016).

Suite à sa liaison sur son récepteur présent à la surface des cellules entérocytaires, le TNF- α active la voie des MAP3 kinase qui entraîne l'activation de la voie NF- κ B qui à son tour augmente l'expression de la « myosine light chain kinase » (MLCK) qui contrôle la stabilité des jonctions serrées. L'équipe de Jerrold Turner (Université de Chicago, USA) a montré l'importance de la MLCK dans la déstabilisation des jonctions serrées en réponse au TNF- α (Shen *et al.* 2006). La MLCK contrôle, *via* la phosphorylation de la myosin light chain (MLC), la contraction de l'acto-myosine. Cette ceinture d'acto-myosine est nécessaire à la stabilisation des jonctions serrées mais une contraction excessive entraîne leur déstabilisation. Chez l'Homme, un taux élevé de TNF- α est retrouvé dans la muqueuse intestinale ou la *lamina propria* de patients atteints de MICI ou d'obésité (Lee 2015; Monteiro-Sepulveda *et al.* 2015). Le TNF- α semble avoir un rôle majeur dans la maladie de Crohn, puisque le traitement des patients souffrant de cette maladie avec des anticorps anti-TNF- α est une stratégie thérapeutique efficace et qui conduit notamment à une amélioration de la fonction de barrière intestinale (Levin *et al.* 2016).

D'autres cytokines sont également capables de perturber la barrière intestinale, comme

INTRODUCTION

l'interféron- γ , l'IL-1 β et l'IL-6. Les mécanismes d'action impliqués dans l'augmentation de la perméabilité intestinale par ces cytokines sont partiellement décrits. Ils interviennent dans l'activation de voie de signalisation impliquant de nombreuses kinases (PKA, PKC, ROCK), les GTPases Rho et Rac et la voie NF- κ B. Les données actuelles ne permettent pas de déterminer si l'activation d'une cascade de signalisation précise est réellement spécifique d'une cytokine. Quelle que soit la cytokine considérée, les voies de signalisation activées conduisent toutes à la déstabilisation des complexes jonctionnels (Andrews *et al.* 2018). Les cytokines peuvent également agir en combinaison les unes avec les autres, comme cela a été décrit pour le TNF- α et l'INF- γ qui agissent de façon indépendante et synergique sur la diminution de l'expression de l'occludine *via* l'activation de voie de signalisation contrôlant le facteur de transcription AP2 (Mankertz *et al.* 2000).

D'autres cytokines, comme l'IL-17, auraient un effet bénéfique sur la barrière intestinale. En effet, il a été montré que même si l'invalidation totale de l'expression d'IL-17 chez la souris ne perturbe pas la barrière intestinale en condition basale (Lee *et al.* 2015), ces souris présentent une perméabilité intestinale aux macromolécules augmentée (*versus* des souris sauvages) lorsqu'elles sont soumises à une colite induite par le sulfate de dextran (DSS) (Lee *et al.* 2015). De même, l'inhibition des voies de signalisation dépendantes de la cytokine IL-17, par des anticorps neutralisants, est associée à une augmentation de la perméabilité intestinale chez la souris sauvage soumise à une colite (Lee *et al.* 2015; Maxwell *et al.* 2015). Ce défaut de barrière intestinale serait dû à la perte de localisation à la membrane de la protéine de jonction serrée, l'occludine (Lee *et al.* 2015).

L'IL-10 et l'IL-22 (qui appartient à la même famille de cytokines que l'IL-10) participent au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. Ces deux cytokines se lient sur des récepteurs formés par des hétérodimères dont les partenaires sont communs à IL-10 et IL-22 (Andrews *et al.* 2018; Onyiah and Colgan 2016). L'invalidation totale du récepteur IL-10, IL-10R1, chez la souris provoque des défauts de la barrière intestinale se traduisant par une diminution de la TEER et une augmentation de la perméabilité intestinale, indiquant que cette cytokine aurait un effet bénéfique sur la barrière intestinale (Kominsky *et al.* 2014). IL-22 est décrit comme jouant un rôle protecteur sur la barrière intestinale en augmentant la sécrétion de mucus et de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales intestinales *via* l'action de la kinase STAT3 (Sovran *et al.* 2015). Cependant, des travaux récents montrent également

INTRODUCTION

que l'IL-22 est capable de provoquer des défauts de barrière intestinale *via* l'augmentation de l'expression de la claudine 2, qui est une protéine formant des pores favorisant le passage des cations et des petites molécules (<4 Å) (Tsai *et al.* 2017; Wang *et al.* 2017). Ainsi, les données acquises sur l'IL-22 (Zenewicz 2018) illustrent bien la complexité du mode d'action de ces cytokines sur la barrière intestinale.

2) Microbiote et fonction de barrière

De plus en plus de travaux s'intéressent au rôle du microbiote intestinal dans le fonctionnement de l'organisme. Historiquement, beaucoup d'études ont porté sur l'effet de pathogènes sur l'épithélium intestinal. Depuis les avancées technologiques permettant la caractérisation de plus en plus précise du métagénome, la mise en évidence d'une dysbiose dans plusieurs maladies inflammatoires ou métaboliques a permis d'émettre des hypothèses sur l'implication de la relation cellules hôtes-microbiote dans la survenue de ces pathologies et en particulier *via* son rôle dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale.

Le microbiote intestinal jouerait un rôle critique dans le dysfonctionnement de la barrière épithéliale puisque des souris axéniques ou des souris déplétées de leur flore intestinale suite à l'administration d'antibiotiques sont plus susceptibles à l'inflammation induite par le DSS, soulignant ainsi son rôle dans l'homéostasie intestinale (Natividad and Verdu 2013). D'autres études rapportent l'effet de l'administration de probiotiques sur la perméabilité aux ions ou aux macromolécules cependant très peu de publications décrivent les mécanismes impliqués (Natividad and Verdu 2013). Je présenterai ici comme exemple les données connues sur une bactérie pathogène et sur une bactérie commensale.

Un rôle direct d'une souche pathogène adhérente et invasive d'*Escherichia coli* (AIEC) sur la barrière épithéliale intestinale a été observé (pour revue (Shawki and McCole 2016)). Cette bactérie, historiquement isolée à partir d'un échantillon de muqueuse iléale provenant d'un patient atteint de la maladie de Crohn, est présente en abondance chez certains patients atteints de MICI. Le rôle de cette espèce bactérienne sur la barrière intestinale fait intervenir plusieurs acteurs cellulaires et moléculaires. Sur un modèle de cellules épithéliales en culture, l'AIEC provoque augmentation de la perméabilité aux ions et aux macromolécules (Wine *et al.* 2009). Des modifications de la localisation à la membrane de ZO-1 (protéine des jonctions serrées) et de la E-cadhérine (protéine des jonctions adhérentes) ont été rapportées

INTRODUCTION

dans des modèles cellulaires infectés par AIEC (Wine *et al.* 2009). Au-delà de ces effets directs, l'AIEC suite à sa translocation à travers l'épithélium est capable d'activer la sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires de la *lamina propria* et d'augmenter la sécrétion de TNF- α ce qui pourrait également contribuer à amplifier les perturbations de la barrière (Eaves-Pyles *et al.* 2008).

La bactérie *Akkermansia muciniphila* (AKK) appartient à la flore commensale intestinale et a fait l'objet de nombreuses études concernant son implication dans diverses pathologies (diabète de type 1, MICI, obésité) (pour revue (Derrien *et al.* 2017)). Elle est considérée comme ayant un effet bénéfique sur l'homéostasie de l'épithélium intestinal et la diminution de son abondance est corrélée avec ces pathologies. Sur modèles de cellules épithéliales en culture, AKK induit une diminution de la perméabilité aux ions (Reunanen *et al.* 2015). Son action sur la barrière intestinale serait également indirecte *via* sa capacité à contrôler le microbiote intestinal, à sécréter des acides gras à longues chaînes, à augmenter la production de mucus et à stimuler les défenses immunitaires (Derrien *et al.* 2017).

Au-delà de l'effet spécifique de ces bactéries, les fragments bactériens comme les LPS produits par les bactéries Gram négatif, sont capables d'augmenter la perméabilité *via* l'activation des récepteurs TLR présents sur les cellules épithéliales intestinales (Guo *et al.* 2013). Toutefois, le traitement de souris axéniques avec des fragments bactériens contribue au contraire à l'amélioration de leur fonction de barrière intestinale en augmentant l'épaisseur de la couche de mucus pour atteindre un niveau similaire à celle présente chez les souris sauvages (Petersson *et al.* 2011). Le microbiote peut également moduler la perméabilité intestinale *via* son action sur le système endocannabinoïde. En effet, l'action conjointe de LPS et d'un agoniste du récepteur aux endocannabinoïdes augmente la perméabilité intestinale et diminue l'expression des protéines ZO-1 et occludine alors que l'utilisation d'un antagoniste du récepteur normalise la perméabilité intestinale et l'expression de ces deux protéines de jonctions serrées (Muccioli *et al.* 2010).

Le microbiote est également capable de moduler la barrière intestinale à travers la production d'acides gras à courtes chaînes (Morrison and Preston 2016) et *via* leur rôle dans le métabolisme des acides biliaires (Wahlström *et al.* 2016). Les acides gras à courtes chaîne, majoritairement du butyrate, acétate et propionate, sont produits suite à la dégradation des fibres non digestibles par le microbiote (Flint *et al.* 2015) ou par la fermentation des acides aminés dans le côlon (Russell *et al.* 2011). Le rôle de ces acides gras à courtes chaînes et des

INTRODUCTION

acides biliaires sur la barrière intestinale est présenté dans le chapitre suivant.

3) Lipides et fonction de barrière

Je mentionnerai dans ce chapitre quelques exemples de l'impact de certaines classes de lipides sur la barrière intestinale puis de l'effet des régimes hyperlipidiques qui ont fait l'objet de nombreux travaux.

Comme indiqué dans le chapitre précédent, les AGCC sont produits par le microbiote principalement dans le côlon. Ces AGCC présentent des effets protecteurs sur la barrière intestinale (Mariadason *et al.* 1997). Dans les cellules épithéliales en culture, le butyrate augmente l'expression de plusieurs protéines de jonction serrées (occludine et ZO-1) et restaure l'altération de la perméabilité induite par une modification de la disponibilité en calcium (Cheng *et al.* 2018; Wang *et al.* 2012). Ces effets seraient dépendants de l'augmentation de l'expression de la claudine-1 (une autre protéine des jonctions serrées) par le butyrate, suggérant l'implication d'un facteur de transcription (Wang *et al.* 2012). *In vivo* chez des souris diabétiques (suite à une mutation sur le récepteur à la leptine, modèle db/db), le butyrate restaure l'intégrité de la barrière intestinale *via* l'activation de voie de signalisation dépendante du récepteur GPR43 et impliquant la protéine NLRC3 (membre de la famille des NOD-like receptor) (Cheng *et al.* 2018).

Les acides biliaires, qu'ils soient primaires ou secondaires (déconjugés par le microbiote), sont capables de perturber l'intégrité de la barrière épithéliale. *In vivo*, cet effet surviendrait dans différentes situations pathologiques (comme dans le cas du syndrome de l'intestin irritable) ou lorsqu'un dysfonctionnement du cycle entéro-hépatique conduit à un excès d'acides biliaires dans la lumière intestinale (Bajor *et al.* 2010). Leurs actions sur la perméabilité intestinale et la sécrétion de peptides antimicrobiens dépend de la nature de l'acide biliaire considéré, du temps d'exposition et du modèle cellulaire utilisé, certains acides biliaires exerçant des effets délétères (chenodeoxycholic acid) et d'autres pas ou peu d'effets (lithocholic acid) (Sarathy *et al.* 2017; Tremblay *et al.* 2017). Il n'existe que peu de données sur les mécanismes moléculaires impliqués, cependant une diminution de l'occludine et une induction du stress oxydatif sont observés dans des cellules épithéliales intestinales en culture (Sarathy *et al.* 2017).

Une action du cholestérol sur la barrière intestinale a été reportée. En effet, il a été montré, dans la lignée épithéliale intestinale Caco-2, que la déplétion des membranes en

INTRODUCTION

cholestérol provoque une augmentation de la perméabilité aux ions et aux macromolécules, et une diminution de la localisation de protéines des jonctions serrées aux jonctions intercellulaires (Lambert *et al.* 2005). Un rôle du cholestérol dans le maintien des protéines de jonctions serrées dans des domaines membranaires riches en cholestérol a été évoqué (Lambert *et al.* 2007).

Les phospholipides, et en particulier la phosphatidylcholine, participeraient au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. En effet ce sont des constituants de la couche de mucus et ils contribuent au maintien de l'intégrité des membranes des cellules épithéliales (Lichtenberger 2013). Peu de données existent quant aux mécanismes mis en jeu, la phosphatidylcholine exercerait un rôle protecteur contre l'invasion de pathogènes comme *Clostridium difficile* (Olson *et al.* 2015). Un apport de de phosphatidylcholine est utilisé pour traiter les patients atteints de colite ulcéraire (Schneider *et al.* 2010; Stremmel 2005).

Ainsi, pris isolément, de nombreux lipides sont capables de moduler la barrière intestinale *via* plusieurs mécanismes. De nombreuses études dont le but était d'établir ou de reproduire les caractéristiques de pathologies humaines comme le diabète ou l'obésité ont utilisé des animaux soumis à des régimes hyperlipidiques généralement sur du long terme. Dans ces modèles d'études, les modifications métaboliques induites par l'apport en lipides, l'altération de la barrière intestinale, le changement du microbiote et l'inflammation sont intimement liés.

Une alimentation riche en lipides chez le rat est associée à l'élévation de marqueurs inflammatoires intestinaux tels que la calprotectine fécale, mais également à la réduction de l'expression de la claudine-4 au niveau des villosités et des plaques de Peyer (Aqilah Zainal Abidin 2015). Du fait de la perturbation des jonctions intercellulaires situées au niveau des plaques de Peyer, il a été observé un transport accru d'antigènes à travers ces plaques (Khan 2017). Chez la souris, 4 semaines de régime hyperlipidique entraînent une augmentation de la perméabilité intestinale et une réduction de l'expression de gènes de transporteurs d'ions et de leurs localisations membranaires. Ces défauts conduisent à une perturbation des sécrétions d'ions par les cellules épithéliales, en particulier l'ion chlorure, qui altère massivement la couche de mucus avec notamment une rétention de la mucine MUC2 au niveau de la membrane apicale des cellules à mucus et une plus faible expression d'une métalloendopeptidase (Meprin- β) responsable du détachement et du relargage de mucus (Tomas *et al.* 2016).

INTRODUCTION

Un lien entre apports lipidiques, changement de la composition du microbiote intestinal, altération de la barrière et altérations métaboliques a été identifié pour la première fois par l'équipe de P. Cani et N. Delzenne. Cette équipe a observé chez la souris soumise à un régime obésogène un taux plasmatique de LPS élevé, donnant naissance à la notion d'endotoxémie métabolique. Cette augmentation de LPS circulant a été proposée comme la conséquence d'un défaut de barrière intestinale, comme en témoigne la diminution de l'expression de l'occludine et ZO-1 (Cani *et al.* 2007; Cani *et al.* 2008). L'infusion à elle seule de LPS pendant 4 semaines chez des souris sous un régime standard reproduit les désordres métaboliques comparables à ceux observés lors d'un traitement obésogène hyperlipidique (Cani *et al.* 2007). Depuis ces travaux pionniers, plusieurs autres études ont montré chez la souris génétiquement obèse ou rendue obèse par un régime riche en lipides, que l'expression et la localisation des protéines de jonctions serrées sont altérées contribuant possiblement à la translocation de LPS dans la circulation (Cani and Jordan 2018). Par ailleurs, le microbiote intestinal jouerait un rôle critique dans le dysfonctionnement de la barrière épithéliale puisqu'un traitement antibiotique administré à des souris rendues obèses par un régime hyperlipidique prévient l'augmentation de la perméabilité intestinale due au régime (Cani *et al.* 2008). La modulation du microbiote par l'administration de prébiotiques chez des souris obèses génétiquement améliore la fonction de barrière *via* une diminution de la perméabilité intestinale comparée aux souris obèses n'ayant pas reçu de prébiotiques; en particulier, une expression augmentée de ZO-1 et de l'occludine et une meilleure localisation de ces protéines aux jonctions serrées ainsi qu'une amélioration du statut inflammatoire de ces souris ont été observés (Cani *et al.* 2009). A l'inverse, un traitement antibiotique administré à des souris rendues obèses par un régime hyperlipidique prévient l'augmentation de la perméabilité intestinale due au régime (Cani *et al.* 2008).

Il a également été montré que le statut inflammatoire agit en conjonction avec l'apport lipidique pour moduler la barrière intestinale. En effet, il a été montré chez la souris IFN- $\gamma^{-/-}$ soumise à une alimentation riche en lipides pendant plusieurs semaines que la perméabilité intestinale est diminuée comparée aux souris sauvages ayant reçu le même régime. Ces travaux démontrent que cette cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les cellules intestinales est impliquée dans l'altération de la perméabilité induite par un régime hyperlipidique (Luck *et al.* 2015).

Chez l'homme, notre équipe a récemment montré qu'après une charge en lipides la perméabilité jéjunale (analysée *ex vivo*) est deux fois plus élevée chez des patients obèses,

INTRODUCTION

comparée à des non-obèses, alors qu'elle n'est pas différente en conditions basales (Genser et al. 2018). Cette augmentation de perméabilité en réponse à une charge en lipides est corrélée avec le degré d'inflammation systémique et intestinale (Genser *et al.* 2018).

4) Barrière intestinale altérée : un élément initiateur de l'inflammation intestinale et systémique au cours de l'obésité ?

L'origine de l'inflammation systémique de bas grade observée au cours de l'obésité chez l'Homme et dans des modèles murins sous régime hyperlipidique reste inconnue. Dans ces situations pathologiques bien installées, une altération de la barrière intestinale, une modification de la composition du microbiote intestinal et un état inflammatoire chronique coexistent, rendant difficile l'identification du facteur déclenchant.

Plusieurs observations suggèrent qu'une altération de la barrière intestinale serait un événement précoce qui surviendrait bien avant l'apparition des désordres métaboliques et de l'inflammation.

Le point de départ de cette hypothèse est l'endotoxémie métabolique décrite plus haut et le fait que l'infusion de fragments bactériens dans la circulation suffit à produire des désordres métaboliques (Cani *et al.* 2007). Un passage du LPS par la voie transcellulaire, mais aussi en paracellulaire dans le cas d'une altération de la barrière intestinale, est proposé (Guerville and Boudry 2016). *Via* sa liaison aux TLR sur les cellules épithéliales intestinales et son passage dans la circulation, le LPS pourrait ainsi enclencher des voies de signalisation et stimuler les cellules immunitaires.

Dans des modèles murins d'obésité induite par un régime hyperlipidique, l'augmentation de la perméabilité intestinale a été observée bien avant l'apparition de l'obésité. En effet, Johnson *et al.* ont montré une augmentation de la perte fécale d'albumine dès le premier jour de régime et une augmentation de la perméabilité intestinale aux macromolécules mesurée *in vivo* par le passage d'un marqueur fluorescent (FITC-dextran 4kD) après 7 jours de régime (Johnson *et al.* 2015). Dans cette étude, Johnson *et al.* montrent qu'une semaine de régime suffit à provoquer une déplétion en cellules éosinophiles dans la *lamina propria*, suggérant une modification de la réponse immunitaire dans l'intestin (Johnson *et al.* 2015). De même, chez le rat soumis à une alimentation riche en lipides, la perméabilité paracellulaire est augmentée de façon significative comparée au régime standard, au bout d'une semaine dans l'intestin grêle et après 3 semaines dans le côlon (Hamilton *et al.*

INTRODUCTION

2015).

Plusieurs études réalisées chez la souris, montrent qu'un défaut de barrière intestinale causé par la perte de l'expression de protéines de jonction rend les animaux plus susceptibles de développer une inflammation. L'équipe de J. Gordon fut la première à montrer, à l'aide d'une souris transgénique exprimant un dominant négatif de la N-cadhérine, que la perte de fonction de la E-cadhérine chez la souris conduit non seulement à l'augmentation de la perméabilité mais aussi à une infiltration de cellules immunitaires dans la muqueuse intestinale (Hermiston and Gordon 1995). Chez des animaux âgés de 6 semaines, cette inflammation, principalement observée au niveau du jéjunum, est caractérisée par une augmentation de lymphocytes, neutrophiles et macrophages dans la *lamina propria* et une augmentation du nombre de lymphocytes intra-épithéliaux. A l'âge de 3 mois, le phénotype développé s'apparente à celui observé chez l'Homme dans la maladie de Crohn montrant ainsi une aggravation du phénotype au cours du temps (Hermiston and Gordon 1995). D'autres études ont montré que l'inactivation chez la souris de la protéine de jonction serrée JAM-A (Laukoetter *et al.* 2007; Vetrano *et al.* 2008) ou de la protéine desmosomale PrP^c (Petit *et al.* 2012) bien que conduisant à une altération de la barrière intestinale, ne provoque à l'état basal que peu ou pas d'inflammation. Cependant, lorsque ces animaux reçoivent un traitement au DSS afin d'induire une colite, l'inflammation survient plus précocement et de façon plus importante que chez des animaux contrôles soumis au même traitement.

Une perturbation des jonctions cellulaires *via* l'expression chez la souris d'une forme constitutivement active de la protéine kinase MLCK (impliquée dans la régulation des jonctions intercellulaires, cf. § II-3-a), provoque une augmentation de la perméabilité ainsi que des modifications subcliniques de l'expression de marqueurs de l'inflammation (Su *et al.* 2009a). Ces animaux, bien que ne développant pas spontanément de pathologie, sont plus susceptibles au développement d'une colite induite expérimentalement (Su *et al.* 2009a).

Les différents exemples mentionnés ci-dessous montrent qu'une altération de la barrière intestinale peut contribuer au déclenchement d'une réponse inflammatoire. La séquence des événements conduisant à l'inflammation intestinale et systémique au cours de l'obésité reste cependant à être élucidée.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

L'implication de l'intestin dans l'étiologie de l'inflammation systémique de bas grade observée au cours de l'obésité a été mise en avant cette dernière décennie par plusieurs travaux réalisés chez l'Homme et dans des modèles murins soumis à un régime hyperlipidique. Dans le cas d'une obésité installée, la coexistence de perturbations métaboliques, d'une altération de la barrière intestinale, des changements de la composition du microbiote et d'une inflammation rend difficile l'identification du ou des facteurs initiateurs.

Les travaux pionniers de Cani *et al* sur l'endotoxémie métabolique (Cani *et al.* 2007; Cani *et al.* 2008) associés aux travaux montrant qu'une seule charge en lipides suffit à provoquer une endotoxémie et une élévation du taux plasmatique de cytokines chez l'Homme sain (Erridge *et al.* 2007; Laugerette *et al.* 2011; Vors *et al.* 2015) et la souris (Ghoshal *et al.* 2009), suggèrent que l'apport en lipides et une altération de la barrière intestinale sont impliqués dans les étapes précoces de la survenue de l'inflammation systémique de bas grade.

Ces données nous permettent de formuler l'hypothèse que la répétition de repas riche en lipides pourrait provoquer des altérations de l'épithélium intestinal conduisant à l'inflammation intestinale. Celle-ci pourrait être à l'origine d'une inflammation systémique affectant l'ensemble des tissus de l'organisme et participerait à la mise en place de l'inflammation de bas grade observée au cours de l'obésité.

L'objectif principal de ma thèse a été d'étudier les évènements précoces induits par un apport à court terme de lipides alimentaires sur les fonctions intestinales.

Dans un premier travail (article 1, Ghezzal *et al.* soumis) j'ai cherché à déterminer si un apport d'acide gras suffit à provoquer une altération de la barrière et à initier une inflammation. L'ensemble de ces évènements pouvant être à l'origine de l'inflammation de bas grade observée au cours de l'obésité. Ce travail a été réalisé sur modèle murin et sur un modèle humain de cellules épithéliales intestinales en culture, les cellules Caco-2/TC7.

Dans un deuxième travail (article 2, (Morel *et al.* 2018)), j'ai participé à une étude portant sur la détection des lipides par le récepteur scavenger SR-B1 dans les cellules entérocytaires Caco-2/TC7. Cette étude m'a permis d'étudier les effets d'une signalisation lipidique sur la modulation de la composition des domaines résistants à l'action de détergents,

OBJECTIFS

« les rafts », qui représentent des plateformes de signalisation et dans lesquelles résident également plusieurs protéines de jonctions. Un rôle possible de la détection des lipides par les cellules épithéliales intestinales dans le contrôle de l'intégrité de la barrière intestinale sera abordé dans la discussion générale.

RESULTATS

I. Effet d'un acide gras saturé sur l'intégrité de la barrière intestinale et sur l'initiation de l'inflammation

Les résultats de cette étude sont présentés à la fin de ce chapitre sous la forme d'un article scientifique soumis dont je suis le premier auteur et qui s'intitule : « Saturated fatty acids damage gut epithelium integrity and initiate inflammatory cytokine production » (article 1)

Les données de la littérature concernant l'existence d'une endotoxémie métabolique déclenchée par une alimentation riche en lipides (Cani *et al.* 2007; Cani *et al.* 2008; Erridge *et al.* 2007; Ghoshal *et al.* 2009; Laugerette *et al.* 2011; Vors *et al.* 2015), nous permettent d'émettre l'hypothèse qu'une perturbation de l'intégrité de la barrière intestinale par les lipides alimentaires serait un événement précoce impliqué dans l'initiation d'une inflammation intestinale voire systémique. L'inflammation métabolique serait d'autre part directement affectée par la nature des acides gras qui compose l'alimentation. En effet, une inflammation plus importante est observée chez des souris nourries avec un régime isocalorique enrichi en huile de palme en comparaison avec d'autres huiles telles que l'huile de tournesol ou de colza (Laugerette *et al.* 2012; Ravussin *et al.* 2012). Ce résultat suggère que les acides gras saturés auraient des effets délétères plus importants que d'autres types d'acides gras sur la barrière intestinale.

L'objectif de ce travail a donc été d'étudier les effets à court terme d'un acide gras saturé, l'acide palmitique, sur la barrière intestinale et l'inflammation. Ce travail a été réalisé sur modèle murin et sur la lignée de cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2/TC7.

Résumé des résultats obtenus :

1/ Un apport aigu ou répété d'huile de palme est-il capable de perturber la barrière intestinale et d'induire une inflammation *in vivo*, chez la souris ?

J'ai tout d'abord recherché si l'apport à court terme d'acides gras saturés provoquait des effets délétères *in vivo* dans un modèle murin. J'ai étudié l'effet de l'huile de palme puisqu'elle est particulièrement riche en acides gras saturés et contient environ 45% d'acide palmitique. Dans mes expériences réalisées chez la souris, les lipides alimentaires n'ont pas été administrés *via* un régime hyperlipidique mais par gavage. En effet, il a été montré que les

RESULTATS

fibres alimentaires participent au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale (Chen *et al.* 2013; Ogata *et al.* 2017). Afin de limiter l'impact d'un appauvrissement en fibres, souvent observé lors de l'utilisation d'un régime hyperlipidique, dans mes expériences les animaux (souris sauvages C57BL/6) sont maintenus sous régime standard (riche en fibres) *ad libitum* et gavés quotidiennement avec de l'huile de palme.

Dans un certain nombre des expériences *in vivo*, j'ai inclus un groupe d'animaux qui a reçu dans l'eau de boisson du sulfate de dextran (DSS), un agent chimique connu pour induire une colite (Chassaing *et al.* 2014; Håkansson *et al.* 2015). La comparaison des animaux gavés avec l'huile de palme et ceux traités au DSS permettra d'évaluer l'ampleur de l'inflammation qui pourrait être induite par l'huile de palme.

J'ai étudié l'effet d'un gavage unique ou répété d'huile de palme sur l'intégrité de la barrière intestinale par différentes approches complémentaires : la mesure de la perméabilité intestinale aux macromolécules à l'aide d'un traceur fluorescent (FITC-dextran 4kD) et l'analyse par immunofluorescence de l'état des jonctions intercellulaires.

La mesure *in vivo* de la perméabilité intestinale aux macromolécules a révélé qu'un apport unique d'huile de palme suffit à augmenter la perméabilité intestinale d'un facteur 2 environ. Cette augmentation est d'une amplitude similaire à celle qui est observée chez les animaux gavés au DSS. L'apport répété d'huile de palme pendant 5 jours consécutifs ne semble pas exacerber cet effet. Comme la perméabilité intestinale est dépendante de l'intégrité des jonctions intercellulaires, j'ai réalisé des marquages en immunofluorescence sur des sections de jéjunum de souris pour visualiser l'état des jonctions. J'ai analysé plus particulièrement la localisation de plusieurs protéines de jonctions serrées (ZO-1, occludine et tricelluline) et des jonctions adhérentes (E-cadhérine). Un apport unique d'huile de palme entraîne la perte de la localisation membranaire de l'occludine et de la tricelluline ; la répétition d'un tel apport provoque la perte de la localisation à la membrane de toutes les protéines de jonctions étudiées.

J'ai ensuite évalué l'inflammation à la fois intestinale dans différents segments de l'intestin (jéjunum, iléon et côlon) et systémique des souris traitées en quantifiant l'expression des gènes et des protéines connus pour être modulés dans des processus inflammatoires. Les résultats obtenus montrent que la répétition d'ingestion d'huile de palme entraîne un déséquilibre de la balance inflammatoire en faveur de l'augmentation de marqueurs pro-inflammatoires dans l'intestin.

RESULTATS

Il a été décrit que la composition du microbiote peut changer rapidement après un changement alimentaire (David *et al.* 2014). J'ai donc recherché si l'apport répété d'huile de palme pendant 4 jours modifiait cette composition. Je me suis focalisée essentiellement sur les espèces connues pour être modulées dans des maladies inflammatoires de l'intestin et l'obésité. Grâce à un travail collaboratif avec l'équipe de Philippe Seksik (U1157, hôpital Saint-Antoine, Paris), j'ai mesuré l'abondance relative de certains groupes et espèces de bactéries par qPCR dans les fèces de souris traitées. Cette mesure montre que les espèces ayant des attributs protecteurs contre des agents pathogènes et bénéfiques pour les cellules de l'hôte, comme *Clostridium leptum*, *Akkermensia muciniphila* et Segmented Filamentous Bacteria (Marchix *et al.* 2018), voient leur abondance diminuée après un apport itératif d'huile de palme comparé au traitement contrôle sans huile. A l'inverse, le genre *Bacteroides*, connu pour être augmenté chez des animaux soumis à un régime obésogène enrichi en acides gras saturés (Devkota *et al.* 2012), a été retrouvé en quantité élevée chez nos souris ayant reçu de l'huile de palme de façon répétée.

Ainsi, les résultats chez la souris démontrent qu'un apport unique d'huile de palme est suffisant pour déclencher des défauts au niveau de la barrière intestinale et que la répétition d'un tel apport, bien que délivré à court terme, entraîne en plus une réponse de type pro-inflammatoire dans l'intestin et une modification de l'abondance d'espèces bactériennes du microbiote.

2/ Quels sont les mécanismes par lesquels l'acide palmitique induit des effets délétères sur la barrière intestinale et provoque une inflammation ?

Afin de déterminer le rôle spécifique de l'acide palmitique et de s'affranchir de l'impact du changement de la composition du microbiote sur la barrière intestinale, j'ai entrepris des expériences dans un modèle de cellules épithéliales intestinales, les cellules Caco-2/TC7. La lignée cellulaire Caco-2/TC7 a été établie après clonage de la lignée cancéreuse colique humaine Caco-2 (Chantret *et al.* 1994). Ce modèle de cellules épithéliales en culture est parmi les modèles cellulaires existant celui qui présente une différenciation morphologique et fonctionnelle la plus proche d'un entérocyte humain normal. Cette lignée forme une monocouche cellulaire. La culture de ces cellules sur filtre semi-perméable permet de mimer l'environnement physiologique de l'épithélium intestinal *in vivo* en séparant deux compartiments distincts : un compartiment apical mimant le contenu présent dans la lumière

RESULTATS

intestinale et un compartiment basal mimant le compartiment sanguin et la lymphe. L'huile de palme étant composée majoritairement d'acide palmitique et d'acide oléique, j'ai comparé les effets de ces deux acides gras sur l'intégrité de la barrière épithéliale et la sécrétion de cytokines. Ces acides gras sont apportés sous forme de micelles lipidiques représentant la forme physiologique des lipides alimentaires après un repas au niveau de la lumière intestinale. Dans mes expériences sur la lignée cellulaire Caco-2/TC7, j'ai comparé les effets provoqués par l'apport de ces acides gras à ceux induits par l'apport d'EGTA, connu pour perturber les jonctions et augmenter la perméabilité cellulaire *via* son effet de chélateur de calcium (Artursson 1990; Boulenc *et al.* 1993).

J'ai donc évalué l'impact d'un apport aigu ou répété d'acide oléique et d'acide palmitique sur l'intégrité de la barrière épithéliale. J'ai montré que quelle que soit la durée du traitement (24h ou 4 jours), l'acide oléique n'entraîne pas de modification de la perméabilité épithéliale mesurée par le passage du FITC-dextran 4kDa et par la mesure du passage d'ions (TEER) à travers la monocouche de cellules entérocytaires. De plus, la localisation et l'intensité des protéines de jonctions intercellulaires déterminées par marquage en immunofluorescence après l'apport d'acide oléique ne sont pas affectées et demeurent similaires aux cellules contrôles. En revanche, un traitement unique de 24h d'acide palmitique déclenche une augmentation de la perméabilité paracellulaire et une diminution de l'intensité des protéines de jonctions intercellulaires étudiées (ZO-1, occludine, tricelluline et E-cadhérine) sans affecter leur localisation membranaire. L'apport répété d'acide palmitique sur 4 jours exacerbe ces effets. En effet, la perméabilité paracellulaire après cet apport itératif est multipliée par un facteur 6 environ comparée aux cellules non traitées. Cet effet est associé à la délocalisation de la protéine des jonctions adhérentes E-cadhérine et à une diminution de l'intensité de fluorescence de l'ensemble des protéines de jonctions serrées.

Les cellules épithéliales intestinales étant capables de sécréter des cytokines (Miron and Cristea 2012; Stadnyk 2002), j'ai étudié les effets de ces deux acides gras, et en particulier de l'acide palmitique, sur l'expression des cytokines IL-8, IL-1 β et TGF- β 1 particulièrement bien exprimées par les cellules Caco-2/TC7. J'ai observé que l'acide oléique administré à court terme (24h) ou à plus long terme (4j) n'a pas d'effet sur l'expression de l'ensemble des cytokines analysées. En revanche un traitement de 24h avec de l'acide palmitique augmente le taux d'ARNm d'IL-8. Un apport à plus long terme (4 jours) accentue cet effet et induit la sécrétion de cette cytokine pro-inflammatoire. Cet apport itératif d'acide

RESULTATS

palmitique diminue également le taux d'ARNm de la cytokine anti-inflammatoire TGF β par rapport aux cellules contrôles. En revanche l'acide palmitique n'a pas d'effet sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α alors le taux d'ARNm de ces cytokines augmente après un traitement par l'EGTA. Ce résultat suggère que les mécanismes d'action mis en jeu par l'acide palmitique et l'EGTA sont différents.

Afin de déterminer si les effets délétères sur la barrière épithéliale et l'initiation d'une réponse inflammatoire médiés par l'acide palmitique sont transitoires, j'ai traité les cellules avec de l'acide palmitique pendant 4 jours suivi de 24h ou 48h sans aucun traitement. Les résultats obtenus montrent que l'impact du traitement itératif, bien qu'il soit atténué au bout de 48h, perdure dans le temps.

J'ai souhaité déterminer les mécanismes moléculaires responsables des effets délétères de l'acide palmitique sur la barrière et l'inflammation intestinale. Contrairement à l'acide oléique, l'acide palmitique est connu pour provoquer un stress du réticulum endoplasmique (RE) et la synthèse *de novo* des céramides qui sont toutes deux des voies métaboliques décrites comme perturbatrices des fonctions cellulaires (Chaurasia and Summers 2015; Lindholm *et al.* 2017). J'ai donc étudié l'implication de ces deux voies.

L'analyse par qPCR de l'expression de plusieurs marqueurs du stress du RE montre une légère augmentation du taux de leurs ARNm après traitement avec l'acide palmitique mais aussi avec l'acide oléique, comparé aux cellules non traitées. En comparaison, une forte augmentation de l'expression de ces marqueurs est observée en réponse au DTT, un agent inducteur du stress du RE. Ainsi, si on ne peut pas totalement exclure l'implication d'un stress du RE dans les effets de l'acide palmitique, il ne semble pas à lui seul expliquer l'impact de cet acide gras sur la barrière épithéliale et l'inflammation.

Pour explorer un effet de l'acide palmitique *via* la synthèse *de novo* des céramides, j'ai tout d'abord cherché à déterminer si l'apport de céramides aux cellules Caco-2/TC7 modifie la perméabilité cellulaire et l'expression de cytokines. L'augmentation intracellulaire du taux de céramides est réalisée par l'apport de céramides à courte chaîne, le C2-céramide, qui sera ensuite élongé dans la cellule (Hajduch *et al.* 2001; Tran *et al.* 2016; Uchida 2014). J'ai observé que l'apport de C2-céramide produit les mêmes effets délétères sur la barrière épithéliale et sur l'expression des cytokines inflammatoires que ceux observés après un traitement par l'acide palmitique. Afin de déterminer si une augmentation du taux de céramides produits par la voie de synthèse *de novo* à partir de l'acide palmitique est

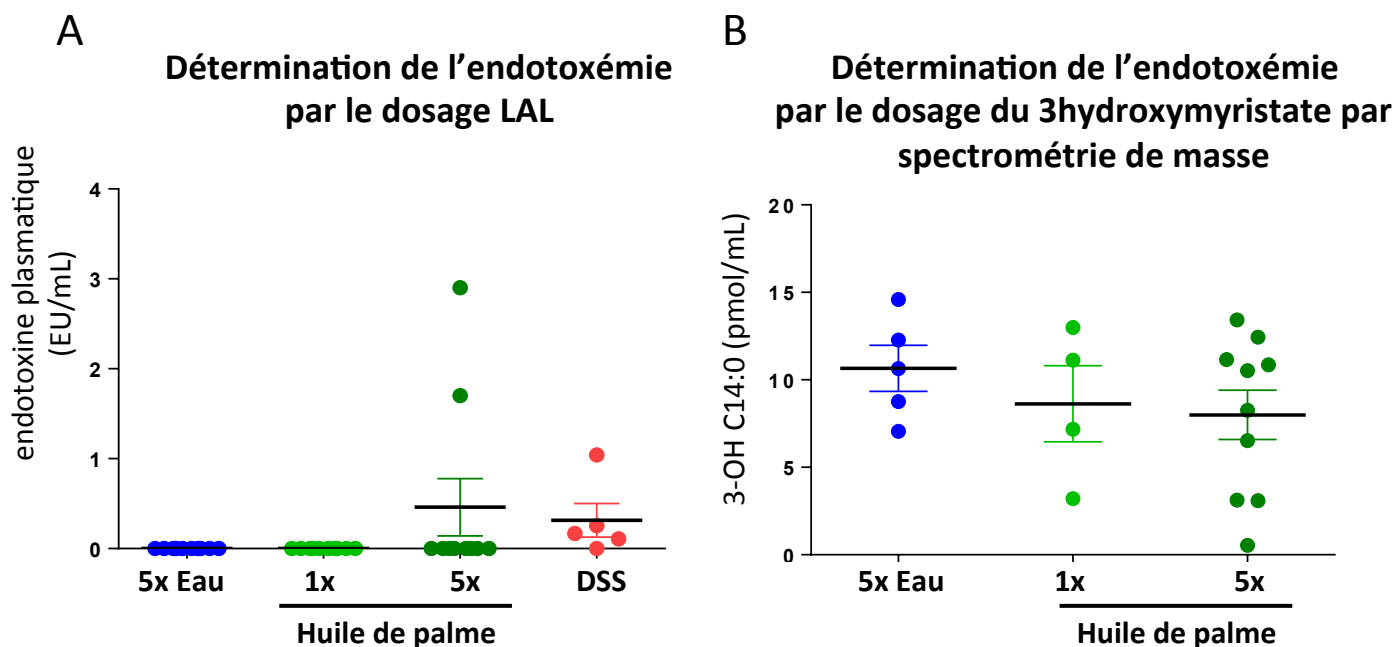


Figure 13 : Effet d'un apport aigu ou répété d'huile de palme sur l'endotoxémie.

Les souris soumises à un régime standard ont été traitées avec un gavage unique ou répété (5 fois) d'huile de palme ou d'eau. L'endotoxémie après traitement a été comparée à celle des souris développant une inflammation en réponse au DSS à 3,5% administré dans l'eau de boisson pendant 5 jours. Le sang a été prélevé en intracardiaque 1h après le dernier gavage dans des conditions stériles. Comme attendu, les souris traitées au DSS ont une endotoxémie augmentée. Il semble que l'ingestion à court-terme d'huile de palme n'entraîne pas d'endotoxémie métabolique.

A/ L'endotoxémie est mesurée par dosage LAL (« Limulus Amebocyte Lysate ») et exprimée en unité d'endotoxine par millilitre de plasma. (Collaboration avec l'équipe de Marie-Caroline Michalski, UMR 1060, Lyon)

B/ L'endotoxémie a été déterminée par la mesure du 3hydroxymyristate représentant l'AG estérifié majoritaire (C14:0) provenant du LPS. La quantification du 3hydroxymyristate total (libre et estérifié) et du 3hydroxymyristate libre dans le plasma a été effectuée (résultats non montrés). La soustraction de ces deux dosages correspond au 3hydroxymyristate estérifié considéré comme provenant du LPS. Les concentrations dosées par le spectromètre de masse en tandem (MS/MS) sont exprimées en picomoles par millilitre de plasma. (Collaboration avec l'équipe de Jean-Paul Pais de Barros, Plateforme de Lipidomique, UMR 866, Dijon).

RESULTATS

responsable de ces effets, j'ai utilisé un inhibiteur spécifique de la première enzyme impliquée dans la synthèse *de novo* des céramides, la L-cyclosérine. Les cellules ont été traitées avec l'acide palmitique en présence ou non de L-cyclosérine. J'ai observé que l'ajout de l'inhibiteur de la synthèse *de novo* des céramides n'a pas d'effet sur l'augmentation de la perméabilité paracellulaire induite par l'acide palmitique. L'inhibition de la voie de synthèse *de novo* des céramides ne permet donc pas la restauration d'une perméabilité normale. Cependant, l'apport de L-cyclosérine empêche l'augmentation de l'expression d'IL-8 suite au traitement avec l'acide palmitique.

Ainsi, l'acide palmitique administré de façon aiguë est capable d'induire des dysfonctionnements au niveau de la barrière épithéliale et de déclencher une réponse inflammatoire impliquant la synthèse des céramides. La répétition à court terme d'un tel traitement induit des effets délétères plus marqués et qui perdurent dans le temps.

3/ Résultats complémentaires

Au cours de ce travail j'ai également réalisé d'autres expériences dont les résultats ne sont pas inclus dans l'article 1 et qui sont rapportés ci-dessous.

a) *Effet de l'apport itératif d'huile de palme sur l'endotoxémie*

Suite à un apport lipidique, plusieurs travaux montrent la présence d'une endotoxémie (Erridge *et al.* 2007; Laugerette *et al.* 2011) qui serait le reflet d'une altération de la barrière. L'endotoxémie, définie par le passage de fragments bactériens (LPS), a été mesurée dans cette étude par deux méthodes : le dosage LAL pour « Limulus Amebocyte Lysate » (collaboration avec l'équipe de Marie-Caroline Michalski, UMR 1060, Lyon) et le dosage par spectrophotométrie de masse (MS/MS) (collaboration avec l'équipe de Jean-Paul Pais de Barros, Plateforme de Lipidomique, UMR 866, Dijon). Le dosage LAL pour « Limulus Amebocyte Lysate » est un dosage enzymatique indirect permettant de quantifier avec une grande sensibilité le taux d'endotoxine dans un échantillon (Laugerette *et al.* 2015). La seconde méthode permet de quantifier les acides gras majoritairement présents dans les LPS (Pais de Barros *et al.* 2015)). Un des acides gras majoritaire est le myristate (C14:0). Cette méthode quantifie les taux de myristate total (libre +estérifié) et de myristate libre contenu dans un échantillon. La soustraction de ces deux dosages permet de déduire le taux de myristate estérifié qui est considéré équivalent à la concentration de LPS. Ce dosage est moins sensible que le dosage LAL mais il est moins dépendant de facteurs pouvant interférer (contaminants, fibrinogène, héparine). Les résultats du LAL montrent que seules 2/10 souris

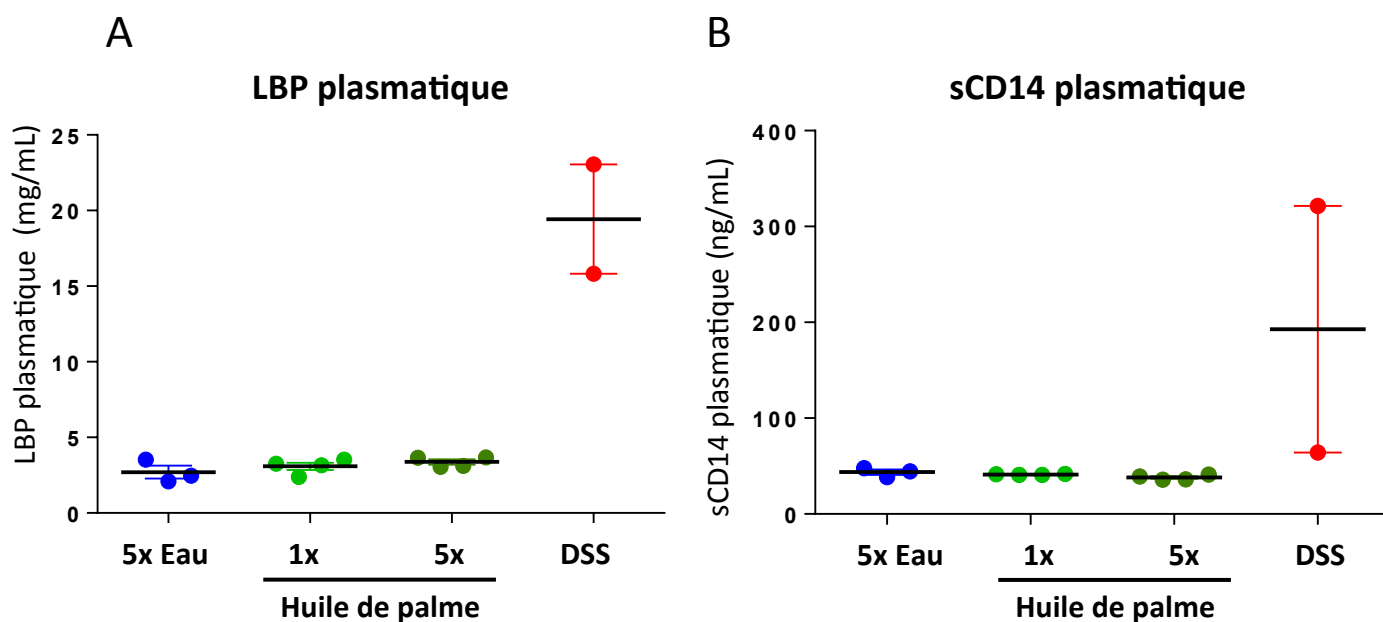


Figure 14 : Effet d'un apport aigu ou répété d'huile de palme sur des marqueurs circulants de l'endotoxémie.

Les souris soumises à un régime standard ont été traitées avec un gavage unique ou répété (5 fois) d'huile de palme ou d'eau, et comparées aux souris développant une inflammation en réponse au DSS. Le sang a été prélevé en intracardiaque 1h après le dernier gavage dans des conditions stériles. En accord avec les résultats obtenus par le dosage LAL et la quantification du 3hydroxymyristate, les souris DSS semblent avoir des teneurs plasmatiques en LBP et sCD14 augmentées (n=2). L'ingestion à court-terme d'huile de palme n'entraîne pas d'augmentation de ces marqueurs indirects de l'endotoxémie métabolique.

A/ La concentration de la protéine LBP est mesurée par dosage ELISA dans le plasma des souris et exprimée en milligrammes par millilitre de plasma.

B/ Les teneurs plasmatiques de la protéine sCD14 sont déterminées par ELISA et exprimées en nanogrammes par millilitre de plasma.

(Collaboration avec l'équipe de Marie-Caroline Michalski, UMR 1060, Lyon).

LBP : lipopolysaccharide-binding protein

sCD14 : cluster ou classe de différenciation 14, sous sa forme soluble

RESULTATS

ayant reçu 5 gavages d'huile de palme à raison d'un gavage par jour ont des concentrations de LPS plasmatiques élevées par rapport à celles qui ont reçu de l'eau, et sont comparables aux valeurs retrouvées chez des souris ayant développées une colite en réponse à un agent inflammatoire le DSS. Les résultats obtenus par spectrométrie de masse ne permettent pas de mettre en évidence une endotoxémie chez les animaux gavés avec l'huile de palme (figure 13).

Les résultats obtenus avec les deux méthodes utilisées ne permettent donc pas de mettre en évidence un passage de LPS plus important après 5 jours de traitement avec de l'huile de palme. L'absence d'augmentation des concentrations de LPS est cohérente avec l'analyse de deux protéines exprimées par les cellules épithéliales intestinales et impliquées dans les effets médiés par le LPS (figure 14). La protéine LBP (lipopolysaccharides-binding protein), connue pour lier avec une haute affinité le LPS, module l'inflammation induite par le LPS (Guerville and Boudry 2016). En effet, elle potentialise la reconnaissance du LPS en le transférant sur le complexe protéique membranaire mCD14-TLR-4/MD2 responsable du déclenchement de la signalisation inflammatoire. La protéine CD14 existe sous forme membranaire (mCD14) liée au complexe mais également sous forme soluble (sCD14) dans le plasma où elle agit comme un cofacteur avec la LBP pour médier la reconnaissance et la signalisation induite par le LPS. Ces deux protéines ont également été proposées comme marqueurs d'une barrière intestinale altérée (Tabung et al. 2017). En accord avec l'augmentation de la concentration plasmatique de LPS chez les souris développant une colite en réponse au DSS, les résultats montrent comme attendu une augmentation des teneurs plasmatiques de la LBP et de sCD14. En revanche, leurs concentrations plasmatiques ne sont pas modifiées en réponse à l'huile de palme.

b) Effet de l'huile de palme chez des souris présentant un défaut intrinsèque de la barrière intestinale

Notre équipe a récemment montré que les sujets obèses présentent à l'état basal des altérations modestes de la barrière intestinale qui sont exacerbées après une charge en lipides (Genser *et al.* 2018). J'ai donc souhaité déterminer si dans nos conditions expérimentales d'apport en huile de palme, les effets de celle-ci sur la barrière intestinale étaient accentués dans un modèle de souris présentant des défauts intrinsèques de la barrière intestinale. En collaboration avec Valérie Alquier-Blacqué et Laurent Ferrier (INRA TOXALIM, Toulouse), j'ai utilisé le modèle de souris génétiquement modifié qui exprime de façon constitutive la forme activée de la MLCK, impliquée dans la régulation des jonctions cellulaires (souris CA-

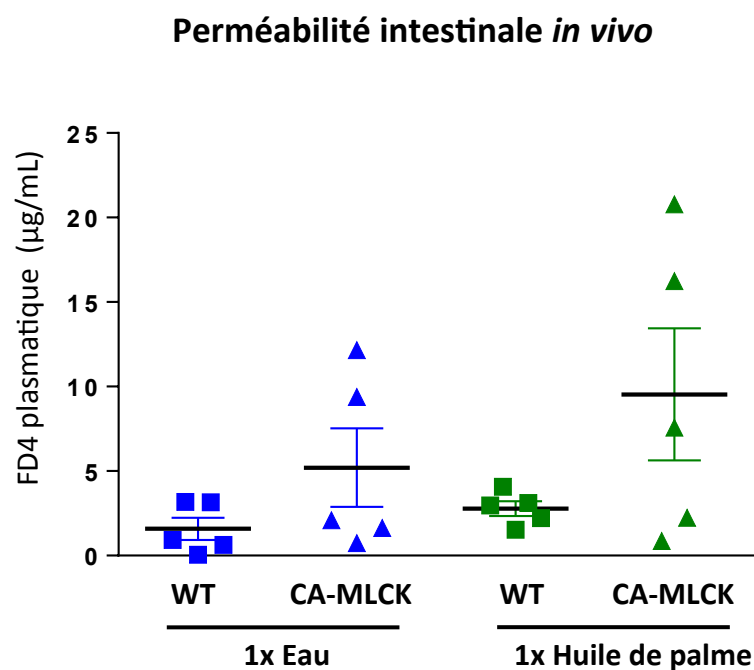


Figure 15 : Impact d'un apport unique d'huile de palme sur la perméabilité intestinale mesurée *in vivo* chez des souris transgéniques CA-MLCK.

Les souris sauvages ou exprimant constitutivement la forme constitutivement active de la kinase MLCK (CA-MLCK) sont soumises à un régime standard. Les souris ont reçu un apport unique d'huile de palme ou de l'eau. La perméabilité au FD4 a été quantifiée 1h après gavages successifs de 200µL d'eau ou d'huile de palme et 200µL de FD4. Bien que ce résultat doit être confirmé, il semblerait qu'un apport unique d'huile de palme chez les souris CA-MLCK entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale comparée aux souris contrôles.

(Collaboration avec Valérie Alquier-Blacqué et Laurent Ferrier (INRA TOXALIM, Toulouse))

RESULTATS

MLCK). Les souris CA-MLCK, créées par l'équipe de Jerrold Turner (Université de Chicago, USA), présentent une perméabilité intestinale plus élevée que des souris contrôles ainsi qu'un recrutement et une activation de cellules immunitaires dans la muqueuse intestinale mais ne développent pas spontanément de pathologies particulières (Su *et al.* 2009b). Une expérience pilote semble indiquer qu'un apport unique d'huile de palme à des souris CA-MLCK provoque une augmentation de la perméabilité intestinale plus élevée que chez les souris contrôles (figure 15). Des expériences supplémentaires doivent être entreprises afin de confirmer ce résultat. Il serait également intéressant d'étudier l'expression de marqueurs de l'inflammation dans ces conditions expérimentales et après un apport répété d'huile de palme.

c) *Effet d'un apport d'huile d'olive sur la perméabilité intestinale mesurée in vivo chez la souris*

Ayant observé dans le modèle cellulaire Caco-2/TC7 une absence d'effet d'un apport d'acide oléique alors que l'acide palmitique perturbait la barrière épithéliale et modifiait l'expression de cytokines, j'ai voulu savoir si une différence dans la composition en acides gras pouvait également être mise en évidence *in vivo*. J'ai donc comparé l'effet de l'huile d'olive (contenant environ 70% d'acide oléique et 10% d'acide palmitique) à celui de l'huile palme (contenant 35% d'acide oléique et 45% d'acide palmitique). La mesure *in vivo* de perméabilité intestinale (figure 16) montre qu'un apport unique ou répété d'huile d'olive augmente le passage de FITC-dextran 4kDa. Cependant, cette augmentation semble moins élevée qu'après un apport d'huile de palme. Des expériences supplémentaires devront être réalisées afin de déterminer l'effet d'huile d'olive sur l'état des jonctions cellulaires et l'expression des marqueurs inflammatoires.

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats montre que l'apport à court terme d'acides gras saturés, et en particulier d'acide palmitique, est capable d'induire des défauts de la barrière intestinale, d'initier une réponse inflammatoire intestinale et de modifier la composition du microbiote. Ces effets délétères qui se mettent en place de façon précoce pourraient conduire à plus long terme aux altérations irréversibles observées dans les pathologies présentant une composante inflammatoire de bas-grade affectant l'intestin comme dans le cas de l'obésité.

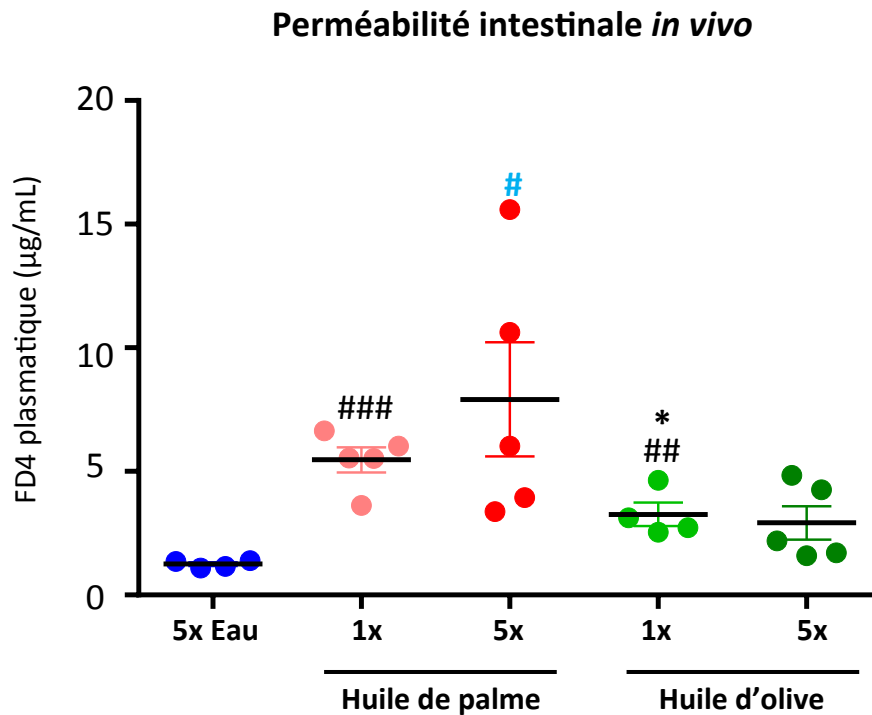


Figure 16 : Comparaison des effets d'apports aigus et répétés d'huile de palme et d'huile d'olive sur la perméabilité intestinale mesurée *in vivo* chez la souris.

Les souris soumises à un régime standard ont reçu un traitement unique ou répété (5 fois) d'huile de palme ou d'huile d'olive ou d'eau. Au 5^{ème} jour de traitement, elles ont reçu deux gavages successifs : le 5^{ème} gavage avec 200µL d'huile ou d'eau et 200µL d'une solution (0,5mg/g de souris) contenant le marqueur fluorescent FITC-dextran 4kDa (FD4). La concentration plasmatique de FD4 a été mesurée 1h après les gavages successifs par fluorométrie. La perméabilité intestinale est augmentée dès le 1^{er} gavage avec l'huile de palme et cet effet perdure jusqu'au 5^{ème} gavage contrairement aux souris ayant été traitées avec de l'huile d'olive. Ces dernières voient leur perméabilité augmentée au 1^{er} gavage et ce phénomène ne persiste pas après 5 gavages.

Les valeurs exprimées représentent la moyenne +/- SEM. Test comparant l'ensemble des groupes entre eux : ANOVA à un facteur (symbole turquoise) post-test Sidak test, test comparant les groupes deux à deux : test t de Student (symbole noir).

(vs 5xEau) ; * (vs 1x Huile de Palme)

* et # : p<0,05 ; ## : p<0,01 ; ### : p<0,001.

ARTICLE 1

Saturated fatty acids damage gut epithelium integrity and initiate inflammatory cytokine production

Sara Ghezzal^{a,1}, Barbara Graziela Postal^{a,1}, Elodie Quevrain^c, Loic Brot^c, Philippe Seksik^{c,d}, Armelle Leturque^a, Sophie Thenet^{a,b,2}, Véronique Carrière^{a,2,*}

^{1,2}These authors contributed equally to this work

^aSorbonne Université, INSERM, Université Paris Descartes Paris 5, CNRS, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006 Paris, France

^bEPHE, PSL Research University, F-75006 Paris, France

^cSorbonne Université, INSERM, CNRS, ENS, U1157, F-75012 Paris, France

^dService de Gastroentérologie & Nutrition, Hôpital Saint-Antoine, APHP, F-75012 Paris, France

*To whom correspondence should be addressed: Dr Véronique Carrière, INSERM U1138 team AL, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'école de médecine, 75006, Paris, France, Phone: 33144272407, Fax: 33143251615, Email: veronique.carriere@crc.jussieu.fr

Keywords: fatty acid, intestine, inflammation, cytokine, cell-cell junction, gut permeability.

Abbreviations:

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DDIT3: DNA Damage Inducible Transcript 3
DSS : dextran sodium sulfate
DTT: dithiothreitol
EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
ER: endoplasmic reticulum
EtOH : ethanol
FD4 : 4kDa FITC-dextran
HSPA5: Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5
OA: oleic acid
PA: palmitic acid
TEER: Transepithelial electrical resistance
XBP1: X-box binding protein-1
ZO-1: zonula occludens-1

Abstract

Excess of lipid consumption is known to trigger obesity and low-grade inflammation in mice, through mechanisms that are not fully deciphered yet. We tested the hypothesis that the intestine could be damaged and trigger inflammation, according to the repetition and the nature of lipid supplies. In mice, one to five palm oil gavages damaged intestinal permeability via mislocalization of junctional proteins at cell-cell contacts, changed the microbiota composition by decreasing the abundance of *Akkermensia muciniphila*, Segmented Filamentous Bacteria and *Clostridium leptum*, and increased inflammatory cytokine expression. This was further studied in human intestinal epithelial cells Caco-2/TC7, using the two main components of palm oil i.e palmitic and oleic acids. Saturated palmitic acid, but not unsaturated oleic acid, impaired paracellular permeability and junctional protein location and induced inflammatory cytokine expression in Caco-2/TC7 cells. Part of these effects was prevented by inhibition of *de novo* ceramide synthesis.

Taken together, our data show that limited repeated supplies of saturated fat, through palmitic acid, is sufficient to induce intestinal dysfunctions on barrier integrity, inflammation and microbiota composition suggesting that reiterated consumption of saturated fatty acids is an early player in gut alterations observed in metabolic diseases.

Highlights

- Saturated oil gavages are sufficient to damage the intestinal barrier
- Microbiota composition in mice is changed after 4 gavages with palm oil.
- Palmitic acid impairs paracellular permeability and cell-cell junctions.
- Palmitic acid modifies cytokine expression profile in intestinal epithelial cells.
- Inhibition of ceramide synthesis blocks part of palmitic acid effects.

1. Introduction

Obesity is the result of an energy imbalance between calories consumed and calories expended and its rising incidence is associated with changes in eating habits. Obesity is associated with systemic and tissue low-grade inflammation, which, contributes to the development of insulin resistance and increased risk of cardiovascular diseases [1, 2]. While the adipose tissue inflammation has been described as an important actor in the maintenance of the inflammatory state once obesity is established [1], the origin of this inflammation remains undetermined.

The subclinical systemic inflammation observed during obesity has been attributed to the immune response to increased levels of lipopolysaccharides (LPS) from Gram-negative bacteria cell wall, then called metabolic endotoxemia [3]. The passage of bacterial fragments into the blood through the intestinal mucosa emphasized the importance of intestinal epithelial barrier in this process [3-5]. In a recent study, we showed that obese subjects present subtle impairments of the intestinal barrier function that is exacerbated after a lipid challenge, this feature being correlated with systemic and intestinal inflammation [6]. Thus, loss of intestinal barrier integrity is probably part of the mechanisms driving subclinical chronic inflammation.

Studies in rodents under long term high-fat diet (HFD) also highlighted the role of lipids on endotoxemia but only few have analyzed the HFD impact on intestinal barrier integrity (for recent reviews [5, 7]). Decreased mRNA levels of the tight junction proteins ZO-1 and occludin were observed in the intestine of mice after 4 weeks of HFD [8]. Gulhane et al [9] showed that prolonged HFD in mice leads to an increase in colonic inflammation, which is associated with endotoxemia and a decreased expression of the tight junction protein claudin-1 in this tissue. Some studies reported that the composition of HFD could influence microbiota changes, endotoxemia and immune response. Laugerette et al [10] compared, in mice, the effects of 8-week diets enriched in oils with distinct fatty acids profiles and showed that a diet enriched in palm oil results in the most active transport of LPS toward tissues and the highest plasma level of the pro-inflammatory cytokine IL-6. More recently, Lam et al [11] showed that mice fed for 8 weeks with high-fat diets enriched in either saturated fatty acids or in n-6 polyunsaturated fatty acids displayed similar weight gain and adiposity, but only mice fed with saturated HFD exhibited a decreased transepithelial resistance (reflecting an increased

paracellular permeability to ions) and macrophage infiltration in the colon. The importance of the nature of fatty acids present in HFD for their impact on gut permeability and inflammation should therefore be further investigated.

Several studies suggest that the effects of HFD on intestinal permeability occur before the onset of obesity. An increase of albumin in feces, reflecting higher intestinal permeability, was observed as early as after 1 day of HFD and an increase of the passage of FITC-dextran molecule through the intestinal epithelium was shown after 7 days [12]. Moreover, studies conducted in lean humans or in rodents under chow diet showed that a single lipid meal led to a moderate and transient increase in endotoxemia [13-15] as well as proinflammatory cytokine IL-6 plasma level [13]. In these studies, neither the importance of fatty acids composition of the meal (especially the effects of saturated fatty acids), nor the integrity of intestinal epithelial barrier was documented. Nevertheless, these results suggested that an acute supply of lipids was sufficient to provoke a transient alteration of intestinal epithelial barrier.

It can be hypothesized that the repetition of lipid supplies could amplify or maintain a defect of intestinal epithelial barrier, which in turn could initiate or contribute to low-grade inflammation. The purpose of this study was to explore the impact of an acute single or repeated supply of saturated fatty acids on intestinal epithelial barrier integrity and its consequence on the expression of intestinal genes involved in inflammatory response. We focused on the effects of palmitic acid, one of the main saturated fatty acids present in human nutrition. Mechanistic investigations were conducted on ER stress and ceramide synthesis.

2. Materials and Methods

2.1 Mouse treatments, induction and assessment of colitis, and intestinal permeability

Three-month-old male C57BL/6J mice (Janviers labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were fed *ad libidum* a standard chow diet (A03, SAFE, Augy, France). Mice were kept with the artificial light-dark cycle 12:12h with lights on 07:00h. Mice were force-fed with palm oil (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) whose fatty acid composition is rich in saturated palmitic acid (about 45%) and unsaturated oleic acid (about 35%). Mice were forced-fed with 0.2ml of palm oil for one or 5

consecutive days at 18:00h. The last day of the experiment, mice were successively force-fed with 0.2ml palm oil and with 0.2ml of 4kDa FITC-dextran (Sigma-Aldrich) solution (0.5mg/g of mice in water) at 9:00h. Mice were anesthetized and then euthanized 1 hour after the last gavage. Blood, small intestine and colon were then collected. Duodenum was removed and the rest of the small intestine was divided in two equal parts named here jejunum and ileum. For *in vivo* measurement of intestinal permeability, FITC-dextran concentrations were determined in the plasma by fluorometry (FLUOstar Omega; BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France). Colitis was induced in mice by 5 days of 3.5% dextran sodium sulfate (DSS) (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France) in drinking water, followed by a 3-day recovery period without DSS. All experiments involving mice were approved by the French Minister of Education and Research and by the Animal Care and Use Committee N°5 (agreement number: APAFIS#2710-201510301447819).

2.2 Fecal microbiota analysis

Mice received one gavage with 0.2ml palm or water each day for 4 consecutive days. Fresh feces were collected 16h after the last gavage and immediately stored at -80°C until analysis. DNA was extracted from 100mg of feces obtained from pools of fecal pellets from 1 to 3 mice, as previously described [16]. The primers used for group and species-specific 16S rRNA-targeted are described in Table 1. PCR was performed using the Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR Systems (ThermoFischer Scientific, Illkirch, France). Determination of bacteria count in fecal samples was achieved using DNA extracted from cultured bacterial strains (see Table 1) and analyzed as described previously [16]. For the two species, Segmented Filamentous Bacteria and *Akkermensia muciniphila*, abundance was determined by relative quantification to DNA extracted from feces of untreated mice.

2.3 Cell culture and cell treatments

Caco-2/TC7 cell line is a clonal population of the human colon carcinoma-derived Caco-2 cells, which reproduces to a high degree most of the morphological and functional characteristics of enterocytes [17]. Cells were checked for absence of mycoplasma contamination. In all experiments, cells were

cultured on 6-well Transwell® filters (ThermoFischer Scientific) for 3 weeks to obtain fully differentiated enterocyte-like cells as previously described [18, 19].

Palmitic acid or oleic acid (Sigma-Aldrich) was supplied as complex micelles to mimic the physiological form in which these fatty acids are present in the intestinal lumen *in vivo*. Complex micelles (2 mM sodium taurocholate, 0.6 mM oleic acid or 0.6 mM palmitic acid, 0.2 mM lysophosphatidylcholine, 0.05 mM cholesterol, and 0.2 mM monoacylglycerol) were prepared in serum-free medium as previously described [19, 20] and added to the upper compartment for the indicated times. Micelles were removed and replaced by fresh apical medium during the analysis of epithelium integrity. In some experiments, cells were treated with 4.5mM EGTA (Sigma-Aldrich) added in the upper compartment or with 2mM dithiothreitol (Sigma-Aldrich), 20mM L-cycloserin (Sigma-Aldrich), 100 μ M C₂-ceramide (Cayman Chemical Compagny, Montigny-le-Bretonneux, France) added in both upper and lower compartments. C₂-ceramide was dissolved in 0.5% ethanol as previously described [21]. The duration of treatments is indicated in the legend of figures.

2.4 Permeability and transepithelial electrical resistance (TEER) measurements in Caco-2/TC7 cells

To assess paracellular permeability, 1mg/ml of 4 kDa FITC-dextran (TdB Consultancy AB, Uppsala, Sweden) was added to the apical medium the last day of treatment. Samples of basal medium were collected after 4h, and fluorescence was determined with a microplate fluorometer (FLUOstar Omega; BMG Labtech). Transepithelial electrical resistance (TEER), which is inversely proportional to permeability to small ions, was measured before and after treatments using a Volt-Ohm Meter (Millipore, Guyancourt, France).

2.5 Total RNA extraction and RT-PCR analysis

Total RNA from Caco-2/TC7 cells and from intestinal segments was extracted with TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH), according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription (RT) was performed with 1 μ g of RNA using high-capacity cDNA reverse transcriptase kit (Applied Biosystem, ThermoFisher Scientific, Illkirch France). Semiquantitative real-time polymerase chain reactions were performed with the Mx3000P Stratagen system using SYBR Green

(Agilent, Les Ullis, France) according to the manufacturer's procedures. The list of human and mouse primers sequences are displayed in Table 2. The primers sequences for the specific quantification of the spliced XBP1 mRNA have been previously described in Van Schadewijk et al. [22].

2.6 Cytokine content and secretion

Cytokine IL-8 and IL-1 β protein levels were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using kits from R&D System (Lille, France). For cytokine quantification in mouse intestine, whole intestinal segments were homogenized in PBS buffer using FastPrep® instrument (MP-Biosciences, Illkirch-Graffenstaden, France), submitted to sonication (Bioruptor®, Diagenode, Seraing, Belgium) and then centrifuged at 10,000g for 10 min at 4°C. The supernatant (100 μ g of proteins) was used for ELISA. For experiments in Caco-2/TC7 cells, 0.2ml of basal medium was used for ELISA.

2.7 Analysis of junctional proteins by immunofluorescence

Immunofluorescence analyses were performed as previously described [23]. Briefly, Caco-2/TC7 cells were fixed and permeabilized by incubation for 5 minutes in methanol at -20°C. Jejunum cryosections were fixed for 30 minutes with 4% paraformaldehyde at 4°C, and permeabilized for 30 minutes in 0.1% Triton X-100 at 4°C. For immunostaining of mouse jejunum cryosections, we used primary antibodies for tricellulin (1:10; Tric2469; kindly provided by Dr Furuse [24, 25]), ZO-1 (1:200; 617300; Thermofischer scientific), occludin (1:10; Moc-37; kindly provided by Dr Furuse [26]) and for E-cadherin (1:500; ECCD2 M108; from Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France). For immunostaining on Caco-2/TC7 cells, we used primary antibodies for tricellulin (1:200; MARVELD2 700191; Thermofischer scientific), ZO-1 (1:200; ZO1-1A12; 33-9100 Thermofischer scientific), occludin (1:200; 71-1500; Thermofischer scientific) and for E-cadherin (1:500; ECCD2 M108; from Takara Bio Europe). Alexa 488 and Alexa 546-conjugated anti-immunoglobulin G were used as secondary antibodies (1/400; Molecular Probes, Life Technologies, Saint-Aubin, France). Nuclei were stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to assess the monolayer integrity. Cells were

examined by microscopy using an Axio Imager 2 microscope equipped with an apotome.2, allowing optical sectioning (Zeiss, Oberkochen, Germany). Images were acquired by ZEN 2011® software (Zeiss,) and analyzed by Image J 1.46c.

2.8 Statistical analysis

Values were expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Two group comparisons were performed using Student's T-test. Comparisons involving multiple groups were done using one-way analysis of variance (ANOVA). A level of $p < 0.05$ was considered as significant.

3. Results

3.1 Palm oil gavage in mice increases intestinal permeability, perturbs cell-cell junction and modifies the expression of genes involved in inflammation

We first analyzed in mice the effects of palm oil administration on intestinal barrier integrity by measuring intestinal permeability to FITC-dextran 4kDa. We compared the effects of a single gavage of palm oil to daily gavages for 5 consecutive days. A group of mice treated with dextran sodium sulfate (DSS) was used as a model of chemically induced colitis (for review [27]). As previously described [28], DSS treatment induced a 2-fold increase in intestinal permeability as compared to control group ($p=0.0008$) (Fig. 1A). The permeability to 4 kDa molecules after palm oil gavage was increased in the same range as in our positive control, DSS. Mice that received one palm oil gavage displayed higher intestinal permeability ($p<0.0001$) than the control group without further increase following multiple gavages.

As an efficient epithelial barrier is dependent on cell-cell junction integrity, we analyzed by immunofluorescence in the jejunum the localization of three tight junction proteins (ZO-1, occludin and tricellulin) and of the adherens junction protein E-cadherin. One palm oil gavage resulted in loss of membrane localization of occludin and tricellulin at cell-cell contacts while ZO-1 and E-cadherin were not affected (Fig.1B). After 5 consecutive palm oil gavages, the distribution of all these proteins was perturbed. In particular, we observed the internalization of E-cadherin and ZO-1 proteins.

We then analyzed the expression of several genes linked to inflammation in intestine (Fig. 2). We showed that Gata3 mRNA level, a master gene controlling the functions of T cells and innate lymphoid cells [29, 30], was decreased ($p=0.0024$) in jejunum of mice submitted to 5 palm oil gavages as compared to control mice (Fig. 2A). No modification of Gata3 mRNA level was observed in mice that received a single palm oil gavage whereas it was decreased in the DSS group ($p=0.0003$). One palm oil gavage increased the mRNA level of the antimicrobial peptide gene Reg3g ($p=0.0118$) in ileum as compared to the control group (Fig. 2B), but no modification was observed in mice submitted to 5 palm oil gavages or to DSS. The protein level of pro-inflammatory IL-1 β tended to increase ($p=0.053$) in colon of mice submitted to one palm oil gavage and a 2.4-fold increase ($p=0.0027$) was observed after 5 gavages (Fig. 2C).

Altogether, we show *in vivo* in mice that a short-term treatment with palm oil is sufficient to increase intestinal permeability, to provoke the mislocalization of several proteins involved in cell-cell junctions and to modify immune-related gene expression profile in intestine, suggesting tissue inflammation.

3.2 Palm oil gavages in mice modify fecal microbiota composition

Based on previous studies showing changes in the abundance of bacteria species during obesity or intestinal inflammation (for review [31]), we measured the abundance of selected fecal bacteria after 4 palm oil gavages. We found that *clostridium leptum* (Fig. 3A, $p=0.0273$), *Akkermensia muciniphila* (Fig. 3B, $p=0.0274$) and Segmented Filamentous Bacteria (Fig. 3C, $p=0.0133$) abundances were significantly decreased after 4 palm oil gavages, while *Bacteroides* sp. abundance was increased (Fig. 3D, $p=0.0230$). The abundance of *Lactobacillus* sp. (Fig. 3E) and *Clostridium coccooides* (Fig. 3F) as well as total bacteria count (Fig. 3G) were unaffected. Thus, these results indicate that the gut microbiota composition is modified after 4 palm oil gavages.

3.3 Palmitic acid perturbs permeability and cytokine expression in human intestinal epithelial cells

Palm oil being composed of both saturated and unsaturated fatty acids, the specific impact of palmitic versus oleic acid needed to be determined. We compared the effects of these two fatty acids,

delivered as complex micelles, on paracellular permeability of a monolayer of the human enterocytic-like cell line Caco-2/TC7. Cells were incubated for 24h or daily during 4 consecutive days with micelles containing either palmitic or oleic acid. A 24h-treatment with 4.5mM EGTA, a calcium chelator, was used as treatment known to destabilize cell-cell junctions and to increase epithelial permeability [32, 33]. As expected, EGTA treatment increased the permeability of Caco-2/TC7 cell monolayer to 4kD FITC dextran ($p < 0.0001$) (Fig. 4A) and to ions (decreased TEER, $p < 0.0001$) (Fig. 4B). A 1 day-treatment with palmitic acid provoked a significant increase of FD4 flux without significant changes in TEER (Fig. 4C). A repeated supply for 4 days of palmitic acid markedly enhanced the permeability of the cell monolayer to FD4 ($p = 0.0152$). TEER was decreased as soon as the first 48h of treatment ($p = 0.038$). These effects were not observed when oleic acid was supplied instead of palmitic acid.

We analyzed by immunofluorescence the localization of the tight junction proteins ZO-1, occludin and tricellulin and of the adherens junction protein, E-cadherin, in cells treated with palmitic acid- or oleic acid-containing micelles (Fig. 5). In cells treated for 24h with palmitic acid we observed a decrease in the fluorescence intensity of all junction proteins analyzed, without modification of their localization at cell-cell contact. However, repeated supply of palmitic acid micelles during 4 days provoked the internalization of E-cadherin, ZO-1 and occludin as well as the loss of tricellulin at tricellular junction. In accordance with the absence of effects on paracellular permeability, the distribution of junction proteins was not altered by oleic acid micelles.

Intestinal epithelial cells are able to produce cytokines [34, 35] among which CXCL8 (IL-8), TGFB1 and IL1B genes are particularly well expressed in Caco-2/TC7 cells. We then determined whether palmitic acid could induce the production of these cytokines. Cells were treated for 24h or 4 days with palmitic acid- or oleic acid-containing micelles (Fig. 6). Palmitic acid increased the expression of IL-8 (as soon as after 24h of treatment ($p = 0.0214$), Fig. 6A) and its secretion in basal medium (after 4-days treatment, Fig. 6B), while oleic acid did not exert any effect. A small decreased of TGFB1 mRNA level ($p = 0.0022$) was observed after a repeated supply of palmitic acid (Fig. 6C), whereas oleic acid did not modify its expression. Neither oleic acid nor palmitic acid modified IL-1 β mRNA level whatever the duration of the treatments (Fig. 6D). Interestingly, we showed that EGTA

increased IL-8 ($p < 0.0001$) and IL-1 β mRNA levels ($p < 0.0001$) as well as IL-8 secretion ($p = 0.0042$), indicating that the destabilization of cell-cell junctions was sufficient to induce cytokine production.

We then determined whether the effects of palmitic acid could rapidly vanish after its removal from medium culture (Fig.7). Cells were treated daily during 4 days with palmitic-acid containing micelles and then cultured in control medium for 1 or 2 more days. We observed a time-dependent decrease of FD4 passage through the cell monolayer after the removal of palmitic acid. However, 2 days after the medium change, the paracellular permeability of the monolayer remained 3.5 fold higher in cells previously treated with palmitic acid than in untreated cells (Fig. 7A, $p = 0.0008$). The removal of palmitic acid did not allow recovering the basal level of TEER, which remained between 10 to 15% lower than control cells (Fig. 7B, $p = 0.007$). Immunofluorescence analyses of junction proteins were performed after 4 days of palmitic acid treatment and 1 and 2 days after its removal (Fig. 7C). A gradual recovery of occludin and tricellulin distribution was observed during the time-course after palmitic acid removal. However the distribution of E-cadherin and ZO-1 remained largely altered even 2 days after the cells were cultured back with control medium. We also observed that the effects of palmitic acid on IL-8 (Fig. 7D) and TGFB1 (Fig. 7E) mRNA levels were abolished 2 days and 1 day, respectively, after its withdrawal from culture medium. Altogether these results show that the effects of palmitic acid are slowly attenuated after the arrest of treatment.

3.4 Palmitic acid induces a moderate endoplasmic reticulum stress

We sought to analyze the molecular mechanisms involved in the effects of palmitic acid on barrier integrity and cytokine production in Caco-2/TC7 cells. Palmitic acid is known to be a more potent inducer of endoplasmic reticulum (ER) stress than oleic acid [36-39]. Moreover, it has been shown that the induction of ER stress by various stimuli, including fatty acids, is able to increase the expression of cytokines in several cell types [40, 41] and may induce dysfunction of epithelial barriers (for review [42]). We thus wanted to determine whether the observed effects of palmitic acid were due to an induction of ER stress. Caco-2/TC7 cells were then treated for 24h or daily during 4 consecutive days with palmitic acid- or oleic acid-containing micelles. A treatment with 2mM DTT was used as a known inducer of ER stress [43, 44]. As expected, DTT treatment increased paracellular permeability

(Fig. 8A) and IL-8 mRNA level (Fig. 8B). The induction of ER stress by DTT treatment was assessed through the increased expression of GRP78/HSPA5, GADD153/DDIT3 and of the spliced form of XBP1 (Fig. 8C-E), three gene markers of unfolded protein response. Oleic acid treatment provoked a moderate induction of GRP78/HSPA5 expression, detectable only after 24h treatment ($p=0.0085$) but not after 4 days (Fig. 8C), while GADD153/DDIT3 and spliced XBP1 mRNA levels were unchanged (Fig. 8D-E). Palmitic acid increased, but to a limited extent as compared to DTT, the expression of all these three gene markers of ER stress. This effect was mainly observed after 24h treatment (Fig. 8C-E). As palmitic acid exerts only a moderate induction of ER stress while its impact on epithelial barrier integrity and IL-8 expression was important, we thus hypothesized that other molecular mechanisms may also be involved in the deleterious effect of palmitic acid.

3.5 Ceramide mediates the deleterious effect of palmitic acid on epithelial barrier and immune response.

Palmitic acid, but not oleic acid, is a precursor of *de novo* ceramide synthesis (for review [45]), which contributes not only to membrane structure but also to signaling and metabolic dysfunctions in various cell types, including Caco-2/TC7 cells [21, 46]. We thus wanted to determine whether ceramide could provoke epithelial barrier damages and induce cytokine production. Caco-2/TC7 cells were treated with C₂-ceramide, a short chain cell-permeable biologically active analogue of ceramide. We observed that a 24h-treatment with C₂-ceramide provoked a marked increase of paracellular permeability ($p<0.0001$) (Fig. 9A) along with a decrease of TEER ($p<0.0001$) (Fig. 9B). Immunofluorescence analysis showed that the localization at cell-cell contacts of tight junction proteins (ZO-1, occludin and tricellulin) and of the adherens junction protein E-cadherin were altered (Fig. 9C). C₂-ceramide treatment increased the expression and the secretion of IL-8 ($p=0.0201$) (Fig. 9D-E), decreased TGFB1 mRNA level ($p=0.038$) (Fig. 9F) and had no effect on IL-1 β mRNA level (Fig. 9G). For all these parameters, no effect of ethanol used as the vehicle for C₂-ceramide was observed. Altogether, these results show that C₂-ceramide treatment induces similar effects than palmitic acid on intestinal epithelial barrier integrity and cytokine production.

We then determined whether the inhibition of *de novo* ceramide synthesis could attenuate the deleterious effect of palmitic acid. Caco-2/TC7 cells were treated with L-cycloserine, an irreversible inhibitor of serine palmitoyltransferase, the first enzyme of *de novo* ceramide synthesis [47, 48]. The treatment with L-cycloserine did not modify the paracellular permeability of Caco-2/TC7 cell monolayer at the basal state or in presence of palmitic acid-containing micelles (Fig. 10A). However, L-cycloserine treatment abolished the palmitic acid-dependent increase in IL-8 mRNA level (Fig. 10B). These results suggested that inflammatory but not permeability effects of palmitic acid on enterocytes were dependent on *de novo* ceramide synthesis.

4. Discussion

In this study, we showed *in vivo* that treatment with palm oil gavages for 5 days is sufficient to provoke a defect in intestinal epithelial barrier integrity and an alteration of the expression of genes involved in the immune response in intestine. Using a model of human enterocytes, we demonstrated that palmitic acid exerted direct deleterious effects on intestinal epithelial cells, part of which were linked to *de novo* ceramide synthesis. Our results highlight direct links between the repeated consumption of palmitic acid and intestinal barrier defects as well as proinflammatory cytokine expression. These alterations, occurring before the onset of diet-induced obesity, may thus represent an early event in the initiation of low-grade inflammation.

We observed that a single supply of palm oil *in vivo* in mice provoked an increase in intestinal epithelium permeability accompanied by the loss of several tight junction proteins at cell-cell contacts, whereas a global mislocalization of tight and adherens junction proteins was evidenced only after repeated gavages. This rapid intestinal barrier defect is in accordance with the increase of albumin fecal content, used as a marker of intestinal permeability alteration, observed in mice one day after the beginning of a high-fat diet [12]. Similar effects on epithelium permeability without marked changes in the localization of cell-cell junction proteins at cell-cell contacts were showed in Caco-2/TC7 cell monolayer incubated for 24h with palmitic acid-containing micelles. These results indicate that a single supply of saturated lipids is sufficient to affect intestinal permeability. Interestingly, the

increased expression of the gene coding for antimicrobial peptide Reg3 γ , as soon as after one palm oil gavage, suggests that intestine has engaged mucosal defense. Moreover, in Caco-2/TC7 cells, an increase in pro-inflammatory cytokine IL-8 mRNA level was observed after only 24h treatment with palmitic acid-containing micelles. Altogether our results show that a single supply of saturated fatty acids is sufficient to initiate an immune response by intestinal epithelial cells.

After repeated supplies of palm oil *in vivo* or palmitic acid in Caco-2/TC7 cells, we observed a marked mislocalization of junction proteins at cell-cell contacts, which was associated with enhanced paracellular permeability as well as additional modifications of immune gene expression profile suggesting tissue inflammation. The deleterious effects of palmitic acid vanished more slowly than they appeared.

IL-8 is a chemokine produced by many cell types, including intestinal epithelial cells, and it is known to participate to the acute phase response of inflammation [49]. In intestine, IL-8 is involved in the neutrophil activation and infiltration in intestinal mucosa where it participates to host defense against bacteria invasion. The level of expression of IL-8 was enhanced with the duration of lipid challenge in palmitic acid-treated human enterocytic Caco-2/TC7 suggesting tissue inflammation. IL-8 expression is absent in mice [50], IL-1 β is an important pro-inflammatory cytokines in this species. In colon of mice, the protein IL-1 β level increased significantly in parallel with the duration of lipid challenge, highlighting a tissue inflammatory response to lipid gavages. An increased expression of IL-1 β expression in intestine was frequently reported in high-fat-diet models and in human obesity (for review [57]). Both IL-1 β and IL-8 are known to perturb tight junction proteins [58, 59], their time-dependent increase of expression with lipid challenge may contribute to exacerbate the mislocalization of junction protein and thus to amplify permeability defects.

We observed that the expression of Gata3 mRNA level is decreased in proximal intestine only after repeated palm oil gavages. Gata3 is a key transcription factor involved in the differentiation and the maturation of innate lymphoid cells controlling both the expression of pro-and anti-inflammatory cytokines [30]. A link between Gata3 activity and visceral fat inflammation during obesity was recently reported [60]. However its exact role in intestinal inflammation remains to be characterized.

Interestingly the increase of Reg3g mRNA level observed after one palm oil gavage was no longer observed after repeated gavages. As Reg3g is involved in host defense against bacteria, this suggests that saturated fat overload results in a decreased efficiency of intestinal defense response.

Associated with changes in immune-related gene expression and intestinal barrier defects, we observed that repeated palm oil gavages provoked changes in microbiota composition. We studied some bacteria species previously reported as modified by high-fat diet or obesity. We showed a decreased fecal abundance of *Clostridium leptum*, *Akkermensia muciniphila* and segmented filamentous bacteria in palm oil-treated mice as compared to control. These three bacteria species are known to exert a protective role against pathogen proliferation and to contribute to host defense by promoting maturation of immune cells [61]. Their decreased abundances were in relevance with inflammatory status of the tissue. The anti-inflammatory properties of *Akkermensia muciniphila* has gained attention and highlight its interest as a therapeutic target to treat intestinal inflammation [64]. In particular, gut *Akkermensia muciniphila* abundance is reduced in human obesity [65, 66] and in high-fat diet-induced obesity in mice [67]. The decreased of abundance segmented filamentous bacteria observed after palm oil gavages is in accordance with its reduction in mice submitted to long-term high-fat diet [62], but its role in inflammation is still questioned [63]. We observed an increase in *Bacteroides* sp. in palm oil-treated mice, in congruence with several reports showing an increase in the abundance of this species associated with the consumption of high-fat diet, rich in saturated fatty acids [70-73]. We can conclude that 4 gavages with palm oil are sufficient to promote changes in microbiota composition corresponding to the changes reported in obesity induced by high-fat diet and relevant to gut inflammation.

The studies of molecular mechanisms involved in the deleterious effects of palmitic acid on intestinal epithelial cells revealed the contribution of *de novo* synthesis of ceramides. In established obesity, elevation of circulating saturated fatty acids and inflammatory signals promote ceramide synthesis [75]. In the present study, we observed that C2-ceramide acted on three parameters: increase in intestinal epithelial permeability, mislocalization of junctional proteins and modification of cytokine expression. Interestingly, intestinal barrier defect was shown recently to be associated with elevated C16-ceramide levels, [76] and with increased ceramides content induced by

sphingomyelinase addition [77]. Nevertheless, we observed that the inhibition of *de novo* ceramide synthesis reduced pro-inflammatory cytokine expression but failed to restore cell monolayer permeability suggesting a role of *de novo* ceramide synthesis restricted to the inflammatory process. Very few studies have analyzed the direct impact of ceramides on cytokine expression, however an induction of IL-6 by C2-ceramide was reported in human fibroblast [78] and in human astrocytoma cells [79]. We showed that the inhibition of *de novo* ceramide synthesis prevented the increase of IL-8 secretion in palmitic acid-treated cells. Thus, palmitic acid engaged multiple mechanisms, including ceramide pathways, for exerting its deleterious effects on intestinal permeability and inflammation.

Recent advances suggest that fatty acids may act via their binding to membrane receptors (such as TLRs, G protein-coupled receptor) or nuclear receptors (such as PPARs, LXR or FXR) and the subsequent rapid activation of signaling cascades (for review [81]). Our study showed a specific effect of palmitic acid since oleic acid showed no effect on intestinal barrier integrity and cytokine expression. However, several fatty acids, such as short and medium fatty acids, were reported to modulate intestinal barrier integrity (for review [81]). Interestingly we reported in Caco-2/TC7 cells that a very short treatment (4 hours) with oleic acid under the form of mixed micelles could perturb the distribution of tricellulin and increase intestinal permeability [6]. Altogether, these data underline the differential effects of fatty acids according to their nature and length of exposure on intestinal barrier integrity.

In conclusion, our results showed that limited repeated supply of saturated fatty acids and particularly palmitic acid are sufficient to deregulate intestinal inflammatory response, to induce an intestinal barrier defect and to change microbiota composition. Most of these alterations, which are features of obesity and metabolic diseases, stress that reiterated consumption of saturated fatty acids is an early player in gut alterations observed in these pathologies.

5. Acknowledgements

S.G. received a doctoral fellowship from Sorbonne Université (formerly Université Pierre et Marie Curie), Paris, France. B.G.P. is recipient of doctoral fellowship CNPq 207303/2014-2 from the Science Without Border program of the Brazilian government. We thank all the staff in charge of

animal housing and care at the animal core facility of the Centre d'Explorations Fonctionnelles at the Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France. We thank Dr Furuse (National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan) for kindly providing us antibodies directed against occludin and tricellulin.

6. Conflict of interest

No conflict of interest declared.

7. Authors contributions

S.G., B.G.P., S.T. and V.C. designed and conducted the experiments and analyzed the data. E.Q., L.B., P.S. managed the microbiota analysis. S.G. and V.C. wrote the paper. B.G.P., S.T., P.S., E.Q. and A.L. revised the manuscript. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

8. References

- [1] S.S. Pereira, J.I. Alvarez-Leite, Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes, *Curr Obes Rep*, 3 (2014) 422-431.
- [2] M. Monteiro-Sepulveda, S. Touch, C. Mendes-Sa, S. Andre, C. Poitou, O. Allatif, A. Cotillard, H. Fohrer-Ting, E.L. Hubert, R. Remark, L. Genser, J. Tordjman, K. Garbin, C. Osinski, C. Sautes-Fridman, A. Leturque, K. Clement, E. Brot-Laroche, Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling, *Cell metabolism*, 22 (2015) 113-124.
- [3] P.D. Cani, J. Amar, M.A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A.M. Neyrinck, F. Fava, K.M. Tuohy, C. Chabo, A. Waget, E. Delmee, B. Cousin, T. Sulpice, B. Chamontin, J. Ferrieres, J.F. Tanti, G.R. Gibson, L. Casteilla, N.M. Delzenne, M.C. Alessi, R. Burcelin, Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance, *Diabetes*, 56 (2007) 1761-1772.
- [4] A.L. Neves, J. Coelho, L. Couto, A. Leite-Moreira, R. Roncon-Albuquerque, Jr., Metabolic endotoxemia: a molecular link between obesity and cardiovascular risk, *Journal of molecular endocrinology*, 51 (2013) R51-64.
- [5] N.E. Boutagy, R.P. McMillan, M.I. Frisard, M.W. Hulver, Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant?, *Biochimie*, 124 (2016) 11-20.
- [6] L. Genser, D. Aguanno, H.A. Soula, L. Dong, L. Trystram, K. Assmann, J.E. Salem, J.C. Vaillant, J.M. Oppert, F. Laugerette, M.C. Michalski, P. Wind, M. Rousset, E. Brot-Laroche, A. Leturque, K. Clement, S. Thenet, C. Poitou, Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes, *J Pathol*, (2018).
- [7] J.R. Araujo, J. Tomas, C. Brenner, P.J. Sansonetti, Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity, *Biochimie*, 141 (2017) 97-106.
- [8] P.D. Cani, R. Bibiloni, C. Knauf, A. Waget, A.M. Neyrinck, N.M. Delzenne, R. Burcelin, Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice, *Diabetes*, 57 (2008) 1470-1481.

- [9] M. Gulhane, L. Murray, R. Lourie, H. Tong, Y.H. Sheng, R. Wang, A. Kang, V. Schreiber, K.Y. Wong, G. Magor, S. Denman, J. Begun, T.H. Florin, A. Perkins, P.O. Cuiv, M.A. McGuckin, S.Z. Hasnain, High Fat Diets Induce Colonic Epithelial Cell Stress and Inflammation that is Reversed by IL-22, *Sci Rep*, 6 (2016) 28990.
- [10] F. Laugerette, J.P. Furet, C. Debar, P. Daira, E. Loizon, A. Geloën, C.O. Soulage, C. Simonet, J. Lefils-Lacourtablaise, N. Bernoud-Hubac, J. Bodenec, N. Peretti, H. Vidal, M.C. Michalski, Oil composition of high-fat diet affects metabolic inflammation differently in connection with endotoxin receptors in mice, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302 (2012) E374-386.
- [11] Y.Y. Lam, C.W. Ha, J.M. Hoffmann, J. Oscarsson, A. Dinudom, T.J. Mather, D.I. Cook, N.H. Hunt, I.D. Caterson, A.J. Holmes, L.H. Storlien, Effects of dietary fat profile on gut permeability and microbiota and their relationships with metabolic changes in mice, *Obesity (Silver Spring)*, 23 (2015) 1429-1439.
- [12] A.M. Johnson, A. Costanzo, M.G. Gareau, A.M. Armando, O. Quehenberger, J.M. Jameson, J.M. Olefsky, High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability, *PloS one*, 10 (2015) e0122195.
- [13] F. Laugerette, C. Vors, A. Geloën, M.A. Chauvin, C. Soulage, S. Lambert-Porcheron, N. Peretti, M. Alligier, R. Burcelin, M. Laville, H. Vidal, M.C. Michalski, Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation, *J Nutr Biochem*, 22 (2011) 53-59.
- [14] S. Ghoshal, J. Witta, J. Zhong, W. de Villiers, E. Eckhardt, Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides, *Journal of lipid research*, 50 (2009) 90-97.
- [15] C. Erridge, T. Attina, C.M. Spickett, D.J. Webb, A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation, *Am J Clin Nutr*, 86 (2007) 1286-1292.
- [16] H. Sokol, P. Seksik, J.P. Furet, O. Firmesse, I. Nion-Larmurier, L. Beaugerie, J. Cosnes, G. Corthier, P. Marteau, J. Dore, Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota, *Inflamm Bowel Dis*, 15 (2009) 1183-1189.
- [17] I. Chantret, A. Rodolose, A. Barbat, E. Dussaulx, E. Brot-Laroche, A. Zweibaum, M. Rousset, 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) (1994) 213-225.
- [18] E. Morel, S. Ghezzal, G. Lucchi, C. Truntzer, J.P. Pais de Barros, F. Simon-Plas, S. Demignot, C. Mineo, P.W. Shaul, A. Leturque, M. Rousset, V. Carriere, Cholesterol trafficking and raft-like membrane domain composition mediate scavenger receptor class B type 1-dependent lipid sensing in intestinal epithelial cells, *Biochimica et biophysica acta*, 1863 (2018) 199-211.
- [19] O. Beaslas, C. Cueille, F. Delers, D. Chateau, J. Chambaz, M. Rousset, V. Carriere, Sensing of dietary lipids by enterocytes: a new role for SR-BI/CLA-1, *PloS one*, 4 (2009) e4278.
- [20] D. Chateau, T. Pauquai, F. Delers, M. Rousset, J. Chambaz, S. Demignot, Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells, *Journal of cellular physiology*, 202 (2005) 767-776.
- [21] T.T. Tran, B.G. Postal, S. Demignot, A. Ribeiro, C. Osinski, J.P. Pais de Barros, A. Blachnio-Zabielska, A. Leturque, M. Rousset, P. Ferre, E. Hajdich, V. Carriere, Short Term Palmitate Supply Impairs Intestinal Insulin Signaling via Ceramide Production, *The Journal of biological chemistry*, 291 (2016) 16328-16338.
- [22] A. van Schadewijk, E.F. van't Wout, J. Stolk, P.S. Hiemstra, A quantitative method for detection of spliced X-box binding protein-1 (XBP1) mRNA as a measure of endoplasmic reticulum (ER) stress, *Cell Stress Chaperones*, 17 (2012) 275-279.
- [23] C.S. Petit, F. Barreau, L. Besnier, P. Gandille, B. Riveau, D. Chateau, M. Roy, D. Berrebi, M. Svrcak, P. Cardot, M. Rousset, C. Clair, S. Thenet, Requirement of cellular prion protein for intestinal barrier function and mislocalization in patients with inflammatory bowel disease, *Gastroenterology*, 143 (2012) 122-132 e115.
- [24] J. Ikenouchi, H. Sasaki, S. Tsukita, M. Furuse, S. Tsukita, Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin, *Molecular biology of the cell*, 19 (2008) 4687-4693.
- [25] J. Ikenouchi, M. Furuse, K. Furuse, H. Sasaki, S. Tsukita, S. Tsukita, Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells, *The Journal of cell biology*, 171 (2005) 939-945.

- [26] M. Saitou, Y. Ando-Akatsuka, M. Itoh, M. Furuse, J. Inazawa, K. Fujimoto, S. Tsukita, Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution, *Eur J Cell Biol*, 73 (1997) 222-231.
- [27] D.D. Eichele, K.K. Kharbanda, Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis, *World J Gastroenterol*, 23 (2017) 6016-6029.
- [28] Y. Yan, V. Kolachala, G. Dalmaso, H. Nguyen, H. Laroui, S.V. Sitaraman, D. Merlin, Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis, *PloS one*, 4 (2009) e6073.
- [29] J. Zhu, GATA3 Regulates the Development and Functions of Innate Lymphoid Cell Subsets at Multiple Stages, *Front Immunol*, 8 (2017) 1571.
- [30] Y.Y. Wan, GATA3: a master of many trades in immune regulation, *Trends Immunol*, 35 (2014) 233-242.
- [31] A. Woting, M. Blaut, The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease, *Nutrients*, 8 (2016) 202.
- [32] X. Boulenc, E. Marti, H. Joyeux, C. Roques, Y. Berger, G. Fabre, Importance of the paracellular pathway for the transport of a new bisphosphonate using the human CACO-2 monolayers model, *Biochemical pharmacology*, 46 (1993) 1591-1600.
- [33] P. Artursson, Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells, *Journal of pharmaceutical sciences*, 79 (1990) 476-482.
- [34] A.W. Stadnyk, Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines, *Can J Gastroenterol*, 16 (2002) 241-246.
- [35] N. Miron, V. Cristea, Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut, *Clin Exp Immunol*, 167 (2012) 405-412.
- [36] V. Pardo, A. Gonzalez-Rodriguez, J. Muntane, S.C. Kozma, A.M. Valverde, Role of hepatocyte S6K1 in palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress, lipotoxicity, insulin resistance and in oleic acid-induced protection, *Food Chem Toxicol*, 80 (2015) 298-309.
- [37] J. Deguil, L. Pineau, E.C. Rowland Snyder, S. Dupont, L. Beney, A. Gil, G. Frapper, T. Ferreira, Modulation of lipid-induced ER stress by fatty acid shape, *Traffic*, 12 (2011) 349-362.
- [38] H. Danino, K. Ben-Dror, R. Birk, Exocrine pancreas ER stress is differentially induced by different fatty acids, *Exp Cell Res*, 339 (2015) 397-406.
- [39] J.M. Caviglia, C. Gayet, T. Ota, A. Hernandez-Ono, D.M. Conlon, H. Jiang, E.A. Fisher, H.N. Ginsberg, Different fatty acids inhibit apoB100 secretion by different pathways: unique roles for ER stress, ceramide, and autophagy, *Journal of lipid research*, 52 (2011) 1636-1651.
- [40] J.A. Willy, S.K. Young, J.L. Stevens, H.C. Masuoka, R.C. Wek, CHOP links endoplasmic reticulum stress to NF-kappaB activation in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis, *Molecular biology of the cell*, 26 (2015) 2190-2204.
- [41] A.C. Tang, A. Saferali, G. He, A.J. Sandford, L.J. Strug, S.E. Turvey, Endoplasmic Reticulum Stress and Chemokine Production in Cystic Fibrosis Airway Cells: Regulation by STAT3 Modulation, *J Infect Dis*, 215 (2017) 293-302.
- [42] X. Ma, Z. Dai, K. Sun, Y. Zhang, J. Chen, Y. Yang, P. Tso, G. Wu, Z. Wu, Intestinal Epithelial Cell Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis: An Update Review, *Front Immunol*, 8 (2017) 1271.
- [43] C.M. Osowski, F. Urano, Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system, *Methods Enzymol*, 490 (2011) 71-92.
- [44] D.R. Beriault, G.H. Werstuck, Detection and quantification of endoplasmic reticulum stress in living cells using the fluorescent compound, Thioflavin T, *Biochimica et biophysica acta*, 1833 (2013) 2293-2301.
- [45] B.M. Castro, M. Prieto, L.C. Silva, Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties, *Progress in lipid research*, 54 (2014) 53-67.
- [46] J.A. Chavez, S.A. Summers, A ceramide-centric view of insulin resistance, *Cell metabolism*, 15 (2012) 585-594.
- [47] J. Lowther, B.A. Yard, K.A. Johnson, L.G. Carter, V.T. Bhat, M.C. Raman, D.J. Clarke, B. Ramakers, S.A. McMahon, J.H. Naismith, D.J. Campopiano, Inhibition of the PLP-dependent enzyme

- serine palmitoyltransferase by cycloserine: evidence for a novel decarboxylative mechanism of inactivation, *Mol Biosyst*, 6 (2010) 1682-1693.
- [48] M.S. Kang, K.H. Ahn, S.K. Kim, H.J. Jeon, J.E. Ji, J.M. Choi, K.M. Jung, S.Y. Jung, D.K. Kim, Hypoxia-induced neuronal apoptosis is mediated by de novo synthesis of ceramide through activation of serine palmitoyltransferase, *Cell Signal*, 22 (2010) 610-618.
- [49] E. Gruys, M.J. Toussaint, T.A. Niewold, S.J. Koopmans, Acute phase reaction and acute phase proteins, *J Zhejiang Univ Sci B*, 6 (2005) 1045-1056.
- [50] H. Nomiya, N. Osada, O. Yoshie, The evolution of mammalian chemokine genes, *Cytokine Growth Factor Rev*, 21 (2010) 253-262.
- [51] J. Brandauer, R.Q. Landers-Ramos, N.T. Jenkins, E.E. Spangenburg, J.M. Hagberg, S.J. Prior, Effects of prior acute exercise on circulating cytokine concentration responses to a high-fat meal, *Physiol Rep*, 1 (2013) e00040.
- [52] T.A. Sanders, A. Filippou, S.E. Berry, S. Baumgartner, R.P. Mensink, Palmitic acid in the sn-2 position of triacylglycerols acutely influences postprandial lipid metabolism, *Am J Clin Nutr*, 94 (2011) 1433-1441.
- [53] J. Kracmerova, E. Czudkova, M. Koc, L. Malisova, M. Siklova, V. Stich, L. Rossmeislova, Postprandial inflammation is not associated with endoplasmic reticulum stress in peripheral blood mononuclear cells from healthy lean men, *Br J Nutr*, 112 (2014) 573-582.
- [54] D. Esser, E. Oosterink, J. op 't Roodt, R.M. Henry, C.D. Stehouwer, M. Muller, L.A. Afman, Vascular and inflammatory high fat meal responses in young healthy men; a discriminative role of IL-8 observed in a randomized trial, *PloS one*, 8 (2013) e53474.
- [55] M. Strackowski, S. Dzienis-Strackowska, A. Stepień, I. Kowalska, M. Szelachowska, I. Kinalska, Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor-alpha system, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87 (2002) 4602-4606.
- [56] C.S. Kim, H.S. Park, T. Kawada, J.H. Kim, D. Lim, N.E. Hubbard, B.S. Kwon, K.L. Erickson, R. Yu, Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters, *Int J Obes (Lond)*, 30 (2006) 1347-1355.
- [57] D.A. Winer, H. Luck, S. Tsai, S. Winer, The Intestinal Immune System in Obesity and Insulin Resistance, *Cell metabolism*, 23 (2016) 413-426.
- [58] R. Al-Sadi, S. Guo, D. Ye, K. Dokladny, T. Alhmoud, L. Ereifej, H.M. Said, T.Y. Ma, Mechanism of IL-1beta modulation of intestinal epithelial barrier involves p38 kinase and activating transcription factor-2 activation, *J Immunol*, 190 (2013) 6596-6606.
- [59] H. Yu, X. Huang, Y. Ma, M. Gao, O. Wang, T. Gao, Y. Shen, X. Liu, Interleukin-8 regulates endothelial permeability by down-regulation of tight junction but not dependent on integrins induced focal adhesions, *Int J Biol Sci*, 9 (2013) 966-979.
- [60] G. Qiang, H.W. Kong, D. Fang, M. McCann, X. Yang, G. Du, M. Bluher, J. Zhu, C.W. Liew, The obesity-induced transcriptional regulator TRIP-Br2 mediates visceral fat endoplasmic reticulum stress-induced inflammation, *Nat Commun*, 7 (2016) 11378.
- [61] E. Thursby, N. Juge, Introduction to the human gut microbiota, *The Biochemical journal*, 474 (2017) 1823-1836.
- [62] L. Garidou, C. Pomie, P. Klopp, A. Waget, J. Charpentier, M. Aloulou, A. Giry, M. Serino, L. Stenman, S. Lahtinen, C. Dray, J.S. Iacovoni, M. Courtney, X. Collet, J. Amar, F. Servant, B. Lelouvier, P. Valet, G. Eberl, N. Fazilleau, V. Douin-Echinard, C. Heymes, R. Burcelin, The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing RORgammat and Controls Metabolic Disease, *Cell metabolism*, 22 (2015) 100-112.
- [63] A.C. Ericsson, C.E. Hagan, D.J. Davis, C.L. Franklin, Segmented filamentous bacteria: commensal microbes with potential effects on research, *Comp Med*, 64 (2014) 90-98.
- [64] N. Ottman, S.Y. Geerlings, S. Aalvink, W.M. de Vos, C. Belzer, Action and function of *Akkermansia muciniphila* in microbiome ecology, health and disease, *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 31 (2017) 637-642.
- [65] C.L. Karlsson, J. Onnerfalt, J. Xu, G. Molin, S. Ahrne, K. Thorngren-Jerneck, The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight, *Obesity (Silver Spring)*, 20 (2012) 2257-2261.

- [66] M.C. Dao, A. Everard, J. Aron-Wisnewsky, N. Sokolovska, E. Prifti, E.O. Verger, B.D. Kayser, F. Levenez, J. Chilloux, L. Hoyles, M.I.-O. Consortium, M.E. Dumas, S.W. Rizkalla, J. Dore, P.D. Cani, K. Clement, Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology, *Gut*, 65 (2016) 426-436.
- [67] A. Everard, C. Belzer, L. Geurts, J.P. Ouwerkerk, C. Druart, L.B. Bindels, Y. Guiot, M. Derrien, G.G. Muccioli, N.M. Delzenne, W.M. de Vos, P.D. Cani, Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (2013) 9066-9071.
- [68] Y. Kusumoto, J. Irie, K. Iwabu, H. Tagawa, A. Itoh, M. Kato, N. Kobayashi, K. Tanaka, R. Kikuchi, M. Fujita, Y. Nakajima, K. Morimoto, T. Sugizaki, S. Yamada, T. Kawai, M. Watanabe, Y. Oike, H. Itoh, Bile acid binding resin prevents fat accumulation through intestinal microbiota in high-fat diet-induced obesity in mice, *Metabolism*, 71 (2017) 1-6.
- [69] A. Santacruz, A. Marcos, J. Warnberg, A. Marti, M. Martin-Matillas, C. Campoy, L.A. Moreno, O. Veiga, C. Redondo-Figuero, J.M. Garagorri, C. Azcona, M. Delgado, M. Garcia-Fuentes, M.C. Collado, Y. Sanz, E.S. Group, Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents, *Obesity (Silver Spring)*, 17 (2009) 1906-1915.
- [70] H. Yan, R. Potu, H. Lu, V. Vezzoni de Almeida, T. Stewart, D. Ragland, A. Armstrong, O. Adeola, C.H. Nakatsu, K.M. Ajuwon, Dietary fat content and fiber type modulate hind gut microbial community and metabolic markers in the pig, *PLoS one*, 8 (2013) e59581.
- [71] S.N. Heinritz, E. Weiss, M. Eklund, T. Aumiller, C.M. Heyer, S. Messner, A. Rings, S. Louis, S.C. Bischoff, R. Mosenthin, Impact of a High-Fat or High-Fiber Diet on Intestinal Microbiota and Metabolic Markers in a Pig Model, *Nutrients*, 8 (2016).
- [72] R. Caesar, V. Tremaroli, P. Kovatcheva-Datchary, P.D. Cani, F. Backhed, Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling, *Cell metabolism*, 22 (2015) 658-668.
- [73] G.D. Wu, J. Chen, C. Hoffmann, K. Bittinger, Y.Y. Chen, S.A. Keilbaugh, M. Bewtra, D. Knights, W.A. Walters, R. Knight, R. Sinha, E. Gilroy, K. Gupta, R. Baldassano, L. Nessel, H. Li, F.D. Bushman, J.D. Lewis, Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes, *Science (New York, N.Y.)*, 334 (2011) 105-108.
- [74] W.A. Walters, Z. Xu, R. Knight, Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD, *FEBS letters*, 588 (2014) 4223-4233.
- [75] R. Fucho, N. Casals, D. Serra, L. Herrero, Ceramides and mitochondrial fatty acid oxidation in obesity, *FASEB J*, 31 (2017) 1263-1272.
- [76] Y.R. Kim, G. Volpert, K.O. Shin, S.Y. Kim, S.H. Shin, Y. Lee, S.H. Sung, Y.M. Lee, J.H. Ahn, Y. Pewzner-Jung, W.J. Park, A.H. Futerman, J.W. Park, Ablation of ceramide synthase 2 exacerbates dextran sodium sulphate-induced colitis in mice due to increased intestinal permeability, *J Cell Mol Med*, 21 (2017) 3565-3578.
- [77] J. Bock, G. Liebisch, J. Schweimer, G. Schmitz, G. Rogler, Exogenous sphingomyelinase causes impaired intestinal epithelial barrier function, *World J Gastroenterol*, 13 (2007) 5217-5225.
- [78] S.J. Lauderkind, A. Bielawska, R. Raghov, Y.A. Hannun, L.R. Ballou, Ceramide induces interleukin 6 gene expression in human fibroblasts, *J Exp Med*, 182 (1995) 599-604.
- [79] B.L. Fiebich, K. Lieb, M. Berger, J. Bauer, Stimulation of the sphingomyelin pathway induces interleukin-6 gene expression in human astrocytoma cells, *J Neuroimmunol*, 63 (1995) 207-211.
- [80] L.J. John, M. Fromm, J.D. Schulzke, Epithelial barriers in intestinal inflammation, *Antioxid Redox Signal*, 15 (2011) 1255-1270.
- [81] T. Suzuki, Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions, *Cell Mol Life Sci*, 70 (2013) 631-659.

Figure legends

Figure 1: Palm oil gavage increases intestinal permeability *in vivo*. (A) Mice were submitted to one (1x) or 5 gavages (5x) with 200µl palm oil or water. A control group was constituted of mice treated with DSS in drinking water to induce a colitis. The intestinal permeability was assessed after

the gavage with oil or water by measuring plasma concentration of FD4 one hour after an oral FITC-dextran 4kDa (FD4) load. Results are expressed in $\mu\text{g/ml}$ (mean \pm SEM, n=5-10). ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ as compared to water. (B) The distribution of cell-cell junction proteins, E-cadherin, ZO-1, occludin and tricellulin was analyzed by immunofluorescence on jejunum sections. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). White arrowheads indicate the labeling of tricellulin at tricellular contacts in control (water) conditions. Bar= 10 μm .

Figure 2: Repeated gavages with palm oil modify expression of genes involved in immune response. Mice were submitted to one (1x) or 5 (5x) gavages with 200 μl palm oil or water. A control group was constituted of mice treated with DSS. Intestine was collected one hour after the last gavage. The expression of Gata3 in jejunum (A) and of Reg3g in ileum (B), were determined by RT-PCR. Cyclophilin was used as reference gene. Results are expressed in arbitrary units (a.u.) as the ratio of target gene to cyclophilin (cyclo) mRNA level (mean \pm SEM, n=5-10). (C) The quantification of Il-1 β protein in the colon was determined by ELISA. Results are expressed in pg/mg of protein as mean \pm SEM, n=5-9. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared to water condition.

Figure 3: Repeated palm oil gavages modify gut microbiota composition. Mice were submitted to daily gavages with water or palm oil for 4 consecutive days. Total DNA from feces was extracted and used for quantification of bacteria species content by qPCR. Results are expressed as mean \pm SEM, n=4-6, * $p < 0.05$ as compared to water, ns: not statistically significant, a.u.: arbitrary unit. Fecal quantification of (A) *Clostridium leptum*, (B) *Akkermensia muciniphila*, (C) Segmented Filamentous bacteria, (D) *Bacteroides* sp., (E) *Lactobacillus* sp., and (F) *Clostridium coccooides*. (G) Total fecal bacterial counts.

Figure 4: Saturated palmitic acid but not unsaturated oleic acid increases paracellular permeability of an intestinal epithelial monolayer. Caco-2/TC7 cells were incubated with control medium (Ctrl) or treated with micelles containing either palmitic acid (PA) or oleic acid (OA) for 24h or daily for 4 consecutive days (4d). A 24h-treatment with 4.5mM EGTA was used as positive control known to display altered epithelial barrier integrity. (A) Paracellular permeability across Caco-2/TC7 cell monolayer was evaluated by measuring the accumulation during 4 h of FITC-4kDa dextran (FD4) in the basal compartment. Results are expressed as percentage of FD4 input (amount added in the apical compartment), mean \pm SEM, n=6-15. Fold-increase, as compared to control condition, is indicated at the top of the corresponding histogram. (B) TEER was assessed in control and EGTA-treated cells. Results are expressed in percentage of TEER measured in control condition, as mean \pm SEM, n=6. The percentage of decrease compared to the control condition is indicated. (C) TEER was measured before (0) and every 24h during the treatment with micelles containing palmitic acid (PA) or

oleic acid (OA) or in untreated cells (control). The percentage of decrease in PA-treated cells as compared to control cells is indicated. Results are expressed in ohm.cm^2 as mean \pm SEM, $n=6$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ as compared to untreated cells, unless otherwise indicated.

Figure 5: Repeated supply of palmitic acid, but not of oleic acid, alters the localization of junction proteins at cell-cell contacts. Cells were incubated or not with palmitic acid (PA)-containing micelles (for 24h or 4 days) or with oleic acid (OA)-containing micelles (for 4 days). Immunofluorescence analysis was performed to study the localization of E-cadherin, ZO-1, occludin and tricellulin. Nuclei were stained DAPI. Bar= $20\mu\text{m}$

Figure 6: Palmitic acid modifies cytokine expression in Caco-2/TC7 cells. Caco-2/TC7 cells were cultured in the same conditions as in Figure 4. The mRNA levels of IL-8 (A), TGF β 1 (C) IL-1 β (D), were quantified by RT-PCR. Cyclophilin was used as reference gene. Results are expressed in arbitrary units (a.u.) as the ratio of target gene to cyclophilin (cyclo) mRNA level (mean \pm SEM, $n=6-15$). (B) The concentration of IL-8 protein in the basal compartment was quantified by ELISA. Results are expressed in pg/ml as mean \pm SEM, $n=6$. Fold-increase as compared to control condition is indicated at the top of histograms. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ as compared to control.

Figure 7: The removal of palmitic acid partially reverses its deleterious effects on intestinal epithelial cell monolayer integrity and on expression of genes involved in immune response. Caco-2/TC7 cells were cultured in control medium (Ctrl) or with palmitic acid-containing micelles (PA) for 4 days followed or not by a period of one or 2 more days in control medium without PA (w/o PA). (A) Paracellular permeability was evaluated by measuring FITC-dextran flux across Caco-2/TC7 monolayer, after a 4-day palmitic acid treatment and each day after cells were shifted to control medium. FITC-dextran 4 kilodaltons (FD4) was added in the apical compartment and fluorescence values were determined in the basal compartment 4 hours later. Results are expressed in percentage of FD4 input in the apical compartment, mean \pm SEM, $n=6-18$. Fold-increase, as compared to control condition, is indicated at the top of histograms. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ as compared to control cells at the same day of the culture, unless otherwise indicated. (B) TEER was measured in control (white circles) and in palmitic acid-treated cells. The measure was performed before treatment (day 0), at day 1 and 4 of palmitic acid treatment (black circles) and after the removal of palmitic acid-containing micelles (grey circles). Dashed line indicated the day when PA-treated cells were shifted to control medium. Results are expressed in ohm.cm^2 as mean \pm SEM, $n=6-18$. The percentage of decrease in PA-treated cells as compared to control cells is indicated. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ as compared to control cells. (C) Immunofluorescence analysis was performed to study the localization of E-cadherin, ZO-1, occludin and tricellulin. Nuclei were stained with DAPI. Bar= $20\mu\text{m}$. (D-E) The

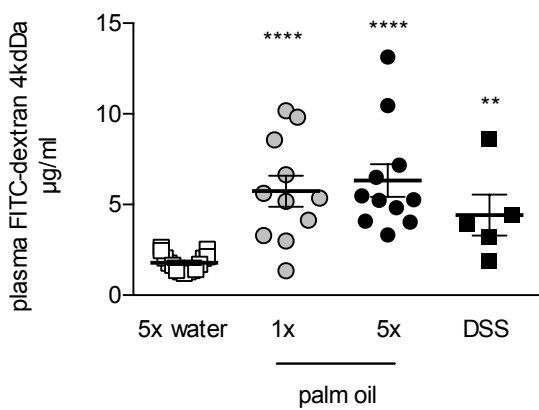
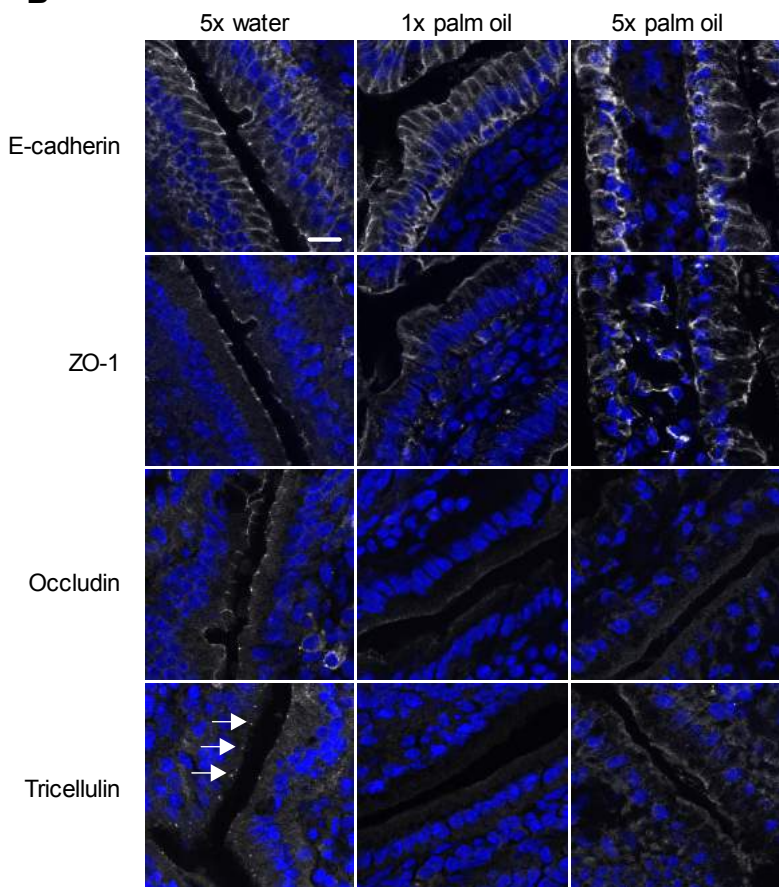
mRNA levels of IL-8 (**D**) and TGFB1 (**E**) were quantified by RT-PCR. Cyclophilin was used as reference gene. Results are expressed in arbitrary units (a.u.) as the ratio of target gene to cyclophilin (cyclo) mRNA level (mean \pm SEM, n =6-18). *p<0.05, **p<0.01 as compared to control, unless otherwise indicated, ns: not statistically significant.

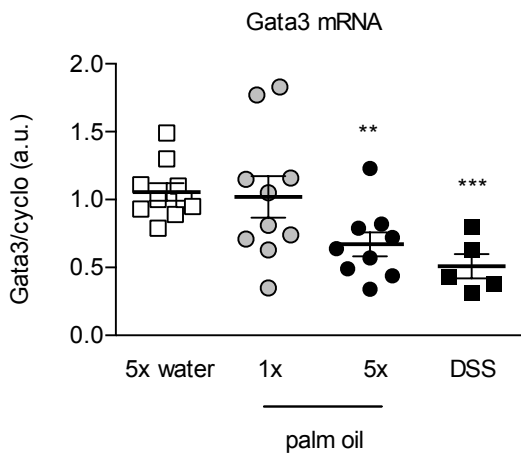
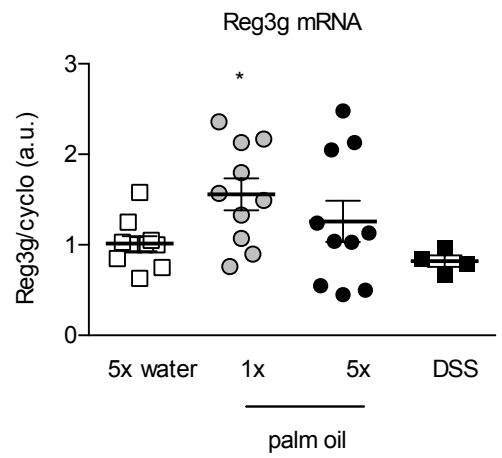
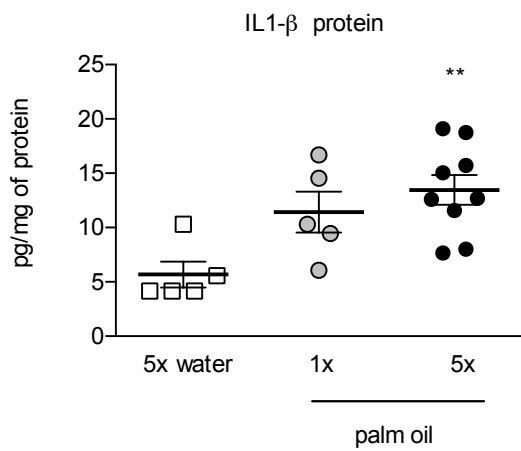
Figure 8: Palmitic acid provokes a moderate ER stress in Caco-2/TC7 cells. Caco-2/TC7 cells were incubated with control medium (Ctrl), or were treated for 24h or daily for 4 consecutive days (4d) with micelles containing either palmitic acid (PA) or oleic acid (OA). A 4h-treatment with 2mM DTT was used to induce an ER stress (positive control). (**A**) Paracellular permeability was evaluated by measuring FITC-dextran flux across Caco-2/TC7 cell monolayer. FITC-dextran 4 kilodaltons (FD4) was added in the apical compartment the last day of the experiment and fluorescence values were determined in the basal compartment 4 hours later. Results are expressed in percentage of FD4 added in the apical compartment (input), mean \pm SEM, n=4-6. The mRNA levels of IL-8 (**B**) GRP78/HSPA5 (**C**), GADD153/DDIT3 (**D**) and XBP-1 spliced form (**E**) were quantified by RT-PCR. Cyclophilin was used as reference gene. Results are expressed in arbitrary units (a.u.) as the ratio of target gene to cyclophilin (cyclo) mRNA level, (mean \pm SEM, n=6-15). Fold-increase as compared to control condition is indicated at the top of some histograms. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.01, ****p<0.0001 as compared to control.

Figure 9: C₂-ceramide addition provokes barrier defects and modulates cytokine expression. Caco-2/TC7 cells were culture in absence (Ctrl) or in presence for 24h of vehicle 0.5% ethanol (EtOH), or 100 μ M C₂-ceramide (C₂-Cer). (**A**) Paracellular permeability was evaluated by measuring FITC-dextran flux across Caco-2/TC7 cell monolayer as in Figure 4. Results are expressed as percentage of FD4 input in the apical compartment, (mean \pm SEM, n=6). (**B**) TEER was measured after 24h-treatments. Results are expressed in % of value obtained in untreated cells, mean \pm SEM, n=6. (**C**) Caco-2/TC7 cells were analyzed by immunofluorescence for tight junction proteins ZO-1, occludin, tricellulin and for E-cadherin an adherens junction protein. Nuclei are stained with DAPI. Bar= 20 μ m. The mRNA levels of IL-8 (**D**), TGFB1 (**F**) and IL-1B (**G**) were quantified by RT-PCR. Cyclophilin was used as reference gene. Results are expressed in arbitrary units (a.u.) as the ratio of target gene to cyclophilin (cyclo) mRNA level (mean \pm SEM, n=6-15). (**E**) The concentration of IL-8 protein in the basal compartment was quantified by ELISA. Results are expressed in pg/ml as mean \pm SEM (n=6). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.01, ****p<0.0001 as compared to untreated cells.

Figure 10: Inhibition of *de novo* ceramide synthesis abolishes inflammatory effects of palmitic acid. Caco-2/TC7 cells were cultured for 24h in absence (Ctrl) or in presence of micelles containing palmitic acid (PA) or 20mM L-cycloserine (Lcyclo). In one condition, cells were pre-treated with L-cycloserine for 1 h before incubation for 24h with PA-containing micelles (PA+Lcyclo). (**A**)

Paracellular permeability was evaluated by measuring FITC-dextran flux across Caco-2/TC7 cell monolayer. Results are expressed in percentage of FD4 input in the apical compartment,, mean \pm SEM, n=3-6. **(B)** The mRNA levels of IL-8 were quantified by RT-PCR. Cyclophilin was used as reference gene. Results are expressed in arbitrary units (a.u.) as the ratio of IL-8 gene mRNA level to cyclophilin (cyclo) mRNA level (mean \pm SEM, n=3-6). **p<0.01*** p<0.001 as compared to control cells unless indicated, ns: non statistical significant.

A**B**

A**B****C**

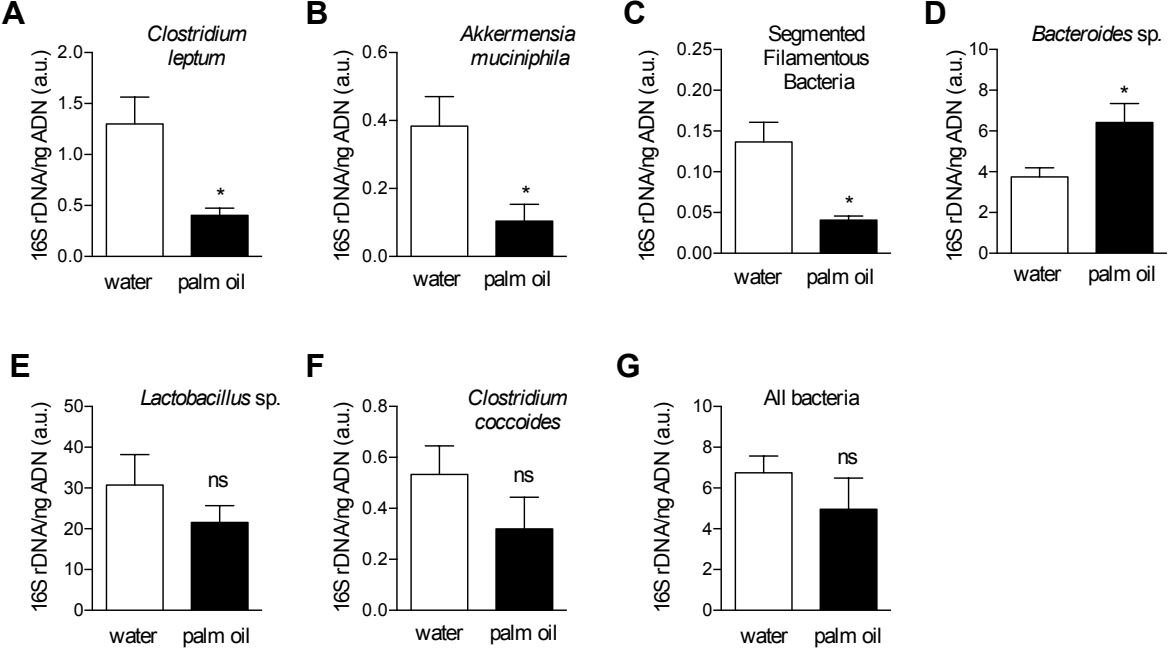


Figure 3

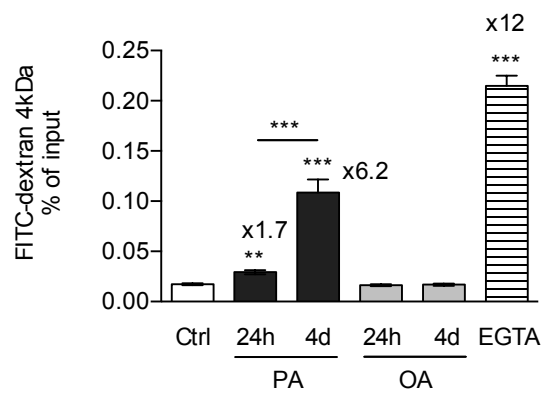
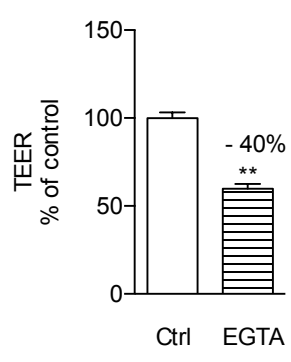
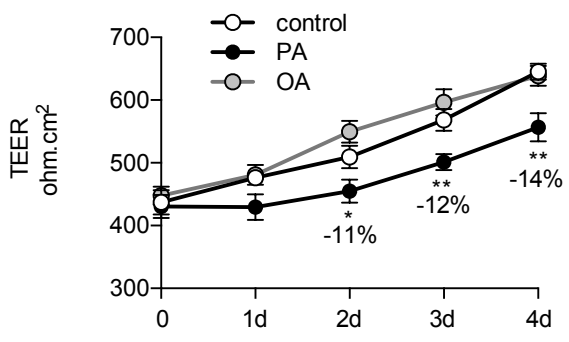
A**B****C**

Figure 4

E-cadherin

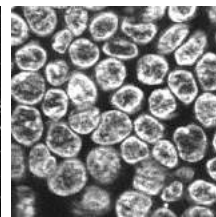
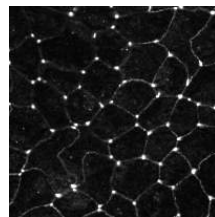
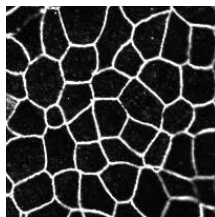
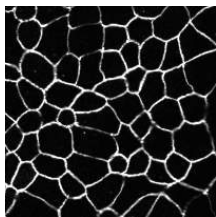
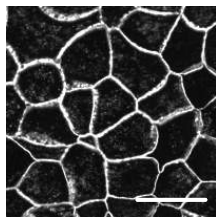
ZO-1

Occludin

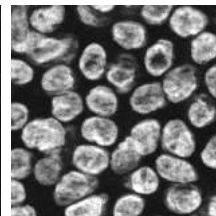
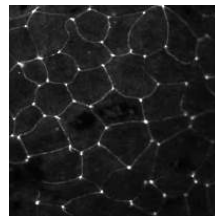
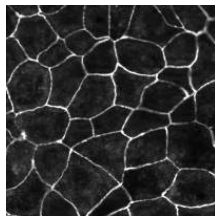
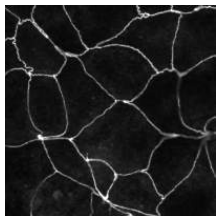
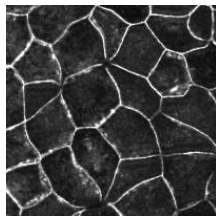
Tricellulin

Nuclei

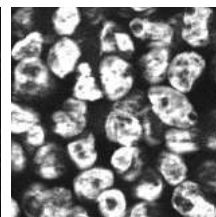
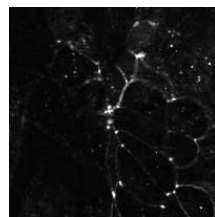
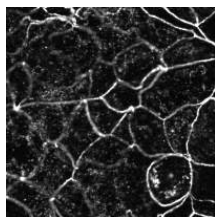
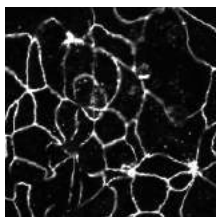
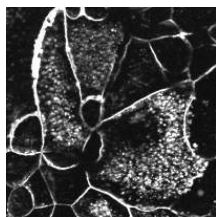
ctrl



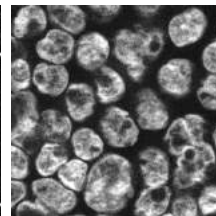
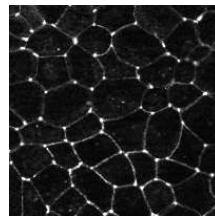
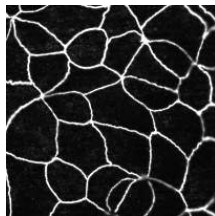
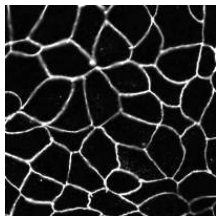
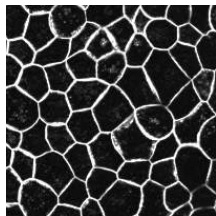
24h PA



4d PA



4d OA



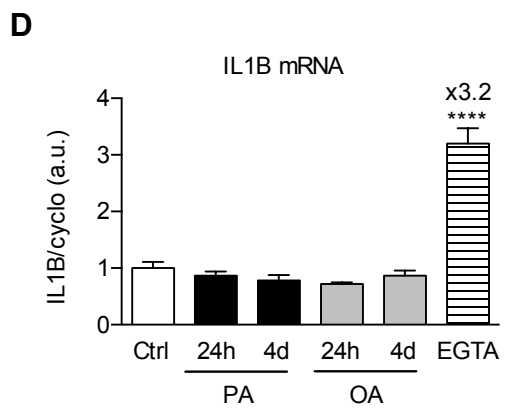
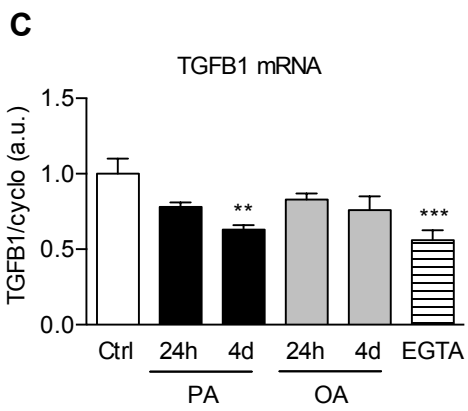
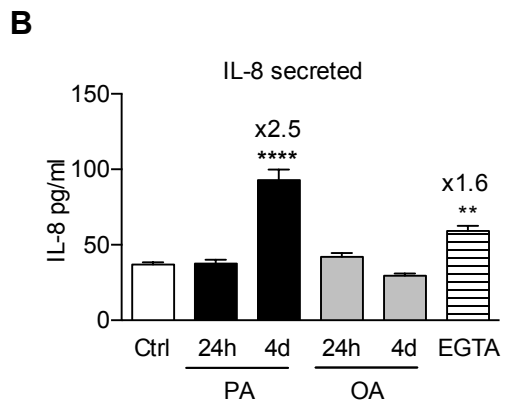
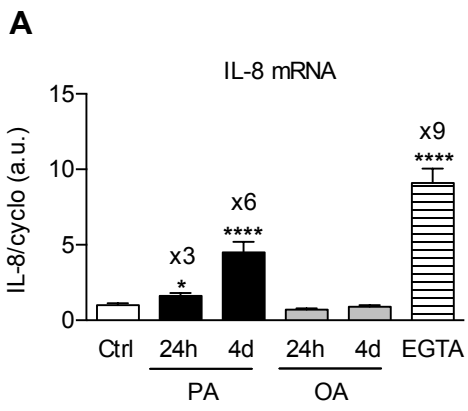


Figure 6

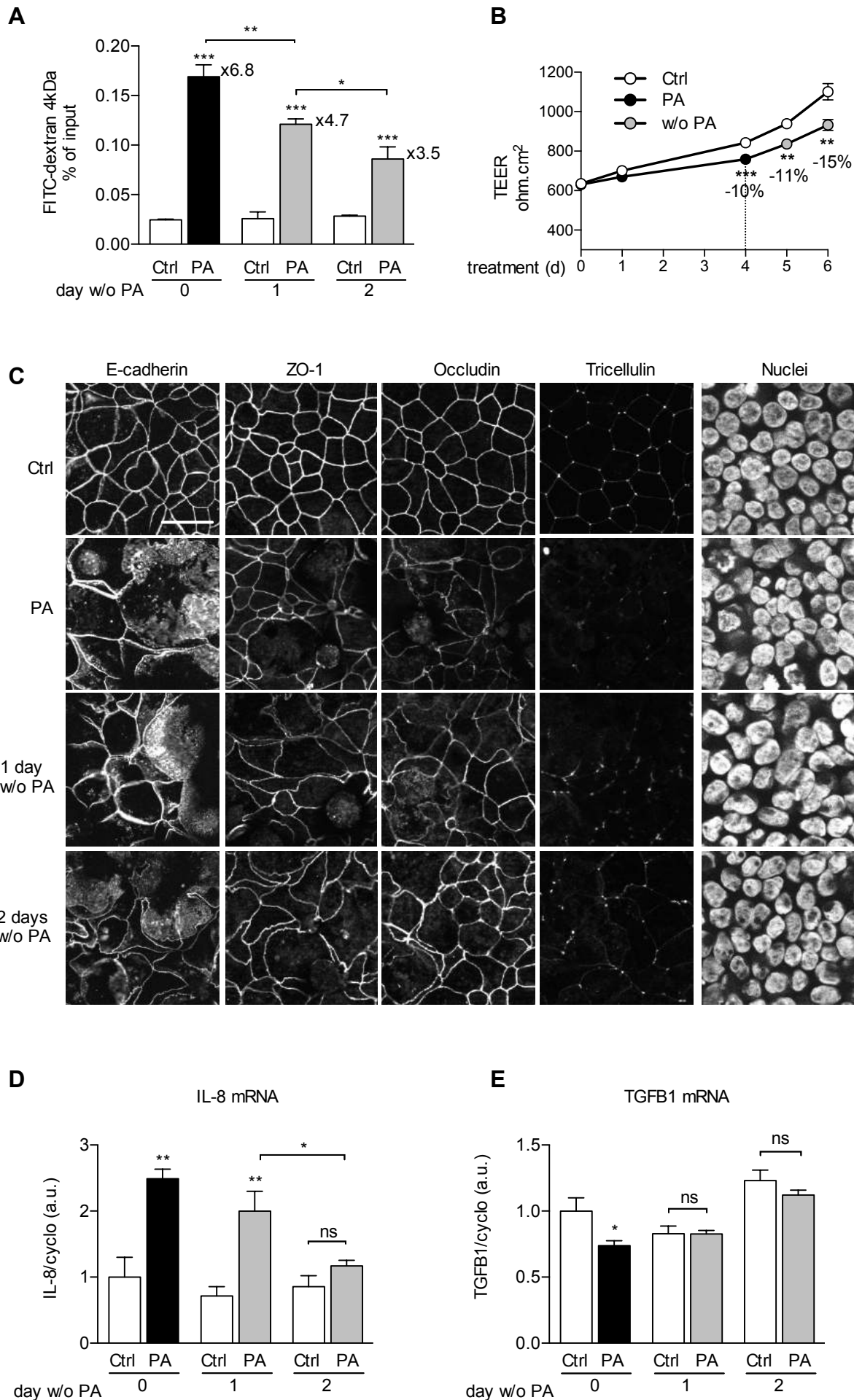
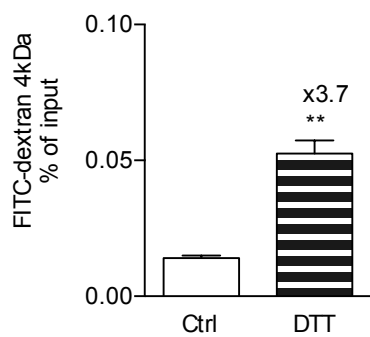
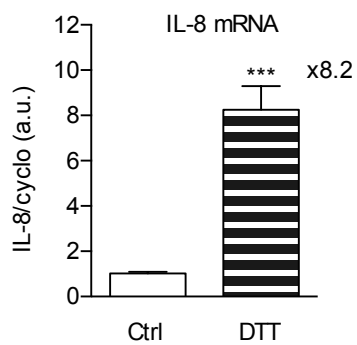
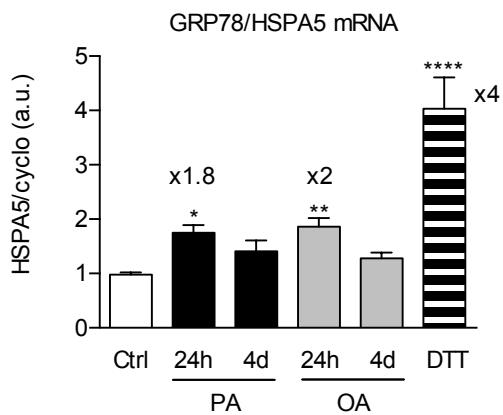
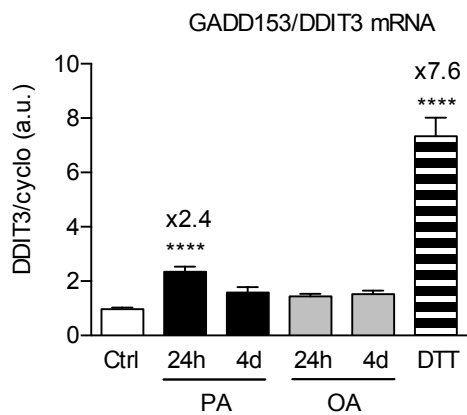
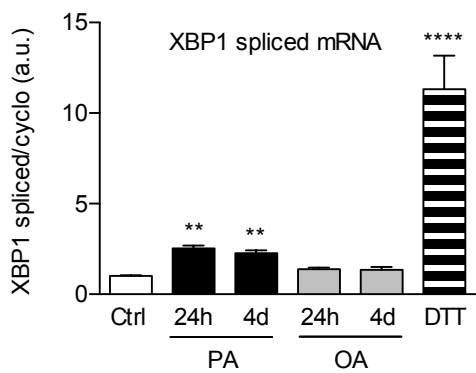
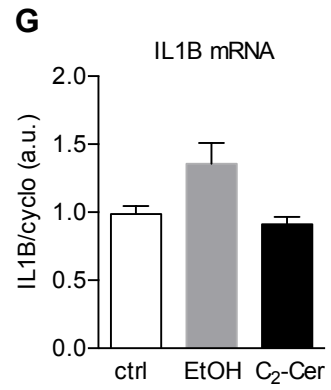
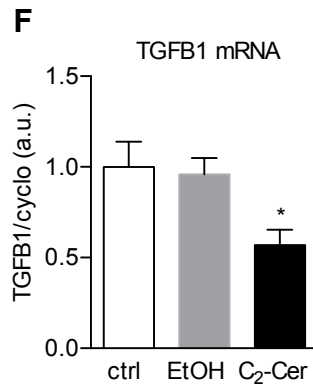
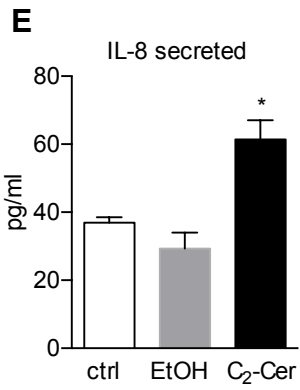
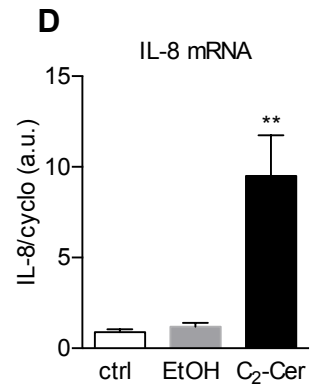
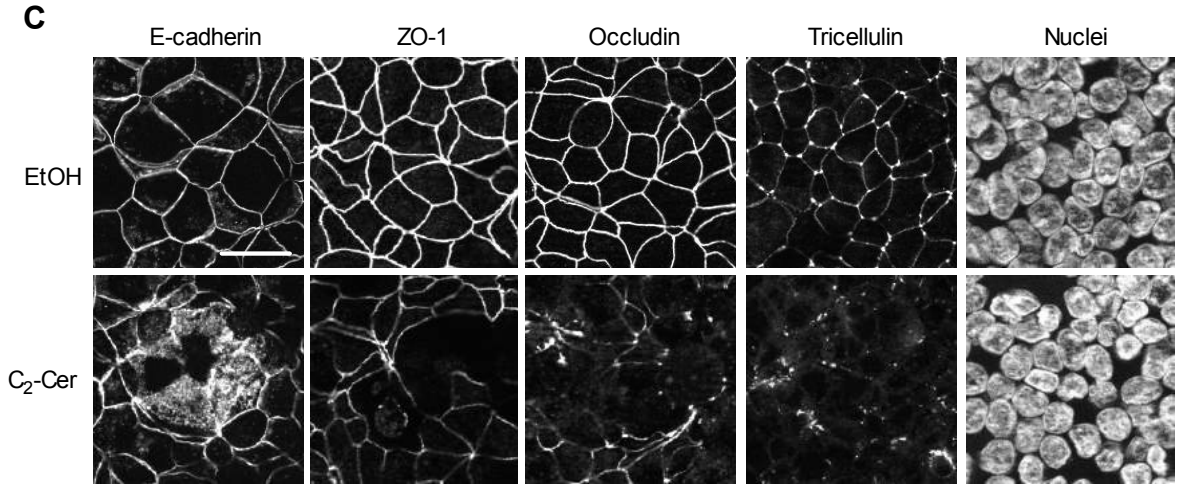
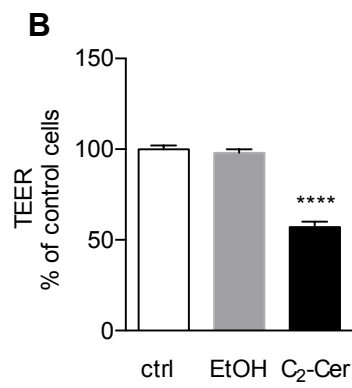
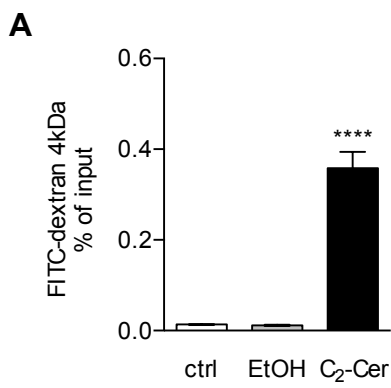


Figure 7

A**B****C****D****E**



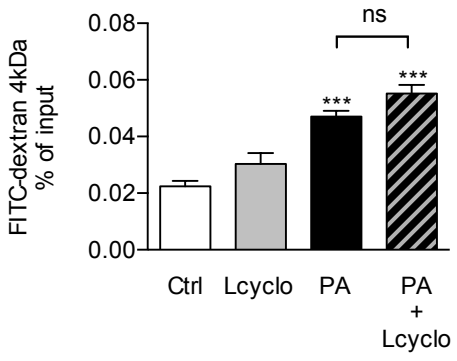
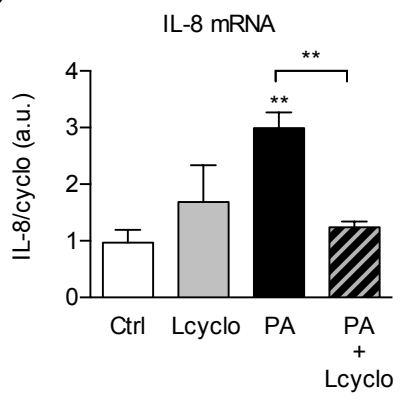
A**B**

Table 1: Primer sequences and bacteria strains used used for the quantification of bacterai group or species

group or species	forward primer		reverse primer		bacteria strain used for the standard curve
	name	sequence	name	sequence	
<i>Clostridium leptum</i>	Clept 09	5'-CCTTCCGTCCGSAGTTA-3'	Clept 08	5'-GAATTAAC CACAT CT CACTGCTT-3'	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
<i>Akkermensia muciniphila</i>	AKK-F	5'-GGTAGCCGGTCTGAGAGGAT-3'	AKK-R	5'-TAGGTGTCTGGACCGTGTCTC-3'	see legend below
<i>Lactobacillus</i> sp.	Lacto 04	5'-CGCCACTGGTGTTCYTCCATA-3'	Lacto 05	5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3'	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Segmented Filamentous Bacteria	SFB-F	5'-CACGGTCCATACTCCTACGG-3'	SFB-R	5'-AGGGTTTCCCCATTGTG-3'	see legend below
<i>Bacteroides</i> sp.	Bacter 11	5'-CCTWCGATGGATAGGGGTT-3'	Bacter 08	5'-CACGCTACTTGGCTGGTTCAG-3'	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
<i>Clostridium coccooides</i>	Ccoc 07	5'-GACGCCGCGTGAAGGA-3'	Ccoc 14	5'-AGCCCCAGCCTTTCACATC-3'	<i>Clostridium coccooides</i>
All bacteria	F_Bact 1369	5'-CGGTGAATACGTTCCCGG-3'	R_PROK 1492	5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'	<i>Escherichia coli</i>

The determination of *Akkermensia muciniphila* and Segmented Filamentous Bacteria abundance was determined by relative quantification to a control sample.

Table 2: List of primer sequences used for RT-PCR analyses

human genes (alias names)	forward primer	reverse primer
CXCL8 (IL-8)	5'-AGACAGCAGAGCACACAAGC-3'	5'-ATGGTTCCTCCGGTGGT-3'
TGFB1 (TGF-Beta-1)	5'-GCAGCACGTGGAGCTGTA-3'	5'-CAGCCGGTTGCTGAGGTA-3'
IL1B (IL-1-Beta)	5'-CTGTCCTGCGTGTGAAAGA-3'	5'-TTGGGTAATTTTGGGATCTACA-3'
HSPA5 (GRP78, BIP)	5'-CTGGGTACATTTGATCTGACTGG-3'	5'-TCCTTGAGCTTTTTGTCTTCCT-3'
DDIT3 (GADD153, CHOP)	5'-AGCTGTGCCACTTTCCTTTC-3'	5'-CAGAACCAGAGAGGTCACA-3'
XBP1 spliced form	5'-TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG-3'	5'-GCTGGCAGGCTCTGGGGAAG-3'
PPIB (Cyclophilin B)*	5'-GCCTTAGCTACAGGAGAGAA-3'	5'-TTTCCTCCTGTGCCATCTC-3'
mouse genes	forward primer	reverse primer
Gata3	5'-TTATCAAGCCCAAGCGAAG-3'	5'-TGGTGGTGGTCTGACAGTTC-3'
Reg3g	5'-ACCATCACCATCATGTCCTG-3'	5'-GGCATCTTCTTGCCAACCTT-3'

* PPIB gene is used as reference gene and the same sequences are used for both human and mouse species.

ARTICLE 2

II. Etude des mécanismes précoces mis en jeu dans la détection des lipides par le récepteur scavenger SR-B1 dans la lignée entérocytaire Caco-2/TC7

Les résultats de cette étude sont présentés à la fin de ce chapitre sous la forme d'un article scientifique publié dans la revue BBA Molecular and Cell Biology of Lipids dont je suis deuxième auteur et qui s'intitule : « Cholesterol trafficking and raft-like membrane domain composition mediate scavenger receptor class B type 1-dependent lipid sensing in intestinal epithelial cells » (article 2). Ce travail était déjà bien avancé quand j'y ai pris part, mais j'ai participé à la préparation des « rafts » pour l'analyse protéomique et lipidomique et à l'exploitation des résultats.

La détection des lipides est un mécanisme qui participe au contrôle de nombreuses fonctions cellulaires, en particulier dans les cellules épithéliales intestinales (Iyer *et al.* 2015). Les travaux précédents de l'équipe ont montré que le récepteur scavenger SR-B1 est capable de détecter les lipides alimentaires lorsqu'ils sont présentés aux entérocytes sous leur forme physiologique de micelles (Béaslas *et al.* 2009). Cette détection, mise en évidence à l'aide de micelles contenant de l'acide oléique, facilite l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides (Béaslas *et al.* 2009; Briand *et al.* 2016).

SR-B1 est un récepteur dont le rôle dans le métabolisme des lipides et du cholestérol est assez bien documenté dans le contexte de l'athérosclérose, notamment par son implication dans le transport réverse du cholestérol entraînant l'entrée sélective des esters de cholestérol des HDL dans le foie. Il est également connu pour son rôle de transporteur bidirectionnel du cholestérol entre les lipoprotéines et les tissus périphériques (pour revue (Shen *et al.* 2018)). Jusqu'à une dizaine d'années, son rôle dans l'épithélium intestinal restait mal connu, d'autant plus que sa fonction de transporteur de cholestérol dans ce tissu avait été remise en cause par la découverte du transporteur NPC1L1 qui assure à 70% l'entrée du cholestérol dans les entérocytes (Altmann 2004). La mise en évidence par notre équipe de son rôle de détecteur de micelles dans les cellules Caco-2/TC7, a permis de montrer que la détection des micelles enclenche l'activation très rapide de voies de signalisation (impliquant les MAP kinases) et provoque le recrutement de SR-B1 dans les « rafts » (Béaslas *et al.* 2009). Un travail

RESULTATS

collaboratif avec l'équipe de Philip Shaul (University of Texas Southwestern Medical Center, USA), qui a construit un mutant de SR-B1 défectif pour sa fonction de détection, a permis de montrer que la glutamine (Q), en position 445 dans la séquence protéique de SR-B1, qui interagit avec le cholestérol de la membrane, était indispensable à cette détection (Saddar *et al.* 2013). En effet, contrairement à la forme sauvage, le mutant de SR-B1, SR-B1-Q445A, est incapable de lier le cholestérol membranaire et de déclencher la signalisation cellulaire en réponse à un apport de lipides. La forme SR-B1-Q445A qui agit comme un dominant-négatif, empêche également le recrutement du récepteur au niveau des « rafts » (Saddar *et al.* 2013).

L'objectif du travail auquel j'ai participé a été de préciser les mécanismes moléculaires associés à la détection des lipides par SR-B1 dans les entérocytes, en s'attachant à identifier les événements cellulaires précoces associés à la reconnaissance du cholestérol membranaire. Ce travail a été réalisé sur les cellules Caco-2/TC7 transfectées avec la forme sauvage de SR-B1 ou avec la forme mutée SR-B1-Q445A, défective pour la fonction de détection. La comparaison des événements cellulaires observés entre ces deux populations cellulaires, après un apport de micelles contenant de l'acide oléique, nous a permis d'identifier les événements directement associés à la détection des lipides par SR-B1 dans les cellules Caco-2/TC7.

Les travaux précédents de notre équipe ayant montré que les mouvements du cholestérol au niveau de la membrane plasmique reproduisent les événements subcellulaires associés à la détection des lipides par SR-B1 (Saddar *et al.* 2013), nos travaux ont en premier lieu porté sur l'étude du trafic intracellulaire du cholestérol.

L'analyse de la distribution intracellulaire du cholestérol en réponse aux lipides a été réalisée grâce à l'ajout de cholestérol couplé à un fluorochrome (cholesterol-bodipy) dans les micelles. L'incubation des cellules pendant un temps court, 1 heure, avec les micelles contenant le cholestérol fluorescent, montre que contrairement à ce qui est observé dans les cellules exprimant la forme sauvage de ce récepteur, le cholestérol s'accumule rapidement dans les gouttelettes lipidiques dans les cellules SR-B1-Q445A. D'autre part, l'incubation des cellules avec des micelles contenant du cholestérol marqué au tritium pendant 48 heures, suivie d'une «chasse» en présence de micelles sans cholestérol, montre une diminution de l'efflux de cholestérol du pôle apical dans les cellules exprimant le mutant de SR-B1. Ces premiers résultats montrent qu'après un apport de micelles la détection des lipides par SR-B1 est nécessaire au trafic intracellulaire du cholestérol, ainsi qu'à l'efflux du cholestérol au pôle

RESULTATS

apical des cellules. Une étude complémentaire, réalisée cette fois-ci en absence de micelles, montre que la présence du mutant de SR-B1 ralentit les mouvements de cholestérol libre à partir de la membrane plasmique et provoque son accumulation dans des vésicules intracellulaires. Ainsi, cette première série de résultats montre que la détection des micelles par SR-B1 participe au trafic intracellulaire du cholestérol.

Les travaux précédents de l'équipe ayant montré que la détection des lipides dépendante de SR-B1 était associée au recrutement de ce récepteur au niveau des « rafts » (Béaslas *et al.* 2009; Saddar *et al.* 2013), nous avons comparé la composition en lipides et en protéines des « rafts », 15 minutes après l'apport de micelles dans les cellules Caco-2/TC7 exprimant la forme sauvage ou mutée de SR-B1. Ce temps court de traitement, correspondant au temps d'activation des voies de signalisation, permet d'évaluer les changements associés à la détection s'opérant de façon précoce dans les « rafts ». Les « rafts », riches en cholestérol et en sphingolipides, peuvent être isolés du fait de leur propriété de résistance à l'action de détergents. Nous avons donc isolé ces structures avant et après challenge lipidique dans les cellules entérocytaires Caco-2/TC7 exprimant la forme sauvage ou mutée de SR-B1. Grâce à une collaboration avec la plateforme lipidomique de Dijon (Dr Pais de Barros, UMR1231), nous avons pu déterminer les modifications de la composition en lipides des « rafts ».

Les résultats de l'analyse lipidomique montrent qu'en absence de traitement par les micelles, les « rafts » issus des cellules exprimant le récepteur muté présentent de façon intrinsèque des concentrations en lipides beaucoup plus élevées comparées aux « rafts » isolés à partir des cellules exprimant le récepteur SR-B1 sauvage. Ils sont notamment plus riches en cholestérol, sphingolipides et phospholipides. Quinze minutes après l'incubation avec les micelles, des changements de la composition lipidique des « rafts » sont observés dans les deux populations cellulaires. Cependant, si l'apport de micelles provoque l'augmentation de la concentration de la lysophosphatidyléthanolamine (18:0/0:0) et de la sphingomyéline (d18:0/16:0) dans les « rafts » des cellules exprimant la forme sauvage de SR-B1, la concentration de ces deux lipides reste inchangée dans les « rafts » des cellules SR-B1-Q445A. Ce résultat suggère que ces deux lipides sont impliqués dans la détection des micelles par SR-B1.

En parallèle, nous avons étudié la composition des « rafts » en protéines grâce à une collaboration avec la plateforme protéomique de Dijon (Patrick Ducoroy, CLIPP). Cette étude révèle que, 15 min après l'apport de micelles, l'abondance de 41 protéines est modifiée (augmentée ou diminuée) dans les « rafts » de cellules exprimant la forme sauvage de SR-B1.

RESULTATS

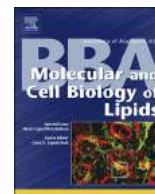
Parmi ces 41 protéines, 30 protéines voient leur abondance inchangée après apport de micelles dans les « rafts » des cellules SR-B1-Q445A et 6 autres protéines présentent des variations de leur abondance opposées à celles qui avaient été observées pour les cellules exprimant la forme sauvage. Ces 36 protéines interviennent dans différents processus cellulaires tels que : 1/ l'adhésion cellulaire, les jonctions intercellulaires (JAM1) et le cytosquelette ; 2/ les interactions protéines-protéines ; 3/ les réactions d'oxydo-réduction ; 4/ le transport d'ions ou encore 5/ la transduction du signal. Ce résultat suggère que ces 36 protéines sont potentiellement impliquées dans la détection des micelles par SR-B1 dans les cellules Caco-2/TC7.

Ainsi cette étude a permis de mettre en évidence dans les cellules épithéliales intestinales un nouveau rôle du récepteur SR-B1 dans l'homéostasie cellulaire du cholestérol. Grace à l'analyse lipidomique et protéomique des « rafts », ce travail a permis l'identification de nouveaux acteurs lipidiques et protéiques impliqués dans la détection des lipides dans les entérocytes par SR-B1.



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbalip

Cholesterol trafficking and raft-like membrane domain composition mediate scavenger receptor class B type 1-dependent lipid sensing in intestinal epithelial cells

Etienne Morel^{a,1}, Sara Ghezzal^a, Géraldine Lucchi^{b,2,3}, Caroline Truntzer^{b,3}, Jean-Paul Pais de Barros^{c,3}, Françoise Simon-Plas^d, Sylvie Demignot^{a,e}, Chieko Mineo^f, Philip W. Shaul^f, Armelle Leturque^a, Monique Rousset^a, Véronique Carrière^{a,*}

^a Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, UMPC Université Paris 6, Université Paris Descartes Paris 5, CNRS, F-75006 Paris, France

^b Clinical Innovation Proteomic Platform CLIPP, Université Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

^c Plateforme de Lipidomique, INSERM UMR1231, Université de Bourgogne Franche Comté, F-21000 Dijon, France

^d Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

^e EPHE, PSL Research University, F-75006 Paris, France

^f Center for Pulmonary and Vascular Biology, Department of Pediatrics, University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas, TX, 75390, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Scavenger receptor
Cholesterol
Lipid raft
Sphingolipid
Lipid trafficking

ABSTRACT

Scavenger receptor Class B type 1 (SR-B1) is a lipid transporter and sensor. In intestinal epithelial cells, SR-B1-dependent lipid sensing is associated with SR-B1 recruitment in raft-like/ detergent-resistant membrane domains and interaction of its C-terminal transmembrane domain with plasma membrane cholesterol. To clarify the initiating events occurring during lipid sensing by SR-B1, we analyzed cholesterol trafficking and raft-like domain composition in intestinal epithelial cells expressing wild-type SR-B1 or the mutated form SR-B1-Q445A, defective in membrane cholesterol binding and signal initiation. These features of SR-B1 were found to influence both apical cholesterol efflux and intracellular cholesterol trafficking from plasma membrane to lipid droplets, and the lipid composition of raft-like domains. Lipidomic analysis revealed likely participation of d18:0/16:0 sphingomyelin and 16:0/0:0 lysophosphatidylethanolamine in lipid sensing by SR-B1. Proteomic analysis identified proteins, whose abundance changed in raft-like domains during lipid sensing, and these included molecules linked to lipid raft dynamics and signal transduction. These findings provide new insights into the role of SR-B1 in cellular cholesterol homeostasis and suggest molecular links between SR-B1-dependent lipid sensing and cell cholesterol and lipid droplet dynamics.

1. Introduction

Cellular transport and trafficking of cholesterol, as well as the molecular composition of the plasma membrane, are critically involved in the governance of cell fate and cell metabolism. The scavenger receptor Class B type 1 (SR-B1) is primarily known for its function as a

cholesterol transporter, particularly in the liver, where it is responsible for the last step in the reverse cholesterol transport pathway, which entails the selective uptake of cholesterol ester from High Density Lipoprotein (HDL). SR-B1 also mediates the bidirectional transport of cholesterol and phospholipids from peripheral tissues or cells to lipoproteins [1]. In the intestine, the functions of SR-B1 regarding

Abbreviations: AGR2, anterior gradient protein 2 homolog; CALX, calnexin; CTTM, C-terminal transmembrane domain; DRM, detergent-resistant membranes; HDL, high density lipoprotein; HNRH1, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H; HNRPK, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1; JAM1, junctional adhesion molecule 1; K1C9, keratin, type I cytoskeletal 9; KAP2, cAMP-dependent protein kinase type II-α regulatory subunit; LDHB, L-lactate dehydrogenase B chain; LPC, lysophosphatidylcholine; LPE, lysophosphatidylethanolamine; MβCD, methyl-β-cyclodextrin; NDUA2, NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex subunit 2; PC, phosphatidylcholine; PDE8A, high affinity cAMP-specific and IBMX-insensitive 3',5'-cyclic phosphodiesterase 8A; PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphoinositide; PL, phospholipids; pPE, plasmalogen phosphatidylethanolamine; PPM, postprandial lipid micelles; PS, phosphatidylserine; SM, sphingomyelin; SR-B1, scavenger receptor Class B type 1; STX16, syntaxin-16; VAMP8, vesicle-associated membrane protein 8; VATD, ion transport, such as V-type proton ATPase subunit D; VP9D1, VPS9 domain-containing protein 1

* Corresponding author at: INSERM U1138 team AL, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'école de médecine, 75006, Paris, France.

E-mail address: veronique.carriere@crc.jussieu.fr (V. Carrière).

¹ Present address: Cell Biology Department of Institut Necker-Enfants Malades (INEM), INSERM U1151-CNRS UMR 8253, Université Paris Descartes Paris 5, F-75993 Paris, France.

² Present address: Chemosens platform, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, INRA, F-21000 Dijon, France.

³ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.11.009>

Received 3 August 2017; Received in revised form 13 November 2017; Accepted 27 November 2017

Available online 02 December 2017

1388-1981/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

cholesterol and lipid metabolism remain unclear. Although SR-B1 is expressed at the apical membrane of enterocytes [2–4], which are the absorptive cells of the intestinal epithelium, its role in intestinal cholesterol uptake has been questioned since NPC1L1 has been demonstrated to be responsible for 70% of cholesterol entry in enterocytes [5–7]. Moreover SR-B1-null mice [8] and mice overexpressing SR-B1 in the proximal intestine [9] do not display alterations in intestinal cholesterol absorption or in trans-intestinal cholesterol efflux [10]. However, other reports showed that SR-B1 is involved in the secretion of triglyceride-rich lipoproteins by enterocytes upon lipid supply [9,11,12].

In addition to serving in cholesterol movement, SR-B1 functions as a signal transducer in certain cell types, particularly in endothelial cells and in intestinal epithelium. In endothelial cells, the binding of HDL to SR-B1 triggers the sequential activation of protein kinases, among which the activating phosphorylation of Src kinase represents the earliest signaling event identified [13]. This signaling cascade leads to the production of nitric oxide and it promotes endothelial cell migration, which both contribute to the maintenance of endothelial monolayer integrity by HDL and SR-B1 [13]. In Caco-2/TC7 enterocyte-like cells, SR-B1 triggers intracellular signaling in response to the supply, at the apical pole of the cells, of postprandial lipid micelles (PPM), which mimic the form and composition of the dietary lipids that are present in the gut lumen following a meal. The sensing of PPM by SR-B1 activates MAP kinases and the trafficking of apolipoprotein B, the structural apolipoprotein required for triglyceride-rich lipoprotein assembly and secretion, from the apical region of the cell to basolateral secretory domains [14,15]. These intracellular events are associated with the recruitment of SR-B1 into raft-like membrane domains [14,15], which are known to be signaling platforms [16].

Studies have been conducted to analyze the molecular mechanisms involved in SR-B1-dependent lipid sensing. It has been established that the C-terminal transmembrane domain (CTTM) and the C-terminal cytosolic domain of SR-B1 are required for its property to sense lipid movement and initiate intracellular signaling [17]. The discovery of the effects of a single point mutation in the SR-B1 CTTM domain, which represents the unique domain of SR-B1 able to interact with plasma membrane cholesterol [17,18], highlighted the importance of plasma membrane cholesterol for SR-B1-dependent lipid sensing and resulting signaling [15]. This mutated form of SR-B1, created by the replacement of the glutamine residue in position 445 of SR-B1 amino acid sequence by an alanine residue (SR-B1-Q445A), provoked a marked decrease in the capacity of SR-B1 to bind plasma membrane cholesterol, whereas the capacities of the receptor to bind HDL and to transport cholesterol were unmodified [15]. In intestinal epithelial cells and endothelial cells expressing SR-B1-Q445A, the addition of ligand (PPM and HDL respectively) failed to activate signaling and subsequent cellular events [15]. Moreover, it was shown that SR-B1-Q445A is not recruited in raft-like membrane domains of intestinal epithelial cells after a PPM supply, contrary to what is observed for wild-type SR-B1 [14,15]. The initiating cellular events involved in SR-B1-dependent lipid sensing remain unknown. However, plasma membrane cholesterol movement, through cyclodextrin treatment, is sufficient to reproduce, in intestinal epithelial cells and endothelial cells, all the signaling cascades and subcellular events in wild-type SR-B1-expressing cells while SR-B1-Q445A transfected cells are unresponsive [15]. Altogether these results emphasize the critical importance of plasma membrane cholesterol in SR-B1-dependent intracellular signaling, and they suggest that the initiating events in SR-B1-related lipid sensing take place at the plasma membrane and may involve cholesterol trafficking. Although it has been shown that SR-B1 reorganizes the free cholesterol pool in the plasma membrane [19–21], the modifications in the plasma membrane microenvironment that occur upon SR-B1 lipid sensing remain largely unknown.

The purpose of the present study was to analyze the early cellular events involved in intestinal epithelial SR-B1-dependent lipid sensing

by analyzing cholesterol trafficking and the remodeling of raft-like membrane domains upon supply of lipid micelles.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and lipid micelle supply

Caco-2/TC7 cell line is a clonal population of the human colon carcinoma-derived Caco-2 cells, which reproduces to a high degree most of the morphological and functional characteristics of enterocytes [22,23]. These cells were stably transfected with constructs expressing mouse WT SR-B1 or SR-B1-Q445A as previously described [15]. The presence of SR-B1 at plasma membrane (Suppl. Fig. 1) was shown by FACS analysis (BD LSRII FACS system and FlowJo software) performed on unpermeabilized cells as described in [24], using an anti-SR-B1 antibody (NB400–113 Novus Biologicals, Lille, France) and an anti-rabbit antibody conjugated to phycoerythrin (111–116 – 144 Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA, USA). As previously described [15], SR-B1-Q445A has a dominant negative effect on signaling triggered by endogenous SR-B1 in both endothelial and Caco-2/TC7 cells. Cells were tested for mycoplasma contamination and found clean. In all experiments, cells were cultured on filter supports for 3 weeks to obtain fully differentiated enterocyte-like cells. Lipid micelles (2 mM sodium taurocholate, 0.6 mM oleic acid, 0.2 mM lysophosphatidylcholine, 0.05 mM cholesterol, and 0.2 mM monoacylglycerol) were prepared in serum-free medium as previously described [14,15,25] and added to the upper compartment for the indicated times. When appropriate, lipid micelles were supplemented with 5 μ M BODIPY-cholesterol (Avanti polar lipids, Alabaster, AL, USA) or with 5 μ Ci/ml [$1,2\text{-}^3\text{H}(\text{N})$]-cholesterol (57,6 Ci/mmol, PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France). Transfection of Caco-2/TC7 cells with control RNAi and SR-B1 RNAi were performed as previously described [26].

2.2. Cholesterol labelling, trafficking and distribution

The intracellular distribution of cholesterol was analyzed in pulse-chase experiments. Caco-2/TC7 cells were incubated with BODIPY-cholesterol-containing lipid micelles for 1 h, washed twice with warm phosphate-buffered saline (PBS), and then incubated with non-fluorescent lipid micelles for one more hour. At the end of the experiment cells were rinsed with cold PBS and prepared for confocal microscopy analysis.

The trafficking of cholesterol from the plasma membrane towards intracellular domains was analyzed as described previously [27]. Briefly, BODIPY-cholesterol was combined with 370 mM methyl- β -cyclodextrin (M β CD, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) in a 100:1 M ratio (M β CD/BODIPY-cholesterol). Caco-2/TC7 cells were incubated at their apical pole with M β CD/BODIPY-cholesterol complex in serum-free medium for 1 min at 37 °C. The final concentration of M β CD and BODIPY-cholesterol were 0.185 mM and \sim 1 μ M, respectively. Cells were rinsed three times in warm PBS and then incubated with serum-free medium for the indicated times and analyzed by confocal microscopy.

Free cholesterol was visualized by filipin staining. Caco-2/TC7 cells were incubated or not with 3 μ g/ml U-18666A (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) added in both compartments of the filter support for 18 h. Cells were then rinsed three times with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde (PFA), and incubated with 0.05 mg/ml filipin (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) in PBS/10%serum for 15 min. After extensive washing with PBS, cells were analyzed by confocal microscopy using a UV filter set.

2.3. Cholesterol efflux analysis

Caco-2/TC7 cells were cultured on filter supports and incubated

with [1,2-³H(N)]-cholesterol containing lipid micelles in the apical compartment for 48 h. Apical and basal compartments of the filter were then rinsed three times with serum-free medium. Cells were then collected (TO) or incubated with fresh serum-free medium in the basal compartment and with unlabelled lipid micelles devoid of cholesterol in the apical compartment for 2 h. Total radioactivity was measured in cells (TO) and in apical medium (T2 h) by liquid-scintillation counting after lipid extraction with chloroform/methanol (2:1, v:v).

2.4. Confocal microscopy analysis

Confocal microscopy analyses were performed as described [26]. Briefly, cells were fixed with 4% PAF, permeabilized by 0.05% saponin in PBS/10% serum and, when appropriate, stained for neutral lipids with LD540 dye [28]. After nuclear staining by DAPI and postfixation with 4% PFA, images were acquired by laser scanning confocal microscopy (LSM 710 microscope; Carl Zeiss) and analyzed with ZEN software (Carl Zeiss).

2.5. RT-PCR analysis

Total RNAs were extracted from differentiated Caco-2/TC7 cells and used for real-time PCR analysis as previously described [29]. Oligonucleotide sequences were as follows: forward, 5'-GTGAGATGGCAGAGA ACGGTGTG-3' and reverse, 5'-TGCCCTTTGGTCTTGTCCA-3' for human *PLIN2* mRNA; forward 5'-GCCTTAGCTACAGGAGAGAA-3' and reverse, 5'-TTTCCTCTGTGCCATCTC-3' for human *PPIB* mRNA (reference gene).

2.6. Western blot analysis

Cell lysates and western blots were performed as previously described [14]. Primary antibodies were used against human SR-B1 (BD 610882, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and human ANXA2 (BD 610068, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

2.7. Preparation of raft-like/detergent-resistant membranes

Detergent-resistant membranes (DRM) were prepared from a sucrose gradient as previously described [14]. Briefly, 10⁸ Caco-2/TC7 cells were homogenized on ice in 2 ml of TRIS-buffered saline (TBS) (10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl) containing 1% Triton X-100 and protease inhibitors. Cell homogenates were adjusted to 40% sucrose with 2 ml of 80% sucrose/TBS. The resulting 4 ml were covered with 4 ml of 30% sucrose and 4 ml of 5% sucrose and centrifuged (SW41, L8 Beckman, 18 h, 39,000 rpm, 4 °C). Sequential 1 ml fractions were collected from the top of the tube and fractions 3 to 5, corresponding to DRM were pooled.

2.8. Lipidomic analysis

Detergent-resistant membranes collected from the sucrose gradient were kept at -80 °C until use. Lipid standards di-myristoyl phosphatidylcholine (DMPC), 19:0-lysophosphatidylcholine (19:0-LPC), di-myristoyl phosphatidylethanolamine (DPME), myristoyl-lysophosphatidylethanolamine (MLPE), di-myristoyl phosphatidylserine (DMPS), d18:1/17:0 sphingomyelin (17:0-SM) and d18:1/17:0 ceramide were used; all of them were purchased from Avanti Polar Lipids (Coger, Paris, France). LC-MS/MS quality grade solvents were purchased from Fischer Scientific (Illkirch, France). Other chemicals of the highest grade available were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). For quantification of total cholesterol by GS-MS analysis, DRM fractions (20 µl) were spiked with epicoprostanol (2 µg) used as internal standard. Total cholesterol was quantified by GC-MS as previously described [30]. A calibration curve was generated with cholesterol standards processed as DRM fraction samples. For

quantification of the different classes of lipids by LC-MS/MS, the DRM fraction (180 µl) was spiked with 20 µl of an internal standard mix containing 1000 ng DMPC, 250 ng 17:0-SM, 500 ng 19:0LPC, 200 ng DMPE, 400 ng DMPS, 100 ng MLPE and 100 ng d18:1/17:0 Cer. Total lipids were further extracted according to the method of Folch et al. [31]. Targeted lipidomic analysis by LC-MS/MS was conducted in Multiple Reaction Monitoring mode as previously described [32].

2.9. Proteomic analysis

Detergent-resistant membranes collected from sucrose gradient were dialyzed (Flot-A-lyser G2 3.5-5 kDa, Spectrumbios, Breda, The Netherlands) for 3 h at 4 °C and then concentrated using an amicon Ultra-4 filter (ultracel-3 membrane 3 kDa, Millipore, Fontenay-sous-Bois, France) according to the manufacturer's instructions. DRM were then centrifuged (20 min, 12,000 g, 4 °C) and kept at -80 °C until use. Proteins from DRM samples were processed as previously described [33]. Briefly, proteins were first extracted with a Urea-containing buffer (6 M urea, 2.2 M thiourea, 5 mM EDTA, 0.1%SDS, 5% *N*-octyl glucoside, 50 mM Tris-HCl) and separated shortly (1 cm) on a 1D 4–12% acrylamide gel electrophoresis (ThermoScientific, Villebon sur Yvette, France). Proteins were excised from gel, reduced, alkylated and digested by Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade, (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Peptides (2 µg) were separated with the nanoRSLC (ThermoScientific) fitted with a C18 trapping column (5 µm average particle diameter; 300 µm inner diameter × 5 mm length; ThermoScientific) and a C18 analytical column (2 µm average particle diameter; 75 µm inner diameter × 150 mm length; ThermoScientific). A 120-min gradient was performed and peptides were analyzed by nanoLC-MS/MS using an LTQ-Orbitrap Elite mass spectrometer equipped with the Advion TriVersa NanoMate nanospray source. Full-scan spectra from a mass/charge ratio of 400 to one of 1700 at a resolution of 120,000 full width at half maximum were acquired in the Orbitrap mass spectrometer. From each full-scan spectrum, the 20 ions with the highest intensity were selected for fragmentation in the ion trap.

The acquired data were searched against the International Protein Index/UniProt using Mascot and X!Tandem. Based on tandem mass spectrometry data, peptides and proteins identifications were validated through Peptide- and ProteinProphet software [34]. At the end of the above steps, each injection is described by a list of validated proteins and peptides. Peptides that were not identified in at least 2 of the 3 technical replicates injected per sample were excluded [35]. Retention times were then aligned and peptide intensities extracted using the MASIC software [36]. Using this quantification, a new filter based on the coefficients of variation of each peptide in each sample is applied to discard poorly reproducible peptides [35]. A linear mixed model was used to select differential proteins in DRM from WT SR-B1- and SR-B1-Q445A-expressing cells (Clough et al., 2012). The FDR (false discovery rate) correction was applied to take into account the high dimension (far more tested variables than samples). Only proteins identified with at least 2 peptides fragments and with a fold change higher than 2, with a FDR at 5%, were kept.

2.10. Statistical analysis

For comparing two groups, unpaired Mann-Whitney test was used. For multiple comparisons, one-way ANOVA or two-way ANOVA were performed, followed by Dunnett's multiple comparison tests or Bonferroni's multiple comparison tests, depending on the combinations of comparisons. All analyses were performed using Prism software (GraphPad prism software, La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. SR-B1-dependent lipid sensing modulates cholesterol distribution in intestinal epithelial cells

We first analyzed the link between SR-B1-dependent lipid sensing and intracellular cholesterol distribution using the incapacity of the SR-B1-Q445A mutant to bind plasma membrane cholesterol and trigger intracellular signaling [15]. The intracellular distribution of cholesterol was studied in WT SR-B1- or SR-B1-Q445A-expressing Caco-2/TC7 cells in a pulse-chase experiment using BODIPY-cholesterol (Fig. 1A and Fig. 1B). Cells were incubated for 1 h with BODIPY-cholesterol-containing lipid micelles followed by 1 h of chase with unlabelled cholesterol-containing lipid micelles. At the end of the experiment, we observed an increased amount of BODIPY-cholesterol in SR-B1-Q445A-expressing cells as compared to WT SR-B1-expressing cells, at both the apical and intracellular levels. These results revealed impaired cellular cholesterol trafficking in intestinal epithelial cells when SR-B1 cannot trigger lipid sensing.

We then analyzed more precisely the intracellular localization of BODIPY-cholesterol in both WT and SR-B1-Q445A-expressing cells. In enterocytes as well as in Caco-2/TC7 cells, the supply of PPM is known to induce the formation of lipid droplets [26,37], which store triglycerides and cholesterol esters. We analyzed the localization of BODIPY-cholesterol and of lipid droplets that were stained with the neutral lipid dye LD540. We observed that BODIPY-cholesterol co-localizes with lipid droplet staining (Fig. 1C) in both WT and SR-B1-Q445A-expressing cells. However, SR-B1-Q445A cells display a more intense co-labelling (Fig. 1C, merge), which could be related to an increased accumulation of lipid droplets (Fig. 1C, LD540 staining) in these cells as compared to WT SR-B1-expressing cells. Interestingly, such an accumulation of lipid droplets is also observed in Caco-2/TC7 cells transfected with RNAi for SR-B1 (Suppl. Fig. 2). We thus analyzed, in WT- and SR-B1-Q445A-expressing cells, the expression of PLIN-2 (Fig. 1D), which is known to be associated with lipid droplets and to modulate their formation and/or their stabilization [37,38]. Before the addition of lipid micelles, we observed that the two cell lines express similar PLIN-2 mRNA levels. After a 24 h incubation with PPM, an increase of PLIN-2 mRNA abundance is observed in both cell lines; however, the upregulation occurs to a greater extent in SR-B1-Q445A cells as compared to WT SR-B1 cells. Altogether these results indicate that SR-B1-dependent lipid sensing participates to the dynamics of lipid droplets.

We next studied whether the observed perturbation of cholesterol distribution in SR-B1-Q445A-expressing cells is associated with a modification of cholesterol efflux. Cells were incubated for 48 h with [³H]-cholesterol-containing lipid micelles and then chased for 2 h with lipid micelles devoid of cholesterol in the apical compartment (Fig. 1E). We found that the apical efflux of [³H]-cholesterol is lower in SR-B1-Q445A-expressing cells as compared to WT SR-B1-expressing cells, whereas basal efflux of [³H]-cholesterol is similar in both cell types. Thus, the modification of cholesterol distribution in SR-B1-Q445A cells is associated with attenuated apical cholesterol efflux.

3.2. SR-B1 is involved in cholesterol trafficking from plasma membrane

Having previously observed that plasma membrane cholesterol movement is required for SR-B1-dependent lipid sensing [15], we analyzed the cholesterol trafficking between plasma membrane and intracellular compartments in WT SR-B1- and SR-B1-Q445A-expressing cells (Fig. 2). Cells were pulse-labelled by the addition of BODIPY-cholesterol/methyl- β -cyclodextrin complexes (Bdp-Chol/CD) to the apical compartment for 1 min at 37 °C, as previously described [27], and then chased with a medium without Bdp-Chol/CD for 5 min or 60 min. This short pulse allows limited incorporation of BODIPY-cholesterol into the cells, thus avoiding a saturation of the labelling and a better visualization of cholesterol trafficking from the plasma

membrane [27]. After a 1 min pulse, the intensity of sub-apical BODIPY-cholesterol labelling is similar in both cells (1' pulse, Fig. 2A and quantification in Fig. 2B). During the pulse-chase, the intensity of sub-apical BODIPY-cholesterol labelling rapidly decreased in WT SR-B1-expressing cells, probably due to a rapid metabolism or efflux of BODIPY-cholesterol. In contrast, in SR-B1-Q445A cells BODIPY-cholesterol continued to label the plasma membrane after 5 min of chase, and accumulated in intracellular compartments after 60 min of chase.

We next analyzed the capacity of plasma membrane cholesterol in WT SR-B1- and SR-B1-Q445A-expressing cells to be distributed in intracellular compartments. We visualized free cholesterol using filipin staining and studied free cholesterol movement using the properties of compound U-18666A to inhibit cholesterol transport leading to an intracellular accumulation of cholesterol [39]. Before U-18666A treatment, a similar localization of free cholesterol at the plasma membrane is observed in both WT and SR-B1-Q445A cell lines (Fig. 2C, ctrl panels). After U-18666A treatment, intracellular filipin signal is observed in WT SR-B1-expressing cells, indicating that free cholesterol is accumulating in vesicular structures (Fig. 2C, square showing an enlargement of the XY plan). By contrast, in SR-B1-Q445A-expressing cells treated with U-18666A, filipin staining is mainly observed at the plasma membrane, indicating that free cholesterol remains trapped at this level. The quantification of filipin fluorescence intensity showed a higher signal at plasma membrane (Fig. 2D) in SR-B1-Q445A cells treated with U-18666A (as compared to U-18666A-treated WT SR-B1 cells) that is associated with a decreased intracellular filipin dot numbers (Fig. 2E). Altogether these results reveal an impairment of cholesterol trafficking in cells expressing the SR-B1-Q445A mutant.

3.3. The expression of SR-B1-Q445A modifies the lipid composition of raft-like domain

We showed previously, in intestinal epithelial cells, that SR-B1-dependent lipid sensing is associated with the recruitment of SR-B1 in raft-like membrane domains [14,15]. Raft domains of the plasma membrane are signaling platforms characterized by a large amount of cholesterol and sphingolipids that can be isolated by their properties to be resistant to detergent action [40]. We thus determined whether the observed perturbations of cholesterol trafficking in SR-B1-Q445A cells are associated with alterations in raft lipid composition. We isolated detergent-resistant membranes (DRM) from WT SR-B1 and SR-B1-Q445A cells treated or not with PPM for 15 min, which is a time compatible with the activation of lipid signaling [14]. We conducted LC-MS/MS studies to determine lipid composition of DRM and analyzed the total concentration of 10 lipid subclasses, cholesterol, ceramides, phosphatidylcholine (PC), lysopPC (LPC), phosphatidylethanolamine (PE), lysoPE (LPE), plasmalogen PE (pPE), phosphoinositide (PI), phosphatidylserine (PS) and sphingomyelin (SM), as well as several individual species in each subclass. In the absence of lipid micelle treatment (Fig. 3), we observed that DRM from SR-B1-Q445A-expressing cells display higher concentrations of cholesterol (+ 32%, Fig. 3A), SM (+ 94%, Fig. 3B), PE (+ 24%, Fig. 3C), pPE (+ 72%, Fig. 3D), PI (+ 59%, Fig. 3E) and PS (+ 51%, Fig. 3F), as compared to DRM from WT SR-B1-expressing cells. By contrast, no change in the total concentration of PC, LPC, LPE and ceramides is observed between the two cell lines (Fig. 3G, H, I, J). Among the individual lipid species analyzed in the different lipid subclasses, d18:0/16:0 SM (Fig. 3K), one of the most represented SM, and d18:0/C20:0 ceramide (Fig. 3L), a minor species in this subclass, displayed the greatest increase of concentration (approximately a 3 fold change) in DRM from SR-B1-Q445A cells as compared to WT cells. Overall, the lipidomic analysis revealed that DRM from SR-B1-Q445A cells display higher concentrations of lipids (Fig. 4A), in particular of phospholipids (PL) (Fig. 4B), than those from WT SR-B1 cells. The qualitative analysis of lipid composition of DRM, achieved by the calculation of SM to total PL ratio (Fig. 4C) revealed that DRM from SR-B1-Q445A cells are enriched in SM as compared to

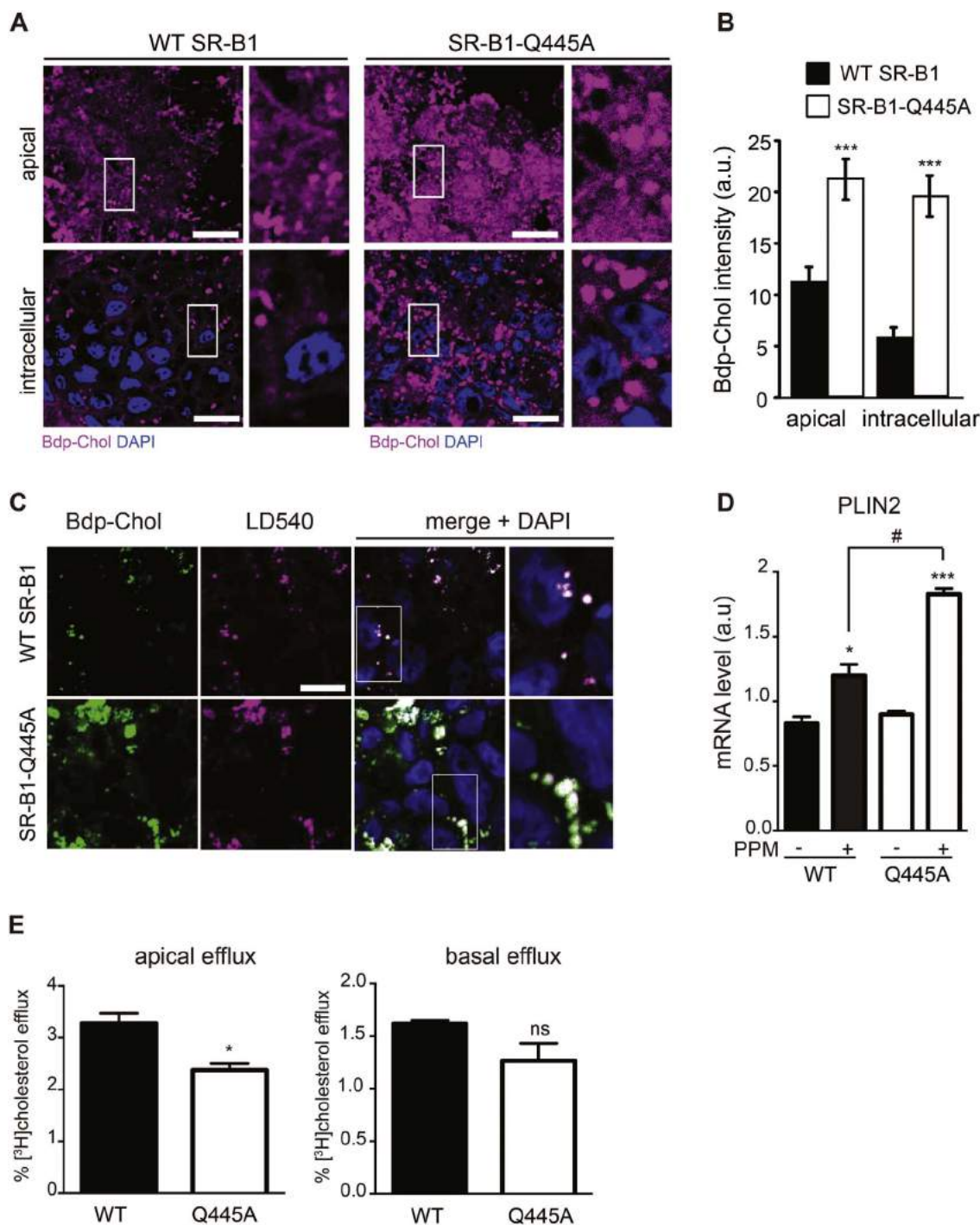


Fig. 1. SR-B1-dependent lipid sensing modulates cholesterol processing and lipid droplet dynamics. (A) Pulse-chase experiments were conducted on Caco-2/TC7 cells stably transfected with WT SR-B1 or SR-B1-Q445A. Cells were cultured on semi-permeable filters in the presence of BODIPY-cholesterol-containing lipid micelles in the apical compartment of the filter for 1 h (pulse), and then with unlabelled cholesterol-containing lipid micelles for one more hour (chase). At the end of the experiment, BODIPY-cholesterol (Bdp-Chol; purple) distribution was analyzed by confocal microscopy. Diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue) is used for visualization of nuclei. Bar = 10 μ m. (B) Summary data (mean \pm SEM) for Bdp-Chol fluorescence quantified at both apical and intracellular XY planes (5 fields per condition). *** p < 0.001 versus WT SR-B1 expressing cells. (C) Transfected Caco-2/TC7 cells described in (A) were cultured for 1 h with Bdp-Chol-containing lipid micelles. Neutral lipids of lipid droplets were stained with LD540 dye (purple). Co-localization of lipid droplets and Bdp-Chol (green) was analyzed by confocal microscopy. Enlarged views of the fields designated by white rectangles are displayed on the right. DAPI (blue) is used for nucleus staining. Bar = 10 μ m. (D) Cells expressing WT SR-B1 (WT) and SR-B1-Q445A (Q445A) were cultured in the presence (+) or absence (-) of PPM for 24 h. The mRNA levels of PLIN2 were quantified by RT-PCR. Results are expressed as the ratio (mean \pm SEM, n = 6) of PLIN2 mRNA levels to cyclophilin mRNA level used as control. * p < 0.05 and *** p < 0.01 as compared to the same cell line in absence of PPM; # p < 0.05, n = 5. (E) Cells were cultured in the presence of [³H]-cholesterol-containing lipid micelles in the apical compartment for 48 h. At the end of treatment (T0), cells were washed and then incubated for 2 h with unlabelled lipid micelles devoid of cholesterol in the apical compartment. Radioactivity was then quantified in the apical (left panel) and basal (right panel) medium. Results are expressed as percentage of radioactivity counted in the corresponding medium to the radioactivity counted in cells at T0, mean \pm SEM of 6 independent cultures. * p < 0.05, ns: non-significant.

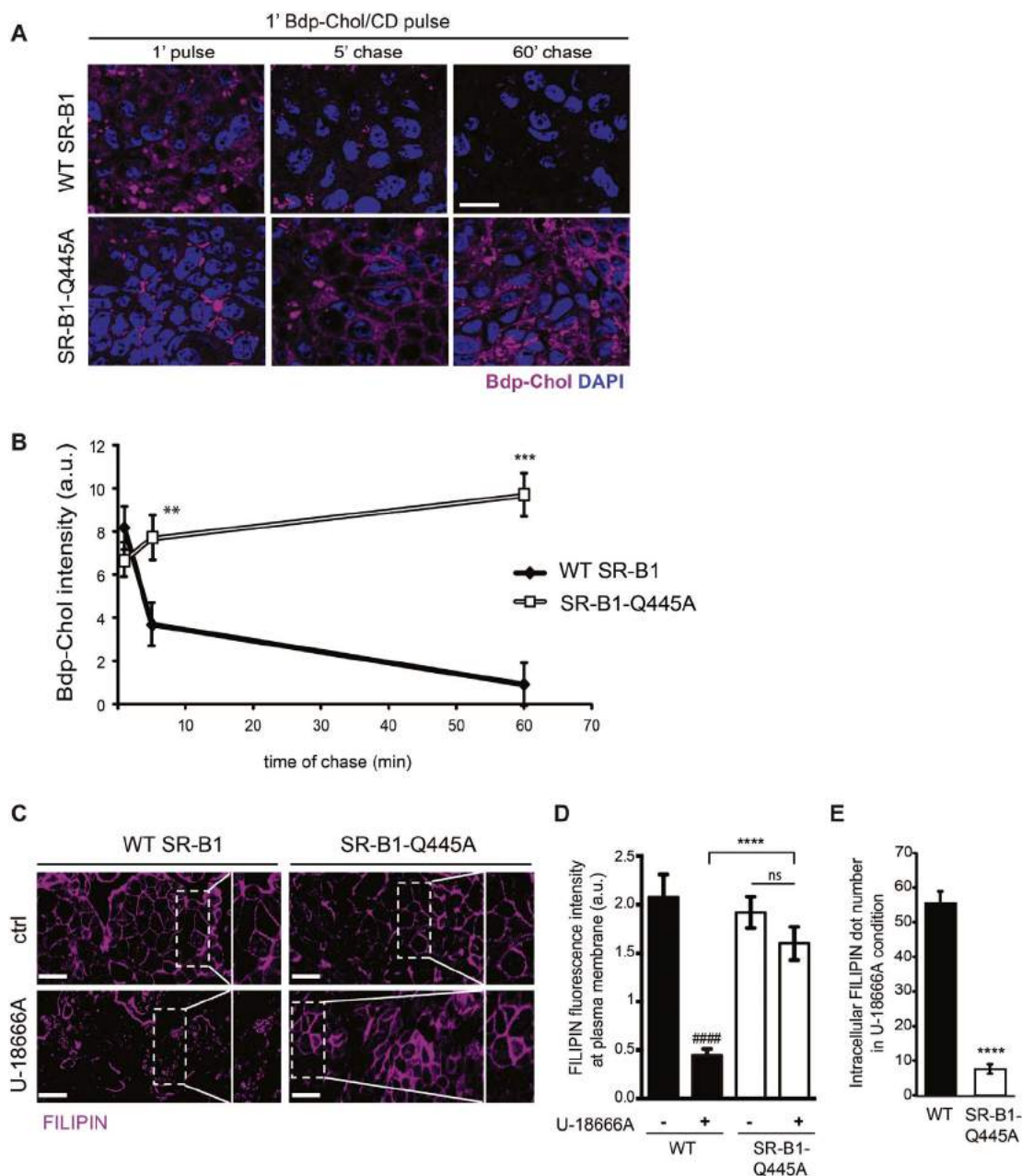


Fig. 2. SR-B1 is involved in cholesterol trafficking from plasma membrane. (A) Pulse-chase experiments were conducted on Caco-2/TC7 cells stably transfected with WT SR-B1 or SR-B1-Q445A. Cells were cultured on semi-permeable filters and incubated in presence of BODIPY-cholesterol combined with methyl- β -cyclodextrin (Bdp-Chol/CD) in the apical compartment for 1 min (pulse), and then with culture medium without cholesterol for 5 min and 1 h (chase). BODIPY-Cholesterol (purple) distribution was analyzed by confocal microscopy. DAPI (blue) is used for visualization of nucleus. Sub-apical XY planes are shown. Bar = 10 μ m. (B) Summary data (mean \pm SEM) for Bdp-Chol fluorescence intensity quantified at sub-apical XY planes (5 fields per condition) are expressed as arbitrary units (a.u.). ** p < 0.01 and *** p < 0.001 versus WT SR-B1 expressing cells. (C) Cells were incubated or not (ctrl) with U-18666A for 18 h, then free cholesterol was visualized by filipin staining (purple). Rectangles and squares on the right of the XY planes represent enlargement of the selected area. Bar = 10 μ m (D) Filipin fluorescence intensity at plasma membrane reported to surface area was quantified in both cell lines with or without U18666A treatment. Results are expressed as arbitrary units (a.u.), mean \pm SEM, (5 fields per condition). #### p < 0.0001 as compared to WT SR-B1 in absence of U-18666A, **** p < 0.0001 as compared to U-18666A-treated WT SR-B1 cells, ns: non-significant (E) Intracellular filipin dot numbers were quantified in both cell lines after U18666A treatment. Results are expressed as mean \pm SEM (5 fields per condition). **** p < 0.0001 as compared to WT SR-B1.

WT SR-B1 cells. Altogether, these results show that the presence of the mutated form of SR-B1 modifies the lipid composition of DRM.

After the addition of lipid micelles, changes in DRM lipid composition were observed. Lipid micelle treatment promotes a marked increase in LPC concentration, but this modification occurs to the same extent in both cell lines (Suppl. Fig. 3). This dramatic increase in LPC concentration probably results from the incorporation of exogenous LPC, provided by PPM, within cell membranes. More interestingly, after the supply of lipid micelles, the alterations in the concentrations of certain lipids differed in DRM of WT SR-B1 as compared to SR-B1-

Q445A cells (Table 1). In DRM from WT SR-B1-expressing cells, the concentration of d18:0/16:0 SM increased by 17% upon lipid micelle provision, and the concentration of 18:0/0:0 LPE increased by 43%. In contrast, no alterations were observed in these lipids in DRM from SR-B1-Q445A-expressing cells after PPM treatment. These results indicate that d18:0/16:0 SM and 18:0/0:0 LPE may be involved in SR-B1-dependent signaling in response to lipid micelles. On the other hand, several lipid concentrations in DRM were decreased after PPM supply in SR-B1-Q445A-expressing cells whereas they remained unchanged after such treatment in WT SR-B1 cells (Table 1). This included a decrease of

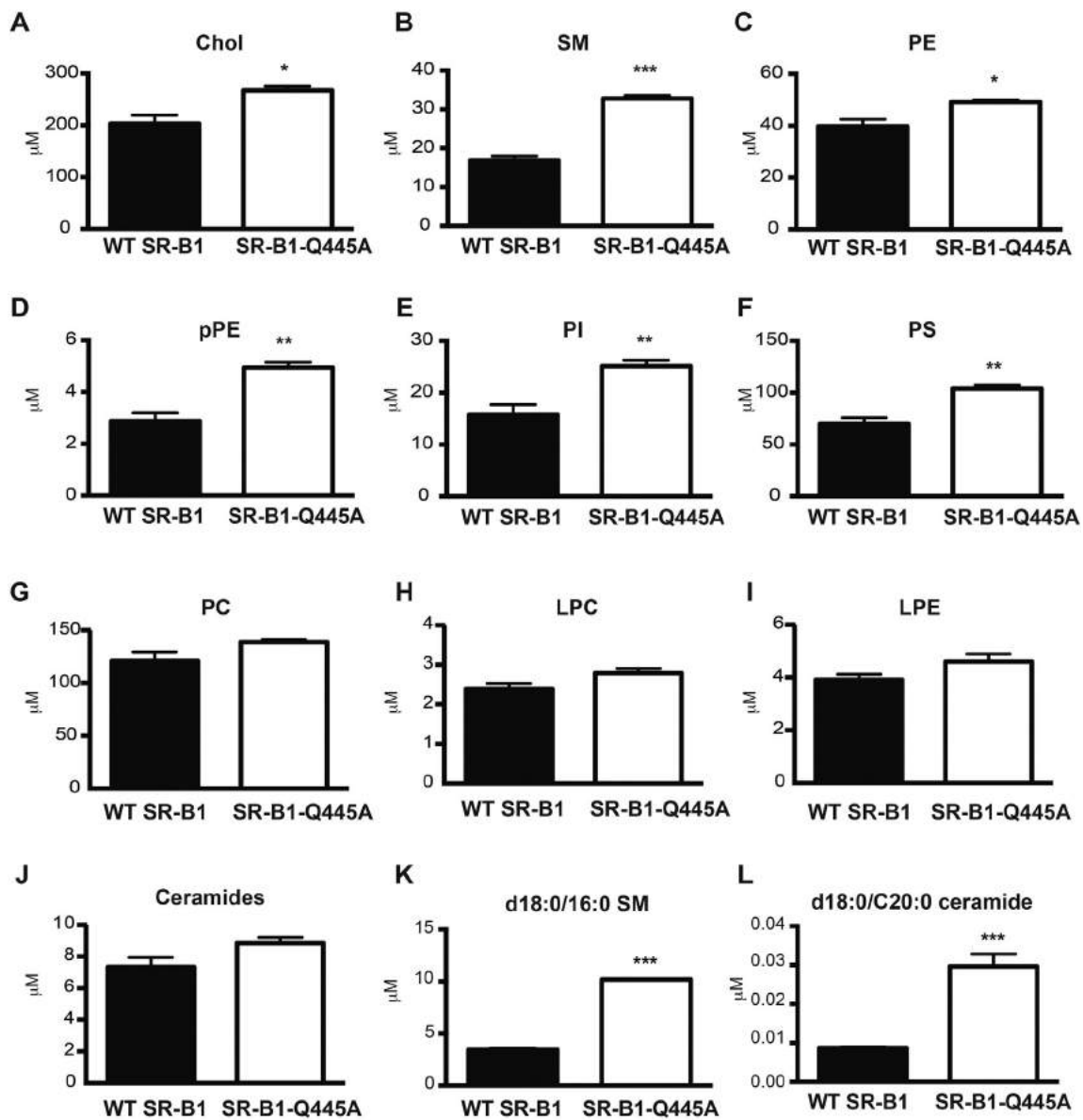


Fig. 3. SR-B1-Q445A-expressing cells display changes in detergent-resistant membrane lipid composition as compared to WT SR-B1 cells. Detergent-resistant membranes were isolated from WT SR-B1- and SR-B1-Q445A-expressing cells. Concentrations of six lipid subclasses (A–J), of d18:0/16:0 SM (K) and d18:0/C20:0 ceramide (L) were determined by LC-MS/MS: cholesterol (chol), SM (sphingomyelin), PE (phosphatidylethanolamine), pPE (plasmalogen PE), PI (phosphoinositide) and PS (phosphoserine), PC (phosphatidylcholin), LPC (lysopPC), LPE (LysoPE) and ceramides. Results are expressed in μM as mean \pm SEM from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ as compared to WT SR-B1-expressing cells.

total ceramide (– 28%) and of total PE (– 10%) as well as several individual lipid species in different subclasses (Table 1).

Altogether these results show that lipid composition of raft-like membrane domains is modified during SR-B1-dependent lipid sensing.

3.4. SR-B1-dependent lipid signaling modifies the protein composition of raft-like domains

In order to identify proteins in raft domains that could be involved in the SR-B1-dependent lipid sensing and resulting signaling in intestinal epithelial cells, we analyzed and compared changes in the amounts of DRM proteins after PPM supply in WT SR-B1- versus SR-B1-Q445A-expressing cells (Table 2). We isolated detergent-resistant membranes from both cell lines before and 15 min after PPM supply. The quantity of total protein was similar in all DRM (data not shown). Proteins were identified by mass spectrometry, and changes in protein amounts induced by PPM treatment for each cell line were determined.

We first analyzed modifications of protein amounts in DRM from WT SR-B1-expressing cells after PPM supply. We found that PPM supply promotes significant changes in the abundance of 41 proteins in DRM from WT SR-B1 cells, 25 of them being more represented and 16 of them less represented as compared to the condition without PPM treatment (Table 2). These proteins have been classified in several function categories according to UniProt Consortium annotations.

We then determined whether the amounts of these 41 identified proteins were also modified after PPM supply in DRM from SR-B1-Q445A cells. We observed that 5 of them (Table 2, green lines) displayed similar directional change in abundance in DRM from SR-B1-Q445A as compared to WT SR-B1 cells after PPM supply, suggesting that these proteins are not involved in SR-B1-dependent lipid sensing. More importantly, we found that 6 proteins, namely anterior gradient protein 2 homolog (AGR2), keratin, type I cytoskeletal 9 (K1C9), VPS9 domain-containing protein 1 (VP9D1), L-lactate dehydrogenase B chain (LDHB), Syntaxin-16 (STX16) and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (HNRH1)

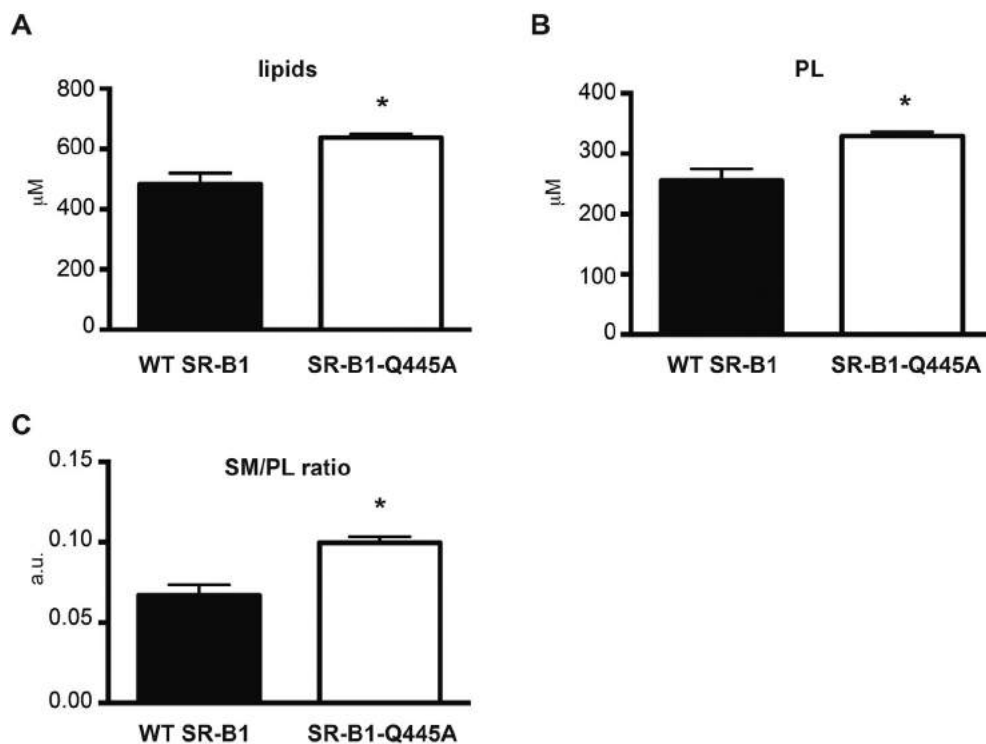


Fig. 4. Changes of total lipid and total phospholipid concentrations, as well as sphingomyelin to phospholipid ratio in detergent-resistant membranes of SR-B1-Q445A cells as compared to WT SR-B1 cells. Concentration in DRM fractions of (A) total lipid calculated by summing all lipid subclasses and (B) total phospholipid calculated by summing the PC, PE, PS, PI, LPC, pPE, LPE obtained from LC-MS/MS experiments. Results are expressed in μM as mean \pm SEM from three independent experiments. * $p < 0.05$ as compared to WT SR-B1-expressing cells. (C) The SM/PL ratio was calculated from concentrations of total SM and total PL for each condition. Results are expressed as arbitrary units (a.u.) \pm SEM from three independent experiments, * $p < 0.05$ as compared to WT SR-B1-expressing cells.

displayed opposite variations in DRM from SR-B1-Q445A as compared to WT SR-B1 cells after PPM supply (Table 2, red lines). AGR2 is involved in protein processing, K1C9 belongs to an intermediate filament family, VP9D1 participates in ion transport, LDHB is involved in oxidation-reduction processes, STX16 plays a role in vesicular docking and fusion, and HNRH1 participates in the maturation of mRNA. Displaying

disparate recruitment to DRM in WT versus SR-B1-Q445A cells, these six proteins are candidates for molecules involved in SR-B1-dependent signaling in response to lipid movement. Additional candidates are the 30 proteins whose abundance changed after PPM supply in DRM from WT SR-B1 but not in SR-B1-Q445A cells (Table 2, uncoloured lines). These proteins belong to functional categories related to 1) cell adhesion/

Table 1

Lipid concentrations in DRM are modified differentially between WT SR-B1 and SR-B1-Q445A after PPM supply.

Subclass	Lipids Species	WT SR-B1 (mM, mean \pm SEM)		SR-B1-Q445A (mM, mean \pm SEM)		WT vs WT PPM		Q445A vs Q445A PPM		
		–	PPM	–	PPM	Variation	<i>p</i> Value	Variation	<i>p</i> Value	
SM	<u>d18:0/16:0</u>	3.44 \pm 0.07	4.04 \pm 0.17	10.21 \pm 0.04	10.19 \pm 0.42	+ 17%	0.03	–	0.96	
	d18:1/18:0	0.38 \pm 0.02	0.36 \pm 0.01	0.58 \pm 0.02	0.50 \pm 0.01	–	0.4	-14%	0.02	
	<u>d18:1/24:1</u>	2.68 \pm 0.35	2.42 \pm 0.17	4.23 \pm 0.15	3.58 \pm 0.13	–	0.54	-15%	0.03	
PC	<u>16:0/16:1</u>	13.9 \pm 1.61	12.44 \pm 2.13	20.37 \pm 0.65	17.79 \pm 0.64	–	0.61	-12%	0.047	
	LPE	2.78 \pm 0.27	3.98 \pm 0.27	3.25 \pm 0.2	3.79 \pm 0.03	+ 43%	0.035	–	0.053	
PE	Total	39.78 \pm 2.68	40.14 \pm 3.53	49.14 \pm 0.85	44.01 \pm 0.98	–	0.94	-10%	0.017	
	16:0/18:2	1.51 \pm 0.22	1.37 \pm 0.34	1.91 \pm 0.08	1.55 \pm 0.05	–	0.75	-19%	0.016	
	<u>16:0/18:1</u>	6.47 \pm 0.6	6.15 \pm 0.92	8.89 \pm 0.18	7.48 \pm 0.17	–	0.78	-16%	0.005	
	17:0/17:0	0.57 \pm 0.05	0.53 \pm 0.03	0.47 \pm 0.004	0.41 \pm 0.01	–	0.56	-13%	0.019	
	18:1/18:2	0.84 \pm 0.08	0.84 \pm 0.1	1.03 \pm 0.04	0.90 \pm 0.03	–	0.99	-12%	0.038	
	<u>18:0/18:2</u>	6.31 \pm 0.56	6.41 \pm 0.87	7.8 \pm 0.22	6.98 \pm 0.19	–	0.93	-10%	0.048	
	<u>18:0/18:1</u>	12.32 \pm 0.68	12.36 \pm 0.92	14.69 \pm 0.04	13.2 \pm 0.23	–	0.97	-10%	0.0029	
	16:0/22:6	0.59 \pm 0.06	0.58 \pm 0.06	0.78 \pm 0.03	0.67 \pm 0.02	–	0.84	-14%	0.045	
	18:1/22:6	0.24 \pm 0.02	0.24 \pm 0.02	0.26 \pm 0.01	0.23 \pm 0.004	–	0.96	-11%	0.049	
	pPE	16:0p/18:1	0.32 \pm 0.027	0.33 \pm 0.026	0.57 \pm 0.016	0.46 \pm 0.009	–	0.8	-19%	0.0036
	16:0p/20:4	0.11 \pm 0.014	0.13 \pm 0.011	0.18 \pm 0.007	0.16 \pm 0.001	–	0.33	-11%	0.030	
	PS	16:0/18:1	5.55 \pm 0.29	5.14 \pm 0.58	8.10 \pm 0.17	7.10 \pm 0.25	–	0.56	-12%	0.029
Ceramide	Total	7.33 \pm 0.603	6.07 \pm 0.242	8.84 \pm 0.362	6.39 \pm 0.223	–	0.12	-28%	0.0044	
	d18:1/14:0	0.24 \pm 0.022	0.18 \pm 0.015	0.3 \pm 0.024	0.18 \pm 0.005	–	0.09	-38%	0.0085	
	<u>d18:1/16:0</u>	1.62 \pm 0.081	1.39 \pm 0.076	1.85 \pm 0.109	1.32 \pm 0.039	–	0.11	-29%	0.01	
	d18:1/18:0	0.036 \pm 0.004	0.028 \pm 0.002	0.043 \pm 0.002	0.028 \pm 0.003	–	0.13	-25%	0.01	
	d18:1/20:0	0.027 \pm 0.002	0.017 \pm 0.003	0.043 \pm 0.004	0.029 \pm 0.002	–	0.061	-35%	0.025	
	d18:1/22:0	0.5 \pm 0.055	0.39 \pm 0.017	0.69 \pm 0.013	0.48 \pm 0.044	–	0.14	-32%	0.01	
	<u>d18:1/24:1</u>	2.33 \pm 0.373	1.77 \pm 0.226	2.56 \pm 0.07	1.69 \pm 0.092	–	0.27	-33%	0.0017	
	<u>d18:1/24:0</u>	1.88 \pm 0.105	1.63 \pm 0.109	2.31 \pm 0.125	1.76 \pm 0.067	–	0.16	-24%	0.018	
	d18:1/26:0	0.039 \pm 0.005	0.034 \pm 0.04	0.047 \pm 0.001	0.037 \pm 0.001	–	0.58	-21%	0.0011	

WT SR-B1- and SR-B1-Q445A-expressing cells were cultured in absence (–) or in presence of lipid micelles (PPM) for 15 min. Detergent-resistant membranes (DRM) were isolated through a sucrose gradient and lipid concentrations were determined by LC-MS/MC analysis. Results (mM) are expressed as mean \pm SEM from three independent experiments. The species representing > 10% of the total amount of species analyzed in their lipid subclass are underlined. Statistical changes (variation and *p* value) are in bold.

Table 2

List of proteins whose abundance in DRM changes after PPM supply in WT SR-B1- versus SR-B1-Q445A-expressing cells.

WT SR-B1					Q445A-SR-B1	
fold change after PPM	p value	accession	protein name	function	fold change after PPM	p value
212.49	2.34E-05	P00403	COX2 Cytochrome C oxidase sub unit 2	oxidation-reduction	0.67	0.517
76.88	3.5E-07	Q9UJU6	DBNL Drebin-like protein	cell adhesion/junction and cytoskeleton	1.27	0.345
9.42	0.012	P40227	TCPZ T-complex protein 1 subunit zeta	protein interaction/processing	0.52	0.369
8.42	0.007	P42167	LAP2B Lamina-associated polypeptide 2 isoforms b/g	nucleus/transcription/translation	1.38	0.747
8.17	1.01E-05	P46777	RL5 60S ribosomal protein L5	protein interaction/processing	1.09	0.715
7.13	0.014	Q9Y5K8	VATD V-type proton ATPase subunit D	ion transport	0.76	0.77
6.89	0.016	P37059	DHB2 Estradiol 17-beta-dehydrogenase	steroid, lipid metabolism	0.85	0.864
6.29	1.4E-07	O43169	CYB5B Cytochrome b5	oxidation-reduction	1.31	0.011
5.55	0.032	P61978	HNRPK Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	nucleus/transcription/translation	1.73	0.524
4.10	0.009	O75381	PEX14 Peroxisomal membrane protein PEX14	protein interaction/processing	0.80	0.727
3.90	0.004	P56134	ATPK ATP synthase subunit f	oxidation-reduction	0.52	0.071
3.55	0.044	Q9NRR3	C42S2 Cdc42 small effector protein 2	cell adhesion/junction and cytoskeleton	0.89	0.851
3.36	0.011	O95994	AGR2 Anterior gradient protein 2 homolog	protein interaction/processing	0.12	0.0006
3.13	0.004	O43678	NDUA2 NAH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex subunit 2	oxidation-reduction	1.09	0.801
3.12	0.047	P50454	SERPH Serpin H	cell adhesion/junction and cytoskeleton	0.46	0.175
3.01	0.002	Q8NBX0	SCPDL Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	oxidation-reduction	1.31	0.456
2.87	0.035	Q12907	LMAN2 Vesicular integral-membrane protein VIP36	vesicular trafficking/autophagy	1.14	0.815
2.65	0.025	P51114	FXR1 Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	nucleus/transcription/translation	1.80	0.123
2.54	0.01	P40879	S26A3 Chloride-anion exchanger	ion transport	0.98	0.956
2.46	0.003	Q9H6A9	PCX3 Pecanex-like protein 3	unclassified	2.36	0.0033
2.28	0.017	P36578	RL4 60S ribosomal protein L4	protein interaction/processing	1.40	0.296
2.17	0.015	Q9Y624	JAM1 Junctional adhesion molecule A	cell adhesion/junction and cytoskeleton	1.25	0.545
2.13	3.22E-06	P35527	K1C9 Keratin, type I cytoskeletal 9	cell adhesion/junction and cytoskeleton	0.60	0.0019
2.12	1.41E-06	P27824	CALX Calnexin	protein interaction/processing	1.01	0.974
2.06	5.95E-05	Q16864	VATF V-type proton ATPase subunit F	ion transport	1.37	0.0061
0.50	0.031	P13861	KAP2 cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	signal transduction	0.81	0.547
0.49	0.002	Q15363	TMED2 Transmembrane emp24 domain-containing protein 2	vesicular trafficking/autophagy	0.66	0.0197
0.47	0.0036	Q9Y2B5	VP9D1 VPS9 domain-containing protein 1	ion transport	1.78	0.012
0.46	0.0067	p07195	LDHB L-lactate dehydrogenase B chain	oxidation-reduction	1.66	0.035
0.43	0.002	Q14974	IMB1 Importin subunit beta-1	protein interaction/processing	1.16	0.394
0.41	0.012	Q9BV40	VAMP8 Vesicle-associated membrane protein 8	vesicular trafficking/autophagy	0.97	0.956
0.41	0.044	Q5T0W9	FA83B Protein FAM83B	signal transduction	0.74	0.541
0.41	0.011	Q8N3R9	MPP5 MAGUK p55 subfamily member 5	cell adhesion/junction and cytoskeleton	0.76	0.515
0.40	0.005	O14662	STX16 Syntaxin-16	vesicular trafficking/autophagy	2.88	0.002
0.38	0.030	Q99536	VAT1 Synaptic vesicle amine transport	oxidation-reduction	1.02	0.974
0.38	0.016	Q99623	PHB2 Prohibitin-2	nucleus/transcription/translation	1.40	0.412
0.32	0.001	P05362	ICAM1 Intercellular adhesion molecule 1	cell adhesion/junction and cytoskeleton	0.77	0.411
0.29	9.3E-05	Q5T0Z8	CF132 Uncharacterized protein C6orf132	unclassified	1.22	0.224
0.25	0.0002	P08574	CY1 Ubiquinol-Cytochrome-C Reductase Complex Cytochrome C1 Subunit	oxidation-reduction	0.48	0.043
0.17	1.92E-06	P31943	HNRH1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	nucleus/transcription/translation	1.41	0.022
0.14	0.024	O60658	PDE8A High affinity cAMP-specific and IBMX-insensitive 3',5'-cyclic phosphodiesterase 8A	signal transduction	0.92	0.950

WT SR-B1- and SR-B1-Q445A- expressing cells were cultured in absence (-) or in presence of lipid micelles (PPM) for 15 min. Detergent-resistant membranes (DRM) were isolated through sucrose gradient and protein enrichment was determined by tandem mass spectrometry analysis. Proteins with a fold change higher than 2 in DRM from WT SR-B1-expressing cells after PPM supply are listed. Fold change variation of these proteins in DRM from SR-B1-Q445A-expressing cells are reported. *P* values < 0.05 are in bold. Proteins with similar direction change in their abundance in DRM after PPM in WT SR-B1- and SR-B1-Q445A-expressing cells are highlighted in green. Proteins with opposite variations induced by PPM in DRM in WT SR-B1- versus SR-B1-Q445A expressing cells are highlighted in red. Proteins unchanged in abundance in DRM after PPM supply in SR-B1-Q445A-expressing cells are indicated by a lack of highlighting.

junction and cytoskeleton, such as the junctional adhesion molecule A (JAM1) and the intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1), which are involved in cell-cell contact; 2) protein interaction/processing, such as peroxisomal membrane protein PEX14 involved in protein-protein docking, and calnexin (CALX) involved in protein folding; 3) oxidation/reduction, such as the NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex subunit 2 (NDUA2); 4) ion transport, such as V-type proton ATPase subunit D (VATD); 5) pre-mRNA processing, such as Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (HNRPK); and 6) signal transduction, such as the cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit (KAP2), protein FA83B and the High affinity cAMP-specific and IBMX-insensitive 3',5'-cyclic phosphodiesterase 8A (PDE8A). The vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP8), which is involved in vesicular trafficking, is also present among the 30 proteins that remain unchanged after PPM supply in DRM from SR-B1-Q445A cells as compared to WT SR-B1 cells.

Altogether these results showed that SR-B1-dependent lipid sensing is associated with changes in the amount of several proteins in detergent-resistant membranes.

4. Discussion

SR-B1-dependent lipid sensing has been previously characterized in endothelial cells and in intestinal epithelial cells [14,15,41]. The discovery that the glutamine at the position 445 in the C-terminal transmembrane domain of SR-B1 was crucial in this process revealed that the lipid sensing is dependent on the interaction of SR-B1 with plasma membrane cholesterol [15]. The plasma membrane cholesterol sensing is also required for the recruitment of SR-B1 in raft-like membrane domains upon lipid micelle stimulation in intestinal epithelial cells. In the present study, we analyzed changes in the lipid and protein composition of raft-like domains occurring during SR-B1-dependent lipid sensing in intestinal epithelial cells, and also the impact of this sensing on cholesterol trafficking. We discovered that a defect in SR-B1-mediated lipid sensing leads to an alteration of cholesterol distribution and to a decreased apical cholesterol efflux. Associated with these events, we observed, using SR-B1-Q445A or RNA interference, an exaggerated accumulation of lipid droplets in the absence of efficient SR-B1-dependent lipid sensing. Such a link between SR-B1 and lipid droplet

dynamics could be suggested from previous reports. Indeed, SR-B1 is found associated with lipid droplets during fat absorption in enterocytes [42,43]. SR-B1 is also present in mature adipocytes, where it could be involved in lipid storage in adipose tissue [44,45]. Interestingly, our proteomic analysis of DRM from WT SR-B1 cells revealed increased DHB2 protein abundance in DRM after PPM supply, and this did not occur in DRM from SR-B1-Q445A-expressing cells. Although DHB2, which belongs to the family of 17β -hydroxysteroid dehydrogenases, is mainly known for its role in steroid metabolism, it has been shown to be associated with lipid droplets in intestinal epithelial cells. Its depletion increased triglyceride secretion, suggesting a role for this enzyme in the control of the balance between lipid storage and lipid secretion in these cells [29].

The impact of SR-B1 on cellular cholesterol metabolism has been mainly understood in the context of selective cholesteryl ester uptake from HDL and in the bidirectional flux of free cholesterol between cells and HDL (for review [21]). SR-B1 is known to be localized to caveolae/lipid rafts and to interact with several phospholipids [46–48]. A number of these studies indicated that SR-B1-dependent cholesterol flux may be mediated by changes in the lipid organization of the plasma membrane and particularly that of the raft membrane domains [49–52]. Our lipidomic analysis revealed that the presence of SR-B1-Q445A per se modifies the lipid composition of DRM as compared to cells expressing the wild type form of SR-B1. These modifications, which are characterized by increases in cholesterol, sphingomyelins, and several phospholipids, result in a relative enrichment of sphingomyelins versus total phospholipids in DRM. It has been observed that sphingomyelins are critical for cholesterol sequestration in the plasma membrane [53] and for the regulation of cholesterol efflux [54]. Moreover, modulation of SM amount in HDL or in cell membrane modified SR-B1-dependent cholesterol flux [55,56]. Interestingly, two

point mutations in the extracellular loop of human SR-B1 (S112F and T175A) result in a reduced efflux of free cholesterol to HDL and in the impairment of the redistribution of free cholesterol pools at the plasma membrane [57]. Thus, our findings provide evidence that, through its capacity to bind plasma membrane cholesterol, SR-B1 governs the lipid composition of raft-like membrane domains, thereby preparing a favourable environment for lipid sensing processes.

We analyzed additionally whether SR-B1-dependent lipid sensing is associated with modifications in the lipid composition of DRM. Lipidomic analysis showed that PPM supply provokes an enrichment of d18:0/16:0 SM and 18:0/0:0 lysophosphatidylethanolamines in WT SR-B1 cells. This enrichment is not observed in DRM from SR-B1-Q445A after PPM supply, suggesting that these lipids may be involved in SR-B1-dependent lipid sensing and in the resulting intracellular signaling. Although these lipids belong to classes of lipids recognized to be involved in cell signaling, their specific roles in such processes are largely unknown. Sphingomyelins are important structural component of lipid rafts that can be metabolized into ceramides, which induce changes in membrane fluidity [58] and impairment of receptor-dependent signaling [59,60]. Lysophosphatidylethanolamines are minor components of the cell membrane which are able to induce calcium-related and MAPK signaling in several cell lines [61–64].

In addition to the changes in the lipid composition of DRM that occurred during SR-B1-dependent lipid signaling, we compared alterations in protein abundance in DRM from WT SR-B1- and SR-B1-Q445A-expressing cells after PPM supply. Proteins present in DRM are generally hydrophobic and their identification by proteomic analysis is dependent on their intrinsic properties and on the detergents used to solubilize and extract them [65,66]. Moreover, we selected only proteins that were covered by > 2 peptides. SR-B1 itself was not reproducibly identified, in reproducible manner, by our proteomic

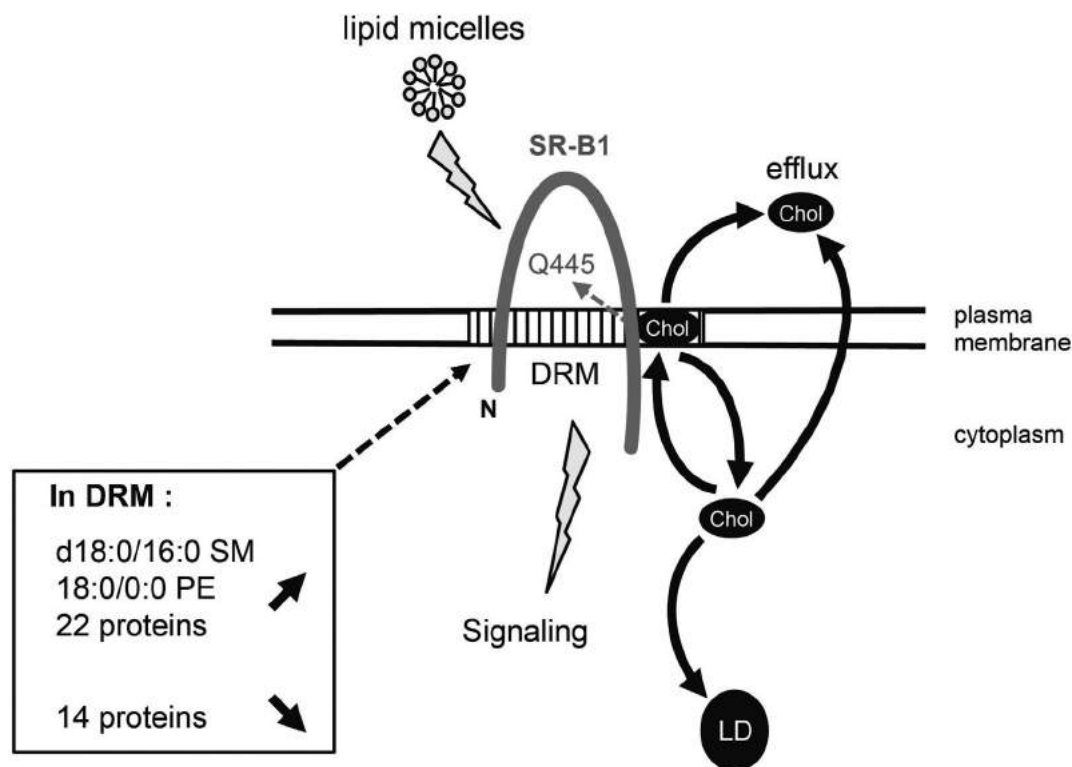


Fig. 5. SR-B1-dependent lipid sensing is linked to cholesterol trafficking and modifications of lipid and protein composition of detergent-resistant membranes in intestinal epithelial cells. In intestinal epithelial cells, SR-B1-dependent lipid sensing in response to lipid micelles requires plasma membrane cholesterol (Chol) interaction with the glutamine at position 445 (Q445) in the C-terminal transmembrane domain of SR-B1 [14,15]. In this study, we identified that SR-B1-dependent lipid sensing is linked to intracellular cholesterol trafficking from plasma membrane and towards lipid droplet (LD) as well as cholesterol efflux. Lipidomic analysis of detergent-resistant membranes (DRM) revealed that the enrichment of d18:0/16:0 SM and 18:0/0:0 PE is associated with SR-B1-dependent lipid sensing. Moreover, we observed an increased abundance of 22 proteins and a decreased abundance of 14 proteins in DRM after lipid micelles supply, highlighting their potential role in SR-B1-dependent lipid signaling. SM: sphingomyelin; PE: phosphatidylethanolamine; N: N-terminal region.

analysis procedure, probably due to its low solubility. Nevertheless, our study revealed modifications in the abundance of a variety of proteins involved in several cellular processes (Table 2). Most of them are related to the cytoskeleton and oxidation/reduction metabolism. It is well known that the dynamics of plasma membrane organization and lipid raft assembly are dependent on the actin cytoskeleton and that they consume large amounts of ATP (for review [67]). Additionally, many proteins involved in oxidation/reduction process are located in DRM [68] and they were identified to be altered by PPM supply (such as COX2, VATD, ATPK, VATF). Moreover, this dynamic organization of the plasma membrane is linked to the endosomal/lysosomal system, where an ATP-dependent acidification of vesicles occurs [69,70]. In our study, we also observed changes in the abundance of syntaxin-16 (STX16) and vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP8). These proteins belong to the SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) family, which is involved in membrane fusion and vesicular trafficking [71]. SNARE proteins participate also in cholesterol trafficking [72], and particularly in its movement from lipid droplets to mitochondria during steroidogenesis [73,74]. SNARE proteins have been implicated additionally in autophagy [75], which is a cellular process that controls lipid droplet dynamics in intestinal epithelial cells [26]. Moreover, our proteomic analysis showed changes in the abundance of proteins involved directly in signal transduction. These included KAP2 (cAMP-dependent protein kinase type-II), and PDE8A (phosphodiesterase 8A), which are linked to cAMP-dependent signaling [76,77], and FA83B (Protein FAM83B), which is involved in epidermal growth factor receptor activation and downstream RAS/MAPK and PI3K/AKT/TOR signaling cascades [78,79]. Finally, we observed an increased abundance of PEX14 (Peroxisomal membrane protein PEX14) in DRM from WT SR-B1 cells after PPM supply that did not occur in DRM from SR-B1-Q445A cells. PEX14 is an important component of peroxisomal import machinery and it interacts directly with other peroxin proteins such as PEX5 [80,81], which binds peroxisomal targeting signal type 1 (PTS1)-containing proteins such as SR-B1 [82]. Interestingly, PEX14 is also able to interact with LC3 protein involved in autophagy in a process dependent on nutrient availability [83]. Although the discrete functions of these proteins that are pertinent to their recruitment to DRM in response to PPM are yet to be elucidated, it is apparent that the dynamics of DRM composition are greatly influenced by the capacity of SR-B1 to bind plasma membrane-associated cholesterol and to initiate signaling in response to PPM.

In summary, our studies demonstrated that a point mutation in SR-B1 abolishing the property of the receptor to sense lipids induces modifications in lipid composition of raft-like membrane domains and cell cholesterol distribution in intestinal epithelial cells. The SR-B1-dependent lipid sensing influences both apical cholesterol efflux and intracellular cholesterol trafficking from the plasma membrane to lipid droplets. Two saturated lipids (d18:0/16:0 sphingomyelin and 16:0/0:0 lysophosphatidylethanolamine) and several proteins involved in lipid raft dynamics and signal transduction play an important role in lipid sensing by SR-B1 (Fig. 5). Our findings, which provide new insights into the role of SR-B1 in cellular cholesterol homeostasis, suggest molecular links between SR-B1-dependent lipid sensing and cell cholesterol and lipid droplet dynamics.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.11.009>.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgements

We thank Patrick Ducoroy and Delphine Pecqueur from CLIPP

(Dijon, France) for their expertise in proteomic analysis. We thank Béatrice Riveau for the maintenance of Caco-2/TC7 cell culture. We thank Zeina Chamoun, Alexandra Grosfeld and Sophie Thenet for helpful discussion. We thank Maude Le Gall for helping us with FACS analysis. Confocal microscopy was performed at the Centre d'Imagerie Cellulaire et de Cytométrie (Centre de Recherche des Cordeliers, UMRS 1138, Paris, France).

This research was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and Université Pierre et Marie Curie (Paris 6) (UMRS1138), and also by National Institutes of Health grants R01-HL131597 (P.W.S.) and R01-HL126795 (C.M.).

Conflict of interest

No conflict of interest declared.

Authors contributions

E.M., S.G. G.L., C.T., J-P.B., S.D., M.R. and V.C. designed and conducted the experiments and analyzed the data. M.R. and V.C. wrote the paper. F-S-P. coordinated lipidomic and proteomic analyses. C.M. and P.W.S. created SR-B1-Q445A mutant. A.L., M.R., F-S-P, C.M. and P.W.S. revised the manuscript. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

References

- [1] M. Hoekstra, T.J. Van Berkel, M. Van Eck, Scavenger receptor BI: a multi-purpose player in cholesterol and steroid metabolism, *World J. Gastroenterol.* 16 (2010) 5916–5924.
- [2] C.H. Han, M.H. Lee, Topology of scavenger receptor class B type I (SR-BI) on brush border membrane, *J. Vet. Sci.* 3 (2002) 265–272.
- [3] M.V. Lobo, L. Huerta, N. Ruiz-Velasco, E. Teixeira, P. de la Cueva, A. Celdran, A. Martin-Hidalgo, M.A. Vega, R. Bragado, 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 (2001) 1253–1260.
- [4] S.F. Cai, R.J. Kirby, P.N. Howles, D.Y. Hui, Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine, *J. Lipid Res.* 42 (2001) 902–909.
- [5] P. Mardones, V. Quinones, L. Amigo, M. Moreno, J.F. Miquel, M. Schwarz, H.E. Miettinen, B. Trigatti, M. Krieger, S. VanPatten, D.E. Cohen, A. Rigotti, Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice, *J. Lipid Res.* 42 (2001) 170–180.
- [6] S.W. Altmann, 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, M.P. Graziano, Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption, *Science* 303 (2004) 1201–1204 New York, N.Y.
- [7] S.W. Altmann, 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, M.P. Graziano, 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 (2002) 77–93.
- [8] A. Rigotti, B.L. Trigatti, M. Penman, H. Rayburn, J. Herz, M. Krieger, 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 (1997) 12610–12615.
- [9] F. Bietrix, D. Yan, M. Nauze, C. Rolland, J. Bertrand-Michel, C. Comera, S. Schaaq, R. Barbaras, A.K. Groen, B. Perret, F. Terce, X. Collet, Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 7214–7219.
- [10] K.S. Bura, C. Lord, S. Marshall, A. McDaniel, G. Thomas, M. Warriar, J. Zhang, M.A. Davis, J.K. Sawyer, R. Shah, M.D. Wilson, A. Dikkers, U.J. Tietge, X. Collet, L.L. Rudel, R.E. Temel, J.M. Brown, Intestinal SR-BI does not impact cholesterol absorption or transintestinal cholesterol efflux in mice, *J. Lipid Res.* 54 (2013) 1567–1577.
- [11] A.A. Hayashi, J. Webb, J. Choi, C. Baker, M. Lino, B. Trigatti, K.E. Trajcevski, T.J. Hawke, K. Adeli, Intestinal SR-BI is upregulated in insulin-resistant states and is associated with overproduction of intestinal apoB48-containing lipoproteins, *Am. J. Phys.* 301 (2011) G326–G337.
- [12] M. Lino, S. Farr, C. Baker, M. Fuller, B. Trigatti, K. Adeli, Intestinal scavenger receptor class B type I (SR-BI) as a novel regulator of chylomicron production in healthy and diet-induced obese states, *Am. J. Phys.* 309 (2015) G530–G539.
- [13] C. Mineo, P.W. Shaul, Functions of scavenger receptor class B, type I in atherosclerosis, *Curr. Opin. Lipidol.* 23 (2012) 487–493.
- [14] O. Beaslas, C. Cueille, F. Delers, D. Chateau, J. Chambaz, M. Rousset, V. Carriere, Sensing of dietary lipids by enterocytes: a new role for SR-BI/CLA-1, *PLoS One* 4 (2009) e4278.

- [15] S. Saddar, V. Carriere, W.R. Lee, K. Tanigaki, I.S. Yuhanna, S. Parathath, E. Morel, M.ARRIER, J.K. Sawyer, R.K. Gerard, R.E. Temel, J.M. Brown, M. Connelly, C. Mineo, P.W. Shaul, Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a plasma membrane cholesterol sensor, *Circ. Res.* 112 (2013) 140–151.
- [16] I. Leventhal, S.L. Veatch, The continuing mystery of lipid rafts, *J. Mol. Biol.* 428 (2016) 4749–4764.
- [17] S. Saddar, C. Mineo, P.W. Shaul, Signaling by the high-affinity HDL receptor scavenger receptor B type I, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 144–150.
- [18] C. Assanasen, C. Mineo, D. Seetharam, I.S. Yuhanna, Y.L. Marcel, M.A. Connelly, D.L. Williams, M. de la Llera-Moya, P.W. Shaul, D.L. Silver, Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 969–977.
- [19] M. de la Llera-Moya, M.A. Connelly, D. Drazul, S.M. Klein, E. Favari, P.G. Yancey, D.L. Williams, G.H. Rothblat, Scavenger receptor class B type I affects cholesterol homeostasis by magnifying cholesterol flux between cells and HDL, *J. Lipid Res.* 42 (2001) 1969–1978.
- [20] M. de la Llera-Moya, G.H. Rothblat, M.A. Connelly, G. Kellner-Weibel, S.W. Sakr, M.C. Phillips, D.L. Williams, Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface, *J. Lipid Res.* 40 (1999) 575–580.
- [21] M.C. Phillips, Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 24020–24029.
- [22] F. Zucco, 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. Torrelles, A. Stammati, 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 (2005) 603–618.
- [23] I. Chantret, A. Rodolose, A. Barbat, E. Dussaulx, E. Brot-Laroche, A. Zweibaum, M. Rousset, 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) (1994) 213–225.
- [24] A. Michau, G. Guillemain, A. Grosfeld, S. Vuillaumier-Barrot, T. Grand, M. Keck, S. L'Hoste, D. Chateau, P. Serradas, J. Teulon, P. De Lonlay, R. Scharfmann, E. Brot-Laroche, A. Leturque, M. Le Gall, Mutations in SLC2A2 gene reveal hGLUT2 function in pancreatic beta cell development, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 31080–31092.
- [25] D. Chateau, T. Pauquai, F. Delers, M. Rousset, J. Chambaz, S. Demignot, Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells, *J. Cell. Physiol.* 202 (2005) 767–776.
- [26] S.A. Khalidoun, M.A. Emond-Boisjoly, D. Chateau, V. Carriere, M. Lacasa, M. Rousset, S. Demignot, E. Morel, Autophagosomes contribute to intracellular lipid distribution in enterocytes, *Mol. Biol. Cell* 25 (2014) 118–132.
- [27] M. Jansen, Y. Ohsaki, L. Rita Rega, R. Bittman, V.M. Olkkonen, E. Ikonen, Role of ORPs in sterol transport from plasma membrane to ER and lipid droplets in mammalian cells, *Traffic* 12 (2011) 218–231.
- [28] J. Spandl, D.J. White, J. Peychl, C. Thiele, Live cell multicolor imaging of lipid droplets with a new dye, *LD540*, *Traffic* 10 (2009) 1579–1584.
- [29] F. Beilstein, J. Bouchoux, M. Rousset, S. Demignot, Proteomic analysis of lipid droplets from Caco-2/TC7 enterocytes identifies novel modulators of lipid secretion, *PLoS One* 8 (2013) e53017.
- [30] L. Menegaut, D. Masson, N. Abello, D. Denimal, C. Truntzer, P. Ducoroy, L. Lagrost, J.P. Pais de Barros, A. Athias, J.M. Petit, L. Martin, E. Steinmetz, B. Kretz, Specific enrichment of 2-arachidonoyl-lysophosphatidylcholine in carotid atheroma plaque from type 2 diabetic patients, *Atherosclerosis* 251 (2016) 339–347.
- [31] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497–509.
- [32] G. Vial, M.A. Chauvin, N. Bendridi, A. Durand, E. Meugnier, A.M. Madec, N. Bernoud-Hubac, J.P. Pais de Barros, E. Fontaine, C. Acquaviva, S. Hallakou-Bozec, S. Bolze, L. Vidal, J. Rieusset, Igemlimin normalizes glucose tolerance and insulin sensitivity and improves mitochondrial function in liver of a high-fat, high-sucrose diet mice model, *Diabetes* 64 (2015) 2254–2264.
- [33] T. Stanislas, D. Bouyssie, M. Rossignol, S. Vesa, J. Fromentin, J. Morel, C. Pichereaux, B. Monsarrat, F. Simon-Plas, Quantitative proteomics reveals a dynamic association of proteins to detergent-resistant membranes upon elicitor signaling in tobacco, *Mol. Cell. Proteomics* 8 (2009) 2186–2198.
- [34] A.I. Nesvizhskii, A. Keller, E. Kolker, R. Aebersold, A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4646–4658.
- [35] X. Lai, L. Wang, H. Tang, F.A. Witzmann, A novel alignment method and multiple filters for exclusion of unqualified peptides to enhance label-free quantification using peptide intensity in LC-MS/MS, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 4799–4812.
- [36] M.E. Monroe, J.L. Shaw, D.S. Daly, J.N. Adkins, R.D. Smith, MASC: a software program for fast quantitation and flexible visualization of chromatographic profiles from detected LC-MS/MS features, *Comput. Biol. Chem.* 32 (2008) 215–217.
- [37] J. Bouchoux, F. Beilstein, T. Pauquai, I.C. Guerrero, D. Chateau, N. Ly, M. Alqub, C. Klein, J. Chambaz, M. Rousset, J.M. Lacorte, E. Morel, S. Demignot, The proteome of cytosolic lipid droplets isolated from differentiated Caco-2/TC7 enterocytes reveals cell-specific characteristics, *Biol. Cell.* 103 (2011) 499–517.
- [38] F. Beilstein, V. Carriere, A. Leturque, S. Demignot, Characteristics and functions of lipid droplets and associated proteins in enterocytes, *Exp. Cell Res.* 340 (2016) 172–179.
- [39] R.J. Cenedella, Cholesterol synthesis inhibitor U18666A and the role of sterol metabolism and trafficking in numerous pathophysiological processes, *Lipids* 44 (2009) 477–487.
- [40] D.A. Brown, J.K. Rose, Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface, *Cell* 68 (1992) 533–544.
- [41] C. Mineo, P.W. Shaul, Regulation of signal transduction by HDL, *J. Lipid Res.* 54 (2013) 2315–2324.
- [42] G.H. Hansen, L.L. Niels-Christiansen, L. Immerdal, E.M. Danielsen, Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in pig enterocytes: trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption, *Gut* 52 (2003) 1424–1431.
- [43] Z. Soayfane, F. Terce, M. Cantiello, H. Robenek, M. Nauze, V. Bezirard, S. Allart, B. Payre, F. Capilla, C. Cartier, C. Peres, T. Al Saati, V. Theodorou, D.W. Nelson, C.L. Yen, X. Collet, C. Comera, Exposure to dietary lipid leads to rapid production of cytosolic lipid droplets near the brush border membrane, *Nutr. Metab. (Lond.)* 13 (2016) 48.
- [44] A.L. Tondou, C. Robichon, L. Yvan-Charvet, N. Donne, X. Le Liepvre, E. Hajdich, P. Ferre, I. Dugail, G. Dagher, 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 (2005) 33536–33540.
- [45] L. Yvan-Charvet, A. Bobard, P. Bossard, F. Massiera, X. Rousset, G. Ailhaud, M. Teboul, P. Ferre, G. Dagher, A. Quignard-Boulangue, In vivo evidence for a role of adipose tissue SR-BI in the nutritional and hormonal regulation of adiposity and cholesterol homeostasis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (2007) 1340–1345.
- [46] Y. Kawasaki, A. Nakagawa, K. Nagaosa, A. Shiratsuchi, Y. Nakanishi, Phosphatidylserine binding of class B scavenger receptor type I, a phagocytosis receptor of testicular sertoli cells, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 27559–27566.
- [47] S. Orłowski, C. Comera, F. Terce, X. Collet, Lipid rafts: dream or reality for cholesterol transporters? *Eur. Biophys. J.* 36 (2007) 869–885.
- [48] A. Rigotti, S.L. Acton, M. Krieger, The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 16221–16224.
- [49] C.J. Fielding, P.E. Fielding, Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships, *Biochim. Biophys. Acta* 1529 (2000) 210–222.
- [50] J. Hu, Z. Zhang, W.J. Shen, S. Azhar, Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones, *Nutr. Metab. (Lond.)* 7 (2010) 47.
- [51] G. Kellner-Weibel, M. de la Llera-Moya, M.A. Connelly, G. Stoudt, A.E. Christian, M.P. Haynes, D.L. Williams, G.H. Rothblat, Expression of scavenger receptor BI in COS-7 cells alters cholesterol content and distribution, *Biochemistry* 39 (2000) 221–229.
- [52] S. Parathath, M.A. Connelly, R.A. Rieger, S.M. Klein, N.A. Abumrad, M. De La Llera-Moya, C.R. Iden, G.H. Rothblat, D.L. Williams, Changes in plasma membrane properties and phosphatidylcholine subspecies of insect Sf9 cells due to expression of scavenger receptor class B, type I, and CD36, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 41310–41318.
- [53] A.R. Leventhal, W. Chen, A.R. Tall, I. Tabas, Acid sphingomyelinase-deficient macrophages have defective cholesterol trafficking and efflux, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 44976–44983.
- [54] K. Nagao, K. Takahashi, K. Hanada, N. Kioka, M. Matsuo, K. Ueda, Enhanced apoA-I-dependent cholesterol efflux by ABCA1 from sphingomyelin-deficient Chinese hamster ovary cells, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 14868–14874.
- [55] P.G. Yancey, M. de la Llera-Moya, S. Swarnakar, P. Monzo, S.M. Klein, M.A. Connelly, W.J. Johnson, D.L. Williams, G.H. Rothblat, High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 36596–36604.
- [56] P.V. Subbaiah, L.R. Gesquiere, K. Wang, Regulation of the selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoproteins by sphingomyelin, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 2699–2705.
- [57] A.C. Chadwick, D. Sahoo, Functional characterization of newly-discovered mutations in human SR-BI, *PLoS One* 7 (2012) e45660.
- [58] M. Kronke, Biophysics of ceramide signaling: interaction with proteins and phase transition of membranes, *Chem. Phys. Lipids* 101 (1999) 109–121.
- [59] M. Chakraborty, X.C. Jiang, Sphingomyelin and its role in cellular signaling, *Adv. Exp. Med. Biol.* 991 (2013) 1–14.
- [60] M. Langeveld, J.M. Aerts, Glycosphingolipids and insulin resistance, *Prog. Lipid Res.* 48 (2009) 196–205.
- [61] S.J. Park, K.P. Lee, D.S. Im, Action and signaling of lysophosphatidylethanolamine in MDA-MB-231 breast cancer cells, *Biomol. Ther.* 22 (2014) 129–135 (Seoul).
- [62] K.S. Park, H.Y. Lee, S.Y. Lee, M.K. Kim, S.D. Kim, J.M. Kim, J. Yun, D.S. Im, Y.S. Bae, Lysophosphatidylethanolamine stimulates chemotactic migration and cellular invasion in SK-OV3 human ovarian cancer cells: involvement of pertussis toxin-sensitive G-protein coupled receptor, *FEBS Lett.* 581 (2007) 4411–4416.
- [63] A. Nishina, H. Kimura, A. Sekiguchi, R.H. Fukumoto, S. Nakajima, S. Furukawa, Lysophosphatidylethanolamine in *Grifola frondosa* as a neurotrophic activator via activation of MAPK, *J. Lipid Res.* 47 (2006) 1434–1443.
- [64] J.M. Lee, S.J. Park, D.S. Im, Calcium signaling of lysophosphatidylethanolamine through LPA1 in human SH-SY5Y neuroblastoma cells, *Biomol. Ther.* 25 (2016) 194–201.
- [65] J.P. Whitelegge, Integral membrane proteins and bilayer proteomics, *Anal. Chem.* 85 (2013) 2558–2568.
- [66] S. Tan, H.T. Tan, M.C. Chung, Membrane proteins and membrane proteomics, *Proteomics* 8 (2008) 3924–3932.
- [67] K. Simons, J.L. Sampaio, Membrane organization and lipid rafts, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (2011) a004697.
- [68] K.B. Kim, J.W. Lee, C.S. Lee, B.W. Kim, H.J. Choo, S.Y. Jung, S.G. Chi, Y.S. Yoon, G. Yoon, Y.G. Ko, Oxidation-reduction respiratory chains and ATP synthase complex are localized in detergent-resistant lipid rafts, *Proteomics* 6 (2006) 2444–2453.
- [69] Y.B. Hu, E.B. Dammer, R.J. Ren, G. Wang, The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration, *Transl. Neurosci.* 4 (2015) 18.
- [70] V.W. Hsu, R. Prekeris, Transport at the recycling endosome, *Curr. Opin. Cell Biol.* 22 (2010) 528–534.

- [71] X. Lou, Y.K. Shin, SNARE zippering, *Biosci Rep*, 36, (2016).
- [72] C. Enrich, C. Rentero, A. Hierro, T. Grewal, Role of cholesterol in SNARE-mediated trafficking on intracellular membranes, *J. Cell Sci.* 128 (2015) 1071–1081.
- [73] Y. Lin, X. Hou, W.J. Shen, R. Hanssen, V.K. Khor, Y. Cortez, A.N. Roseman, S. Azhar, F.B. Kraemer, SNARE-Mediated Cholesterol Movement to Mitochondria Supports Steroidogenesis in Rodent Cells, *Molecular endocrinology* (Baltimore, MD), 30 (2016), pp. 234–247.
- [74] F.B. Kraemer, W.J. Shen, S. Azhar, SNAREs and cholesterol movement for steroidogenesis, *Mol. Cell. Endocrinol.* 441 (2017) 17–21.
- [75] Y. Wang, L. Li, C. Hou, Y. Lai, J. Long, J. Liu, Q. Zhong, J. Diao, SNARE-mediated membrane fusion in autophagy, *Semin. Cell Dev. Biol.* 60 (2016) 97–104.
- [76] S.S. Taylor, J.A. Buechler, W. Yonemoto, cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes, *Annu. Rev. Biochem.* 59 (1990) 971–1005.
- [77] D.A. Fisher, J.F. Smith, J.S. Pillar, S.H. St Denis, J.B. Cheng, Isolation and characterization of PDE8A, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246 (1998) 570–577.
- [78] R. Cipriano, K.L. Miskimen, B.L. Bryson, C.R. Foy, C.A. Bartel, M.W. Jackson, FAM83B-mediated activation of PI3K/AKT and MAPK signaling cooperates to promote epithelial cell transformation and resistance to targeted therapies, *Oncotarget* 4 (2013) 729–738.
- [79] R. Cipriano, J. Graham, K.L. Miskimen, B.L. Bryson, R.C. Bruntz, S.A. Scott, H.A. Brown, G.R. Stark, M.W. Jackson, FAM83B mediates EGFR- and RAS-driven oncogenic transformation, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 3197–3210.
- [80] J.E. Azevedo, W. Schliebs, Pex14p, more than just a docking protein, *Biochim. Biophys. Acta* 1763 (2006) 1574–1584.
- [81] C. Neufeld, F.V. Philipp, B. Simon, A. Neuhaus, N. Schuller, C. David, H. Kooshapur, T. Madl, R. Erdmann, W. Schliebs, M. Wilmanns, M. Sattler, Structural basis for competitive interactions of Pex14 with the import receptors Pex5 and Pex19, *EMBO J.* 28 (2009) 745–754.
- [82] M.S. Johnson, J.M. Johansson, P.A. Svensson, M.A. Aberg, P.S. Eriksson, L.M. Carlsson, B. Carlsson, Interaction of scavenger receptor class B type I with peroxisomal targeting receptor Pex5p, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312 (2003) 1325–1334.
- [83] S. Hara-Kuge, Y. Fujiki, The peroxin Pex14p is involved in LC3-dependent degradation of mammalian peroxisomes, *Exp. Cell Res.* 314 (2008) 3531–3541.

DISCUSSION

DISCUSSION

L'étiologie de l'inflammation intestinale et systémique observée au cours de l'obésité n'est pas élucidée. Les études menées chez des individus obèses ou dans des modèles animaux d'obésité induite par un régime hyperlipidique ne permettent pas de déterminer l'origine de cette inflammation. L'objectif de ma thèse a été de tester l'hypothèse selon laquelle un apport de lipides alimentaires, et en particulier d'acides gras saturés, pouvait conduire à une altération de la barrière intestinale qui en retour faciliterait le passage de pathogènes ou de fragments bactériens activant le système immunitaire. Dans cette hypothèse, l'ensemble de ces événements conduirait à une inflammation intestinale et à une inflammation systémique.

1/ Un apport à court terme de lipides provoque-t-il une altération de la barrière intestinale et une inflammation tissulaire et systémique ?

Sur un modèle murin j'ai mis en évidence l'existence d'une altération de la barrière intestinale dès le premier apport d'acides gras saturés. Elle est caractérisée par une augmentation de la perméabilité épithéliale intestinale aux macromolécules et une altération de la localisation de certaines protéines de jonctions qui s'étend, après 5 jours de gavages, à l'ensemble des protéines de jonctions étudiées : ZO-1, occludine et tricelluline, pour les jonctions serrées et la E-cadhérine, pour les jonctions adhérentes. Associée à cette altération de la barrière épithéliale intestinale, j'ai observé une modification dans l'intestin de l'expression de gènes de l'inflammation (IL-1 β , Reg-3 γ , Gata-3). En revanche, je n'ai pas observé d'augmentation de l'endotoxémie ni d'inflammation systémique. Dans le modèle cellulaire Caco-2/TC7, un apport unique d'acide palmitique provoque également une augmentation de la perméabilité intestinale aux ions et aux macromolécules, une altération de la localisation de protéines des jonctions aux contacts cellules-cellules et une augmentation de l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-8. Ces résultats suggèrent que l'altération de la barrière intestinale et l'augmentation locale de cytokines pro-inflammatoires en réponse aux lipides représentent des événements précoces qui surviennent, au moins pour une partie d'entre eux, dans le compartiment épithélial.

L'inflammation intestinale que j'ai observée *in vivo* chez la souris après 5 gavages d'huile de palme reste cependant modérée. D'une façon intéressante, j'ai observé en plus de l'augmentation de l'expression d'IL-1 β une diminution du facteur de transcription Gata-3. La protéine Gata-3 contrôle la réponse anti-inflammatoire Th-2 en induisant l'expression des interleukines anti-inflammatoires IL-4, IL-5 et IL-13 et en réprimant l'expression de l'interféron- γ (IFN- γ) associé à la réponse Th-1 pro-inflammatoire (Ho *et al.* 2009; Seidelin *et*

DISCUSSION

al. 2015). Une diminution de l'expression de Gata-3 suggère donc un changement phénotypique du profil inflammatoire dans l'intestin des souris ayant reçu l'huile de palme, vers un profil pro-inflammatoire. La diminution de l'expression de Gata-3 que j'ai observée dans l'intestin de souris soumises à une colite par le traitement au DSS nous conforte dans cette hypothèse.

En parallèle, les animaux ayant reçu un seul gavage d'huile de palme présentent une augmentation de l'expression du peptide antimicrobien Reg-3 γ qui n'est plus observée après les gavages répétés et qui n'existe pas chez les souris traitées au DSS. Un rôle bénéfique des peptides antimicrobiens de la famille des Reg III a été évoqué dans l'immunité innée intestinale et la fonction de barrière intestinale (Hogan *et al.* 2006). En effet, des souris déficientes pour le gène *Retlnb*, facteur régulant positivement l'expression de Reg-3 β et Reg-3 γ , présentent une perméabilité intestinale augmentée associée à une diminution de l'expression de ces deux peptides antimicrobiens dans le côlon (Hogan *et al.* 2006; Morampudi *et al.* 2016). De plus, il a été montré une diminution des taux d'ARNm de Reg-3 β et Reg-3 γ dans l'iléon de souris après 10 et 30 jours de régime hyperlipidique (Garidou *et al.* 2015). Ainsi, les résultats obtenus sur Reg-3 γ suggèrent que l'intestin mettrait en place rapidement des mécanismes de défense, protecteurs de la barrière intestinale, qui seraient moins efficaces après un apport répété ou une inflammation plus prononcée (comme dans les souris traitées au DSS). Dans les expériences réalisées dans les cellules Caco-2/TC7, il serait intéressant de déterminer si l'expression de peptides antimicrobiens comme Reg-3 γ est également modifiée en réponse à une charge en lipides.

J'ai néanmoins observé dans ces cellules une augmentation de la cytokine pro-inflammatoire IL-8, impliquée dans le recrutement de cellules immunitaires (David *et al.* 2016). La chimiokine IL-8 est la principale cytokine pro-inflammatoire capable de recruter et d'activer localement des neutrophiles, participant ainsi à la défense des cellules hôtes contre une invasion de bactéries pathogènes. L'IL-8 est surexprimée dans le côlon de patients atteints de rectocolite hémorragique et son niveau est corrélé de façon positive au nombre de neutrophiles infiltrés et à la sévérité de la maladie (Wéra *et al.* 2016). Chez la souris, il n'existe pas d'homologue direct de l'IL-8. Cependant, trois cytokines ont été décrites comme étant des chimiokines et ayant des fonctions homologues à celle de l'IL-8 : CXCL1/KC, CXCL2/MIP-2 et CXCL5-6/LIX (Hol *et al.* 2010). Dans notre étude, les ARNm de ces homologues fonctionnels (quantifiés sur les segments intestinaux totaux) ne semblent pas être modifiés par les gavages avec de l'huile de palme. Il serait néanmoins intéressant de déterminer si l'huile de palme a provoqué le recrutement de neutrophiles en quantifiant par

DISCUSSION

exemple l'expression de MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) ou de MPO (myéloperoxydase) dans les cellules Caco-2/TC7 et chez les souris.

Chez la souris, nous avons voulu savoir si les défauts de la barrière intestinale, en réponse à un traitement à court terme d'huile riche en acides gras saturés, associés à une réponse inflammatoire intestinale modérée, sont également liés à une inflammation systémique. Les dosages plasmatiques IL-6 et d'IL-1 β que nous avons réalisés ne montrent aucune différence entre les animaux ayant reçu ou pas de l'huile de palme. Ceci semblerait indiquer qu'un apport de quelques jours d'huile de palme n'est pas suffisant pour provoquer une inflammation systémique, mais aussi en corollaire que les défauts de la barrière épithéliale intestinale et l'inflammation intestinale sont des événements qui précèdent l'inflammation systémique. Les données de la littérature concernant l'effet de repas ou de régimes riches en lipides sur l'endotoxémie et l'inflammation systémique semblent contradictoires. Des travaux ont montré qu'un repas unique riche en lipides est suffisant pour augmenter l'endotoxémie et les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 dans le plasma chez l'Homme sain (Laugerette *et al.* 2011; Vors *et al.* 2015) et le rongeur (Ghoshal *et al.* 2009). Ces études montrent que ces événements sont souvent transitoires et ne durent que quelques heures. D'autres études réalisées chez la souris soumise à un régime riche en lipides montrent une activation dans l'intestin de NF- κ B 2 semaines après le début du régime et une augmentation de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α dans l'iléon à la 6^{ème} semaine sans pour autant provoquer une inflammation systémique (Ding and Lund 2011).

Ainsi des études plus complètes incluant l'étude de plusieurs marqueurs de l'inflammation systémique chez la souris, comme par exemple les SAA-1,-2,-3 (serum amyloid A-1,-2,-3), représentant des marqueurs de l'inflammation aigüe chez la souris (Tannock *et al.* 2018), et réalisées à différents temps après le gavage sont nécessaires afin d'infirmer ou d'identifier l'existence d'une inflammation systémique et d'une endotoxémie dans nos conditions expérimentales.

2/ Les lipides alimentaires sont-ils à eux seuls responsables des perturbations de la barrière intestinale et de l'inflammation?

Au commencement de mes études chez la souris, ma première question, d'ordre méthodologique, a été de choisir le mode d'apport des lipides alimentaires. Si des études menées chez le rongeur ont montré qu'un régime hyperlipidique obésogène de quelques jours

DISCUSSION

suffit à augmenter la perméabilité intestinale et à perturber la réponse immunitaire intestinale (Hamilton *et al.* 2015; Johnson *et al.* 2015), l'amplitude de l'inflammation intestinale mise en évidence semble être limitée y compris après plusieurs semaines de régime (Johnson *et al.* 2015) contrairement à ce qui peut être observé dans le foie et le tissu adipeux (van der Heijden *et al.* 2015). Plusieurs explications sont possibles : le renouvellement rapide de l'épithélium intestinal et sa capacité d'adaptation, ainsi que la mise en place de mécanismes de défense ou compensateurs, pourraient contribuer à maintenir cette inflammation intestinale à un niveau modéré. Une autre explication serait que les régimes hyperlipidiques utilisés pour les études sur modèles animaux sont souvent dépourvus en fibres. Les fibres sont décrites pour avoir des effets bénéfiques sur les fonctions intestinales par la modulation du métabolisme du microbiote intestinale (Makki *et al.* 2018) et sur l'intégrité de la barrière intestinale (Chen *et al.* 2013; Ogata *et al.* 2017). Une déplétion en fibres provoque un changement du métabolisme des bactéries qui, pour compenser leur carence en glucides provenant de la digestion des fibres, dégradent le mucus riche en glycoprotéines et fragilisent *in fine* la barrière épithéliale, augmentant la susceptibilité à développer une colite en réponse aux bactéries pathogènes (Desai *et al.* 2016). J'ai donc tenté de m'affranchir de ce biais expérimental possible en administrant les lipides alimentaires par gavage quotidien tout en maintenant les animaux sous un régime standard (riche en fibres). Dans ces conditions, j'ai néanmoins observé que les animaux gavés avec de l'huile de palme consomment environ 30% en moins de régime standard que les animaux contrôles. Il n'est donc pas possible de totalement exclure un rôle de la carence en fibres dans les observations que j'ai faites.

J'ai d'autre part observé que 4 jours de gavage avec l'huile de palme provoquent une modification de la composition du microbiote qui est similaire à celle observée après plusieurs semaines de régime hyperlipidique (Clarke *et al.* 2012; Matsuoka and Kanai 2015). En effet, dans mes expériences, le traitement itératif d'huile de palme induit une augmentation de l'abondance des *Bacteroides* connues pour être augmentée suite à un régime obésogène enrichi en acides gras saturés (Devkota *et al.* 2012) et à l'inverse une diminution d'espèces bactériennes telles que *Clostridium leptum*, *Akkermensia muciniphila* et Segmented Filamentous Bacteria, décrites comme ayant des propriétés protectrices pour les cellules hôtes (Marchix *et al.* 2018). L'administration de la bactérie *Akkermensia muciniphila* à des souris soumises à un régime hyperlipidique permet de rétablir les niveaux d'expression du peptide antimicrobien Reg-3 γ (Everard *et al.* 2014). Le changement rapide de la composition du microbiote que j'ai observé est en accord avec des études qui montrent que des changements

DISCUSSION

rapides, en quelques jours seulement, s'opèrent au niveau de la composition du microbiote chez l'Homme sain après un changement alimentaire notamment en lipides (David *et al.* 2014) et chez le rat après une alimentation riche en lipides (Vaughn *et al.* 2017). Compte-tenu du rôle du microbiote dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale (Rolhion and Chassaing 2016), les modifications de sa composition observées après 4 gavages peuvent également contribuer à l'altération de la barrière intestinale voire à l'inflammation intestinale.

3/ La variation d'expression des cytokines inflammatoires en réponse à l'acide palmitique peut-elle expliquer les défauts de l'intégrité de la barrière épithéliale dans les cellules Caco-2/TC7 ?

Dans mes expériences sur les cellules Caco-2, j'ai observé dès les premières 24h une augmentation de l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 puis de sa sécrétion après 4 jours de traitement. Il est difficile de confronter ce résultat aux données de la littérature puisque les données concernant l'évolution de la concentration plasmatique d'IL-8 après un repas riche en lipides chez l'Homme sain restent controversées : selon les études une augmentation (Brandauer *et al.* 2013; Esser *et al.* 2013) ou aucune variation (Kračmerová *et al.* 2014) ont été relevées. Néanmoins, son taux est élevé dans le sérum de patients obèses comparés à des patients non obèses et est corrélé positivement avec l'indice de masse corporel (BMI) et à la masse grasse des individus atteints d'obésité (Kim *et al.* 2006; Straczkowski *et al.* 2002).

Plusieurs données de la littérature montrent que des cytokines pro-inflammatoires sont capables d'altérer la barrière épithéliale intestinale (Al-Sadi *et al.* 2010; Lee 2015; Ma *et al.* 2004). Au-delà des effets souvent décrits de cytokines comme TNF- α , INF- γ ou IL-1 β sur la barrière épithéliale intestinale (Al-Sadi *et al.* 2016; Kominsky *et al.* 2014), des effets délétères et dose-dépendant de l'IL-8 sur les protéines de jonctions serrées, impactant directement la perméabilité de cellules endothéliales, ont été rapportés (Yu *et al.* 2013). Cependant, les mécanismes d'action sous-jacents n'ont pas été étudiés. Compte-tenu du fait qu'une augmentation de l'expression d'IL-8 est observée rapidement après l'apport d'acide palmitique, nous ne pouvons pas exclure que cette cytokine participe au défaut de la barrière de la monocouche épithéliale. Cependant, comme l'augmentation de la sécrétion n'est quantifiable qu'après plusieurs jours de traitement cela supposerait une action de cette cytokine au niveau intracellulaire ou que de faibles niveaux sécrétés, en deçà du seuil de détection de notre dosage ELISA, soient suffisants pour déclencher *via* la liaison sur son récepteur des voies de signalisation capables de perturber les jonctions cellulaires. Pour

DISCUSSION

pouvoir conclure, il serait donc intéressant d'analyser les voies de signalisation contrôlée par l'IL-8 et le rôle qu'elle peut avoir sur la régulation des complexes jonctionnels. Afin de déterminer l'implication possible de cette chimiokine dans l'altération des complexes jonctionnels et l'augmentation de la perméabilité en réponse aux acides gras saturés, il serait judicieux de bloquer l'action de l'IL-8 soit en invalidant son expression soit en bloquant la liaison sur son récepteur (*via* des anticorps bloquants). En effet, il a été démontré que les cellules Caco-2 expriment à la membrane apicale le récepteur à l'IL-8, CXCR1 (Rossi *et al.* 2013).

Dans notre étude bien que les variations d'expression de TGF- β 1 après traitement des cellules Caco-2/TC7 avec l'acide palmitique soient faibles, elles demeurent significatives. Il n'est pas exclu non plus que le facteur TGF- β 1 puisse d'une façon directe ou indirecte perturber les complexes jonctionnels en réponse à l'apport d'acide palmitique. En effet, il a été montré que les protéines de la famille des SMADs ("Small Mothers Against Decapentaplegic") sont capables de réprimer, en réponse au TGF- β 1, l'expression des gènes codant pour les protéines de jonctions telles que laE-cadhérine et l'occludine (Lamouille *et al.* 2014). De plus, dans les cellules Caco-2 l'un des récepteurs du facteur TGF- β 1, TGF- β RI, co-localise avec l'occludine (Yakovich *et al.* 2010) suggérant une interaction possible entre TGF- β 1 et l'occludine et donc une implication de cette cytokine dans la régulation des complexes jonctionnels. Une stratégie similaire à celle envisagée pour l'IL-8 est nécessaire afin de déterminer la participation de TGF- β 1 dans les défauts de la barrière épithéliale observés dans les cellules Caco-2/TC7.

Ainsi, les données obtenues dans la lignée entérocytaire Caco-2/TC7 montrent que les cellules épithéliales sont capables d'initier en réponse aux acides gras saturés, par opposition aux acides gras mono-insaturés, une réponse inflammatoire dans l'épithélium impliquant en particulier la chimiokine pro-inflammatoire IL-8 associée à une altération de la barrière épithéliale. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en avant le facteur déclencheur de cette inflammation. Au vu de la précocité des événements, il est très probable que l'acide gras saturé déclenche simultanément l'altération de la barrière épithéliale et l'expression de l'IL-8. La répétition d'un tel apport mettrait en place un cercle vicieux.

De plus, alors qu'il est classiquement considéré que l'inflammation altère la fonction de barrière *via* les cytokines pro-inflammatoires massivement sécrétées par les cellules du compartiment immunitaire, nos résultats suggèrent qu'une réponse inflammatoire initiée au niveau du compartiment épithélial pourrait participer au démantèlement des jonctions

DISCUSSION

intercellulaires. De plus, de façon surprenante, j'ai observé qu'un traitement à l'EGTA, utilisé comme contrôle positif de démantèlement des jonctions pour l'étude de la perméabilité, augmente l'expression et la sécrétion de l'IL-8, augmente l'expression de l'IL-1 β et diminue celle du TGF- β 1, suggérant que la seule perturbation des jonctions pourrait initier une réponse inflammatoire. L'EGTA agit sur les jonctions intercellulaires en induisant l'internalisation de la E-cadhérine qui est dépendante du calcium. Toutefois, on ne peut pas exclure que la chélation du calcium extracellulaire perturbe la signalisation calcique, impliquée dans la sécrétion de l'IL-8 (Kuhns 1998; Yang *et al.* 2015). Pour confirmer que la perturbation des jonctions initie une réponse inflammatoire au niveau des cellules épithéliales, nous pourrions utiliser des outils plus spécifiques comme des anticorps bloquants anti-E-cadhérine. De telles données apporteraient un éclairage nouveau sur les relations réciproques entre perturbation de la barrière épithéliale et inflammation.

4/ L'altération de la barrière intestinale est-elle suffisante pour initier une inflammation?

Une altération de la barrière intestinale est associée à de nombreuses pathologies inflammatoires intestinales telles que les MICI ou le syndrome de l'intestin irritable (König *et al.* 2016). Une étude récente menée dans une cohorte de patients atteints de MICI a montré une forte corrélation entre l'altération de la barrière intestinale et la sévérité des symptômes (Chang *et al.* 2017). Parmi les gènes de prédisposition à la maladie de Crohn, certains codent pour des protéines de jonctions intercellulaires telles que la E-cadhérine qui a été retrouvée sous forme tronquée chez ces patients (Khor *et al.* 2011). Dans des biopsies issues de patients atteints de la maladie de Crohn, cette protéine de jonction adhérente s'accumule dans le cytoplasme et n'est plus localisée à la membrane plasmique des colonocytes (Muisse 2009).

De plus, des travaux ont mis en avant qu'un défaut de la barrière intestinale serait un évènement précoce impliqué dans l'apparition de l'inflammation intestinale et, dans plusieurs pathologies, bien avant la mise en place des désordres métaboliques (Martini *et al.* 2017). En effet, dans le diabète de type 1 par exemple, il a été montré que l'augmentation de la perméabilité intestinale est un évènement qui précède de plusieurs années la mise en place de la pathologie (Sapone *et al.* 2006). De même, une étude de cas d'une patiente ayant des antécédents familiaux de MICI a montré une perméabilité intestinale élevée chez cette patiente asymptomatique, sans aucun signe macro- ou microscopique de MICI, avec un diagnostic de maladie de Crohn posé seulement 8 ans plus tard (Irvine and Marshall 2000). J'ai donc cherché en particulier les évènements précoces impliquant la barrière intestinale qui

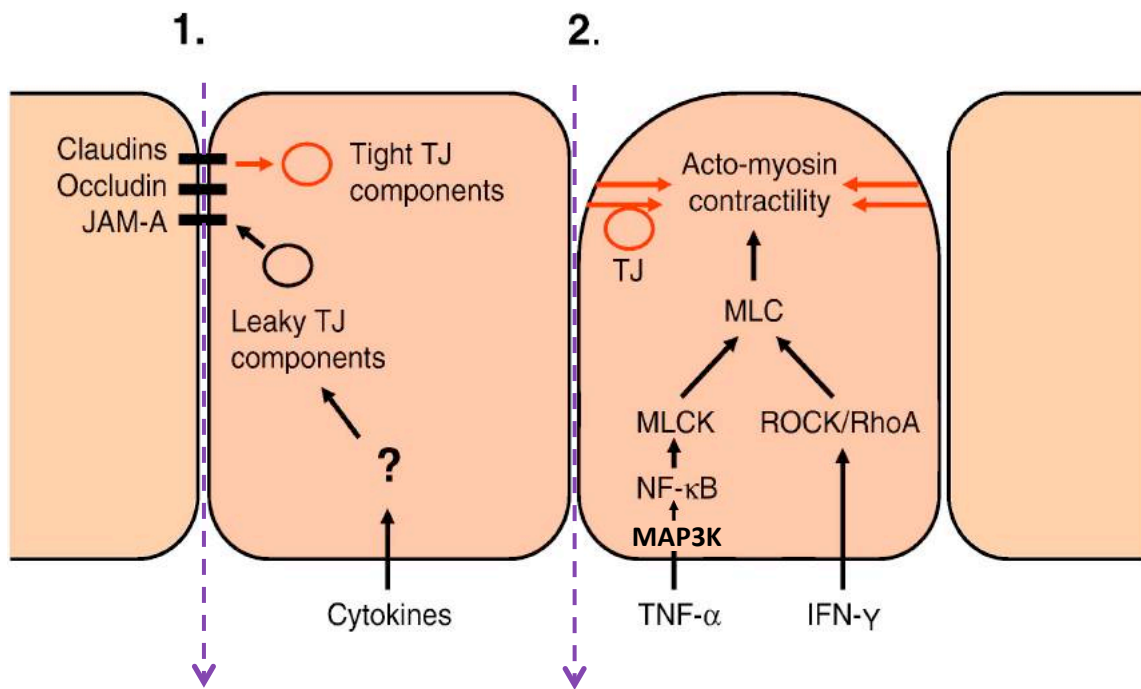


Figure 17: Description de mécanismes possibles conduisant à l'altération des complexes jonctionnels par les cytokines dans des cellules épithéliales intestinales.

Les cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α et IFN- γ sont capables *via* l'activation de voie de signalisation d'induire une déstabilisation des complexes jonctionnels conduisant à l'augmentation de la perméabilité paracellulaire.

1. En réponse aux cytokines, bien que la structure des jonctions serrées soit maintenue, la composition en protéines des complexes jonctionnels est altérée entraînant une déstabilisation des complexes et une perméabilité augmentée.

2. L'internalisation des protéines de jonctions serrées suite à la contraction de la ceinture d'acto-myosine déclenche l'ouverture de la voie paracellulaire.

(Modifiée d'après la revue Capaldo et Nusrat 2009),

DISCUSSION

seraient potentiellement responsables de l'initiation de l'inflammation intestinale en réponse aux lipides.

Dans notre étude, il a été difficile de déterminer la séquence des événements conduisant à l'inflammation intestinale puisque l'altération de la barrière épithéliale survient simultanément avec l'augmentation de marqueurs inflammatoires. En effet, nous avons mis en évidence l'existence d'une altération de la barrière intestinale dès le premier apport d'acides gras saturés une altération de la barrière épithéliale intestinale et une élévation de la cytokine pro-inflammatoire IL-8. De plus chez la souris un apport répété à court terme d'huile de palme déclenche une augmentation de la perméabilité épithéliale intestinale et une perte de la localisation à la membrane des protéines de jonctions serrées occludine et tricelluline.

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons cherché à déterminer si les effets un apport d'huile de palme exacerbe l'état de la barrière dans un modèle barrière intestinale altérée. En effet, une étude récente de notre équipe montre que si les patients obèses présentent à l'état basal des défauts subtils de la barrière intestinale, avec une diminution de l'intensité de l'occludine et de la tricelluline, ceux-ci sont exacerbés après une charge en lipides (Genser *et al.* 2018). En effet, après une charge en lipides la perméabilité jéjunale (analysée *ex vivo*) est deux fois plus élevée chez des patients obèses, comparée à des non-obèses, alors qu'elle n'est pas significativement différente en conditions basales. Cette augmentation de perméabilité en réponse à une charge en lipides est corrélée avec le degré d'inflammation systémique et intestinale.

Pour savoir si une altération subclinique de la barrière intestinale augmente la susceptibilité des animaux aux effets délétères des acides gras saturés, nous avons analysé l'impact d'un apport unique d'huile de palme chez des souris présentant un défaut intrinsèque de la barrière intestinale. Grâce à une étude pilote réalisée en collaboration avec Valérie Alquier-Blacqué et Laurent Ferrier (INRA TOXALIM, Toulouse), nous avons évalué la réponse à un apport unique d'huile de palme des souris CA-MLCK. Ces souris génétiquement modifiées, fournies par l'équipe de Jerrold Turner (Université de Chicago, USA), expriment dans l'épithélium intestinal la kinase MLCK sous une forme constitutivement active (Su *et al.* 2009a). La MLCK est une kinase qui phosphoryle la protéine MLC, laquelle forme avec les filaments d'actine une ceinture contractile entourant la cellule et liée avec les protéines de la famille des zonula-occludens au niveau des jonctions serrées (figure 9 et 17). La suractivation de la MLCK entraîne l'ouverture des jonctions intercellulaires et l'augmentation de la perméabilité paracellulaire (Choi *et al.* 2017). Ainsi, les souris CA-MCLK présentent un

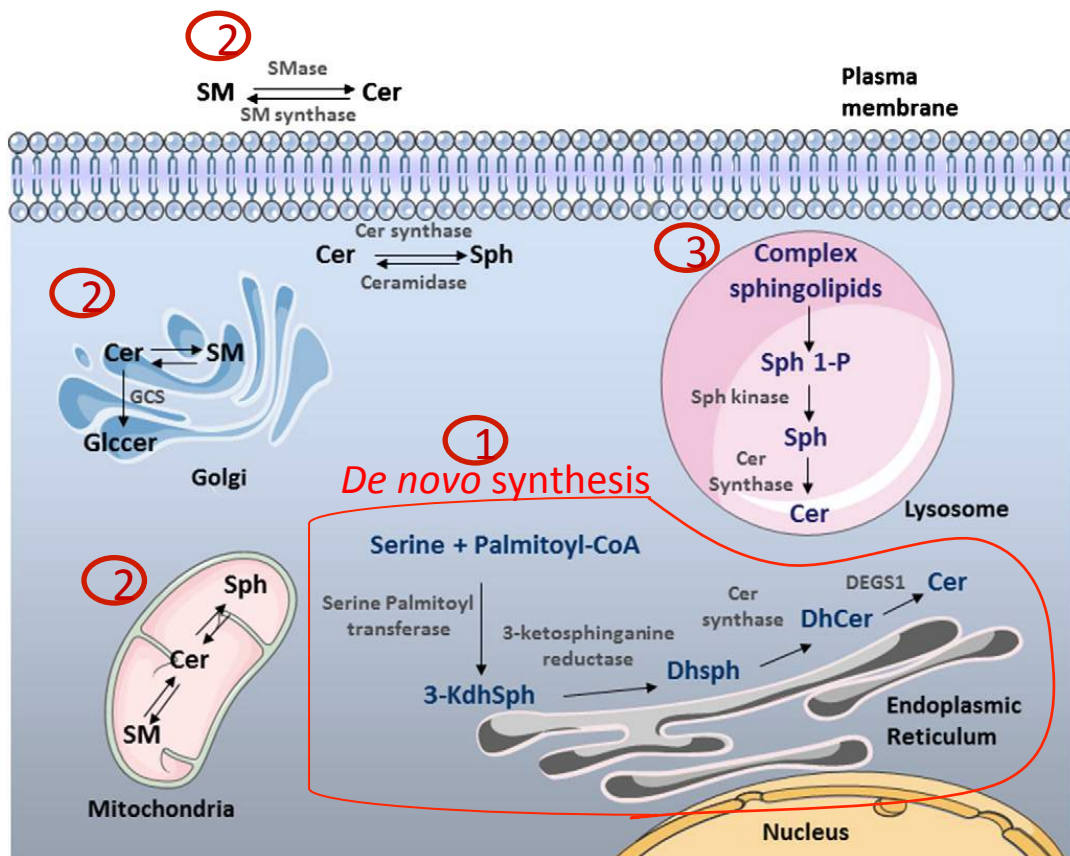


Figure 18 : Principales voies de synthèses des céramides dans la cellule épithéliale intestinale.

Les céramides sont produits par trois voies de synthèse dans la cellule :

1/ La voie de synthèse de novo des céramides qui utilise comme précurseurs le palmitoyl-CoA et la sérine et fait intervenir la 1^{ère} enzyme clé SPT (serine palmitoyl transférase) dans le RE.

2/ La voie des sphingomyélinases qui convertit les sphingomyélines en céramides au niveau de la membrane plasmique, de l'appareil de Golgi et de la mitochondrie.

3/ La voie de recyclage qui dans l'endosome et le lysosome convertit les sphingolipides en céramides.

(Modifiée d'après Rodriguez-Cuenca *et al* 2015)

DISCUSSION

défaut de barrière, un recrutement et une activation de cellules immunitaires dans la muqueuse intestinale mais ne développent aucune pathologie particulière. Dans notre expérience, les souris CA-MLCK traitées par un apport unique d'huile de palme semblent avoir une perméabilité plus élevée que les souris CA-MLCK gavées avec de l'eau. Bien que ces résultats doivent être confirmés par l'évaluation de l'état des jonctions et la quantification de marqueurs inflammatoires, ils étayaient l'hypothèse que l'apport d'acides gras saturés chez des individus prédisposés aggrave l'état basal.

5/ Par quels mécanismes l'acide palmitique provoque-t-il des perturbations de la barrière épithéliale et l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires?

Une étude récente publiée par notre équipe a montré que contrairement à l'acide oléique, un apport unique d'acide palmitique déclenche la synthèse *de novo* de céramides (Tran *et al.* 2016). Connus pour leurs effets délétères dans la cellule, les céramides produits en réponse à cet apport aigu d'acide palmitique, altèrent la signalisation insuline dans les cellules Caco-2/TC7 mais aussi dans l'intestin de souris ayant reçu un gavage unique d'huile de palme (Tran *et al.* 2016). Ainsi, nous avons déterminé si les perturbations de l'intégrité de la barrière intestinale provoquées par l'apport d'acide palmitique sont dépendantes de la production des céramides. Nous avons dans un premier temps cherché à voir si l'administration de céramides aux cellules (apport de C2-céramide) est capable, à elle seule, de provoquer des défauts de la barrière épithéliale et une réponse inflammatoire. Nous avons montré que l'apport de céramides entraîne les mêmes effets délétères sur l'intégrité de la barrière épithéliale et l'expression des cytokines inflammatoires que ceux engendrés par l'acide palmitique. Les céramides sont produits par trois voies de synthèse dans la cellule (figure 18): la voie de synthèse *de novo* des céramides qui utilise comme précurseurs le palmitoyl-CoA et la sérine et fait intervenir la 1^{ère} enzyme clé SPT (serine palmitoyl transférase) dans le RE, la voie des sphingomyélinases qui convertit les sphingomyélines en céramides et la voie de recyclage qui dans l'endosome et le lysosome convertit les sphingolipides en céramides (pour revue (Rodriguez-Cuenca *et al.* 2015)). Afin de déterminer si les effets induits par l'acide palmitique impliquent l'augmentation des taux intracellulaires de céramides produits par la voie de synthèse *de novo* des céramides, nous avons inhibé l'enzyme SPT impliquée dans la première étape de cette voie dans des cellules Caco-2/TC7 traitées avec de l'acide palmitique. Les résultats montrent que si l'inhibition par la L-cyclosérine de cette voie ne permet pas de restaurer la perméabilité paracellulaire, en revanche, elle empêche l'augmentation de la chimiokine IL-8 induite par le traitement par l'acide palmitique. Cette différence d'effet sur

DISCUSSION

les deux paramètres pourrait s'expliquer par le fait que l'inhibiteur, bien qu'administré une heure avant le traitement par l'acide palmitique, ne soit pas suffisamment efficace pour bloquer totalement cette voie; l'acide palmitique permettrait alors la production d'une quantité de céramides suffisante pour induire l'augmentation de la perméabilité sans être assez conséquente pour affecter l'expression de l'IL-8. Il serait alors intéressant de doser les quantités de céramides produites en présence d'acide palmitique avec et sans inhibiteur, et celles produites par le C2-ceramide seul.

Une hypothèse pour expliquer un effet possible des céramides sur la perméabilité serait liée à leur insertion dans la membrane plasmique et à leur capacité à former des canaux (Siskind *et al.* 2002; Siskind 2005). En effet, les céramides sont capables de former des canaux au niveau de la membrane plasmique des mitochondries et d'augmenter la perméabilité de la membrane externe mitochondriale aux protéines de poids moléculaire allant jusqu'à 60kDa (Siskind *et al.* 2002; Siskind 2005). L'augmentation de la perméabilité épithéliale aux macromolécules observée dans notre étude pourrait être expliquée en partie par la formation de canaux formés par les céramides à la membrane plasmique des cellules épithéliales intestinales qui ne serait pas totalement bloquée par la L-cyclosérine. Un marquage par immunofluorescence des céramides membranaires permettrait de montrer la présence ou non de telles structures dans nos cellules Caco-2/TC7 traitées. De plus, de nombreux travaux ont montré la présence de céramides au niveau des « rafts » lipidiques pouvant potentiellement influencer la stabilité et la composition de ces structures (Megha *et al.* 2007) en altérant leur composition protéique (Yu *et al.* 2005). Les protéines de jonctions telles que l'occludine ou les claudines étant également présentes dans ces « rafts » (Eum *et al.* 2015; Head *et al.* 2014), il n'est pas exclu que les céramides puissent moduler la perméabilité épithéliale intestinale à travers l'interaction avec les protéines des jonctions intercellulaires et/ou en perturbant la dynamique membranaire en particulier au niveau des « rafts ».

Une étude récente a montré que la longueur de la chaîne carbonée du céramide produit peut avoir un impact différent sur les cellules (Kim *et al.* 2017). En effet, les auteurs ont montré qu'une invalidation du gène codant l'enzyme CerS2 responsable de l'élongation des céramides à très longues chaînes (C22-C24) entraîne une diminution des céramides à très longues chaînes et une accumulation des céramides à longues chaînes, en particulier du C16-céramide. Les souris déficientes en CerS2 présentent une altération de la fonction de barrière avec une diminution de la protéine de jonction JAM-A, une augmentation de la phosphorylation de la protéine MLC-2 associées à une perméabilité aux macromolécules

DISCUSSION

élevée (Kim *et al.* 2017). Des résultats similaires ont été obtenus dans les cellules Caco-2 après ablation de la CerS2, à l'exception de JAM-A dont le niveau protéique reste inchangé, suggérant que cette protéine ne serait pas directement affectée par la modulation de l'enzyme CerS2 (Kim *et al.* 2017). Ces résultats suggèrent que l'altération de la barrière intestinale serait induite par un déséquilibre de la balance des différents céramides produits et ces défauts seraient causés par l'accumulation des céramides à longues chaînes carbonées en particulier du C16-céramide. Par conséquent, il serait intéressant de quantifier les différentes espèces de céramides, et en particulier le C16 céramide, produits dans nos cellules après ajout de l'acide palmitique, avec ou L-cyclosérine en comparaison aux cellules ayant reçu le C2-céramide, afin de déterminer si une espèce en particulier serait associée à l'augmentation de la perméabilité.

D'autres mécanismes moléculaires induits par l'acide palmitique pourraient expliquer les effets délétères de l'acide gras saturé sur l'intégrité de la barrière épithéliale et la réponse inflammatoire. Le stress du RE est connu pour induire la production de cytokines pro-inflammatoires (Lindholm *et al.* 2017) et moduler la perméabilité épithéliale intestinale (Zhang *et al.* 2015). En effet, l'inactivation d'une protéine régulatrice du stress du RE, IRE1 α , entraîne l'augmentation de la perméabilité intestinale associée à une élévation de marqueurs du stress du RE tels que CHOP/GADD153, et une augmentation dans le côlon de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α) (Zhang *et al.* 2015). La quantification des principaux marqueurs du stress du RE révèle une légère induction du stress du RE suite au traitement par l'acide palmitique mais également par l'acide oléique. Ainsi, bien que nous ne puissions pas exclure l'implication d'un stress du RE dans les effets médiés par l'acide palmitique, il ne peut à lui seul expliquer les perturbations induites par cet acide gras saturé.

Le stress oxydatif a été décrit comme pouvant déstabiliser les complexes jonctionnels dans les cellules Caco-2 *via* la phosphorylation de l'occludine, ZO-1 et E-cadhérine et en altérant la distribution des complexes occludine-ZO-1 et E-cadhérine- β -caténine (RAO *et al.* 2002). L'acide palmitique et les céramides, contrairement à l'acide oléique, peuvent induire du stress oxydatif (Palomer *et al.* 2018). Le stress oxydatif est capable de stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires notamment en activant la voie NF- κ B (Elmarakby and Sullivan 2012). Le stress oxydatif conduit à l'augmentation de l'expression de MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) et du recrutement des macrophages dans le

DISCUSSION

rein de rat diabétique (Elmarakby and Sullivan 2012). Les teneurs plasmatiques de MCP-1 ont été retrouvées positivement corrélées au MDA (malondialdehyde), marqueur du stress oxydatif chez des patients diabétiques (Chiarelli *et al.* 2002). Il serait intéressant de mesurer des marqueurs du stress oxydant tels que le MDA ou l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) dans des cellules Caco-2/TC7 incubées en présence d'acide palmitique, en bloquant ou non la synthèse *de novo* des céramides.

6/ L'acide palmitique est-il le seul acide gras à longue chaîne à avoir des effets sur la barrière épithéliale intestinale ?

Dans les cellules Caco-2/TC7 j'ai observé que contrairement à l'acide palmitique, l'acide oléique n'avait pas d'effet sur la perméabilité de la monocouche cellulaire ni sur l'expression de la cytokine IL-8. Ce résultat suggère que seul l'acide palmitique aurait un effet délétère sur la barrière ou encore que l'acide oléique n'aurait pas d'impact sur la perméabilité intestinale. *In vivo* la comparaison de l'effet d'un apport d'huile d'olive (contenant 70% d'acide oléique et 10% d'acide palmitique) *versus* un apport d'huile de palme (contenant 45% d'acide palmitique et 35% d'acide oléique) ne permet pas de conclure du fait de la présence de chacun des acides gras dans ces deux huiles. Des résultats récents obtenus par notre équipe montrent cependant qu'à très court terme (4 heures) l'acide oléique augmente la perméabilité cellulaire aux macromolécules et diminue l'intensité de la tricelluline des cellules Caco-2/TC7 (Genser *et al.* 2018) alors que nous n'observons plus d'effet après 24h de traitement avec l'acide oléique. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces effets transitoires.

D'un point de vue technique dans l'étude Genser *et al.*, la mesure du passage de FD4 a été réalisée sans retrait des micelles lipidiques contrairement à la mesure de perméabilité dans mon travail qui a été faite 4h après retrait des micelles. Dans ce contexte, une étude non publiée de notre équipe a montré qu'après 24h d'ajout de micelles lipidiques contenant l'acide oléique, la perméabilité aux macromolécules mesurée sans retrait des micelles est plus élevée que dans les cellules non traitées. Cependant cette perméabilité est deux fois plus faible que celle après ajout de micelles contenant l'acide palmitique dans les mêmes conditions (sans retrait de micelles). Ainsi, cela suggère que les mécanismes induits par l'apport à court terme d'acide palmitique déclencheraient des défauts suffisamment importants pour être maintenus à plus long terme. En effet, l'acide palmitique contrairement à l'acide oléique déclenche des mécanismes moléculaires délétères pour la cellule comme la production de céramides et

DISCUSSION

l'induction de cytokine pro-inflammatoire. Ainsi, il n'est pas étonnant qu'à plus long terme l'acide oléique ne provoque pas d'altération de la barrière épithéliale. De plus, nous avons montré que les effets délétères sur l'intégrité de la barrière épithéliale et l'expression des marqueurs inflammatoires perdurent après retrait des micelles contenant l'acide palmitique.

Une autre explication, non exclusive de la première, serait que l'acide oléique soit capable de déclencher des événements cellulaires permettant à la cellule intestinale de s'adapter à un apport massif en lipides. Un tel mécanisme a été décrit par l'équipe dans les cellules Caco-2/TC7 où la détection des micelles contenant de l'acide oléique par le récepteur scavenger SR-B1 active des voies de signalisation qui *in fine* vont enclencher les processus cellulaires impliqués dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines intestinales (Béaslas *et al.* 2009). Cette signalisation constitue un événement très précoce qui se met en place dans les 15 premières minutes après ajout des micelles et provoque le recrutement de SR-B1 dans les « rafts » (Béaslas *et al.* 2009). Les travaux auxquels j'ai participé montrent des modifications rapides de la composition en protéines et en lipides des « rafts » après ajout de micelles contenant de l'acide oléique dans les cellules Caco-2/TC7 (Morel *et al.* 2018). Cet événement précoce induit une modification de protéines intervenant dans de nombreux processus cellulaires impliqués notamment dans l'état de la barrière épithéliale, des fonctions d'oxydo-réduction ou encore de transport d'ions. Il serait donc intéressant d'étudier la composition en protéines des « rafts » après un apport à court et moyen terme d'acide palmitique comparé à l'acide oléique afin de déterminer si certaines protéines de jonctions intercellulaires seraient différemment et transitoirement modulées par ces deux acides gras, ce qui pourrait expliquer les différences d'impact sur la perméabilité épithéliale aux macromolécules. De plus, les travaux précédents de notre équipe ont montré que les mouvements du cholestérol au niveau de la membrane plasmique reproduisent les événements subcellulaires associés à la détection des lipides par SR-B1 (Saddar *et al.* 2013). Il serait intéressant d'étudier si ces événements cellulaires précoces existent après un apport d'acide palmitique et d'en mesurer l'impact sur l'état des jonctions intercellulaires et la perméabilité associée. Des acides gras poly-insaturés sont également détectés par le récepteur CD36 dans les cellules épithéliales intestinales et permettent l'adaptation de la cellule à un apport massif de lipides au début du repas (Niot and Besnard 2017; Tran *et al.* 2011). D'une façon intéressante, l'inactivation du récepteur CD36 chez la souris provoque une altération de la perméabilité intestinale aux macromolécules basale qui est exacerbée après un apport unique d'huile d'olive (Cifarelli and Abumrad 2018).

DISCUSSION

Ainsi il est possible d'envisager que l'augmentation faible et transitoire de la perméabilité observée après l'apport d'acide oléique dans les cellules Caco-2/TC7 puisse être un mécanisme préparant la cellule à l'arrivée massive de lipides. D'autres acides gras comme l'acide palmitique ayant des devenir métaboliques différents avec des conséquences délétères pour la cellule (production de céramides, stress oxydatif...) ne seraient pas ou moins capables de déclencher ce mécanisme d'adaptation.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'ensemble de ce travail démontre que l'apport à court terme d'acides gras saturés en particulier de l'acide palmitique est capable de déclencher de façon précoce des perturbations de l'intégrité de la barrière intestinale, d'initier une réponse inflammatoire et de modifier la composition du microbiote intestinale. Ces dysfonctionnements de l'intestin et les conséquences délétères des lipides sont également des événements décrits dans des pathologies bien installées affectant ce tissu telles que l'obésité. Nous avons montré que les effets délétères induits par les acides gras saturés se mettent très rapidement en place ne permettant pas d'identifier le facteur déclencheur de l'inflammation intestinale. Cependant, les résultats obtenus dans la lignée cellulaire Caco-2/TC7 ont permis de mettre en évidence l'apparition précoce de défauts en réponse aux acides gras saturés dans l'épithélium avec une barrière épithéliale altérée et une augmentation des marqueurs inflammatoires dans ce compartiment exempt de l'influence possible de la *lamina propria* et du microbiote. Ces perturbations observées en réponse aux acides gras saturés dans les cellules Caco-2/TC7 perdurent même après retrait de l'acide palmitique indiquant qu'un apport itératif à court terme est suffisant pour induire des altérations qui persistent supportant l'idée d'effets délétères pouvant devenir irréversibles. La rapidité de ces événements précoces intervenant de façon quasi-simultanée soutient l'hypothèse d'une mise en place rapide d'un cercle vicieux. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour préciser les éléments déclencheurs de l'inflammation intestinale en particulier *in vivo* où la coexistence du microbiote, des cellules immunitaires et épithéliales participe potentiellement à cette inflammation.

Afin de mieux caractériser l'inflammation intestinale dans nos conditions, il serait judicieux de mesurer les marqueurs inflammatoires après avoir retiré la musculature pour analyser séparément les marqueurs dans l'épithélium et la *lamina propria* afin d'optimiser l'analyse et de concentrer les marqueurs inflammatoires pour mieux les détecter. Pour approfondir l'analyse *in vivo* de l'impact sur l'inflammation de l'huile de palme riche en acides gras saturés en comparaison à l'huile d'olive il serait intéressant de quantifier : 1/ *in situ* des marqueurs de l'infiltrat de cellules immunitaires tels que CD3 (marqueur des lymphocytes T) (Monteiro-Sepulveda *et al.* 2015), F4/80 (marqueur des macrophages) (Wagner *et al.* 2018), MPO (myéloperoxydase, marqueur des neutrophiles) (Helke *et al.* 2018) ; 2/ dans les fèces *via* la quantification de la lipocaline-2 (marqueur des neutrophiles) (Moschen *et al.* 2017) ; 3/ dans le plasma le marqueur d'infiltrat des neutrophiles MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) (Osaka *et al.* 2016) ou encore les

CONCLUSION & PERSPECTIVES

marqueurs de l'inflammation aigue SAA-1,-2,-3 (Tannock *et al.* 2018). Il serait également intéressant chez nos souris traitées d'évaluer l'épaisseur de la couche de mucus *via* une coloration histologique au bleu alcian qui colore les mucines et mucopolysaccharides (Röhe *et al.* 2018) afin d'évaluer l'éventuelle implication de la couche de mucus dans les défauts de barrière et la modification du microbiote.

Par ailleurs, nous avons exploré les mécanismes moléculaires potentiellement responsables des effets délétères médiés par l'acide palmitique et nous avons souligné une implication de la voie de synthèse *de novo* des céramides. Une étude récemment publiée a souligné l'importance des taux de céramides en particulier le C-16 céramide dans les défauts de la barrière intestinale (Kim *et al.* 2017). Déterminer et doser les espèces de céramides produits par l'acide palmitique et les comparées à celles produites par l'ajout de C2-céramide dans les cellules permettraient d'identifier l'espèce majoritairement impliquée dans les effets délétères induits par l'acide palmitique. De plus, l'accumulation de C16-céramide a été montrée associée à l'augmentation de la phosphorylation de la MLC-2 et à l'augmentation de la perméabilité paracellulaire chez la souris et dans les cellules Caco-2 (Kim *et al.* 2017). L'étude pilote que nous avons menée sur les souris CA-MLCK renforce l'hypothèse d'une implication de la kinase MLCK et de ces partenaires (MLC) dans l'altération de la barrière intestinale induite par l'huile de palme. Evaluer l'état de suractivation de cette kinase dans nos conditions permettra de mieux mettre en évidence une implication de la MLCK dans les défauts de barrière observés. D'autres mécanismes précoces moléculaires pourraient être responsables des altérations de la barrière épithéliale intestinale. En effet, l'étude de la détection des lipides dépendante de SR-B1 par notre équipe a également mis en avant l'implication de l'activation précoce de la kinase Src dans la signalisation intracellulaire (Saddar *et al.* 2013). Cette kinase a été décrite comme étant impliquée dans l'altération des jonctions serrées et des défauts de la barrière intestinale induits par un traitement au DSS (Samak *et al.* 2015). En effet, l'inhibition de son activité ou l'inactivation de la protéine permet de bloquer les effets délétères dus au DSS. Ainsi, il serait intéressant dans la poursuite de notre étude d'évaluer les conséquences sur l'intégrité de la barrière épithéliale d'une modulation des niveaux d'activité de cette kinase.

Afin de déterminer la cascade des événements et d'identifier le facteur déclencheur conduisant à l'inflammation intestinale en réponse aux lipides chez nos souris gavées à l'huile de palme, il serait judicieux de réaliser une cinétique des phénomènes observés avec quantification à des temps précoces (après 1 ; 2 et 3 jours de traitement) de l'impact des

CONCLUSION & PERSPECTIVES

acides gras saturés sur la barrière intestinale et la mesure en parallèle des modifications de la composition du microbiote. Il serait également intéressant d'évaluer l'état de l'intégrité de la barrière intestinale et la composition du microbiote après retrait des gavages. Ainsi, si nous observons un phénomène de résilience du microbiote, c'est-à-dire un retour à une composition des espèces bactériennes similaires à celle des souris contrôles, mais une persistance des défauts de la barrière intestinale, cela indiquerait qu'un dysfonctionnement de la barrière intestinale pourrait possiblement précéder les modifications du microbiote.

REFERENCES

REFERENCES

- Abreu, M. T. 2010. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews Immunology*, **10**, 2, 131–44.
- Al-Sadi, R., Guo, S., Ye, D., Rawat, M. and Ma, T. Y. 2016. TNF- α Modulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by NIK/IKK- α Axis Activation of the Canonical NF- κ B Pathway. *The American Journal of Pathology*, **186**, 5, 1151–65.
- Al-Sadi, R., Ye, D., Said, H. M. and Ma, T. Y. 2010. IL-1 β -Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability Is Mediated by MEKK-1 Activation of Canonical NF- κ B Pathway. *The American Journal of Pathology*, **177**, 5, 2310–22.
- Altmann, S. W. 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption. *Science*, **303**, 5661, 1201–4.
- Anderson, J. M. and Van Itallie, C. M. 2009. Physiology and Function of the Tight Junction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **1**, 2, a002584–a002584.
- Andrews, C., McLean, M. H. and Durum, S. K. 2018. Cytokine Tuning of Intestinal Epithelial Function. *Frontiers in Immunology*, **9**.
- Aqilah Zainal Abidin, A. 2015. High Fat Diet Alters the Expression of M Cells and Claudin 4 in the Peyer's Patches of Rats. *American Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **3**, 5, 283.
- Araújo, J. R., Tomas, J., Brenner, C. and Sansonetti, P. J. 2017. Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. *Biochimie*, **141**, 97–106.
- Artursson, P. 1990. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **79**, 6, 476–82.
- Asrih, M. and Jornayvaz, F. R. 2015. Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? *Molecular and Cellular Endocrinology*, **418**, 55–65.
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A. and Holm, L. 2001. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **280**, 5, G922–29.
- Bajor, A., Gillberg, P.-G. and Abrahamsson, H. 2010. Bile acids: short and long term effects in the intestine. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **45**, 6, 645–64.
- Balda, M. S. 1996. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical- basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *The Journal of Cell Biology*, **134**, 4, 1031–49.
- Banerjee, A., McKinley, E. T., von Moltke, J., Coffey, R. J. and Lau, K. S. 2018. Interpreting heterogeneity in intestinal tuft cell structure and function. *Journal of Clinical Investigation*, **128**, 5, 1711–19.
- Béaslas, O., Cueille, C., Delers, F., Chateau, D., Chambaz, J., Rousset, M. and Carrière, V. 2009. Sensing of Dietary Lipids by Enterocytes: A New Role for SR-BI/CLA-1 D. Fox (ed). *PLoS ONE*, **4**, 1, e4278.
- Bedford, A. and Gong, J. 2018. Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production. *Animal Nutrition*, **4**, 2, 151–59.
- Begg, D. P. and Woods, S. C. 2013. The endocrinology of food intake. *Nature Reviews Endocrinology*, **9**, 10, 584–97.
- Beilstein, F., Carrière, V., Leturque, A. and Demignot, S. 2016. Characteristics and functions of lipid droplets and associated proteins in enterocytes. *Experimental Cell Research*, **340**, 2, 172–79.

REFERENCES

- Bietrix, F., Yan, D., Nauze, M., Rolland, C., Bertrand-Michel, J., Coméra, C., Schaak, S., Barbaras, R., Groen, A. K., Perret, B., Tercé, F. and Collet, X. 2006. Accelerated Lipid Absorption in Mice Overexpressing Intestinal SR-BI. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 11, 7214–19.
- Birchenough, G. M. H., Johansson, M. E., Gustafsson, J. K., Bergström, J. H. and Hansson, G. C. 2015. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunology*, **8**, 4, 712–19.
- Boulenc, X., Marti, E., Joyeux, H., Roques, C., Berger, Y. and Fabre, G. 1993. Importance of the paracellular pathway for the transport of a new bisphosphonate using the human CACO-2 monolayers model. *Biochemical Pharmacology*, **46**, 9, 1591–1600.
- Brandauer, J., Landers-Ramos, R. Q., Jenkins, N. T., Spangenburg, E. E., Hagberg, J. M. and Prior, S. J. 2013. Effects of prior acute exercise on circulating cytokine concentration responses to a high-fat meal. *Physiological Reports*, **1**, 3.
- Briand, O., Touche, V., Colin, S., Brufau, G., Davalos, A., Schonewille, M., Bovenga, F., Carrière, V., de Boer, J. F., Dugardin, C., Riveau, B., Clavey, V., Tailleux, A., Moschetta, A., Lasunción, M. A., Groen, A. K., Staels, B. and Lestavel, S. 2016. Liver X Receptor Regulates Triglyceride Absorption Through Intestinal Down-regulation of Scavenger Receptor Class B, Type 1. *Gastroenterology*, **150**, 3, 650–58.
- Brubaker, P. L. 2018. Glucagon-like Peptide-2 and the Regulation of Intestinal Growth and Function. In *Comprehensive Physiology*. American Cancer Society, 1185–1210.
- Buckley, A. and Turner, J. R. 2018. Cell Biology of Tight Junction Barrier Regulation and Mucosal Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **10**, 1, a029314.
- Buttet, M., Traynard, V., Tran, T. T. T., Besnard, P., Poirier, H. and Niot, I. 2014. From fatty-acid sensing to chylomicron synthesis: Role of intestinal lipid-binding proteins. *Biochimie*, **96**, 37–47.
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmee, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrieres, J., Tanti, J.-F., Gibson, G. R., Casteilla, L., Delzenne, N. M., Alessi, M. C. and Burcelin, R. 2007. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*, **56**, 7, 1761–72.
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M. and Burcelin, R. 2008. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes*, **57**, 6, 1470–81.
- Cani, P. D. and Jordan, B. F. 2018. Gut microbiota-mediated inflammation in obesity: a link with gastrointestinal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*.
- Cani, P. D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D. M., Muccioli, G. G. and Delzenne, N. M. 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, **58**, 8, 1091–1103.
- Chang, J., Leong, R. W., Wasinger, V. C., Ip, M., Yang, M. and Phan, T. G. 2017. Impaired Intestinal Permeability Contributes to Ongoing Bowel Symptoms in Patients With Inflammatory Bowel Disease and Mucosal Healing. *Gastroenterology*, **153**, 3, 723-731.e1.
- Chantret, I., Rodolose, 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), 213–25.
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M. and Vijay-Kumar, M. 2014. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current Protocols in Immunology*, **104**, Unit 15.25.

REFERENCES

- Chaurasia, B. and Summers, S. A. 2015. Ceramides – Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **26**, 10, 538–50.
- Chen, H., Mao, X., He, J., Yu, B., Huang, Z., Yu, J., Zheng, P. and Chen, D. 2013. Dietary fibre affects intestinal mucosal barrier function and regulates intestinal bacteria in weaning piglets. *The British Journal of Nutrition*, **110**, 10, 1837–48.
- Cheng, D., Xu, J.-H., Li, J.-Y., Wang, S.-Y., Wu, T.-F., Chen, Q.-K. and Yu, T. 2018. Butyrate ameliorated-NLRC3 protects the intestinal barrier in a GPR43-dependent manner. *Experimental Cell Research*, **368**, 1, 101–10.
- Chiarelli, F., Cipollone, F., Mohn, A., Marini, M., Iezzi, A., Fazia, M., Tumini, S., Cesare, D. D., Pomilio, M., Pierdomenico, S. D., Gioacchino, M. D., Cuccurullo, F. and Mezzetti, A. 2002. Circulating Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Early Development of Nephropathy in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, **25**, 10, 1829–34.
- Choi, W., Yeruva, S. and Turner, J. R. 2017. Contributions of intestinal epithelial barriers to health and disease. *Experimental Cell Research*, **358**, 1, 71–77.
- Chung, H. and Kasper, D. L. 2010. Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis. *Current Opinion in Immunology*, **22**, 4, 455–60.
- Cifarelli, V. and Abumrad, N. A. 2018. Intestinal CD36 and Other Key Proteins of Lipid Utilization: Role in Absorption and Gut Homeostasis. In R. Terjung (ed), *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 493–507.
- Claes, A.-K., Zhou, J. Y. and Philpott, D. J. 2015. NOD-Like Receptors: Guardians of Intestinal Mucosal Barriers. *Physiology*, **30**, 3, 241–50.
- Clarke, S. F., Murphy, E. F., Nilaweera, K., Ross, P. R., Shanahan, F., O’Toole, P. W. and Cotter, P. D. 2012. The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: New insights. *Gut Microbes*, **3**, 3, 186–202.
- Clevers, H. C. and Bevins, C. L. 2013. Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. *Annual Review of Physiology*, **75**, 1, 289–311.
- Cone, R. A. 2009. Barrier properties of mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **61**, 2, 75–85.
- Coquerel, D., Delile, E. and Tamion, F. 2013. Le glycocalyx: tapis protecteur de l’endothélium. *Réanimation*, **22**, 2, 173–80.
- Cornick, S., Tawiah, A. and Chadee, K. 2015. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers*, **3**, 1–2, e982426.
- Cui, S. and Chang, P.-Y. 2016. Current understanding concerning intestinal stem cells. *World Journal of Gastroenterology*, **22**, 31, 7099.
- Cuvelier, C., Cabaraux, J.-F., Dufrasne, I., Hornick, J.-L. and Istasse, L. 2004. Acides gras: nomenclature et sources alimentaires. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **148**, 133–40.
- David, J. M., Dominguez, C., Hamilton, D. H. and Palena, C. 2016. The IL-8/IL-8R Axis: A Double Agent in Tumor Immune Resistance. *Vaccines*, **4**, 3.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J. and Turnbaugh, P. J. 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, **505**, 7484, 559–63.
- De Lisle, R. C., Mueller, R. and Boyd, M. 2011. Impaired Mucosal Barrier Function in the Small Intestine of the Cystic Fibrosis Mouse: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **53**, 4, 371–79.
- Demignot, S., Beilstein, F. and Morel, E. 2014. Triglyceride-rich lipoproteins and cytosolic lipid droplets in enterocytes: Key players in intestinal physiology and metabolic disorders. *Biochimie*, **96**, 48–55.

REFERENCES

- Derrien, M., Belzer, C. and de Vos, W. M. 2017. Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions. *Microbial Pathogenesis*, **106**, 171–81.
- Desai, M. S., Seekatz, A. M., Koropatkin, N. M., Kamada, N., Hickey, C. A., Wolter, M., Pudlo, N. A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., Young, V. B., Henrissat, B., Wilmes, P., Stappenbeck, T. S., Núñez, G. and Martens, E. C. 2016. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*, **167**, 5, 1339-1353.e21.
- Devkota, S., Wang, Y., Musch, M. W., Leone, V., Fehlner-Peach, H., Nadimpalli, A., Antonopoulos, D. A., Jabri, B. and Chang, E. B. 2012. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10^{-/-} mice. *Nature*, **487**, 7405, 104–8.
- Ding, S. and Lund, P. K. 2011. Role of intestinal inflammation as an early event in obesity and insulin resistance: *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, **14**, 4, 328–33.
- Dudek-Wicher, R. K., Junka, A. and Bartoszewicz, M. 2018. The influence of antibiotics and dietary components on gut microbiota. *Gastroenterology Review*, **13**, 2, 85–92.
- Duerkop, B. A., Vaishnava, S. and Hooper, L. V. 2009. Immune Responses to the Microbiota at the Intestinal Mucosal Surface. *Immunity*, **31**, 3, 368–76.
- Eaves-Pyles, T., Allen, C. A., Taormina, J., Swidsinski, A., Tutt, C. B., Eric Jezek, G., Islas-Islas, M. and Torres, A. G. 2008. Escherichia coli isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *International Journal of Medical Microbiology*, **298**, 5–6, 397–409.
- Elmarakby, A. A. and Sullivan, J. C. 2012. Relationship between Oxidative Stress and Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy. *Cardiovascular Therapeutics*, **30**, 1, 49–59.
- Enright, E. F., Griffin, B. T., Gahan, C. G. M. and Joyce, S. A. 2018. Microbiome-mediated bile acid modification: Role in intestinal drug absorption and metabolism. *Pharmacological Research*, **133**, 170–86.
- Erridge, C., Attina, T., Spickett, C. M. and Webb, D. J. 2007. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation1–3. 7.
- Esser, D., Oosterink, E., op 't Roodt, J., Henry, R. M. A., Stehouwer, C. D. A., Müller, M. and Afman, L. A. 2013. Vascular and Inflammatory High Fat Meal Responses in Young Healthy Men; A Discriminative Role of IL-8 Observed in a Randomized Trial. *PLoS ONE*, **8**, 2.
- Eum, S. Y., Jarakı, D., András, I. E. and Toborek, M. 2015. Lipid rafts regulate PCB153-induced disruption of occludin and brain endothelial barrier function through protein phosphatase 2A and matrix metalloproteinase-2. *Toxicology and applied pharmacology*, **287**, 3, 258–66.
- Everard, A., Lazarevic, V., Gaïa, N., Johansson, M., Ståhlman, M., Backhed, F., Delzenne, N. M., Schrenzel, J., François, P. and Cani, P. D. 2014. Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *The ISME journal*, **8**, 10, 2116–30.
- Fagarasan, S. 2008. Evolution, development, mechanism and function of IgA in the gut. *Current Opinion in Immunology*, **20**, 2, 170–77.
- Feinle-Bisset, C., Patterson, M., Ghatei, M. A., Bloom, S. R. and Horowitz, M. 2005. Fat digestion is required for suppression of ghrelin and stimulation of peptide YY and pancreatic polypeptide secretion by intraduodenal lipid. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **289**, 6, E948–53.
- Ferrante, A. W. 2013. The immune cells in adipose tissue. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **15**, s3, 34–38.
- Ferrere, G., Leroux, A., Wrzosek, L., Puchois, V., Gaudin, F., Ciocan, D., Renoud, M.-L., Naveau, S., Perlemuter, G. and Cassard, A.-M. 2016. Activation of Kupffer Cells Is Associated with a Specific Dysbiosis Induced by Fructose or High Fat Diet in Mice H. Guillou (ed). *PLOS ONE*, **11**, 1, e0146177.

REFERENCES

- Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P. and Louis, P. 2015. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, **74**, 01, 13–22.
- Gajda, A. M. and Storch, J. 2015. Enterocyte fatty acid-binding proteins (FABPs): Different functions of liver and intestinal FABPs in the intestine. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, **93**, 9–16.
- Garidou, L., Pomié, C., Klopp, P., Waget, A., Charpentier, J., Aloulou, M., Giry, A., Serino, M., Stenman, L., Lahtinen, S., Dray, C., Iacovoni, J. S., Courtney, M., Collet, X., Amar, J., Servant, F., Lelouvier, B., Valet, P., Eberl, G., Fazilleau, N., Douin-Echinard, V., Heymes, C. and Burcelin, R. 2015. The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing ROR γ t and Controls Metabolic Disease. *Cell Metabolism*, **22**, 1, 100–112.
- Genser, L., Aguanno, D., Soula, H. A., Dong, L., Trystram, L., Assmann, K., Salem, J.-E., Vaillant, J.-C., Oppert, J.-M., Laugerette, F., Michalski, M.-C., Wind, P., Rousset, M., Brot-Laroche, E., Leturque, A., Clément, K., Thenet, S. and Poitou, C. 2018. Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes: Jejunal permeability in human obesity. *The Journal of Pathology*.
- Georges, A., Bonneau, J., Bonnefont-Rousselot, D., Champigneulle, J., Rabès, J. P., Abifadel, M., Aparicio, T., Guenedet, J. C., Bruckert, E., Boileau, C., Morali, A., Varret, M., Aggerbeck, L. P. and Samson-Bouma, M. E. 2011. Molecular analysis and intestinal expression of SAR1 genes and proteins in Anderson's disease (Chylomicron retention disease). *Orphanet Journal of Rare Diseases*, **6**, 1, 1.
- Gerbe, F., van Es, J. H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., Romagnolo, B., Shroyer, N. F., Bourgaux, J.-F., Pignodel, C., Clevers, H. and Jay, P. 2011. Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *The Journal of Cell Biology*, **192**, 5, 767–80.
- Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D. J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., Bruschi, M., Harcus, Y., Zimmermann, V. S., Taylor, N., Maizels, R. M. and Jay, P. 2016. Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature*, **529**, 7585, 226–30.
- Ghoshal, S., Witta, J., Zhong, J., de Villiers, W. and Eckhardt, E. 2009. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *Journal of Lipid Research*, **50**, 1, 90–97.
- Greenberg, A. S. and Obin, M. S. 2006. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **83**, 2, 461S–465S.
- Guerville, M. and Boudry, G. 2016. Gastrointestinal and hepatic mechanisms limiting entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **311**, 1, G1–15.
- Guo, S., Al-Sadi, R., Said, H. M. and Ma, T. Y. 2013. Lipopolysaccharide Causes an Increase in Intestinal Tight Junction Permeability in Vitro and in Vivo by Inducing Enterocyte Membrane Expression and Localization of TLR-4 and CD14. *The American Journal of Pathology*, **182**, 2, 375–87.
- Hajdúch, E., Balendran, A., Batty, I. H., Litherland, G. J., Blair, A. S., Downes, C. P. and Hundal, H. S. 2001. Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of protein kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells. *Diabetologia*, **44**, 2, 173–83.
- Håkansson, Å., Tormo-Badia, N., Baridi, A., Xu, J., Molin, G., Hagslätt, M.-L., Karlsson, C., Jeppsson, B., Cilio, C. M. and Ahrné, S. 2015. Immunological alteration and changes of gut microbiota after dextran sulfate sodium (DSS) administration in mice. *Clinical and Experimental Medicine*, **15**, 1, 107–20.

REFERENCES

- Hamilton, M. K., Boudry, G., Lemay, D. G. and Raybould, H. E. 2015. Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **308**, 10, G840–51.
- Head, B. P., Patel, H. H. and Insel, P. A. 2014. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function. *Biochimica et biophysica acta*, **1838**, 2.
- van der Heijden, R. A., Sheedfar, F., Morrison, M. C., Hommelberg, P. P., Kor, D., Kloosterhuis, N. J., Gruben, N., Youssef, S. A., de Bruin, A., Hofker, M. H., Kleemann, R., Koonen, D. P. and Heeringa, P. 2015. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging (Albany NY)*, **7**, 4, 256–67.
- Helander, H. F. and Fändriks, L. 2014. Surface area of the digestive tract – revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **49**, 6, 681–89.
- Helke, K., Angel, P., Lu, P., Garrett-Mayer, E., Ogretmen, B., Drake, R. and Voelkel-Johnson, C. 2018. Ceramide Synthase 6 Deficiency Enhances Inflammation in the DSS model of Colitis. *Scientific Reports*, **8**, 1, 1627.
- Hermiston, M. L. and Gordon, J. I. 1995. Inflammatory Bowel Disease and Adenomas in Mice Expressing a Dominant Negative N-Cadherin. *Science*, **270**, 5239, 1203–7.
- Herrmann, T., Buchkremer, F., Gosch, I., Hall, A. M., Bernlohr, D. A. and Stremmel, W. 2001. Mouse fatty acid transport protein 4 (FATP4): Characterization of the gene and functional assessment as a very long chain acyl-CoA synthetase. *Gene*, **270**, 1–2, 31–40.
- Ho, I.-C., Tai, T.-S. and Pai, S.-Y. 2009. GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nature Reviews Immunology*, **9**, 2, 125–35.
- Hogan, S. P., Seidu, L., Blanchard, C., Groschwitz, K., Mishra, A., Karow, M. L., Ahrens, R., Artis, D., Murphy, A. J. and Valenzuela, D. M. 2006. Resistin-like molecule β regulates innate colonic function: Barrier integrity and inflammation susceptibility. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **118**, 1, 257–68.
- Hol, J., Wilhelmsen, L. and Haraldsen, G. 2010. The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *Journal of Leukocyte Biology*, **87**, 3, 501–8.
- Hooper, L. V. 2015. Epithelial Cell Contributions to Intestinal Immunity. In *Advances in Immunology*. Elsevier, 129–72.
- Horáčková, Š., Plocková, M. and Demnerová, K. 2018. Importance of microbial defence systems to bile salts and mechanisms of serum cholesterol reduction. *Biotechnology Advances*, **36**, 3, 682–90.
- Hosoyamada, Y. and Sakai, T. 2005. Structural and mechanical architecture of the intestinal villi and crypts in the rat intestine: integrative reevaluation from ultrastructural analysis. *Anatomy and Embryology*, **210**, 1, 1–12.
- Hou, Y., Wang, L., Yi, D., Ding, B., Chen, X., Wang, Q., Zhu, H., Liu, Y., Yin, Y., Gong, J. and Wu, G. 2014. Dietary supplementation with tributyrin alleviates intestinal injury in piglets challenged with intrarectal administration of acetic acid. *British Journal of Nutrition*, **111**, 10, 1748–58.
- Hugot, J.-P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.-P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O’Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.-F., Sahbatou, M. and Thomas, G. 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature*, **411**, 6837, 599–603.
- Hussain, M. M. 2014. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation: *Current Opinion in Lipidology*, **25**, 3, 200–206.

REFERENCES

- Ihara, S., Hirata, Y. and Koike, K. 2017. TGF- β in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. *Journal of Gastroenterology*, **52**, 7, 777–87.
- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S. and Tsukita, S. 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *The Journal of Cell Biology*, **171**, 6, 939–45.
- Ikenouchi, J., Sasaki, H., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S. 2008. Loss of Occludin Affects Tricellular Localization of Tricellulin K. E. Mostov (ed). *Molecular Biology of the Cell*, **19**, 11, 4687–93.
- Iqbal, J. and Hussain, M. M. 2009. Intestinal lipid absorption. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **296**, 6, E1183–94.
- Irvine, E. J. and Marshall, J. K. 2000. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology*, **119**, 6, 1740–44.
- Iyer, A., Brown, L., Whitehead, J. P., Prins, J. B. and Fairlie, D. P. 2015. Nutrient and immune sensing are obligate pathways in metabolism, immunity, and disease. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **29**, 9, 3612–25.
- Johansson, M. E. V. and Hansson, G. C. 2016. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nature Reviews Immunology*, **16**, 10, 639–49.
- Johansson, M. E. V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L. and Hansson, G. C. 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *MEDICAL SCIENCES*, **6**.
- Johnson, A. M. F., Costanzo, A., Gareau, M. G., Armando, A. M., Quehenberger, O., Jameson, J. M. and Olefsky, J. M. 2015. High Fat Diet Causes Depletion of Intestinal Eosinophils Associated with Intestinal Permeability P. V. Nerurkar (ed). *PLOS ONE*, **10**, 4, e0122195.
- Joubert, D., Hollande, F., Jay, P. and Legraverend, C. 2009. Les cellules souches intestinales: 30 ans d'une histoire exemplaire. *médecine/sciences*, **25**, 5, 441–44.
- Juge, N. 2012. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends in Microbiology*, **20**, 1, 30–39.
- Kayama, H. and Takeda, K. 2012. Regulation of intestinal homeostasis by innate and adaptive immunity. *International Immunology*, **24**, 11, 673–80.
- Khan, J. 2017. Diet, Obesity and Intestinal Barrier. 1.
- Khor, B., Gardet, A. and Xavier, R. J. 2011. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, **474**, 7351, 307–17.
- Kim, C.-S., Park, H.-S., Kawada, T., Kim, J.-H., Lim, D., Hubbard, N. E., Kwon, B.-S., Erickson, K. L. and Yu, R. 2006. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *International Journal of Obesity*, **30**, 9, 1347–55.
- Kim, Y. S. and Ho, S. B. 2010. Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Current Gastroenterology Reports*, **12**, 5, 319–30.
- Kim, Y., Volpert, G., Shin, K., Kim, S., Shin, S., Lee, Y., Sung, S. H., Lee, Y., Ahn, J., Pewzner-Jung, Y., Park, W., Futerman, A. H. and Park, J. 2017. Ablation of ceramide synthase 2 exacerbates dextran sodium sulphate-induced colitis in mice due to increased intestinal permeability. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **21**, 12, 3565–78.
- Kominsky, D. J., Campbell, E. L., Ehrentraut, S. F., Wilson, K. E., Kelly, C. J., Glover, L. E., Collins, C. B., Bayless, A. J., Saedi, B., Dobrinskikh, E., Bowers, B. E., MacManus, C. F., Müller, W., Colgan, S. P. and Bruder, D. 2014. IFN- γ -mediated induction of an apical IL-10 receptor on polarized intestinal epithelia. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **192**, 3, 1267–76.

REFERENCES

- König, J., Wells, J., Cani, P. D., García-Ródenas, C. L., MacDonald, T., Mercenier, A., Whyte, J., Troost, F. and Brummer, R.-J. 2016. Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*, **7**, 10, e196–e196.
- Kračmerová, J., Czudková, E., Koc, M., Mališová, L., Šiklová, M., Štich, V. and Rossmeislová, L. 2014. Postprandial inflammation is not associated with endoplasmic reticulum stress in peripheral blood mononuclear cells from healthy lean men. *British Journal of Nutrition*, **112**, 4, 573–82.
- Krug, S. M., Amasheh, S., Richter, J. F., Milatz, S., Günzel, D., Westphal, J. K., Huber, O., Schulzke, J. D. and Fromm, M. 2009. Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Molecular Biology of the Cell*, **20**, 16, 3713–24.
- Kuhns 1998. Ca²⁺-Dependent Production and Release of IL-8 in Human Neutrophils | The Journal of Immunology. Available online at <http://www.jimmunol.org/content/161/8/4332> [Accessed 18 August 2018].
- 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. **8**.
- Lambert, D., O'Neill, C. and Padfield, P. 2007. Methyl- β -Cyclodextrin Increases Permeability of Caco-2 Cell Monolayers by Displacing Specific Claudins from Cholesterol Rich Domains Associated with Tight Junctions. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **20**, 5, 495–506.
- Lamouille, S., Xu, J. and Derynck, R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **15**, 3, 178–96.
- Laugerette, F., Furet, J.-P., Debard, C., Daira, P., Loizon, E., Géloën, A., Soulage, C. O., Simonet, C., Lefils-Lacourtablaise, J., Bernoud-Hubac, N., Bodennec, J., Peretti, N., Vidal, H. and Michalski, M.-C. 2012. Oil composition of high-fat diet affects metabolic inflammation differently in connection with endotoxin receptors in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **302**, 3, E374–86.
- Laugerette, F., Pineau, G., Vors, C. and Michalski, M. C. 2015. Endotoxemia Analysis by the Limulus Amoebocyte Lysate Assay in Different Mammal Species Used in Metabolic Studies. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, **6**, 4.
- Laugerette, F., Vors, C., Géloën, A., Chauvin, M.-A., Soulage, C., Lambert-Porcheron, S., Peretti, N., Alligier, M., Burcelin, R., Laville, M., Vidal, H. and Michalski, M.-C. 2011. Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **22**, 1, 53–59.
- Laukoetter, M. G., Nava, P., Lee, W. Y., Severson, E. A., Capaldo, C. T., Babbin, B. A., Williams, I. R., Koval, M., Peatman, E., Campbell, J. A., Dermody, T. S., Nusrat, A. and Parkos, C. A. 2007. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, **204**, 13, 3067–76.
- Leblond, C. P. and Messier, B. 1958. Renewal of chief cells and goblet cells in the small intestine as shown by radioautography after injection of thymidine-H3 into mice. *The Anatomical Record*, **132**, 3, 247–59.
- Lee, J. S., Tato, C. M., Joyce-Shaikh, B., Gulen, M. F., Cayatte, C., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Judo, M., Ayanoglu, G., McClanahan, T. K., Li, X. and Cua, D. J. 2015. Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity*, **43**, 4, 727–38.
- Lee, S. H. 2015. Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. *Intestinal Research*, **13**, 1, 11.

REFERENCES

- Lelouard, H., Fallet, M., de Bovis, B., Méresse, S. and Gorvel, J. 2012. Peyer's Patch Dendritic Cells Sample Antigens by Extending Dendrites Through M Cell-Specific Transcellular Pores. *Gastroenterology*, **142**, 3, 592-601.e3.
- Lelouard, H., Reggio, H., Roy, C., Sahuquet, A., Mangeat, P. and Montcourrier, P. 2001. Glycocalyx on Rabbit Intestinal M Cells Displays Carbohydrate Epitopes from Muc2. *Infection and Immunity*, **69**, 2, 1061-71.
- Leroux, A., Ferrere, G., Godie, V., Cailleux, F., Renoud, M.-L., Gaudin, F., Naveau, S., Prévot, S., Makhzami, S., Perlemuter, G. and Cassard-Doulcier, A.-M. 2012. Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis. *Journal of Hepatology*, **57**, 1, 141-49.
- Levin, A. D., Wildenberg, M. E. and van den Brink, G. R. 2016. Mechanism of Action of Anti-TNF Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, **10**, 8, 989-97.
- Lichtenberger, L. M. 2013. Role of Phospholipids in Protection of the GI Mucosa. *Digestive Diseases and Sciences*, **58**, 4, 891-93.
- Lindholm, D., Korhonen, L., Eriksson, O. and Kõks, S. 2017. Recent Insights into the Role of Unfolded Protein Response in ER Stress in Health and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **5**.
- Lu, Y., Li, X., Liu, S., Zhang, Y. and Zhang, D. 2018. Toll-like Receptors and Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Immunology*, **9**.
- Lu, Z., Ding, L., Lu, Q. and Chen, Y.-H. 2013. Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases. *Tissue Barriers*, **1**, 3, e24978.
- Luck, H., Tsai, S., Chung, J., Clemente-Casares, X., Ghazarian, M., Revelo, X. S., Lei, H., Luk, C. T., Shi, S. Y., Surendra, A., Copeland, J. K., Ahn, J., Prescott, D., Rasmussen, B. A., Chng, M. H. Y., Engleman, E. G., Girardin, S. E., Lam, T. K. T., Croitoru, K., Dunn, S., Philpott, D. J., Guttman, D. S., Woo, M., Winer, S. and Winer, D. A. 2015. Regulation of Obesity-Related Insulin Resistance with Gut Anti-inflammatory Agents. *Cell Metabolism*, **21**, 4, 527-42.
- Lycke, N. Y. and Bemark, M. 2017. The regulation of gut mucosal IgA B-cell responses: recent developments. *Mucosal Immunology*, **10**, 6, 1361-74.
- Ma, T. Y., Iwamoto, G. K., Hoa, N. T., Akotia, V., Pedram, A., Boivin, M. A. and Said, H. M. 2004. TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **286**, 3, G367-76.
- Makki, K., Deehan, E. C., Walter, J. and Bäckhed, F. 2018. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host & Microbe*, **23**, 6, 705-15.
- Mankertz, J., Tavalali, S., Schmitz, H., Mankertz, A., Riecken, E. O., Fromm, M. and Schulzke, J. D. 2000. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci*, **113**, 11, 2085-90.
- Marchix, J., Goddard, G. and Helmrath, M. A. 2018. Host-Gut Microbiota Crosstalk in Intestinal Adaptation. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, **6**, 2, 149-62.
- Mariadason, J. M., Barkla, D. H. and Gibson, P. R. 1997. Effect of short-chain fatty acids on paracellular permeability in Caco-2 intestinal epithelium model. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **272**, 4, G705-12.
- Martini, E., Krug, S. M., Siegmund, B., Neurath, M. F. and Becker, C. 2017. Mend Your Fences. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, **4**, 1, 33-46.
- Matsuoka, K. and Kanai, T. 2015. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Seminars in Immunopathology*, **37**, 47-55.
- Maxwell, J. R., Zhang, Y., Brown, W. A., Smith, C. L., Byrne, F. R., Fiorino, M., Stevens, E., Bigler, J., Davis, J. A., Rottman, J. B., Budelsky, A. L., Symons, A. and Towne, J. E. 2015.

REFERENCES

- Differential Roles for Interleukin-23 and Interleukin-17 in Intestinal Immunoregulation. *Immunity*, **43**, 4, 739–50.
- McDole, J. R., Wheeler, L. W., McDonald, K. G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K. A., Newberry, R. D. and Miller, M. J. 2012. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature*, **483**, 7389, 345–49.
- Megha, Sawatzki, P., Kolter, T., Bittman, R. and London, E. 2007. Effect of ceramide N-acyl chain and polar headgroup structure on the properties of ordered lipid domains (lipid rafts). *Biochimica et biophysica acta*, **1768**, 9, 2205–12.
- Mellitzer, G., Beucher, A., Lobstein, V., Michel, P., Robine, S., Kedinger, M. and Gradwohl, G. 2010. Loss of enteroendocrine cells in mice alters lipid absorption and glucose homeostasis and impairs postnatal survival. *Journal of Clinical Investigation*, **120**, 5, 1708–21.
- Miron, N. and Cristea, V. 2012. Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut: Enterocytes - from digestive to immune functions. *Clinical & Experimental Immunology*, **167**, 3, 405–12.
- Miyauchi, S., Hirasawa, A., Ichimura, A., Hara, T. and Tsujimoto, G. 2010. New Frontiers in Gut Nutrient Sensor Research: Free Fatty Acid Sensing in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Pharmacological Sciences*, **112**, 1, 19–24.
- Monteiro-Sepulveda, M., Touch, S., Mendes-Sá, C., André, S., Poitou, C., Allatif, O., Cotillard, A., Fohrer-Ting, H., Hubert, E.-L., Remark, R., Genser, L., Tordjman, J., Garbin, K., Osinski, C., Sautès-Fridman, C., Leturque, A., Clément, K. and Brot-Laroche, E. 2015. Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling. *Cell Metabolism*, **22**, 1, 113–24.
- Morampudi, V., Dalwadi, U., Bhinder, G., Sham, H. P., Gill, S. K., Chan, J., Bergstrom, K. S. B., Huang, T., Ma, C., Jacobson, K., Gibson, D. L. and Vallance, B. A. 2016. The goblet cell-derived mediator RELM- β drives spontaneous colitis in Muc2-deficient mice by promoting commensal microbial dysbiosis. *Mucosal Immunology*, **9**, 5, 1218–33.
- Morel, E., Ghezzal, S., Lucchi, G., Truntzer, C., Pais de Barros, J.-P., Simon-Plas, F., Demignot, S., Mineo, C., Shaul, P. W., Leturque, A., Rousset, M. and Carrière, V. 2018. Cholesterol trafficking and raft-like membrane domain composition mediate scavenger receptor class B type 1-dependent lipid sensing in intestinal epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1863**, 2, 199–211.
- Morrison, D. J. and Preston, T. 2016. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, **7**, 3, 189–200.
- Moschen, A. R., Adolph, T. E., Gerner, R. R., Wieser, V. and Tilg, H. 2017. Lipocalin-2: A Master Mediator of Intestinal and Metabolic Inflammation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, **28**, 5, 388–97.
- Mowat, A. M. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*, **3**, 4, 331–41.
- Muccioli, G. G., Naslain, D., Bäckhed, F., Reigstad, C. S., Lambert, D. M., Delzenne, N. M. and Cani, P. D. 2010. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Molecular Systems Biology*, **6**.
- Mukherjee, S. and Hooper, L. V. 2015. Antimicrobial Defense of the Intestine. *Immunity*, **42**, 1, 28–39.
- Nakamura, K., SAKURAGI, N., TAKAKUWA, A. and AYABE, T. 2016. Paneth cell α -defensins and enteric microbiota in health and disease. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, **35**, 2, 57–67.
- Natividad, J. M. M. and Verdu, E. F. 2013. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. *Pharmacological Research*, **69**, 1, 42–51.

REFERENCES

- Nauck, M. A. and Meier, J. J. 2018. Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **20**, 5–21.
- Niot, I. and Besnard, P. 2017. Appetite control by the tongue-gut axis and evaluation of the role of CD36/SR-B2. *Biochimie*, **136**, 27–32.
- Ogata, M., Ogita, T., Tari, H., Arakawa, T. and Suzuki, T. 2017. Supplemental psyllium fibre regulates the intestinal barrier and inflammation in normal and colitic mice. *The British Journal of Nutrition*, **118**, 9, 661–72.
- Ohno, H., Kanaya, T. and Williams, I. R. 2012. M Cell Differentiation: Distinct Lineage or Phenotypic Transition? Salmonella Provides Answers. *Cell Host & Microbe*, **12**, 5, 607–9.
- Olson, A., Diebel, L. N. and Liberati, D. M. 2015. Phosphatidylcholine and the intestinal mucus layer: in vitro efficacy against *Clostridium difficile*-associated polymorphonuclear neutrophil activation. *The American Journal of Surgery*, **209**, 3, 493–97.
- Onyiah, J. C. and Colgan, S. P. 2016. Cytokine responses and epithelial function in the intestinal mucosa. *Cellular and molecular life sciences* □: *CMLS*, **73**, 22, 4203–12.
- Osaka, M., Ito, S., Honda, M., Inomata, Y., Egashira, K. and Yoshida, M. 2016. Critical role of the C5a-activated neutrophils in high-fat diet-induced vascular inflammation. *Scientific Reports*, **6**, 1.
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. and Walsh, K. 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, **11**, 2, 85–97.
- Pais de Barros, J.-P., Gautier, T., Sali, W., Adrie, C., Choubley, H., Charron, E., Lalande, C., Le Guern, N., Deckert, V., Monchi, M., Quenot, J.-P. and Lagrost, L. 2015. Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amoebocyte lysate assay. *Journal of Lipid Research*, **56**, 7, 1363–69.
- Palomer, X., Pizarro-Delgado, J., Barroso, E. and Vázquez-Carrera, M. 2018. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **29**, 3, 178–90.
- Pearson, C., Uhlig, H. H. and Powrie, F. 2012. Lymphoid microenvironments and innate lymphoid cells in the gut. *Trends in Immunology*, **33**, 6, 289–96.
- Petersson, J., Schreiber, O., Hansson, G. C., Gendler, S. J., Velcich, A., Lundberg, J. O., Roos, S., Holm, L. and Phillipson, M. 2011. Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, **300**, 2, G327–33.
- Petit, C. S. V., Barreau, F., Besnier, L., Gandille, P., Riveau, B., Chateau, D., Roy, M., Berrebi, D., Svrcek, M., Cardot, P., Rousset, M., Clair, C. and Thenet, S. 2012. Requirement of Cellular Prion Protein for Intestinal Barrier Function and Mislocalization in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, **143**, 1, 122-132.e15.
- Petit, C. S. V., Besnier, L., Morel, E., Rousset, M. and Thenet, S. 2013. Roles of the cellular prion protein in the regulation of cell-cell junctions and barrier function. *Tissue Barriers*, **1**, 2, e24377.
- Petit, V., Niot, I., Poirier, H. and Besnard, P. 2007. Absorption intestinale des acides gras: faits et incertitudes. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **21**, 1, 38–45.
- Phillipson, M., Johansson, M. E. V., Henriksnäs, J., Petersson, J., Gendler, S. J., Sandler, S., Persson, A. E. G., Hansson, G. C. and Holm, L. 2008. The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **295**, 4, G806–12.
- Psichas, A., Reimann, F. and Gribble, F. M. 2015. Gut chemosensing mechanisms. *Journal of Clinical Investigation*, **125**, 3, 908–17.

REFERENCES

- Quévrain, E. and Seksik, P. 2013. Microbiote intestinal: de la diarrhée post-antibiotiques aux maladies inflammatoires intestinales. *La Presse Médicale*, **42**, 1, 45–51.
- Rajilić-Stojanović, M. and de Vos, W. M. 2014. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *Fems Microbiology Reviews*, **38**, 5, 996–1047.
- RAO, R. K., BASUROY, S., RAO, V. U., KARNAKY, K. J. and GUPTA, A. 2002. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin–ZO-1 and E-cadherin– β -catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. 11.
- Ravussin, Y., Koren, O., Spor, A., LeDuc, C., Gutman, R., Stombaugh, J., Knight, R., Ley, R. E. and Leibel, R. L. 2012. Responses of Gut Microbiota to Diet Composition and Weight Loss in Lean and Obese Mice. *Obesity*, **20**, 4, 738–47.
- Reid, D. T., Reyes, J. L., McDonald, B. A., Vo, T., Reimer, R. A. and Eksteen, B. 2016. Kupffer Cells Undergo Fundamental Changes during the Development of Experimental NASH and Are Critical in Initiating Liver Damage and Inflammation P. Strnad (ed). *PLOS ONE*, **11**, 7, e0159524.
- Reunanen, J., Kainulainen, V., Huuskonen, L., Ottman, N., Belzer, C., Huhtinen, H., de Vos, W. M. and Satokari, R. 2015. Akkermansia muciniphila Adheres to Enterocytes and Strengthens the Integrity of the Epithelial Cell Layer. *Applied and Environmental Microbiology*, **81**, 11, 3655–62.
- Rodriguez-Cuenca, S., Barbarroja, N. and Vidal-Puig, A. 2015. Dihydroceramide desaturase 1, the gatekeeper of ceramide induced lipotoxicity. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1851**, 1, 40–50.
- Röhe, I., Hüttner, F. J., Plendl, J., Drewes, B. and Zentek, J. 2018. Comparison of different histological protocols for the preservation and quantification of the intestinal mucus layer in pigs. *European Journal of Histochemistry*: *EJH*, **62**, 1.
- Rolhion, N. and Chassaing, B. 2016. When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **371**, 1707.
- Rossi, O., Karczewski, J., Stolte, E. H., Brummer, R. J. M., van Nieuwenhoven, M. A., Meijerink, M., van Neerven, J. R. J., van Ijzendoorn, S. C. D., van Baarlen, P. and Wells, J. M. 2013. Vectorial secretion of interleukin-8 mediates autocrine signalling in intestinal epithelial cells via apically located CXCR1. *BMC Research Notes*, **6**, 1, 431.
- Russell, W. R., Gratz, S. W., Duncan, S. H., Holtrop, G., Ince, J., Scobbie, L., Duncan, G., Johnstone, A. M., Lopley, G. E., Wallace, R. J., Duthie, G. G. and Flint, H. J. 2011. High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **93**, 5, 1062–72.
- Saddar, S., Carriere, V., Lee, W.-R., Tanigaki, K., Yuhanna, I. S., Parathath, S., Morel, E., Warrior, M., Sawyer, J. K., Gerard, R. D., Temel, R. E., Brown, J. M., Connelly, M., Mineo, C. and Shaul, P. W. 2013. Scavenger Receptor Class B Type I Is a Plasma Membrane Cholesterol Sensor. *Circulation Research*, **112**, 1, 140–51.
- Samak, G., Chaudhry, K. K., Gangwar, R., Narayanan, D., Jaggar, J. H. and Rao, R. 2015. Calcium-Ask1-MKK7-JNK2-c-Src Signaling Cascade Mediates Disruption of Intestinal Epithelial Tight Junctions by Dextran Sulfate Sodium. *The Biochemical journal*, **465**, 3, 503–15.
- Sanctuary, M. R., Kain, J. N., Angkustsiri, K. and German, J. B. 2018. Dietary Considerations in Autism Spectrum Disorders: The Potential Role of Protein Digestion and Microbial Putrefaction in the Gut-Brain Axis. *Frontiers in Nutrition*, **5**.
- Sapone, A., de Magistris, L., Pietzak, M., Clemente, M. G., Tripathi, A., Cucca, F., Lampis, R., Kryszak, D., Carteni, M., Generoso, M., Iafusco, D., Prisco, F., Laghi, F., Riegler, G., Carratu, R., Counts, D. and Fasano, A. 2006. Zonulin Upregulation Is Associated With Increased Gut Permeability in Subjects With Type 1 Diabetes and Their Relatives. *Diabetes*, **55**, 5, 1443–49.

REFERENCES

- Sarathy, J., Detloff, S. J., Ao, M., Khan, N., French, S., Sirajuddin, H., Nair, T. and Rao, M. C. 2017. The Yin and Yang of bile acid action on tight junctions in a model colonic epithelium. *Physiological Reports*, **5**, 10.
- Schneider, H., Braun, A., Füllekrug, J., Stremmel, W. and Eehalt, R. 2010. Lipid Based Therapy for Ulcerative Colitis—Modulation of Intestinal Mucus Membrane Phospholipids as a Tool to Influence Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, **11**, 10, 4149–64.
- Seidelin, J. B., Coskun, M., Kvist, P. H., Holm, T. L., Holgersen, K. and Nielsen, O. H. 2015. IL-33 promotes GATA-3 polarization of gut-derived T cells in experimental and ulcerative colitis. *Journal of Gastroenterology*, **50**, 2, 180–90.
- Shawki, A. and McCole, D. F. 2016. Mechanisms of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Adherent-Invasive Escherichia coli. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, **3**, 1, 41–50.
- Shen, L., Black, E. D., Witkowski, E. D., Lencer, W. I., Guerriero, V., Schneeberger, E. E. and Turner, J. R. 2006. Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *Journal of Cell Science*, **119**, 10, 2095–2106.
- Shen, L., Weber, C. R., Raleigh, D. R., Yu, D. and Turner, J. R. 2011. Tight Junction Pore and Leak Pathways: A Dynamic Duo. *Annual review of physiology*, **73**, 283–309.
- Shen, W.-J., Asthana, S., Kraemer, F. B. and Azhar, S. 2018. Scavenger receptor B type 1: expression, molecular regulation, and cholesterol transport function. *Journal of Lipid Research*, **59**, 7, 1114–31.
- Shreiner, A. B., Kao, J. Y. and Young, V. B. 2015. The gut microbiome in health and in disease. *Current opinion in gastroenterology*, **31**, 1, 69–75.
- Siskind, L. J. 2005. Mitochondrial Ceramide and the Induction of Apoptosis. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **37**, 3, 143–53.
- Siskind, L. J., Kolesnick, R. N. and Colombini, M. 2002. Ceramide Channels Increase the Permeability of the Mitochondrial Outer Membrane to Small Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 30, 26796–803.
- Sovran, B., Loonen, L. M. P., Lu, P., Hugenholtz, F., Belzer, C., Stolte, E. H., Boekschoten, M. V., van Baarlen, P., Kleerebezem, M., de Vos, P., Dekker, J., Renes, I. B. and Wells, J. M. 2015. IL-22-STAT3 Pathway Plays a Key Role in the Maintenance of Ileal Homeostasis in Mice Lacking Secreted Mucus Barrier. *Inflammatory Bowel Diseases*, **21**, 3, 531–42.
- Srivastava, A., Gupta, J., Kumar, S. and Kumar, A. 2017. Gut biofilm forming bacteria in inflammatory bowel disease. *Microbial Pathogenesis*, **112**, 5–14.
- Stadnyk, A. W. 2002. Intestinal Epithelial Cells as a Source of Inflammatory Cytokines and Chemokines. *Canadian Journal of Gastroenterology*, **16**, 4, 241–46.
- Stahl, A. 2001. Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **12**, 6, 266–73.
- Stolarczyk, E. 2017. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Current Opinion in Pharmacology*, **37**, 35–40.
- Straczkowski, M., Dzienis-Straczkowska, S., Stępień, A., Kowalska, I., Szelachowska, M. and Kinalska, I. 2002. Plasma Interleukin-8 Concentrations Are Increased in Obese Subjects and Related to Fat Mass and Tumor Necrosis Factor- α System. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **87**, 10, 4602–6.
- Stremmel, W. 2005. Retarded release phosphatidylcholine benefits patients with chronic active ulcerative colitis. *Gut*, **54**, 7, 966–71.
- Su, L., Shen, L., Clayburgh, D. R., Nalle, S. C., Sullivan, E. A., Meddings, J. B., Abraham, C. and Turner, J. R. 2009a. Targeted Epithelial Tight Junction Dysfunction Causes Immune

REFERENCES

- Activation and Contributes to Development of Experimental Colitis. *Gastroenterology*, **136**, 2, 551–63.
- Su, L., Shen, L., Clayburgh, D. R., Nalle, S. C., Sullivan, E. A., Meddings, J. B., Abraham, C. and Turner, J. R. 2009b. Targeted Epithelial Tight Junction Dysfunction Causes Immune Activation and Contributes to Development of Experimental Colitis. *Gastroenterology*, **136**, 2, 551–63.
- Suzuki, K. and Nakajima, A. 2014. New aspects of IgA synthesis in the gut. *International Immunology*, **26**, 9, 489–94.
- Svendsen, B., Pedersen, J., Albrechtsen, N. J. W., Hartmann, B., Torång, S., Rehfeld, J. F., Poulsen, S. S. and Holst, J. J. 2015. An Analysis of Cosecretion and Coexpression of Gut Hormones From Male Rat Proximal and Distal Small Intestine. *Endocrinology*, **156**, 3, 847–57.
- Tahoun, A., Mahajan, S., Paxton, E., Malterer, G., Donaldson, D. S., Wang, D., Tan, A., Gillespie, T. L., O’Shea, M., Roe, A. J., Shaw, D. J., Gally, D. L., Lengeling, A., Mabbott, N. A., Haas, J. and Mahajan, A. 2012. Salmonella Transforms Follicle-Associated Epithelial Cells into M Cells to Promote Intestinal Invasion. *Cell Host & Microbe*, **12**, 5, 645–56.
- Tan, D. W.-M. and Barker, N. 2014. Chapter Three - Intestinal Stem Cells and Their Defining Niche. In M. Rendl (ed), *Current Topics in Developmental Biology*. Stem Cells in Development and Disease. Academic Press, 77–107.
- Tannock, L. R., Beer, M. C. D., Ji, A., Shridas, P., Noffsinger, V. P., Hartigh, L. den, Chait, A., Beer, F. C. D. and Webb, N. R. 2018. Serum amyloid A3 is a high density lipoprotein-associated acute-phase protein. *Journal of Lipid Research*, **59**, 2, 339–47.
- Teller, I. C. and Beaulieu, J.-F. 2001. Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, **3**, 24.
- Tomas, J., Mulet, C., Saffarian, A., Cavin, J.-B., Ducroc, R., Regnault, B., Kun Tan, C., Duszka, K., Burcelin, R., Wahli, W., Sansonetti, P. J. and Pédrón, T. 2016. High-fat diet modifies the PPAR- γ pathway leading to disruption of microbial and physiological ecosystem in murine small intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**, 40, E5934–43.
- Tran, T. T. T., Poirier, H., Clément, L., Nassir, F., Pelsers, M. M. A. L., Petit, V., Degrace, P., Monnot, M.-C., Glatz, J. F. C., Abumrad, N. A., Besnard, P. and Niot, I. 2011. Luminal Lipid Regulates CD36 Levels and Downstream Signaling to Stimulate Chylomicron Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 28, 25201–10.
- Tran, T. T. T., Postal, B. G., Demignot, S., Ribeiro, A., Osinski, C., Pais de Barros, J.-P., Blachnio-Zabielska, A., Leturque, A., Rousset, M., Ferré, P., Hajduch, E. and Carrière, V. 2016. Short Term Palmitate Supply Impairs Intestinal Insulin Signaling via Ceramide Production. *The Journal of Biological Chemistry*, **291**, 31, 16328–38.
- Travassos, L. H., Carneiro, L. A. M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.-G., Magalhães, J. G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., Boneca, I. G., Allaoui, A., Jones, N. L., Nuñez, G., Girardin, S. E. and Philpott, D. J. 2010. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nature Immunology*, **11**, 1, 55–62.
- Tremblay, S., Romain, G., Roux, M., Chen, X.-L., Brown, K., Gibson, D. L., Ramanathan, S. and Menendez, A. 2017. Bile Acid Administration Elicits an Intestinal Antimicrobial Program and Reduces the Bacterial Burden in Two Mouse Models of Enteric Infection. *Infection and Immunity*, **85**, 6.
- Tsai, P.-Y., Zhang, B., He, W.-Q., Zha, J.-M., Odenwald, M. A., Singh, G., Tamura, A., Shen, L., Sailer, A., Yeruva, S., Kuo, W.-T., Fu, Y.-X., Tsukita, S. and Turner, J. R. 2017. IL-22 Upregulates Epithelial Claudin-2 to Drive Diarrhea and Enteric Pathogen Clearance. *Cell Host & Microbe*, **21**, 6, 671-681.e4.

REFERENCES

- Turner, J. R., Buschmann, M. M., Romero-Calvo, I., Sailer, A. and Shen, L. 2014. The role of molecular remodeling in differential regulation of tight junction permeability. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **36**, 204–12.
- Uchida, Y. 2014. Ceramide signaling in mammalian epidermis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1841**, 3, 453–62.
- Vachon, P. H. 2018. Methods for Assessing Apoptosis and Anoikis in Normal Intestine/Colon and Colorectal Cancer. In J.-F. Beaulieu (ed), *Colorectal Cancer*. Springer New York, New York, NY, 99–137.
- Van der Sluis, M., De Koning, B. A. E., De Bruijn, A. C. J. M., Velcich, A., Meijerink, J. P. P., Van Goudoever, J. B., Büller, H. A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I. B. and Einerhand, A. W. C. 2006. Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology*, **131**, 1, 117–29.
- Vaughn, A. C., Cooper, E. M., DiLorenzo, P. M., O’Loughlin, L. J., Konkel, M. E., Peters, J. H., Hajnal, A., Sen, T., Lee, S. H., de La Serre, C. B. and Czaja, K. 2017. Energy-dense diet triggers changes in gut microbiota, reorganization of gut-brain vagal communication and increases body fat accumulation. *Acta neurobiologiae experimentalis*, **77**, 1, 18–30.
- Vernon, G., Baranova, A. and Younossi, Z. M. 2011. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults: Systematic review: epidemiology of NAFLD and NASH. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **34**, 3, 274–85.
- Vetrano, S., Rescigno, M., Rosaria Cera, M., Correale, C., Rumio, C., Doni, A., Fantini, M., Sturm, A., Borroni, E., Repici, A., Locati, M., Malesci, A., Dejana, E. and Danese, S. 2008. Unique Role of Junctional Adhesion Molecule-A in Maintaining Mucosal Homeostasis in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, **135**, 1, 173–84.
- Villanueva-Millán, M. J., Pérez-Matute, P. and Oteo, J. A. 2015. Gut microbiota: a key player in health and disease. A review focused on obesity. *Journal of Physiology and Biochemistry*, **71**, 3, 509–25.
- Vors, C., Pineau, G., Draï, J., Meugnier, E., Pesenti, S., Laville, M., Laugerette, F., Malpuech-Brugère, C., Vidal, H. and Michalski, M.-C. 2015. Postprandial Endotoxemia Linked With Chylomicrons and Lipopolysaccharides Handling in Obese Versus Lean Men: A Lipid Dose-Effect Trial. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **100**, 9, 3427–35.
- Wagner, C., Bonnardel, J., Da Silva, C., Martens, L., Gorvel, J.-P. and Lelouard, H. 2018. Some news from the unknown soldier, the Peyer’s patch macrophage. *Cellular Immunology*.
- Wahlström, A., Sayin, S. I., Marschall, H.-U. and Bäckhed, F. 2016. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metabolism*, **24**, 1, 41–50.
- Wang, B., Yao, M., Lv, L., Ling, Z. and Li, L. 2017. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*, **3**, 1, 71–82.
- Wang, H.-B., Wang, P.-Y., Wang, X., Wan, Y.-L. and Liu, Y.-C. 2012. Butyrate Enhances Intestinal Epithelial Barrier Function via Up-Regulation of Tight Junction Protein Claudin-1 Transcription. *Digestive Diseases and Sciences*, **57**, 12, 3126–35.
- Wéra, O., Lancellotti, P. and Oury, C. 2016. The Dual Role of Neutrophils in Inflammatory Bowel Diseases. *Journal of Clinical Medicine*, **5**, 12, 118.
- Westphal, J. K., Dörfel, M. J., Krug, S. M., Cording, J. D., Piontek, J., Blasig, I. E., Tauber, R., Fromm, M. and Huber, O. 2010. Tricellulin forms homomeric and heteromeric tight junctional complexes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**, 12, 2057–68.
- Wine, E., Ossa, J. C., Gray-Owen, S. D. and Sherman, P. M. 2009. Adherent-invasive Escherichia coli, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia. *BMC Microbiology*, **9**, 1, 180.

REFERENCES

- Wu, H. and Ballantyne, C. M. 2017. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *Journal of Clinical Investigation*, **127**, 1, 43–54.
- Xie, Y. 2006. Compensatory Increase in Hepatic Lipogenesis in Mice with Conditional Intestine-specific Mttp Deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 7, 4075–86.
- Yakovich, A. J., Huang, Q., Du, J., Jiang, B. and Barnard, J. A. 2010. Vectorial TGFbeta signaling in polarized intestinal epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, **224**, 2, 398–404.
- Yang, I.-H., Wong, J.-H., Chang, C.-M., Chen, B.-K., Tsai, Y.-T., Chen, W.-C., Wang, E. T., Hsu, W.-L. and Chang, W.-C. 2015. Involvement of Intracellular Calcium Mobilization in IL-8 Activation in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **56**, 2, 761–69.
- Yeager, M. and Harris, A. L. 2007. Gap junction channel structure in the early 21st century: facts and fantasies. *Current Opinion in Cell Biology*, **19**, 5, 521–28.
- Yu, C., Alterman, M. and Dobrowsky, R. T. 2005. Ceramide displaces cholesterol from lipid rafts and decreases the association of the cholesterol binding protein caveolin-1. *Journal of Lipid Research*, **46**, 8, 1678–91.
- Yu, H., Huang, X., Ma, Y., Gao, M., Wang, O., Gao, T., Shen, Y. and Liu, X. 2013. Interleukin-8 Regulates Endothelial Permeability by Down-regulation of Tight Junction but not Dependent on Integrins Induced Focal Adhesions. *International Journal of Biological Sciences*, **9**, 9, 966–79.
- Zenewicz, L. A. 2018. IL-22: There Is a Gap in Our Knowledge. *ImmunoHorizons*, **2**, 6, 198–207.
- Zhang, H.-S., Chen, Y., Fan, L., Xi, Q.-L., Wu, G.-H., Li, X.-X., Yuan, T.-L., He, S.-Q., Yu, Y., Shao, M.-L., Liu, Y., Bai, C.-G., Ling, Z.-Q., Li, M., Liu, Y. and Fang, J. 2015. The Endoplasmic Reticulum Stress Sensor IRE1 α in Intestinal Epithelial Cells Is Essential for Protecting against Colitis. *The Journal of Biological Chemistry*, **290**, 24, 15327–36.
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K. and Balda, M. S. 2016. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **17**, 9, 564–80.

ANNEXE



> Les doctorants organisateurs de ces journées proposent un résumé des principaux événements scientifiques qui se sont déroulés les 25 et 26 mai 2016 au centre de recherche des Cordeliers (CRC) lors des journées de l'École « physiologie, physiopathologie et thérapeutique » (ED 394). Outre la présentation de leurs travaux scientifiques lors des sessions « communications orales » et « posters », les participants ont entendu une conférence plénière du Professeur Pierre Corvol sur l'intégrité scientifique et participé à une table ronde consacrée à la médiation scientifique. Ces deux conférences ont permis d'échanger les points de vue sur ces problématiques actuelles. <

Partenariat médecine/sciences - Écoles doctorales (5)

**Nos jeunes pousses
ont du talent !**



Ce travail de rédaction a été encadré par Isabelle Cremer et Catherine Monnot, directrice et directrice adjointe de l'ED394.

isabelle.cremer@crc.jussieu.fr

catherine.monnot@college-de-france.fr

Série coordonnée par Laure Coulombel.

COMPTE RENDU DE CONGRÈS

Les journées 2016 de l'école doctorale « physiologie, physiopathologie et thérapeutique » de l'Université Pierre et Marie Curie*

Sami Ayari¹, Cécile Bandet², Marion Dajon³, Ray El Boustany⁴, Sara Ghezzal¹, Annaelle Jarossay⁵, Hélène Kaplon³, Barbara Postal¹, Élodie Pramil⁶, Jules Russick⁵, pour le comité d'organisation des journées

Des résultats scientifiques à l'honneur !

Les doctorants ont récompensé les présentations de plusieurs de leurs collègues dans les domaines de la physiologie cardio-vasculaire, de l'inflammation, des pathologies virales et génétiques ou de la fonction intestinale, sélectionnées sur l'intérêt scientifique et la qualité de la présentation (orale ou poster).

* « L'école doctorale physiologie, physiopathologie et thérapeutique (P2T)/ED394 est une école doctorale accréditée par l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC) et associée à l'Institut Pasteur, l'Institut Curie, l'INRA, l'IRSN et le Collège de France. Cette école doctorale est pluridisciplinaire, regroupant environ 250 doctorants dans le domaine des sciences de la vie avec une forte composante en biologie, médecine et santé ». (présentation tirée du site http://www.ed394.upmc.fr/fr/l_ecole_doctorale.html).

• *Un modèle murin d'hypertension d'origine sympathique.* L'intervention d'Émilie Simonnet¹ a été très remarquée. Dans le cadre de son projet de thèse, Émilie a mis en évidence le rôle crucial de l'innervation sympathique des artérioles. Celle-ci participe à la régulation de leur diamètre, et donc du flux sanguin dans les tissus périphériques. Émilie a en effet démontré *in vitro* et *in vivo* que lorsque l'innervation

¹ Équipe « développement et physiologie des interactions neurovasculaires », Inserm U1050 - UMR7241 CNRS, Centre interdisciplinaire de recherche en biologie, Collège de France.

¹Équipe « physiopathologies intestinales : nutrition et fonction de barrière », UMRS 1138 (Armelle Leturque), centre de recherche des Cordeliers, Paris, France ; ²équipe « pathogenèse cellulaire et clinique du diabète », UMRS 1138 (Fabienne Foufelle), Centre de recherche des Cordeliers ; ³ équipe « Cancer et immunité anti-tumorale », UMRS 1138, (Isabelle Cremer et Jean-Luc Teillaud), Centre de recherche des Cordeliers ; ⁴équipe « Physiopathologie et thérapeutiques des maladies vasculaires et rénales liées au diabète et à la nutrition » (Ronan Roussel), Centre de recherche des Cordeliers ; ⁵équipe « Immunopathologie et immuno-intervention thérapeutique » UMRS 1138 (Sébastien Lacroix-Desmazes), Centre de recherche des Cordeliers ; ⁶équipe « Mort cellulaire et résistance aux traitements dans les hémopathies malignes » UMRS 1138 (Santos A. Susin), Centre de recherche des Cordeliers, Paris, France.

artérielle se met en place, les artères expriment une molécule de guidage axonale, l'éphrine-A4, qui possède une action répulsive sur les neurones sympathiques. Les souris génétiquement inactivées pour le récepteur Ephrine-A4 présentent donc une innervation artérielle accrue, associée à une hypertension. Ces souris pourraient ainsi constituer le premier modèle murin d'hypertension d'origine sympathique, permettant de tester de nouvelles voies thérapeutiques dans le traitement de l'hypertension artérielle.

• *Récepteur des minéralocorticoïdes et inflammation.* Mathieu Buonafine² a démontré que dans les cellules dendritiques, l'activation du récepteur aux minéralocorticoïdes par l'aldostérone jouait un rôle fondamental au cours de l'inflammation observée lors d'une hypertension induite par l'aldostérone chez la souris. Il a pu mettre en évidence, grâce à des modèles de souris transgéniques, que cet effet implique la protéine *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, dont le rôle est encore mal connu. Cette dernière pourrait jouer un rôle majeur dans la médiation des effets pathologiques de l'activation du récepteur aux minéralocorticoïdes, notamment lorsqu'elle est exprimée par certains types de cellules immunitaires.

• *Réponses immunitaires différentielles et statut des patients VIH.* Concernant les pathologies virales, deux travaux portant sur le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) se sont particulièrement démarqués. Tout d'abord, Angeline Rouers³ a montré que la fonctionnalité des lymphocytes T folliculaires *helper* (Tfh) était altérée lors de l'infection par le VIH. Elle a également démontré que dans le sang des patients *elite controllers*⁴, la réponse des lymphocytes B mémoires anti-VIH était maintenue, contrairement à celle des patients non *controllers* traités. Reste à savoir si chez ces patients *elite controllers*, les fonctionnalités des Tfh sont également intactes. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires lors de l'infection par le VIH pourrait contribuer à l'élaboration de nouvelles stratégies vaccinales anti-VIH.

• *Macrophages et contrôle du réservoir du VIH.* Ester Gea-Mallorqui⁵ a mon-

tré que les macrophages font partie des cellules réservoirs qui empêchent l'éradication complète du VIH. Le VIH-2, très semblable au VIH-1, est mieux contrôlé par le système immunitaire. L'objectif du travail d'Esther est d'analyser cette différence, et notamment de comparer des macrophages infectés *in vitro* par l'un ou l'autre de ces deux virus. Ce travail a permis d'identifier des différences majeures de la distribution dans les macrophages d'une protéine virale, la production virale et la transmission aux lymphocytes T du virus présent dans les macrophages. La connaissance de ces différences pourrait contribuer à un meilleur contrôle de l'infection par le VIH-2.

• *Une nouvelle stratégie thérapeutique dans la mucoviscidose ?* Dans le domaine de la génétique, le travail de Florence Sonnevill⁶ porte sur la mucoviscidose : il démontre que le canal chlorure ANO1 (*anoctamin-1*) pourrait être un canal alternatif pour compenser la protéine déficiente (le canal chlorure CFTR, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Florence a montré que le microARN miR-9 inhibe le gène *ANO1*. Pour lever cette inhibition, une molécule spécifique a été synthétisée : le TSB ANO1. Dans le contexte de la mucoviscidose (modèles de lignées cellulaires épithéliales bronchiques, ou de cultures de cellules primaires issues de patients et de souris), cette molécule restaure les efflux de chlorure ainsi que de nombreux paramètres dérégulés *in vitro* et *in vivo*. Lever l'inhibition de l'expression de cette protéine pourrait donc être considéré comme une nouvelle stratégie thérapeutique.

• *Absorption des sucres intestinaux.* Enfin, dans la thématique métabolisme et nutrition, le travail de Charlotte Schmitt⁷ a été récompensé. Il porte sur les mécanismes de contrôle des fonc-

tions intestinales dans l'obésité et le diabète. Charlotte s'intéresse en particulier à l'absorption intestinale des sucres alimentaires, fonction vitale pour l'organisme. Elle a montré que le transporteur GLUT2 est impliqué dans l'absorption des sucres et dans la plasticité des cellules endocrines de l'intestin.

• *Cellules immunitaires intestinales et obésité.* Sothea Touch⁸ présentait un poster sur le rôle des cellules immunitaires intestinales dans la physiopathologie de l'obésité. Ses résultats ont révélé l'importance du recrutement des cellules immunitaires contribuant à l'inflammation dans cette pathologie. Elle a entrepris une étude des cellules immunitaires sanguines et intestinales de sujets obèses, qui démontre l'altération globale de l'immunité dans ces deux compartiments. Ces données sont actuellement confrontées aux paramètres cliniques et à la composition du microbiote intestinal à la recherche d'un lien entre les modifications du microbiote, l'état inflammatoire et les dysfonctions métaboliques liés à l'obésité humaine.

Le respect de l'intégrité scientifique : une conférence de Pierre Corvol

Docteur en médecine et chercheur, Pierre Corvol, professeur émérite (chaire de médecine expérimentale) et ancien administrateur du Collège de France, vice-président de l'Académie des Sciences, a été chargé par le ministre de l'Enseignement supérieur et de la Recherche d'établir un rapport sur l'intégrité scientifique et de faire des recommandations pour la promouvoir. Il est intervenu lors d'une séance plénière des Journées de notre École doctorale « physiologie, physiopathologie et thérapeutique » sur ce sujet de grande actualité, la formation des doctorants à l'intégrité scientifique étant désormais stipulée dans l'arrêté du 25 mai 2016 fixant le cadre national de la formation

² Équipe « récepteur minéralocorticoïde : physiologie et innovations thérapeutiques », UMR51138 Inserm, centre de recherche des Cordeliers.

³ Équipe « immunobiologie des infections virales et présentation des antigènes », Inserm U1135, CR7 UMRS UPMC, centre de recherche immunologie et maladies infectieuses (CIMI).

⁴ Sur cette dénomination, voir la Nouvelle de V. Martinez et B. Autran, *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 7-9.

⁵ Équipe « transport intracellulaire et immunité », Inserm U932, Institut Curie.

⁶ Équipe « mucoviscidose : physiopathologie et phéno-génomique », UMR5938 Inserm, Centre de recherche Saint Antoine.

⁷ Équipe « physiopathologies intestinales : nutrition et fonction de barrière », UMR51138 Inserm, centre de recherche des Cordeliers.

⁸ Équipe « nutriOMICS », Inserm U1166, ICAN, hôpital la Pitié-Salpêtrière.



conduisant à la délivrance du diplôme national de doctorat.

Lors de son intervention, Pierre Corvol a défini l'intégrité scientifique puis en a exposé les enjeux. Rapidement, il a lancé un dialogue constructif avec les doctorants sur l'importance de l'intégrité scientifique dans notre travail au quotidien. En effet, la recherche scientifique se doit de contribuer à faire évoluer les connaissances de la Science de façon honnête et intègre. La communauté scientifique, et plus largement la société, doivent avoir confiance dans les différents résultats publiés. Le débat sur l'intégrité scientifique a permis de pointer du doigt des méconduites scientifiques, voire des fraudes. Nous avons pu échanger nos points de vue concernant l'arrangement ou la falsification des données, telle que l'augmentation de l'échantillonnage de façon factice pour rendre un résultat statistiquement significatif. Nous avons conclu que ce genre de pratiques est considéré comme une fraude. De plus, ces pratiques peuvent avoir un impact néfaste et important dans les domaines de la santé et de l'environnement. Le coût financier qu'elles peuvent engendrer est loin d'être négligeable pour la société. Nous avons également discuté d'une autre problématique concernant l'intégrité scientifique, le plagiat. N'oublions pas que le plagiat est une forme de méconduite assez répandue et qui fait l'objet de sanctions. Ce comportement peut conduire à des poursuites pénales. Les causes des dérives évoquées ci-dessus sont multiples. Entre 2010 et 2015, dans 27 universités et 8 établissements de recherche en France et à l'international, il a été relevé 22 falsifications de données ; 46 cas de plagiat ; 6 conflits d'intérêt. Par ailleurs, la surinterprétation de données ou de résultats publiés peut conduire à émettre des conclusions scientifiques erronées. Toutes ces formes de méconduites peuvent être motivées par des enjeux de carrière, notamment l'obtention d'un poste stable chez le jeune chercheur, mais

aussi par la recherche de financement ou encore par un besoin de reconnaissance. Afin de contrôler et de pouvoir repérer ce type de comportement, la communauté scientifique internationale a élaboré des codes ou des chartes. De ce fait en 2011, *The European Code of Conduct for Research Integrity*⁹ a été mis en place. En 2015, les universités et les principaux organismes de recherche en France ont signé une charte nationale de déontologie des métiers de la recherche¹⁰. D'autres moyens ont également été développés pour lutter contre tous ces manquements à l'intégrité, notamment sur les réseaux sociaux (<https://www.pubpeer.com> et <https://www.retractionwatch.com>). Ainsi, cela permet de repérer et de diffuser les diverses falsifications de données dans un article. En effet, certains auteurs prétendent avoir réalisé leur expérience en « triplicate », or la figure correspondant à la dite expérience ne présente ni moyenne ni barre d'erreur.

L'accès aux données brutes de la recherche et le projet de Loi « Pour une République numérique¹¹ » devraient contribuer à une recherche intègre et responsable. Enfin, rappelons que c'est à chaque scientifique qu'incombe la responsabilité d'avoir une conduite exemplaire et de produire une science pleinement intègre. Cette conférence a permis de souligner l'importance de la génération et de la divulgation de données scientifiques originales fiables pour la société d'aujourd'hui et de demain.

Transmettre la science : un enjeu de société

Nous avons également choisi d'organiser une table ronde sur le thème de

la médiation scientifique. Nous avons souhaité ouvrir le débat sur les enjeux de la communication scientifique avec les doctorants et nos invités qui en ont fait leur métier. Cette table ronde a été animée par Ange Ansur (coordinatrice éducative « Les Savanturiers¹² »), Mathieu Buonafine (doctorant et grand vainqueur national du concours « Ma thèse en 180 secondes¹³ »), Anne Nassif (directrice de publication de « Nutrimedia¹⁴ ») et Noémie Naguet (chargée de communication au CNRS et à « L'esprit sorcier¹⁵ »).

Le profil varié des invités a rapidement soulevé la question suivante : qui est le mieux placé aujourd'hui pour informer le public de la science ?

En effet, de nombreuses formations permettent d'accéder au métier de médiateur scientifique et les scientifiques ne sont plus les seuls acteurs de la communication scientifique. Noémie Naguet explique avoir suivi une formation en communication pendant un an avec le Cnam (centre national des arts et métiers) car elle souhaitait obtenir la légitimité de pouvoir faire de la communication scientifique après l'obtention de son doctorat en biologie. De même, Ange Ansur dévoile un parcours de traductrice avant de devenir professeure des écoles et de se mettre au service des Savanturiers. Les moyens de communication (vidéos publiées sur Internet, réseaux sociaux, blogs, milieux associatifs, etc.) sont de plus en plus nombreux et permettent de s'adresser à un public plus large (sans qu'une formation scientifique soit indispensable). Leur multiplication témoigne du besoin de diversité des stratégies de communication afin de combler le fossé qui s'est installé entre les scientifiques et le public. Les enjeux sont multiples et loin d'être négligeables. La médiation scientifique intervient non seulement

⁹ Document téléchargeable à l'adresse : http://ec.europa.eu/research/participants/data/ref/h2020/other/hi/h2020-ethics_code-of-conduct_en.pdf

¹⁰ Document téléchargeable à l'adresse : http://www.cnrs.fr/comets/IMG/pdf/charte_nationale_deontologie_signe_e_janvier2015.pdf

¹¹ LOI n° 2016-1321 du 7 octobre 2016 pour une République numérique. Voir le site légifrance <https://www.legifrance.gouv.fr/affichLoiPubliee.do?idDocument=JORFDOLE000031589829&type=general&legislature=14>

¹² <http://les-savanturiers.cri-paris.org/>

¹³ <http://mt180.fr/>

¹⁴ <http://www.nutrimedia.fr/>

¹⁵ <http://www.lespritsorcier.org/>

pour transmettre le savoir mais également pour répondre à des questions d'ordre sociétal. La situation est parfois délicate comme le montre une enquête de l'Institut d'études d'opinion Ipsos, qui a révélé que certains Français ne font plus confiance aux scientifiques quand il s'agit de dire la vérité sur leurs résultats et leurs travaux. Un étudiant présent dans la salle a tenu à rappeler une polémique récente illustrant la défiance des Français vis-à-vis de l'innocuité des vaccins, notamment ceux qui contiennent des sels d'aluminium utilisés comme adjuvant et suspectés de déclencher une myopathie inflammatoire : la myofasciite à macrophages. D'aucuns se sont interrogés sur la rigueur de la vulgarisation scientifique. À force de trop vouloir simplifier le contenu scientifique, le risque est réel de déformer les propos initiaux quel que soit le public auquel on s'adresse. Ces questions ont ensuite laissé place à de nouvelles interrogations sur les contenus scientifiques du Palais de la découverte ou bien de la Cité des sciences : ceux-ci sont très souvent destinés aux enfants étant donné que de moins en moins d'adultes se rendent dans des musées ayant pour thématique les sciences. En effet, une sorte de cercle vicieux s'est installé : plus les enfants sont nombreux, plus les contenus scientifiques seront adaptés aux enfants, ce qui aura pour conséquence d'attirer encore plus d'enfants et ainsi de suite. Cette tendance génère une base solide d'accès aux sciences pour les enfants, et donc la société à venir, mais ne permet pas de remédier à la méfiance vis-à-vis des sciences des adultes de la société actuelle.

Une réflexion a également été engagée sur les moyens qui pourraient être mis en place pour inciter davantage les gens et les chercheurs à s'investir dans des actions de médiation scientifique. Comment les activités de médiation scientifique d'un chercheur peuvent-elles être évaluées par les instances d'évaluation des organismes de recherche et comment peut-on juger ces activités ? Certains scientifiques estiment que la publication des résultats de leurs travaux fait office de médiation scientifique, d'autres leur font remarquer que ces publications ne sont compréhensibles que par leurs pairs et restent incompréhensibles pour le grand public. Par ailleurs, les doctorants sont désireux de s'investir davantage dans la médiation scientifique malgré les éventuelles difficultés auxquelles ils sont souvent confrontés (manque de temps, manque d'outils et de formation et faible valorisation de cette activité). Néanmoins, les activités de médiation scientifique se diversifient au sein des écoles doctorales. « Ma thèse en 180 secondes » est un exemple d'un nouveau moyen de médiation mis en place pour les doctorants. Le défi pour les doctorants est de présenter leur projet de recherche de manière concise en trois minutes avec l'appui d'une seule diapositive. « *Le concours MT180 est un vrai défi de communication et de vulgarisation scientifique* » témoigne Mathieu Buona-fine, vainqueur de la finale nationale 2016 de Ma thèse en 180 secondes, organisée à Bordeaux. Il a remporté le premier prix du jury pour sa présentation sur l'étude du rôle de la *neutrophil gelatinase associated lipocalin* dans les effets cardiovasculaires de l'activation du récepteur des

minéralocorticoïdes. « Il [ce concours] m'a permis de faire découvrir mon travail de thèse à un public très large et de lui ouvrir une petite porte sur le monde complexe de la biologie et de la démarche scientifique [...]. C'est un challenge très formateur qui m'a permis de m'aguerrir à la prise de parole en public et d'aborder mon travail de thèse sous un angle complètement différent », explique-t-il.

En conclusion

Les journées de l'École doctorale 394 ont été une bonne occasion pour les doctorants venant de domaines très différents d'échanger et d'interagir scientifiquement et techniquement, soulignant l'intérêt de la pluridisciplinarité de notre École doctorale. De plus, de nombreuses idées discutées au cours de sessions spéciales (table ronde et conférence plénière), ont permis l'ouverture sur des questions d'avenir, de médiation et d'intégrité. L'ensemble du comité organisateur tient à remercier les doctorants, les sponsors ainsi que les directrices et la gestionnaire de l'École doctorale, acteurs qui ont permis la concrétisation de ces deux journées scientifiques très enrichissantes. ♦


2016 Two-day doctoral conference organised by the Doctoral school "physiology, physiopathology and therapeutics" Pierre and Marie Curie University, Paris

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

TIRÉS À PART

I. Cremer et C. Monnot



Tarifs d'abonnement m/s - 2017

Abonnez-vous

à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement page 202 dans ce numéro de m/s

