



**HAL**  
open science

# Rôle du récepteur nucléaire Rev-erb $\alpha$ dans le contrôle du métabolisme lipidique dans l'entérocyte

Camille Dugardin

► **To cite this version:**

Camille Dugardin. Rôle du récepteur nucléaire Rev-erb $\alpha$  dans le contrôle du métabolisme lipidique dans l'entérocyte. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. NNT : 2016LIL2S045 . tel-03931418

**HAL Id: tel-03931418**

**<https://theses.hal.science/tel-03931418v1>**

Submitted on 9 Jan 2023

**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.

**UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE**  
**Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques**

# **THESE DE DOCTORAT**

Pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université de Lille 2**

Spécialité : Biochimie, Physiologie et Biologie Cellulaire

Présentée par

**Camille DUGARDIN**

## **Rôle du récepteur nucléaire Rev-erba dans le contrôle du métabolisme lipidique dans l'entérocyte**

Dirigée par le Docteur Olivier BRIAND

Soutenue publiquement le

**16 décembre 2016**

Devant le jury composé de :

Pr Bart STAELS

Pr Sylvie DEMIGNOT

Dr Laurent MARTINEZ

Dr Olivier BRIAND

Président

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse



# Sommaire

<i>Résumé</i>	6
<i>Abstract</i>	8
<i>Liste des abréviations</i>	10
<b>AVANT-PROPOS</b>	14
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	17
<b>1. L'intestin</b>	18
1.1. Caractéristiques générales de l'intestin	18
1.1.1. Anatomie macroscopique de l'intestin	18
1.1.2. Anatomie microscopique de l'intestin	19
1.1.3. Histologie de l'intestin	19
1.1.4. Types cellulaires de l'épithélium intestinal	20
1.2. Modèles d'étude du métabolisme entérocytaire	22
1.2.1. Lignées cellulaires intestinales	22
1.2.2. Cellules épithéliales intestinales isolées	24
1.2.3. Explants intestinaux	24
1.2.4. « Mini-intestins »	24
<b>2. Le métabolisme intestinal lipidique</b>	26
2.1. Généralités sur les lipoprotéines	26
2.2. Absorption des lipides alimentaires	28
2.2.1. Généralités sur les lipides alimentaires	29
2.2.2. Solubilisation des lipides alimentaires dans la lumière intestinale	30
2.2.3. Absorption/captation entérocytaire des AG libres et 2-MG	30
2.2.4. Transport intracellulaire jusqu'au réticulum endoplasmique (RE)	31
2.2.5. Synthèse des TG au niveau du RE	32
2.2.5.1. Voie de Clark et Hubscher	33
2.2.5.2. Voie de Kennedy	33
2.2.5.3. Distribution et destin des TG dans le RE	34
2.2.6. Stockage transitoire sous forme de gouttelettes lipidiques	34
2.2.6.1. Généralités sur les gouttelettes lipidiques	34
2.2.6.2. Rôle de stockage transitoire des TG dans l'entérocyte	35
2.2.6.3. Mobilisation des TG par hydrolyse/ré-estérification	36
2.2.6.4. Mobilisation des TG par la lipophagie	36
2.2.6.4.1. Généralités sur l'autophagie	36
2.2.6.4.2. Les étapes de la macro-autophagie	37
2.2.6.4.3. Mise en évidence de la lipophagie	40
2.2.6.4.4. La lipophagie dans l'entérocyte	40

2.2.7.	Production et sécrétion des chylomicrons _____	41
2.2.7.1.	Généralités sur les chylomicrons _____	41
2.2.7.2.	Assemblage des pré-CM _____	42
2.2.7.2.1.	ApoB48 _____	43
2.2.7.2.2.	MTP _____	44
2.2.7.2.3.	ApoAIV _____	44
2.2.7.3.	Transport des pré-CM, maturation et exocytose des CM _____	45
2.2.8.	Hypertriglycéridémie post-prandiale et pathologies associées _____	46
2.2.8.1.	Réponse lipémique post-prandiale et risque cardiovasculaire _____	46
2.2.8.2.	Régulation de la réponse lipémique post-prandiale _____	46
2.2.8.2.1.	Quantité et nature des lipides alimentaires _____	46
2.2.8.2.2.	Insuline _____	47
2.2.8.2.3.	GLP-1 et GLP-2 _____	47
2.2.8.3.	Prise en charge de l'hypertriglycéridémie post-prandiale _____	48
2.3.	Excrétion trans-intestinale du cholestérol (TICE) _____	48
2.3.1.	Le cholestérol _____	49
2.3.2.	TICE et athérosclérose _____	49
2.3.3.	Mise en évidence de l'excrétion trans-intestinale du cholestérol _____	51
2.3.4.	Grandes étapes du TICE au niveau de l'entérocyte _____	53
2.3.4.1.	Métabolisme intravasculaire et lipoprotéines compétentes _____	54
2.3.4.2.	Récepteurs aux lipoprotéines et transporteurs baso-latéraux _____	54
2.3.4.3.	Trafic entérocytaire du cholestérol _____	55
2.3.4.4.	Efflux apical du cholestérol _____	55
2.3.5.	Régulation du TICE _____	56
<b>3.</b>	<b>Le récepteur nucléaire Rev-erba/NR1D1 _____</b>	<b>57</b>
3.1.	Généralités sur les récepteurs nucléaires _____	57
3.1.1.	Structure _____	57
3.1.2.	Mode de fonctionnement _____	58
3.1.3.	Récepteurs nucléaires et métabolisme intestinal lipidique _____	58
3.2.	Le récepteur nucléaire Rev-erba _____	59
3.2.1.	Présentation _____	59
3.2.2.	Ligands _____	59
3.2.2.1.	L'hème, ligand naturel des Rev-erb _____	59
3.2.2.2.	Développement de ligands synthétiques pour les Rev-erb _____	60
3.2.2.3.	Stabilité de la protéine Rev-erba _____	60
3.2.3.	Mécanisme d'action _____	60
3.2.4.	Rôles de Rev-erba _____	62
3.2.4.1.	Rythme circadien _____	62
3.2.4.1.1.	Définition du rythme circadien _____	62
3.2.4.1.2.	Mécanismes moléculaires et rôle de Rev-erba _____	63
3.2.4.1.3.	Désordres métaboliques associés _____	64

3.2.4.1.4.	Rythme circadien et métabolisme intestinal lipidique _____	65
3.2.4.2.	Métabolisme énergétique _____	66
3.2.4.2.1.	Rev-erb $\alpha$ dans le tissu adipeux _____	67
3.2.4.2.2.	Rev-erb $\alpha$ dans le foie _____	68
3.2.4.2.3.	Rev-erb $\alpha$ dans le muscle squelettique _____	68
3.2.4.2.4.	Rev-erb $\alpha$ dans le pancréas _____	69
3.2.4.2.5.	Rev-erb $\alpha$ dans le cerveau _____	69
3.2.4.2.6.	Rev-erb $\alpha$ dans l'intestin _____	70
<b>RESULTATS EXPERIMENTAUX</b> _____		<b>71</b>
<b>Etude n°1 : Le transport rétrograde du cholestérol dans la lignée entérocytaire humaine</b>		
<b>Caco-2/TC7 : un modèle pour l'étude <i>in vitro</i> de la contribution de l'excrétion trans-</b>		
<b>intestinale du cholestérol aux dyslipidémies athérogènes _____</b>		
		<b>72</b>
<b>Etude n°2 : Le récepteur nucléaire Rev-erb<math>\alpha</math> régule la sécrétion intestinale de lipoprotéines</b>		
<b>riches en triglycérides via le contrôle de la lipophagie _____</b>		
		<b>77</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b> _____		<b>109</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> _____		<b>113</b>
<b>ANNEXE</b> _____		<b>130</b>

## Résumé

L'intestin joue un rôle clé dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Les entérocytes sont des cellules polarisées qui permettent les échanges entre la lumière intestinale (membrane apicale) et le compartiment lymphatique et sanguin (membrane baso-latérale). Dans cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au contrôle par les entérocytes de deux processus liés au métabolisme des lipides et du cholestérol : l'excrétion trans-intestinale de cholestérol (TICE) et l'absorption des lipides alimentaires.

Très récemment, il a été montré que l'intestin, en étant le siège d'un mécanisme actif appelé TICE, contribue à 20-30% de l'excrétion fécale du cholestérol chez la souris. Ce mécanisme implique le passage direct du cholestérol provenant de la circulation sanguine à travers les entérocytes vers les fèces. De par son caractère modulable par des substances pharmacologiques comme l'ézétimibe et les statines, le TICE représente une cible thérapeutique potentielle pour corriger les dyslipidémies athérogènes. Cependant, les mécanismes moléculaires gouvernant les processus trans-entérocytaires du TICE sont presque complètement inconnus. Dans une première étude, nous avons mis en évidence la lignée entérocytaire humaine Caco-2/TC7 comme un modèle d'étude du transport rétrograde du cholestérol (du pôle baso-latéral au pôle apical) dans l'entérocyte. Nous avons d'abord montré que suite à l'incubation avec du plasma humain dans le compartiment baso-latéral et des micelles lipidiques dans le compartiment apical, les cellules Caco-2/TC7 miment des caractéristiques du TICE *in vivo*. De plus, grâce à ce modèle *in vitro*, nous avons pu identifier les microtubules comme acteurs nécessaires au transport rétrograde du cholestérol dans l'entérocyte.

Dans une seconde étude, nous nous sommes intéressés au contrôle par le récepteur nucléaire Rev-erb $\alpha$  de la production des chylomicrons (CM) par l'entérocyte. En effet, bien qu'essentiellement vue comme la conséquence d'une clairance retardée, des données émergentes présentent la surproduction de CM par l'intestin comme un contributeur majeur de la dyslipidémie chez l'insulino-résistant. Il existe une balance, au sein de l'entérocyte, entre l'utilisation des lipides absorbés pour un stockage transitoire sous forme de gouttelettes lipidiques (LD) cytosoliques ou pour l'assemblage de lipoprotéines riches en triglycérides (LRT). Le récepteur nucléaire Rev-erb $\alpha$  est un répresseur transcriptionnel impliqué dans le contrôle du métabolisme énergétique et le rythme circadien. Rev-erb $\alpha$  contrôle particulièrement le métabolisme lipidique et le catabolisme des LRT au niveau du foie. Nous avons développé une lignée Caco-2/TC7 invalidée pour Rev-erb $\alpha$  (sh Rev-erb $\alpha$ ) par infection lentivirale. Les résultats indiquent que suite à l'incubation avec des micelles lipidiques dans le compartiment apical, les cellules Caco-2/TC7 sh Rev-erb $\alpha$  sécrètent plus

de LRT dans le milieu baso-latéral et stockent moins de lipides sous la forme de LD cytosoliques. De plus, la lignée Caco-2/TC7 sh Rev-erb $\alpha$  présente une activité lipophagique plus importante et l'inhibition de l'autophagie par la bafilomycine dans cette lignée restaure la sécrétion baso-latérale de LRT et le stockage intracellulaire de LD aux mêmes niveaux que ceux de la lignée sh control. Cette seconde étude montre donc que l'invalidation de Rev-erb $\alpha$  dans l'entérocyte entraîne une augmentation de la mobilisation des lipides des LD via le processus de la lipophagie conduisant à une sécrétion de LRT augmentée. Notre hypothèse est que Rev-erb $\alpha$  joue un rôle clé dans le contrôle de la balance LD/LRT et constitue donc un régulateur de la triglycéridémie post-prandiale.

Les deux études présentées dans cette thèse permettent une meilleure compréhension des mécanismes liés au contrôle du métabolisme lipidique par l'intestin et mettent ainsi en avant Rev-erb $\alpha$  dans l'intestin comme une cible thérapeutique potentielle pour corriger les dyslipidémies athérogènes.

Mots clés : intestin, lipoprotéines, cholestérol, absorption, récepteur nucléaire

## Abstract

The intestine plays a key role in the control of energy homeostasis. Enterocytes, which constitute the main cell type of intestinal epithelium (> 90%), are polarized cells allowing exchanges between intestinal lumen (apical membrane) and lymph/blood compartment (basolateral membrane). In this thesis, cholesterol and lipid metabolism control by enterocytes was studied and particularly, trans intestinal cholesterol excretion (TICE) and dietary lipid absorption.

Recently, it has been estimated that intestine contributes 20-30% of fecal neutral sterol excretion in chow-fed mice. This pathway called TICE involves the direct luminal secretion of plasma-derived cholesterol by enterocytes. Moreover, TICE can be pharmacologically modulated, for instance by ezetimibe and statins and so, represents a new therapeutic target in order to prevent atherosclerosis. However, at present, the molecular mechanisms behind the trans-enterocytic process of TICE are still unknown, especially the steps sustaining cholesterol entry, trafficking and efflux in enterocytes. In the first study of this thesis, we highlighted the human enterocytic Caco-2/TC7 cell line as a suitable model to study the enterocyte-related processes of TICE. We have first shown that upon basolateral incubation with human plasma and apical incubation with lipid micelles, differentiated Caco-2/TC7 cells mimic some of the *in vivo* TICE features. Moreover, using this model, we have identified a key role of the microtubule network in the process.

In the second study of this thesis, chylomicron secretion by enterocytes and its control by the nuclear receptor Rev-erb $\alpha$  were investigated. Indeed, although chylomicron remnant accumulation has been associated to a delayed clearance by the liver, some recent studies show that chylomicron overproduction by the intestine is a major contributor to dyslipidemia in insulin resistant patients. Dietary lipid absorption results from a balance between transient storage in enterocytes as cytosolic lipid droplets (LD) and secretion as triglyceride-rich lipoproteins (TRL). The nuclear receptor Rev-erb $\alpha$  is a transcriptional repressor involved in the control of the energy metabolism and the circadian rhythm. Particularly, Rev-erb $\alpha$  controls lipid metabolism in the liver and thus the catabolism of TRL. The aim of this second study was to investigate the role of Rev-erb $\alpha$  in intestinal lipid metabolism and particularly in TRL secretion. We have infected Caco-2/TC7 cells with lentivirus encoding or not a shRNA targeting Rev-erb $\alpha$  (sh Rev-erb $\alpha$ ). Compared to sh control, sh Rev-erb $\alpha$  Caco-2/TC7 cells secrete higher amounts of micelle-derived LRT in the basolateral medium and exhibit lower quantity of neutral lipids stored as cytosolic LD, whereas the apical uptake is not different. Activation of lipophagy in sh Rev-erb $\alpha$  compared to sh control cells was evidenced by a higher autophagic flux and an increased colocalization of the autophagy marker LC3 with LD.

Finally, autophagy inhibition with bafilomycin in sh Rev-erb $\alpha$  cells restores lipid secretion to the same level as in sh control cells. This second study shows that Rev-erb $\alpha$  knock-down in enterocytes leads to a higher lipophagy-mediated remobilization of intracellular lipids and an increased TRL secretion. Our hypothesis is that Rev-erb $\alpha$  may be a molecular gear in the control of chylomicron secretion and a major regulator of post-prandial triglyceridemia.

In conclusion, these two studies allow to better understand lipid metabolism control by the intestine: the first one by identifying the contribution of the microtubule network in enterocytes for trans-enterocytic retrograde cholesterol transport; the second one by highlighting the nuclear receptor Rev-erb $\alpha$  as a regulator of TRL secretion by enterocytes. Our results point out the intestine as a potential therapeutic target to treat atherogenic dyslipidemia.

Keywords: intestine, lipoproteins, cholesterol, absorption, nuclear receptor

## Liste des abréviations

3-MA	3-méthyladénine
A1CF	ApoBec1 Complementation Factor
ABCA1	ATP Binding Cassette subfamily A member 1
ABCB1	ATP Binding Cassette subfamily B member 1
ABCG5	ATP Binding Cassette subfamily G member 5
ABCG8	ATP Binding Cassette subfamily G member 8
ABHD5	AbHydrolase Domain-Containing Protein 5
ACAT2	Acetyl-CoA Acetyltransferase 2
ACSL	Long-chain Acyl-CoA Synthetase
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AG	Acide Gras
AGPAT	1-AcylGlycerol-3-Phosphate-O-AcylTransferase
ALAS	5-Aminolevulinic acid synthase-1
AMBRA1	Autophagy and Beclin-1 Regulator 1
AMPK	AMP-activated protein kinase
Apo	Apolipoprotéine
ApoAIV	Apolipoprotéine AIV
ApoB	Apolipoprotéine B
ApoBec1	ApoB mRNA editing catalytic component 1
ApoCIII	Apolipoprotéine CIII
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATG	Autophagy-related Genes
ATGL	Adipose Triglyceride Lipase
BNIP3	BCL2/Adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
CCK	Cholécystokinine
CD36	Cluster of Differentiation 36
CM	Chylomicron
DBD	DNA Binding Domain
DG	Diacylglycérol
DGAT	Diacylglycerol AcylTransferase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPP-4	Dipeptidyl peptidase-4
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
ELOVL	Fatty acid elongase
FABP	Fatty Acid Binding Protein
FAF2	Fas Associated Factor Family Member 2
FAS	Fatty Acid Synthase
FAT	Fatty Acid Translocase
FATP	Fatty Acid Transport Protein
FEO	Food Entrainable Oscillator
FXR	Farnesoid X Receptor
G3P	Glycérol-3-Phosphate
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
GLP-1	Glucagon-like Peptide 1
GLP-2	Glucagon-like Peptide 2
GPAT	G3P AcylTransferase
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDAC3	Histone Deacetylase 3
HDL	High Density Lipoprotein
HNF	Hepatocyte Nuclear Factor
HSL	Hormone-Sensitive Lipase
HMGCR	HMG-CoA reductase
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IQGAP2	IQ motif containing GTPase activating protein 2
LAMP	Lysosome-Associated Membrane Protein
LBD	Ligand Binding Domain
LC3	Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3
LD	Lipid Droplet
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	LDL Receptor
LEO	Light Entrainable Oscillator
LGR5	Leucine-rich repeat containing G protein-coupled Receptor 5
LPC	Lysophosphatidylcholine
LPL	Lipoprotein Lipase
LRT	Lipoprotéines Riches en Triglycérides
LXR	Liver X Receptor
MDR2	Multidrug Resistance Gene 2
MG	Monoglycéride

MGAT	MonoacylGlycerol AcylTransferase
MGL	MonoacylGlycerol Lipase
mTORC1	mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
MTTP/MTP	Microsomal Triglyceride Transfer Protein
NCoR	Nuclear receptor Co-Repressor
NPC1L1	Niemann-Pick C1-Like 1
NR1D1	Nuclear Receptor subfamily 1, group D, member 1
NR1D2	Nuclear Receptor subfamily 1, group D, member 2
NRRE	Nuclear Receptor Response Element
OA	Oleic acid
PAP	Phosphatidic Acid Phosphatase
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCSK9	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9
PCTV	Prechylomicron Transport Vesicles
PE	Phosphatidyl-Ethanolamine
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PFA	Paraformaldéhyde
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PI3P	Phosphatidylinosito-3-phosphate
PKC $\zeta$	Protein Kinase C $\zeta$
PL	Phospholipide
PLIN	Périlipine
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PPM	Post prandial micelles
RCT	Reverse Cholesterol Transport
RE	Réticulum Endosplasmique
RXR	Retinoid X Receptor
SCD-1	Stearoyl-CoA desaturase-1
SHP	Small Heterodimer Partner
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SIRT1	Sirtuin 1
SMRT	Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptor
SR-BI	Scavenger Receptor class B type I
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein

SVF	Sérum de Veau Foetal
TBS	Tris Buffer Saline
TC	Taurocholate
TG	Triglycéride
TICE	Trans Intestinal Cholesterol Excretion
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
UBXD8	UBX Domain-Containing Protein 8
UCP1	Uncoupling Protein 1
ULK	UNC-51-Like Kinase
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
ZT	Zeitgeber Time

# **AVANT-PROPOS**

L'athérosclérose est la première cause de mortalité dans les pays occidentalisés et se caractérise par l'accumulation de lipides dans la paroi des grosses et moyennes artères, qui entravent la circulation sanguine. Les perturbations de l'homéostasie des lipoprotéines favorisent le développement de l'athérosclérose. Les dyslipidémies les plus athérogènes sont notamment celles caractérisées par une concentration plasmatique élevée de lipoprotéines à ApoB associée à un HDL-cholestérol bas. De nombreuses études ont permis d'identifier des cibles thérapeutiques pour lutter contre l'athérosclérose et les traitements actuels dits « hypolipémiants » visent à diminuer la synthèse endogène de cholestérol, augmenter son excrétion ou sa clairance par le foie.

Longtemps considéré comme une simple barrière passive aux nutriments, l'intestin est aujourd'hui reconnu comme un organe métabolique majeur, senseur de la qualité et la quantité des aliments, qui participe activement à l'homéostasie lipidique. Outre son rôle primordial dans l'absorption des lipides alimentaires, il a récemment été montré que l'intestin est un acteur majeur de l'excrétion fécale du cholestérol via l'excrétion trans-intestinale du cholestérol. De plus, des données émergentes présentent la surproduction de chylomicrons par l'intestin comme un contributeur majeur des dyslipidémies athérogènes. Ainsi, l'intestin pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique pour corriger les dyslipidémies athérogènes.

Les travaux présentés dans cette thèse se focalisent sur l'étude de deux aspects importants du métabolisme intestinal lipidique, qui se déroulent au sein des entérocytes : la production de chylomicrons et l'excrétion trans-intestinale du cholestérol.

La synthèse bibliographique de cette thèse est composée de trois chapitres. Le premier chapitre est centré sur l'organisation fonctionnelle de l'intestin et la présentation des modèles expérimentaux actuels pour l'étude de l'entérocyte. Le second chapitre porte sur le métabolisme intestinal lipidique et est divisé en deux parties majeures détaillant les mécanismes moléculaires des deux processus que j'ai particulièrement étudié : le métabolisme entérocytaire des lipides alimentaires et l'excrétion trans-intestinale du cholestérol. Ce chapitre évalue également leur contribution respective au risque cardiovasculaire. Enfin, le dernier chapitre concerne les récepteurs nucléaires dont le rôle dans le métabolisme lipidique intestinal a été démontré, en partie, au sein du laboratoire. Plus particulièrement, ce dernier chapitre décrit le récepteur nucléaire Rev-erba.

Les résultats de cette thèse concernent deux études distinctes. La première étude met en avant la lignée entérocytaire humaine Caco-2/TC7 comme modèle d'étude des processus entérocytaires associés à l'excrétion trans-intestinale du cholestérol et qui sont, à ce jour, inconnus. Cette première étude, acceptée pour publication dans *Acta Diabetologica*, a ainsi

permis d'identifier la contribution des microtubules dans le transport rétrograde du cholestérol dans l'entérocyte. La seconde étude évalue le rôle du récepteur nucléaire Rev-erba dans l'absorption entérocytaire des lipides et la production des chylomicrons. Les résultats obtenus suggèrent que Rev-erba dans l'entérocyte joue un rôle clé dans le contrôle de la triglycémie post-prandiale. Les données résultant de ce deuxième projet n'ont pas encore été soumises pour publication.

Les deux études présentées dans cette thèse permettent ainsi une meilleure compréhension des mécanismes liés au contrôle de l'homéostasie lipidique dont l'intestin est le siège, et permettent de considérer l'intestin comme une cible thérapeutique très intéressante dans la lutte contre le risque cardiovasculaire.

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

# 1. L'intestin

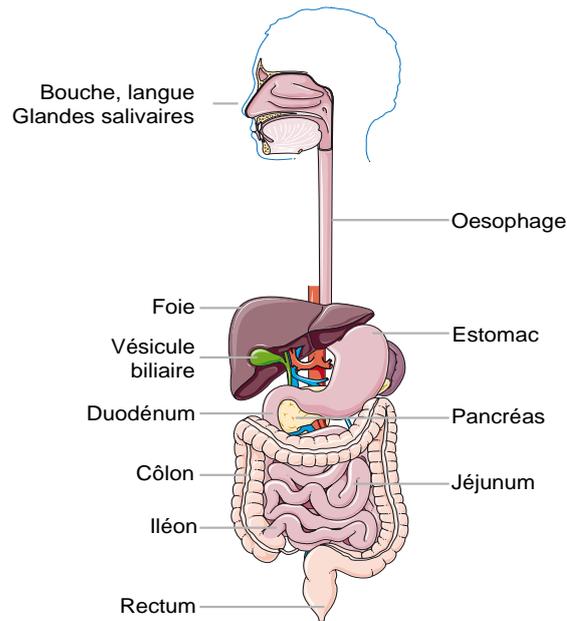
## 1.1. Caractéristiques générales de l'intestin

### 1.1.1. Anatomie macroscopique de l'intestin

L'appareil digestif est un ensemble d'organes permettant la prise alimentaire, la digestion, l'absorption des nutriments puis la défécation. Cet ensemble d'organes comprend la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle puis le gros intestin qui se termine par un orifice, l'anus. A cela s'ajoutent des organes digestifs dits annexes comme la langue, les glandes salivaires, la vésicule biliaire, le pancréas et le foie (figure 1).

L'intestin grêle s'étend du muscle sphincter pylorique dans la région épigastrique jusqu'à la valve iléo-caecale, où il rejoint le gros intestin. C'est la partie la plus longue du tube digestif (4 à 6 mètres chez l'Homme adulte) et son diamètre est de 2,5 à 4 cm. L'intestin grêle comprend trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le duodénum (« d'une longueur de 12 doigts ») mesure près de 25 cm et s'étend du sphincter pylorique jusqu'au jéjunum. Il forme un repli qui s'incurve autour de la tête du pancréas et est le lieu de déversement du canal cholédoque (bile) et du canal pancréatique. Le jéjunum mesure près de 2,5 mètres et s'étend du duodénum jusqu'à l'iléon. L'iléon mesure, quant à lui, environ 3,6 mètres et débouche dans le gros intestin au niveau de la valve iléo-caecale.

Le gros intestin, qui mesure environ 2 mètres chez l'Homme adulte, comprend le caecum, l'appendice vermiforme, le côlon (ascendant, transverse et descendant), le rectum puis le canal anal.



**Figure 1 : Anatomie du tractus gastro-intestinal**

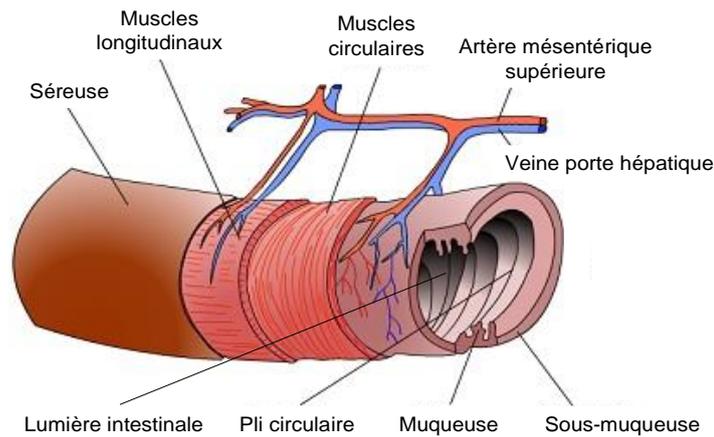
Au cours de ma thèse, je me suis davantage intéressée à l'intestin grêle et plus particulièrement au jéjunum puisque les processus étudiés (absorption des lipides et excrétion trans-intestinale du cholestérol) sont des évènements davantage proximaux que distaux.

### **1.1.2. Anatomie microscopique de l'intestin**

Outre sa longueur qui offre une très grande surface d'absorption, l'intestin grêle présente plusieurs caractéristiques structurales qui amplifient plus de 600 fois cette surface. Parmi elles, on retrouve les plis circulaires ou valvules conniventes qui sont des replis profonds de la muqueuse intestinale (figure 2). La muqueuse intestinale présente également des villosités et des microvillosités formées par la membrane plasmique apicale des cellules épithéliales composant la muqueuse, d'où l'appellation de bordure en brosse.

### **1.1.3. Histologie de l'intestin**

La paroi intestinale est constituée de plusieurs couches tissulaires (figure 2). Au contact de la lumière intestinale, se trouve la muqueuse composée d'un épithélium monostratifié reposant sur du tissu conjonctif appelé chorion qui contient de nombreux capillaires sanguins et chylifères. On retrouve ensuite la sous-muqueuse puis la musculieuse qui est constituée de fibres musculaires longitudinales et circulaires dont la contraction assure le péristaltisme donc la progression du bol alimentaire. Enfin, la couche la plus externe est la séreuse.



**Figure 2 : Histologie de l'intestin**

Il existe également un réseau neuronal autonome tout le long du tube digestif, appelé système nerveux entérique. Il est composé du plexus sous-muqueux localisé entre la muqueuse et la musculature, et du plexus myentérique situé entre la couche musculaire circulaire et la couche musculaire longitudinale. Ce réseau joue un rôle majeur dans l'homéostasie intestinale puisqu'il contrôle, par exemple, la motilité digestive.

#### **1.1.4. Types cellulaires de l'épithélium intestinal**

La muqueuse intestinale est étagée selon deux axes : l'épithélium est organisé selon deux compartiments morphologiquement distincts comprenant de grandes évaginations formant les villosités, et des invaginations formant les cryptes (figure 3).

Les différents types cellulaires composant l'épithélium intestinal dérivent tous de cellules souches pluripotentes situées au fond des cryptes, qui expriment le récepteur à 7 domaines transmembranaires Lgr5 (Leucine-rich repeat containing G protein-coupled Receptor 5) (Barker, *Nature*, 2007). Plusieurs voies de signalisation contrôlent alors le devenir de ces cellules progénitrices, notamment la voie Wnt et la voie Notch (Sailaja, *J Physiol*, 2016).

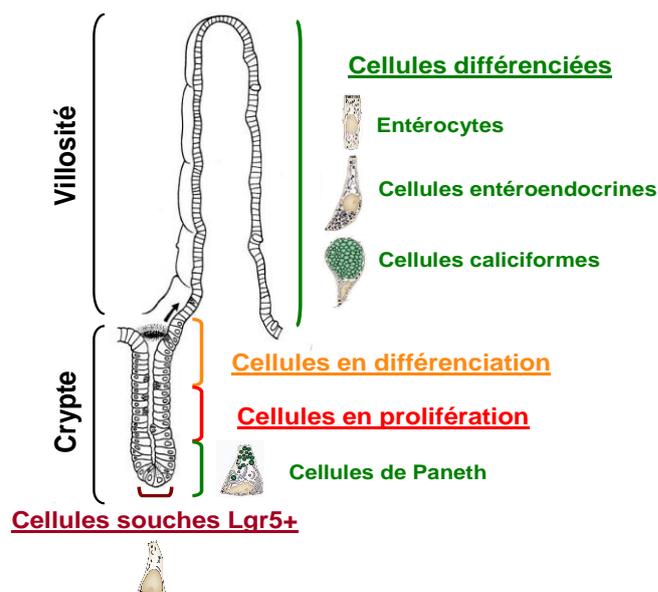
Au niveau des villosités, on retrouve trois types cellulaires principaux :

- les entérocytes qui représentent environ 90% des cellules de l'épithélium ; il s'agit de cellules hautement polarisées qui permettent les échanges entre la lumière intestinale en contact avec leur membrane apicale, et le compartiment lymphatique et sanguin en contact avec leur membrane baso-latérale. Elles assurent donc la fonction d'absorption des nutriments provenant de l'alimentation. De plus, ces cellules présentent des microvillosités au pôle apical, qui constituent la bordure en

brosse, augmentant la surface d'échange. Enfin, les entérocytes jouent un rôle de barrière par l'intermédiaire de leurs jonctions intercellulaires (Balda et Matter, *Trends Cell Biol*, 2003) qui permettent le passage transcellulaire de molécules et empêchent l'entrée de pathogènes.

- les cellules caliciformes ou cellules à mucus qui représentent environ 9% des cellules de l'épithélium ; le mucus permet la protection de la muqueuse intestinale contre les sécrétions acides de l'estomac et joue également un rôle de barrière contre les pathogènes.
- les cellules entéroendocrines qui représentent environ 1% des cellules de l'épithélium ; il existe différents types de cellules entéroendocrines caractérisées par les hormones qu'elles produisent et sécrètent. Les cellules de type L produisent notamment l'incrétine Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) qui permet la régulation du métabolisme glucidique en stimulant la sécrétion d'insuline. Les cellules de type I produisent quant à elles la cholécystokinine (CCK) qui stimule la sécrétion des enzymes pancréatiques ainsi que la sécrétion biliaire et agit comme un signal de satiété (Donovan, *Physiol Behav*, 2007).

Au niveau des cryptes, on retrouve alors les cellules « intermédiaires » en cours de prolifération ou de différenciation ainsi que les cellules de Paneth, situées au fond des cryptes et qui contribuent à la défense de la muqueuse intestinale par la sécrétion de peptides antimicrobiens tels que le lysozyme ou le Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Crosnier, *Nat Rev Genet*, 2006).



**Figure 3 : Types cellulaires de l'épithélium intestinal**

Adapté de Crosnier, *Nature*, 2006

Le renouvellement total des cellules épithéliales des villosités s'effectue en quatre à cinq jours chez l'Homme (Potten, *Int J Exp Pathol*, 1997). Cette caractéristique confère à l'intestin une grande capacité d'adaptation. Au cours de la différenciation, les cellules souches qui donneront naissance aux entérocytes, aux cellules caliciformes et aux cellules entéroendocrines migrent vers le haut des villosités alors que les cellules de Paneth migrent vers le fond des cryptes.

Au cours de ma thèse, je me suis focalisée sur les entérocytes, siège de l'absorption des lipides alimentaires et du TICE (Trans Intestinal Cholesterol Excretion). C'est pourquoi, dans la partie suivante, je vais vous présenter les différents modèles qui existent afin d'étudier le métabolisme entérocytaire et plus particulièrement la lignée cellulaire Caco-2/TC7 que j'ai utilisée tout au long de ma thèse.

## **1.2. Modèles d'étude du métabolisme entérocytaire**

Afin de pouvoir décrypter les mécanismes qui gouvernent les fonctions métaboliques spécifiques aux entérocytes, de nombreux modèles d'étude ont été développés.

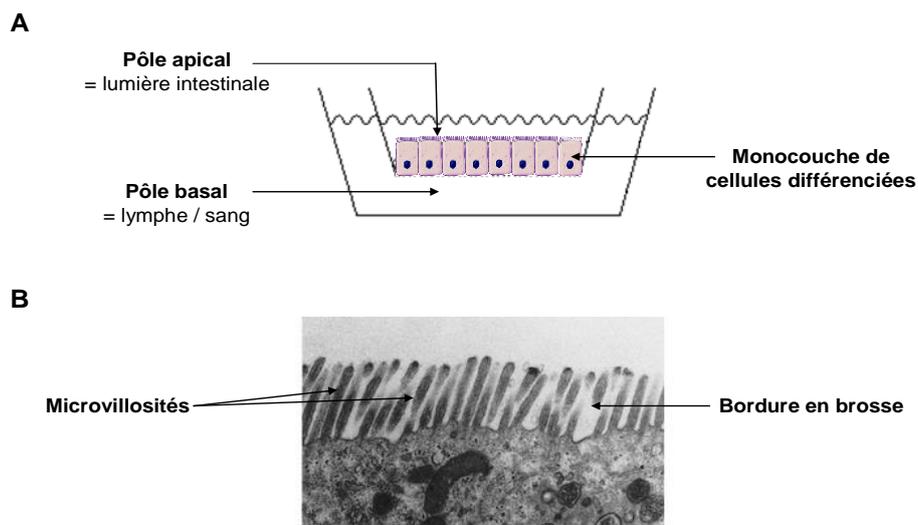
### **1.2.1. Lignées cellulaires intestinales**

Depuis les années 90, les lignées cellulaires humaines issues d'un cancer colorectal ont permis de belles avancées pour mieux comprendre les bases moléculaires du cancer du côlon. De façon intéressante, parmi ces lignées cellulaires issues d'un adénocarcinome et dérivées du côlon, quelques unes (HT29, HRA-19, T84) présentent les propriétés morphologiques et biochimiques associées aux entérocytes de l'intestin grêle (Pageot, *Microsc Res Tech*, 2000).

Cependant, une seule de ces lignées, la lignée Caco-2, est capable de se différencier spontanément en entérocytes matures (Zweibaum, *Bull Acad Natl Med*, 1993). En effet, les cellules de la lignée Caco-2, lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions de culture standard, s'organisent spontanément en une monocouche de cellules polarisées. Aussi, comme cela est le cas pour les cellules absorbives matures, les cellules Caco-2 présentent des microvillosités apicales organisées en une bordure en brosse, au niveau de laquelle sont exprimées des hydrolases telles que la sucrase-isomaltase (Hauri, *J Cell Biol*, 1985). Elles possèdent également un noyau en position basale et des jonctions serrées. La différenciation entérocytaire des cellules Caco-2 a lieu dès lors que la confluence est atteinte : les cellules arrêtent ainsi progressivement de se diviser et commencent à exprimer des marqueurs de différenciation entérocytaire. La culture sur filtre (figure 4) des cellules

Caco-2 (Hidalgo, *Gastroenterology*, 1989) a permis de se rapprocher encore plus de la physiologie intestinale, et de prendre en considération l'asymétrie qui existe entre l'environnement apical des entérocytes (lumière intestinale) et l'environnement basal (compartiment plasmatique). La lignée Caco-2 est aujourd'hui reconnue comme modèle d'étude de la perméabilité intestinale (Hidalgo, *Gastroenterology*, 1989), de l'absorption des lipides alimentaires et la sécrétion de lipoprotéines. En effet, les cellules Caco-2 expriment la plupart des enzymes et protéines nécessaires à l'entrée des acides gras (AG) à leur pôle apical, leur incorporation en triglycérides (TG) par la voie de Kennedy et l'assemblage et la sécrétion de lipoprotéines à ApoB (ApoB48 et ApoB100) à leur pôle basal (Levy, *FASEB J*, 1995).

Différents clones issus de la lignée Caco-2 ont été obtenus entre le passage 29 et le passage 198. Le clone TC7 qui correspond au passage 198, représente une population plus homogène de cellules entérocytaires et possède des caractéristiques fonctionnelles encore plus marquées que la population parentale (Zucco, *Altern Lab Anim*, 2005). La lignée Caco-2/TC7 a donc été largement utilisée pour l'étude du métabolisme intestinal lipidique ((Bouchoux, *Biol Cell*, 2011) ; (Belstein, *PLoS One*, 2013)). Notamment, il a été montré que l'apport de micelles lipidiques d'une composition mimant celles de la période post-prandiale dans le compartiment apical favorise la sécrétion de lipoprotéines à ApoB48 par les cellules Caco-2/TC7 (Chateau, *J Cell Physiol*, 2005). De plus, la preuve de l'existence d'un phénomène de lipophagie dans l'entérocyte a été apportée grâce à ce modèle (Khaldoun, *Mol Biol Cell*, 2014).



**Figure 4 : Culture de la lignée Caco-2/TC7**

A : Représentation schématique de la culture sur filtre

B : Bordure en brosse visualisée par microscopie électronique (Peiffer, *Infect Immun*, 2000)

La lignée Caco-2/TC7 représente donc un modèle reconnu pour l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'absorption des lipides et la sécrétion de lipoprotéines riches en TG par les entérocytes.

Outre cette lignée, il existe d'autres modèles, plus ou moins récents, d'étude du métabolisme entérocytaire que je vais brièvement décrire dans les parties qui suivent.

### **1.2.2. Cellules épithéliales intestinales isolées**

De par le renouvellement rapide de l'épithélium intestinal, il est difficile de garder en culture des entérocytes primaires. Un modèle intéressant a néanmoins été généré à partir d'intestin de fœtus humain (Perreault et Beaulieu, *Exp Cell Res*, 1996), qui a permis l'isolement de cellules épithéliales intestinales grâce à l'utilisation de l'enzyme de dissociation qu'est la thermolysine ou l'utilisation de Matrisperse qui est une solution de dissociation non-enzymatique (Perreault et Beaulieu, *Exp Cell Res*, 1998). Cependant, cette méthode se révèle inefficace à partir de tissu adulte. L'accès limité à de l'intestin fœtal ne permet donc pas d'utiliser couramment ce type de culture primaire et surtout d'étudier les fonctions de l'intestin adulte, comme c'est le cas de l'absorption des nutriments. De plus, la culture à long-terme de ces cellules (plus de 10 jours) reste très compliquée. D'autres méthodes d'isolement d'entérocytes ont également permis d'obtenir des cellules épithéliales intestinales de rat (Evans, *J Cell Sci*, 1992), de souris (Booth, *Epithelial Cell Biol*, 1995) et de porc (Bader, *Br J Pharmacol*, 2000).

### **1.2.3. Explants intestinaux**

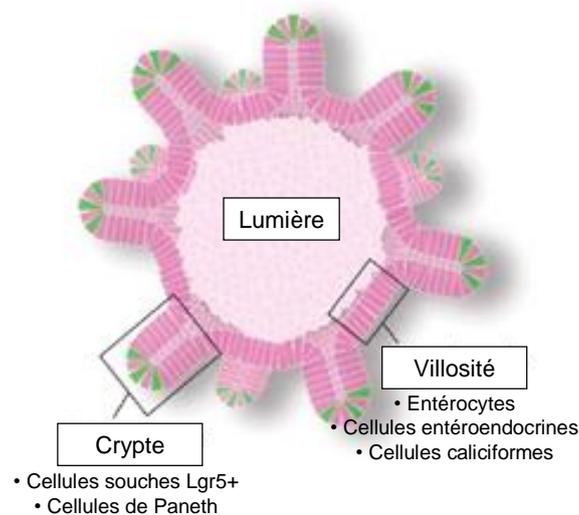
Un autre modèle d'étude du métabolisme entérocytaire repose sur l'utilisation d'explants d'origine animale (souris, rat) ou d'origine humaine ((L'Hirondel, *Gut*, 1975) ; (Cooper, *Methods Mol Biol*, 2015)). La difficulté réside, dans ce modèle, à maintenir en bon état l'explant en culture. Cependant, ce modèle offre de bonnes possibilités pour l'étude de l'absorption intestinale des nutriments lorsqu'il est couplé à l'utilisation d'une chambre de Ussing (He, *Front Biosci*, 2013). Il se prête alors aux études sur le passage transmembranaire de molécules grâce à son système composé de deux compartiments séparés par le tissu d'intérêt.

### **1.2.4. « Mini-intestins »**

Il est maintenant possible de générer des « mini-intestins » grâce à deux méthodes. La première consiste à utiliser des cellules souches pluripotentes embryonnaires et la seconde

des cellules souches adultes provenant d'un donneur. Cette seconde alternative donne lieu à des entéroïdes (intestin grêle) ou colonoïdes (gros intestin) (Zachos, *J Biol Chem*, 2016).

Les entéroïdes sont obtenus après isolement des cryptes intestinales et culture des cellules souches Lgr5-positives. La culture de ces cellules dans une matrice extra-cellulaire de type Matrigel et dans un milieu enrichi en facteurs de croissance (Wnt3a, R-spondin, Noggin) va conduire au développement de structures sphéroïdes polarisées en trois dimensions. Le domaine apical fait face à une lumière intestinale nouvellement formée et le domaine baso-latéral est au contact du Matrigel (figure 5). Les entéroïdes sont représentatifs de la physiologie intestinale puisqu'ils possèdent les différents types cellulaires présents dans l'épithélium intestinal et dans les mêmes proportions (Sato, *Nature*, 2009). Ils sont largement utilisés pour les études sur le développement, la différenciation et les interactions hôte-pathogènes (Foulke-Abel, *Exp Biol Med*, 2014). Leur configuration rend néanmoins difficile l'étude de l'absorption des nutriments puisque l'accès à la lumière intestinale néo-formée reste délicat.



**Figure 5 : Structure d'un entéroïde**

## 2. Le métabolisme intestinal lipidique

L'intestin possède donc des caractéristiques morphologiques uniques, et notamment une surface d'échange importante, véritable interface entre le milieu extérieur et l'organisme proprement dit. Longtemps considéré comme une simple barrière passive aux nutriments, l'intestin est aujourd'hui reconnu comme un organe métabolique majeur, senseur de la qualité et la quantité des aliments et émetteur de signaux mécaniques, nerveux ou hormonaux afin de moduler la prise alimentaire.

Dans cette partie centrée sur le métabolisme intestinal lipidique, je vais, dans un premier temps, détailler la structure générale des lipoprotéines et leurs fonctions puis me focaliser sur deux des grandes fonctions de l'intestin dans le métabolisme lipidique : l'absorption des lipides et l'excrétion trans-intestinale du cholestérol.

### 2.1. Généralités sur les lipoprotéines

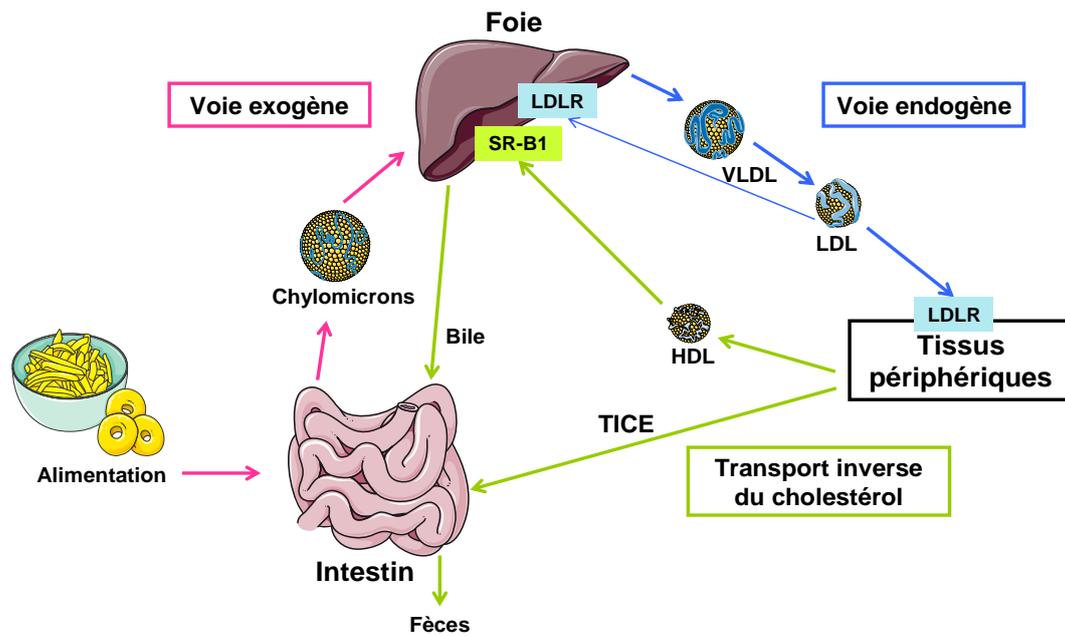
Les lipides sont des molécules hydrophobes insolubles en milieux aqueux. Leur transport entre les différents compartiments de l'organisme nécessite donc les lipoprotéines. Les lipoprotéines sont des complexes macromoléculaires généralement sphériques, composés de lipides et de protéines (apolipoprotéines, enzymes et protéines de transfert). Elles sont constituées d'un cœur lipidique hydrophobe contenant des triglycérides (TG) et des esters de cholestérol, entouré d'une enveloppe hydrophile composée de protéines, de phospholipides et de cholestérol non-estérifié. Les apolipoprotéines contenues dans l'enveloppe protéique jouent un rôle structural, mais elles permettent aussi la reconnaissance des lipoprotéines par des récepteurs spécifiques à la surface des cellules de tissus cibles.

Les lipoprotéines peuvent être classées selon différents critères : leur densité, leur taille, ou leur composition en lipides et apolipoprotéines ([tableau 1](#)). On distingue classiquement 5 classes de lipoprotéines : les chylomicrons (CM), les VLDL, les LDL, les IDL et les HDL.

	Densité (g/mL)	Taille (nm)	Principaux lipides	Principales apolipoprotéines
<b>Chylomicrons</b>	< 0,95	75 - 1200	TG	ApoB48, ApoAIV
<b>VLDL</b>	< 1,006	30 - 80	TG	ApoB100, ApoC
<b>IDL</b>	1,006 - 1,019	25 - 30	Cholestérol	ApoB100, ApoE
<b>LDL</b>	1,019 - 1,063	18 - 25	Cholestérol	ApoB100
<b>HDL</b>	1,063 - 1,21	5 - 12	Cholestérol, phospholipides	ApoAI, ApoAII

**Tableau 1 : Classification des lipoprotéines**

Dans le métabolisme des lipoprotéines, trois types de tissus sont majoritairement impliqués : l'intestin, le foie et les tissus périphériques (figure 6). L'intestin permet l'absorption des lipides alimentaires et la production des chylomicrons. La fonction première de ces lipoprotéines est le transport des lipides provenant de l'alimentation vers les tissus périphériques ; c'est ce que l'on appelle la voie exogène que j'ai particulièrement étudiée pendant ma thèse et qui fera donc l'objet de la deuxième partie de ce chapitre. Le deuxième organe impliqué est le foie capable de synthétiser des lipides et apolipoprotéines, de les remanier avec les lipides provenant de l'intestin et de les sécréter sous forme de VLDL et LDL, devenant alors une source de lipides pour les tissus périphériques ; c'est ce qu'on appelle la voie endogène. Enfin, les tissus périphériques vont utiliser les lipides et le cholestérol comme source énergétique (AG), comme constituants de leur membrane et comme précurseur des hormones stéroïdes. Le cholestérol en excès dans les tissus périphériques retournera au foie grâce aux HDL, afin d'être éliminé de l'organisme par la voie biliaire ; c'est ce qu'on appelle le transport inverse du cholestérol. Nous verrons dans la troisième partie de ce chapitre que la définition du transport inverse du cholestérol a récemment évolué avec la mise en évidence du processus d'excrétion trans-intestinale du cholestérol.



**Figure 6 : Métabolisme des lipoprotéines**

HDL : High Density Lipoprotein ; LDL : Low Density Lipoprotein ; LDLR : LDL Receptor ; SR-B1 : Scavenger Receptor class B type 1 ; TICE : Trans Intestinal Cholesterol Excretion ; VLDL : Very Low Density Lipoprotein.

## 2.2. Absorption des lipides alimentaires

L'absorption intestinale des lipides alimentaires (essentiellement des TG) est définie comme le transfert via l'épithélium des lipides depuis la lumière intestinale vers le compartiment lymphatique. Bien que longtemps considéré comme passif, il s'agit en fait d'un processus multi-étapes et régulé, que je vais donc détailler dans cette partie (figure 7).

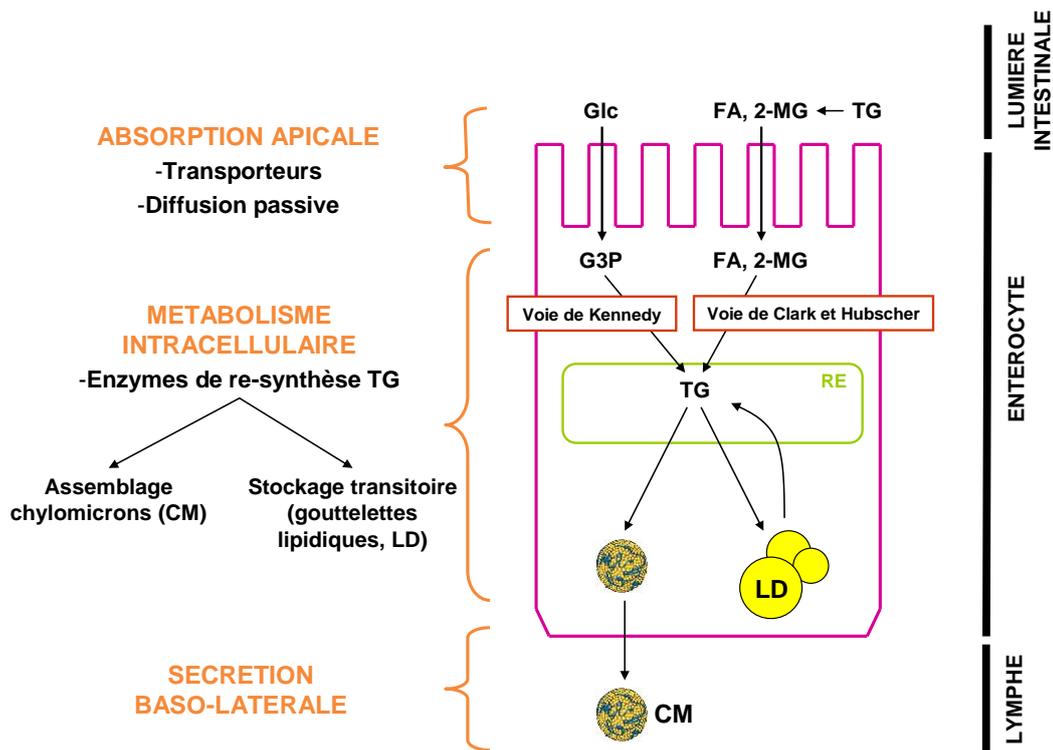


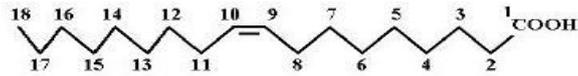
Figure 7 : Grandes étapes de l'absorption entérocytaire des lipides alimentaires

CM : chylomicrons ; FA : Fatty Acid ; G3P : Glycérol-3-Phosphate ; LD : Lipid Droplets ; MG : monoglycérade ; RE : réticulum endoplasmique ; TG : triglycérade.

### 2.2.1. Généralités sur les lipides alimentaires

Bien qu'une consommation excessive contribue à l'épidémie d'obésité et aux dyslipidémies associées, les lipides, dont l'apport quotidien recommandé est de 20 à 35% des apports énergétiques, constituent des nutriments essentiels pour notre organisme. Outre leur rôle énergétique, ils jouent un rôle structural en tant que constituant des membranes cellulaires mais aussi un rôle de médiateurs dans la signalisation cellulaire. Les lipides alimentaires sont à 95% sous forme TG, molécules constituées de 3 molécules d'acides gras (AG) et d'une molécule de glycérol, puis sous forme de phospholipides (PL) et de cholestérol. Pour cette raison, j'exposerai les mécanismes d'absorption spécifiquement des TG dans la suite de ma synthèse bibliographique.

Les acides gras peuvent être classés selon 2 critères : la longueur de leur chaîne carbonée et leur degré d'insaturation (nombre de double liaison sur leur chaîne carbonée). L'acide oléique (18:1) est l'AG mono-insaturé le plus abondant dans notre alimentation (figure 8).



**Figure 8 : Structure de l'acide oléique**

Les lipides étant la plus riche source énergétique (Wang, *Eur J Clin Invest*, 2013), les moyens mis en œuvre en vue de leur absorption se doivent d'être efficaces. Ainsi, l'appareil digestif de l'Homme est capable de digérer et d'absorber 95 % des lipides ingérés, la majorité étant absorbée dans les 60 premiers centimètres de l'intestin (Mansbach et Siddiqi, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016).

### **2.2.2. Solubilisation des lipides alimentaires dans la lumière intestinale**

Majoritairement donc sous la forme de TG, les lipides alimentaires ne sont pas absorbables par l'intestin tels quels. Ils doivent être hydrolysés en AG libres et monoglycérides (MG) pour être absorbés.

L'hydrolyse des TG commence dès la cavité buccale avec l'action de la lipase linguale et se poursuit dans l'estomac avec l'action de la lipase gastrique (Miled, *Biochimie*, 2000). Cependant, à l'entrée de l'intestin grêle, 70% des lipides alimentaires sont encore sous forme de TG. L'arrivée du chyme alimentaire dans le duodénum va alors déclencher le déversement des sécrétions biliaires et pancréatiques dans l'intestin. L'action détergente des sels biliaires permet, dans un premier temps, l'émulsification des agrégats de lipides afin de rendre, dans un second temps, les TG accessibles à l'action de la lipase pancréatique. L'action de cette enzyme conduit alors à l'hydrolyse des TG en AG libres et 2-MG qui, bien que très peu solubles, vont entrer, grâce à leur forme micellaire, dans la couche aqueuse non-agitée en contact avec la muqueuse intestinale et pouvoir être absorbés par les entérocytes (Shi et Burn, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004).

### **2.2.3. Absorption/captation entérocytaire des AG libres et 2-MG**

Les mécanismes moléculaires du transport des AG à travers la membrane entérocytaire apicale ont longtemps été discutés et impliquent à la fois un phénomène de diffusion passive de faible affinité (« flip-flop ») lorsque le gradient est favorable et donc en période post-prandiale (Zakim, *J Membr Biol*, 2000), mais aussi l'action de transporteurs à la bordure en brosse des entérocytes, capables de lier les AG.

Deux transporteurs ont ainsi été découverts comme participant à la translocation des AG de la membrane apicale vers le cytosol : CD36/FAT (Cluster of Differentiation 36/Fatty Acid Translocase) et FATP4 (Fatty Acid Transport Protein 4).

CD36 est une protéine transmembranaire localisée principalement au niveau de la bordure en brosse des entérocytes (Poirier, *Eur J Biochem*, 1996). Son expression suit un gradient crânio-caudal dans l'intestin et est corrélée à la teneur en lipides du régime alimentaire ((Sukhotnik, *Pediatr Surg Int*, 2001) ; (Poirier, *Eur J Biochem*, 1996)). Il est décrit comme un transporteur / récepteur de haute affinité pour les AG à longue chaîne au niveau intestinal. Son invalidation chez la souris diminue la sécrétion de chylomicrons et d'ApoB48 (Nauli, *Gastroenterology*, 2006). Son rôle reste cependant discuté suite à la publication d'études contradictoires ((Tran, *J Biol Chem*, 2011) ; (Nassir, *J Biol Chem*, 2007) ; (Drover, *J Clin Invest*, 2005)).

La famille des Fatty Acid Transport Proteins (FATP) compte 5 isoformes chez les rongeurs et 6 chez l'Homme (Hirsch, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998). Cette famille de protéines transmembranaires possède un site de liaison à l'ATP, qui est important dans le transport des AG. FATP4 est exprimée de façon abondante dans l'intestin grêle, en particulier au niveau de la bordure en brosse apicale des entérocytes matures (Stahl, *Mol Cell*, 1999). Comme CD36, le rôle de FATP4 au niveau de l'intestin reste controversé puisque les études dans lesquelles son expression est invalidée sont contradictoires. En effet, il a été montré que l'invalidation de FATP4 dans des entérocytes primaires de souris diminue l'absorption d'acide oléique radiomarqué (Stahl, *Mol Cell*, 1999) alors que son invalidation *in vivo* spécifiquement dans l'intestin de souris n'a pas d'effet sur l'absorption lipidique (Shim, *J Lipid Res*, 2009).

#### **2.2.4. Transport intracellulaire jusqu'au réticulum endoplasmique (RE)**

Dans l'entérocyte, les produits d'hydrolyse des TG (AG et MG) sont transportés par des protéines cytosoliques, les FABP (Fatty Acid Binding Protein), jusqu'au réticulum endoplasmique (RE). L'intestin est le seul organe qui exprime en grande quantité deux isoformes de la FABP : la FABP1 (liver-FABP) et la FABP2 (intestinal-FABP) aux fonctions différentes (Lagakos, *Am J Physiol Gastroint Liver Physiol*, 2011).

La FABP2 est exprimée uniquement dans l'intestin et ne lie que les AG à longue chaîne. Elle est reconnue pour assurer un transport vectoriel de ces AG depuis la membrane de la bordure en brosse vers le RE, lieu de leur réestérification, et est donc en charge de la majorité des AG arrivant au pôle apical des entérocytes. La substitution d'une seule base dans le codon 54 de la FABP2, une thréonine à la place d'une alanine (A54T), est associée à une hypertriglycémie et une insulino-résistance et a été mise en évidence, pour la première fois, chez les indiens Pima (Baier, *J Clin Invest*, 1995). Cette mutation est responsable de l'augmentation de 2 fois de l'affinité de la FABP2 pour les AG et stimule la synthèse des TG et la sécrétion des CM dans la lignée Caco-2 (Baier, *J Biol Chem*, 1996) et des explants de jéjunum (Levy, *J Biol Chem*, 2001).

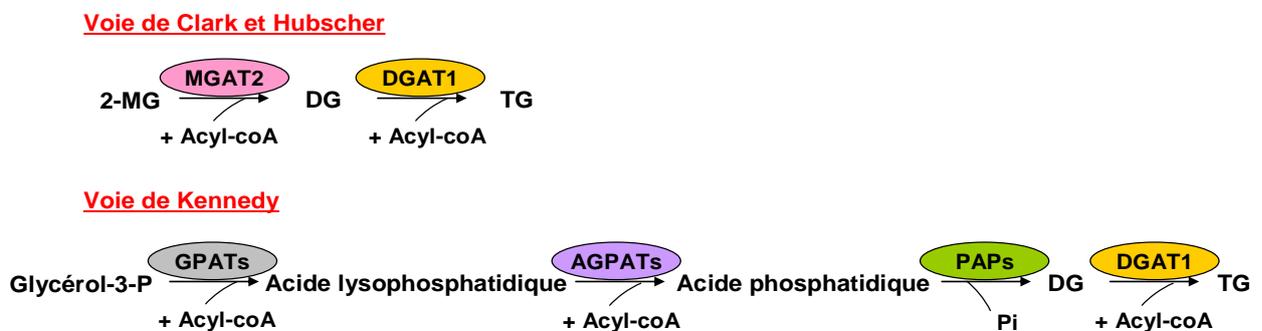
La FABP1 est, quant à elle, exprimée au niveau de l'intestin, du foie et des reins (Gordon, *J Biol Chem*, 1983) et lie une plus grande variété de ligands (AG, acides biliaires, hème) (Niot, *Prog Lipid Res*, 2009). Son rôle dans le transport intestinal des AG est plus flou mais la FABP1 pourrait agir comme un réservoir cytosolique d'AG et semble indispensable au bourgeonnement des vésicules de transport des pré-chylomicrons (PCTV) ((Siddiqi, *J Lipid Res*, 2010) ; (Neeli, *J Biol Chem*, 2007)).

### 2.2.5. Synthèse des TG au niveau du RE

Cette étape est cruciale puisqu'elle permet la conversion des AG toxiques en TG et se fait rapidement : on considère que 30 secondes après leur absorption, 79% des AG sont convertis en TG (Mansbach, *J Lipid Res*, 1998).

Les AG transportés au RE sont « activés » en acyl-CoA par la famille des ACSL (Long-chain Acyl-CoA Synthetase) dont les isoformes 3 et 5 sont majoritaires dans l'intestin (Mashek, *J Lipid Res*, 2006), avant d'être utilisés pour la synthèse de TG.

Les TG sont synthétisés au niveau du RE selon deux voies : la voie du monoacylglycérol (2-MG) ou voie de Clark et Hubscher, majoritaire dans l'entérocyte (~80%) et la voie du glycérol-3-phosphate (G3P) ou voie de Kennedy, retrouvée dans tous les tissus (Mansbach, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007) (figure 9).



**Figure 9 : Voies de re-synthèse des TG dans l'entérocyte**

AGPAT : 1-AcylGlycerol-3-Phosphate-O-AcylTransferase ; DG : diglycéride ; DGAT : DiacylGlycerol AcylTransferase ; GPAT : G3P AcylTransferase ; MG : monoglycéride ; MGAT : MonoacylGlycerol AcylTransferase ; PAP : Phosphatidic Acid Phosphatase ; TG : triglycéride.

L'importance relative de chacune de ces deux voies dépend de l'apport en 2-MG. En période post-prandiale et donc en présence de 2-MG, la voie de Clark et Hubscher est prépondérante (Mansbach et Parthasarathy, *J Lipid Res*, 1982). A l'inverse, en période inter-prandiale, la voie de Kennedy est majoritaire.

### 2.2.5.1. Voie de Clark et Hubscher

Cette voie est sous le contrôle de différentes enzymes dont l'action est successive : les MGAT et DGAT. Dans un premier temps, la MGAT (Monoacylglycerol Acyltransferase) catalyse la formation de 1,2-diacylglycérol (DG) à partir de 2-MG et d'acyl-coA. Puis la DGAT (Diacylglycerol Acyltransferase) synthétise les TG à partir de DG et d'acyl-coA (figure 9).

Il existe 3 isoformes de MGAT (1, 2, 3) mais seules les MGAT2 et 3 sont exprimées dans l'intestin ((Yen, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002) ; (Yen, *J Biol Chem*, 2003)). Cependant, la MGAT3 est exprimée uniquement chez l'Homme et plutôt dans la partie distale de l'intestin (Mansbach et Siddiqi, *Annu Rev Physiol*, 2010). La MGAT2 est donc aujourd'hui reconnue comme l'enzyme majeure contribuant à l'activité MGAT de la voie de Clark et Hubscher. La MGAT2 est localisée au niveau du RE et son expression est maximale dans la partie proximale de l'intestin et induite par un régime riche en graisses (Cao, *J Biol Chem*, 2003). De plus, il a été montré que des souris invalidées pour MGAT2 spécifiquement dans l'intestin étaient protégées des effets métaboliques délétères induits par un régime riche en graisses et ne développaient pas d'hypertriglycéridémie post-prandiale (Nelson, *J Biol Chem*, 2014).

L'activité DGAT, qui catalyse la dernière étape de la synthèse des TG, est portée par deux enzymes DGAT1 et DGAT2 qui ne partagent ni homologie de séquence, ni de structure. Elles sont toutes les deux exprimées au niveau intestinal mais l'activité de la DGAT1 est prépondérante puisque les souris déficientes présentent une diminution de 85% à 90% de l'activité DGAT (Smith, *Nat Genet*, 2000). De plus, l'expression de la DGAT1 est majoritaire chez l'Homme (Hiramane et Tanabe, *J Physiol Biochem*, 2011). L'inactivation du gène de la DGAT1 chez la souris sous régime riche en graisses conduit à une accumulation de lipides au sein des entérocytes et à une plus faible sécrétion de chylomicrons (Buhman, *J Biol Chem*, 2002), montrant ainsi l'importance de la DGAT1 dans le processus mais pas sa nécessité puisque la diminution de son activité peut être compensée par DGAT2. L'inactivation du gène de la DGAT2 est, quant à elle, létale chez la souris mais cela serait dû à un défaut de synthèse de TG dans la peau plutôt que dans l'intestin ((Stone, *J Biol Chem*, 2004) ; (Radner, *Biochim Biophys Acta*, 2014)).

### 2.2.5.2. Voie de Kennedy

Dans cette voie, le G3P est d'abord acylé par les enzymes de la famille GPAT (G3P acyltransferase). L'acide lysophosphatidique résultant est à nouveau acylé par les enzymes de la famille AGPAT (1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase) pour donner de l'acide phosphatidique, puis déphosphorylé par les enzymes PAP (phosphatidic acid phosphatase) pour produire DG. L'activité DGAT catalyse alors la dernière étape de la synthèse des TG (figure 9).

Des études récentes démontrent le rôle de GPAT3 dans le métabolisme lipidique intestinal puisque son invalidation chez la souris entraîne une diminution de la sécrétion de TG et une accumulation de lipides dans les entérocytes, après un bolus d'huile (Khatun, *J Biol Chem*, 2016), suggérant ainsi l'existence de cette voie alternative de synthèse des TG dans l'entérocyte. Cette voie, bien que minoritaire dans l'intestin, est cependant la voie majoritaire de re-synthèse des TG dans le modèle Caco-2 (Levy, *FASEB J*, 1995).

### **2.2.5.3. Distribution et destin des TG dans le RE**

Plusieurs études récentes suggèrent que les TG synthétisés sont ensuite séquestrés dans la bicouche membranaire du RE et que deux destins s'offrent à eux : soit d'être orientés dans la lumière du RE où ils servent de substrat à la formation des chylomicrons (CM) soit de quitter le RE vers le cytosol où ils participent à la formation de gouttelettes lipidiques (LD, « lipid droplets »). Il existerait donc une balance, un carrefour au niveau du RE entre l'utilisation des TG pour la formation de CM ou celles des LD (Demignot, *Biochimie*, 2014). Cet équilibre participe sans aucun doute à la régulation de la triglycéridémie post-prandiale et inter-prandiale via la mobilisation des TG stockés sous forme de LD (Pauquai, *Biochem J*, 2006). Cette hypothèse a été confortée par le fait que les TG contenus dans les LD sont sécrétés sous forme de CM dans les 10 à 30 premières minutes du repas suivant (Mattes, *J Nutr*, 2002). Bien que les facteurs régulant cette balance restent largement méconnus, on note une accumulation de LD dans l'intestin de souris en absence d'ApoB (Hamilton, *J Lipid Res*, 1998) et un rôle de la MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein) dans la formation et la stabilisation des LD dans des hépatocytes primaires de souris (Kulinski, *J Biol Chem*, 2002).

## **2.2.6. Stockage transitoire sous forme de gouttelettes lipidiques**

### **2.2.6.1. Généralités sur les gouttelettes lipidiques**

Les LD cytosoliques sont, comme les lipoprotéines, composées d'un cœur lipidique riche en TG et en esters de cholestérol, entouré d'une enveloppe de phospholipides, de cholestérol non-estérifié et de nombreuses protéines ([tableau 2](#)). Des études récentes ont montré que les LD sont des structures dynamiques, capables d'interagir avec les autres compartiments intracellulaires ((Zehmer, *Proteomics*, 2009) ; (Brasaemle, *J Biol Chem*, 2012)). Les LD sont désormais reconnues comme des organites à part entière.

	<b>Gouttelettes lipidiques</b>	<b>Chylomicrons</b>
<b>Taille</b>	Jusqu'à 6µm	75 - 1200nm
<b>Localisation</b>	Cytosol	RE, Golgi ou extracellulaire
<b>Protéines spécifiques</b>	Famille des périlipines	ApoB
<b>Fonction</b>	Stockage intracellulaire de lipides	Distribution tissulaire des lipides alimentaires

**Tableau 2 : Comparaison entre les gouttelettes lipidiques et les chylomicrons**

Adapté de Demignot, *Biochimie*, 2014

Il est aujourd'hui reconnu et accepté que la biogénèse des LD dérive de l'accumulation de TG néo-synthétisés entre les deux feuillets de la membrane du RE, jusqu'à la formation d'une « lentille » lipidique qui, lorsqu'elle devient trop grosse, bourgeonne en une LD (Wilfling, *Curr Opin Cell Biol*, 2014). Dans tous les types cellulaires, ce bourgeonnement se produit vers le cytosol de la cellule alors que dans les hépatocytes et les entérocytes, il se produit également dans la lumière du RE, pour participer à la formation des lipoprotéines riches en TG (LRT).

Le protéome des LD a fait l'objet de nombreuses études. Il inclut des protéines au rôle structural de la famille des périlipines (PLIN) ((Lee, *Biochim Biophys Acta*, 2009) ; (Bouchoux, *Biol Cell*, 2011)). On y retrouve également des protéines impliquées dans le métabolisme lipidique (comme les ACSL, ApoAIV, MTP) et le trafic intracellulaire (de la famille des Rab), des protéines du cytosquelette (Tubulin, Actin, Annexin) et des protéines chaperonnes (HSP).

#### **2.2.6.2. Rôle de stockage transitoire des TG dans l'entérocyte**

Suite à un bolus d'huile, des LD cytosoliques sont observées au niveau du jéjunum, dans les entérocytes du rat (Palay, *J Biophys Biochem Cytol*, 1959), de la souris (Marenus, *J Ultrastruct Res*, 1982), du lapin (Cartwright, *J Lipid Res*, 2000), du cochon (Hansen, *Gut*, 2003) et chez l'Homme (Robertson, *Gut*, 2003). Les LD sont des organites très dynamiques puisque, chez la souris, elles ne sont plus détectables 12h après le bolus d'huile. Il est maintenant admis que le contenu lipidique des LD est remobilisé ultérieurement. La dynamique des processus conduisant à la remobilisation de ces stocks de TG participe certainement au contrôle de la triglycéridémie pendant les périodes post-prandiale et inter-prandiale.

Dans le modèle Caco-2, les TG stockés sous la forme de LD peuvent être mobilisés et contribuer à la production de LRT. Par des approches protéomiques, quelques protéines potentiellement impliquées dans le contrôle de la balance entre l'utilisation des TG pour la sécrétion de CM ou pour le stockage transitoire sous la forme de LD, ont été identifiées. Parmi elles, on retrouve les protéines de la famille des périlipines : PLIN2 et PLIN3

(Beilstein, *PLoS One*, 2013). Dans des hépatocytes, la surexpression de PLIN2 entraîne une accumulation de LD cytosoliques et une diminution de la sécrétion de VLDL (Magnusson, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006). Leur fonction dans le jéjunum n'a cependant pas encore été élucidée mais PLIN2 pourrait jouer un rôle stabilisateur des TG stockés dans les LD en limitant les interactions avec les lipases alors que PLIN3 serait plutôt impliquée dans la biogénèse des LD.

La mobilisation des TG contenus dans les LD cytosoliques pour la production de LRT résulte de deux phénomènes co-existants : l'hydrolyse/ré-estérification des TG faisant intervenir des lipases et l'autophagie des LD, appelée lipophagie.

### **2.2.6.3. Mobilisation des TG par hydrolyse/ré-estérification**

Comme montré dans les hépatocytes (Lehner, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012), l'hydrolyse des TG des LD dans les entérocytes implique différentes enzymes : la lipase ATGL (Adipose Triglyceride Lipase) qui hydrolyse les TG en DG et AG, la lipase HSL (Hormone-Sensitive Lipase) qui hydrolyse les DG en MG et AG et la lipase MGL (Monoacylglycerol Lipase) qui hydrolyse les MG en AG et glycérol (Zechner, *Cell Metab*, 2012). Une fois couplés au CoA, ces lipides redeviennent ainsi des substrats de la voie de Clark et Hubscher et celle de Kennedy pour la re-synthèse de TG et l'assemblage de CM au niveau du RE.

L'enzyme ATGL ainsi que son co-activateur ABHD5/CGI-58 (Abhydrolase Domain-Containing Protein 5/Lipid Droplet-Binding Protein CGI-58) ont été identifiées à la surface des LD des entérocytes de la lignée Caco-2 (Bouchoux, *Biol Cel*, 2011) mais aussi de la muqueuse intestinale murine (Seyer, *PLoS One*, 2013). Outre son rôle de co-activateur, il a récemment été montré que l'inactivation de ABHD5/CGI-58 conduit à la séquestration de DG dans les LD au niveau du foie et empêche ainsi le développement d'une résistance à l'insuline hépatique (Cantley, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013). UBXD8/FAF2 (UBX Domain-Containing Protein 8/Fas Associated Factor Family Member 2) est un inhibiteur de l'activité lipasique de ATGL et est également retrouvé dans le protéome des LD dans le modèle Caco-2 (Bouchoux, *Biol Cel*, 2011).

### **2.2.6.4. Mobilisation des TG par la lipophagie**

#### **2.2.6.4.1. Généralités sur l'autophagie**

L'autophagie est un processus catabolique hautement conservé, essentiel pour le maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Signifiant « se manger soi-même », l'autophagie est un mécanisme par lequel une cellule est capable de recycler son matériel cytoplasmique. Cette voie, alternative à celle du protéasome, conduit en effet à la

dégradation des organites et macromolécules cellulaires, par l'intermédiaire du lysosome. Par ailleurs, les produits de cette dégradation lysosomale vont permettre la synthèse de nouvelles macromolécules dans la cellule. L'autophagie est induite en conditions de stress nutritionnel (jeûne ou excès de nutriments), d'hypoxie ou en présence de pathogènes.

Il existe 3 types d'autophagie identifiés à ce jour : la micro-autophagie, l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes et la macro-autophagie.

La micro-autophagie est un processus non sélectif caractérisé par une invagination de la membrane lysosomale, permettant ainsi la séquestration du contenu cytoplasmique, qui sera directement dégradé par le lysosome.

L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes est, quant à elle, hautement sélective puisque ce mécanisme protéolytique concerne uniquement les macromolécules possédant le motif KFERQ (30% des protéines solubles cytosoliques et nucléaires). Cette séquence est alors reconnue par la protéine chaperonne HSC70 (Dice, *Revis Biol Cellular*, 1989), permettant ainsi la formation d'un complexe, qui sera adressé à la membrane du lysosome puis internalisé grâce à la protéine transmembranaire LAMP-2A (Lysosome-associated membrane protein 2A).

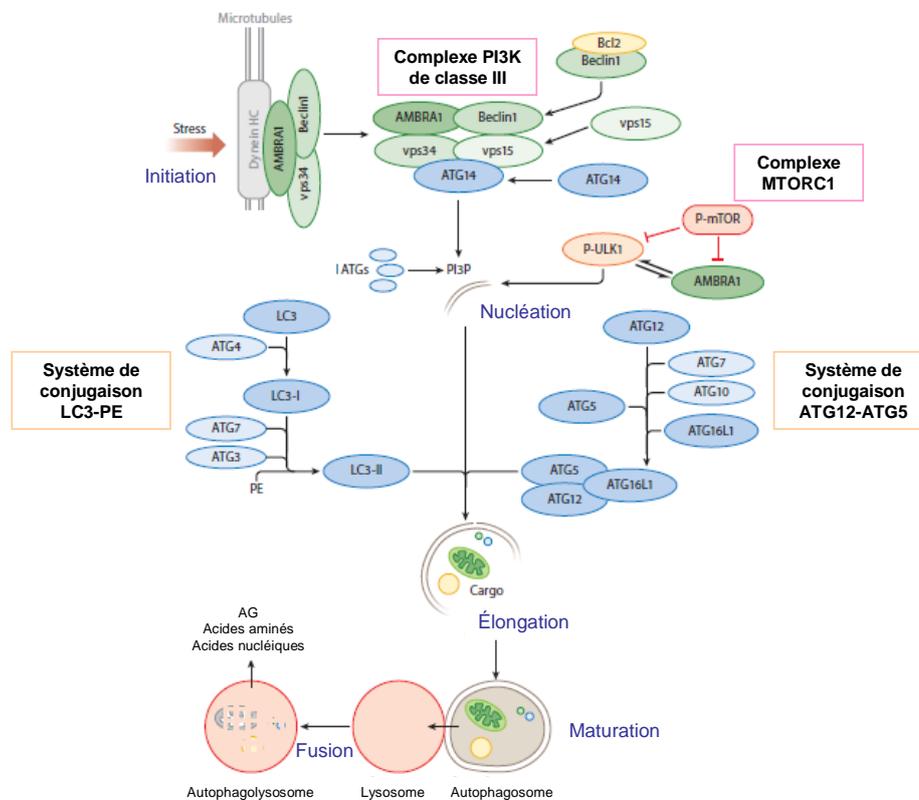
La macroautophagie est, à ce jour, la forme d'autophagie la mieux décrite dans la littérature (Mehrpour, *Cell Res*, 2010). Ce processus de dégradation implique la formation d'une structure caractéristique formée d'une double membrane appelée « autophagosome », qui va séquestrer et englober des organites (dont les LD) ou des complexes protéiques présents dans le cytoplasme. Le contenu à digérer est ensuite adressé au lysosome par fusion de l'autophagosome avec celui-ci afin de former l'autophagolysosome. Au sein de cette structure, le matériel est dégradé par les hydrolases lysosomales puis libéré dans le cytoplasme pour fournir les éléments nécessaires à la survie cellulaire ou à la synthèse de nouvelles molécules.

La lipophagie désigne la macro-autophagie des LD. Il n'existe, à ce jour, aucun acteur propre à la lipophagie identifié. Je vais donc détailler les étapes de la macro-autophagie dans le prochain paragraphe.

#### **2.2.6.4.2. Les étapes de la macro-autophagie**

La macro-autophagie (qui sera désignée par le terme d'« autophagie » dans la suite de ce manuscrit) est un processus dynamique. En effet, on estime à 8 minutes, la durée entre la genèse et la dégradation d'un autophagosome (Eskelinen, *Autophagy*, 2005). A cette grande rapidité s'ajoute une finesse de régulation due à l'implication d'une trentaine de gènes dans le processus (Martinez-Lopez et Singh, *Annu Rev Nutr*, 2015). Cette machinerie, orchestrée par les « ATG » (Autophagy-related Genes), contrôle une succession d'étapes : l'initiation, la

nucléation, l'élongation, la maturation puis la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (figure 10).



**Figure 10 : Grandes étapes de la macro-autophagie**

Adapté de Martinez-Lopez et Singh, *Annu Rev Nutr*, 2015

AG : Acide gras ; AMBRA1 : Autophagy and Beclin-1 Regulator 1 ; ATG : Autophagy-related Genes ; LC3 : microtubule-associated protein 1 Light Chain 3 ; mTORC1 : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1 ; PE : Phosphatidyl-Ethanolamine ; PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase ; PI3P : phosphatidylinositol-3-phosphate ; ULK1 : UNC-51-Like Kinase.

L'initiation de l'autophagie requiert un grand nombre d'acteurs regroupés en 3 complexes, qui interagissent entre eux afin de former une structure membranaire nommée phagophore. L'origine de cette structure membranaire est encore débattue et pourrait impliquer le RE, la membrane nucléaire, la mitochondrie, l'appareil de Golgi ou encore la membrane plasmique. Le premier complexe mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) agit comme un senseur du statut énergétique de la cellule (Jung, *Mol Biol Cell*, 2009). En effet, en conditions normales, ce complexe interagit avec et stabilise par phosphorylation un second complexe, le complexe ULK1 (UNC-51-Like Kinase) (Botti-Millet, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016). Cependant, en conditions de stress nutritionnel, ces deux complexes se dissocient et la protéine ULK1 va alors induire la phosphorylation de la protéine AMBRA1 (Autophagy and Beclin-1 Regulator 1), nécessaire à la formation du troisième complexe protéique (Di Bartolomeo, *J Cell Biol*, 2010) dont elle fait partie : le

complexe PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) de classe III constitué également de VPS34, Beclin-1 et ATG14. La formation du complexe PI3K permet alors la production de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P), essentiel à la nucléation et la maturation du phagophore (Mizushima, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011).

Une fois le phagophore généré, la progression du processus autophagique requiert son élongation et son incurvation autour du contenu cytoplasmique à séquestrer jusqu'à la formation d'une structure close à double membrane mature nommée autophagosome. Cette étape est régulée par deux systèmes de conjugaison interdépendants et analogues aux systèmes d'ubiquitination des protéines : le système de conjugaison ATG12-ATG5 et le système de conjugaison LC3-PE (MAP1LC3 Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 - Phosphatidyl-Ethanolamine). Dans le premier système, la protéine ATG12 joue le rôle d'ubiquitine alors que dans le second, c'est la protéine LC3. Contrairement à ATG12, la protéine LC3 est déjà présente sous forme non mature sur le phagophore et doit être maturée en LC3-I grâce à ATG4, pour être ensuite activée par les enzymes E1 (ATG7) et E2 (ATG3). En effet, ces deux enzymes sont responsables de la liaison d'un phospholipide membranaire : le phosphatidyléthanolamine (PE), donnant naissance au conjugué LC3-PE ou LC3-II, primordial dans les dernières étapes de la formation de l'autophagosome. Alors que le complexe ATG12-ATG5 se dissocie dès la fermeture de l'autophagosome, LC3-II, qui est réparti entre les membranes externes et internes de l'autophagosome, ne s'en dissocie pas. LC3-II ne sera alors dégradé que lors de la fusion avec le lysosome, ce qui en fait un marqueur de choix pour l'autophagie et l'étude du flux autophagique (Tanida, *Int J Biochem Cell Biol*, 2004). L'interdépendance des deux systèmes de conjugaison est cependant avérée puisque l'altération d'un seul des acteurs suffit à abolir la genèse de l'autophagosome.

Enfin, l'ultime étape de ce mécanisme est la dégradation du contenu de l'autophagosome mature suite à sa fusion avec le lysosome. Cette dernière étape requiert la participation des hydrolases acides du lysosome, telles que les lipases qui génèrent des AG à partir de TG, les protéases, les glycases et les nucléases. L'ensemble des produits de dégradation est ensuite libéré dans le cytosol afin d'être réutilisé par la cellule.

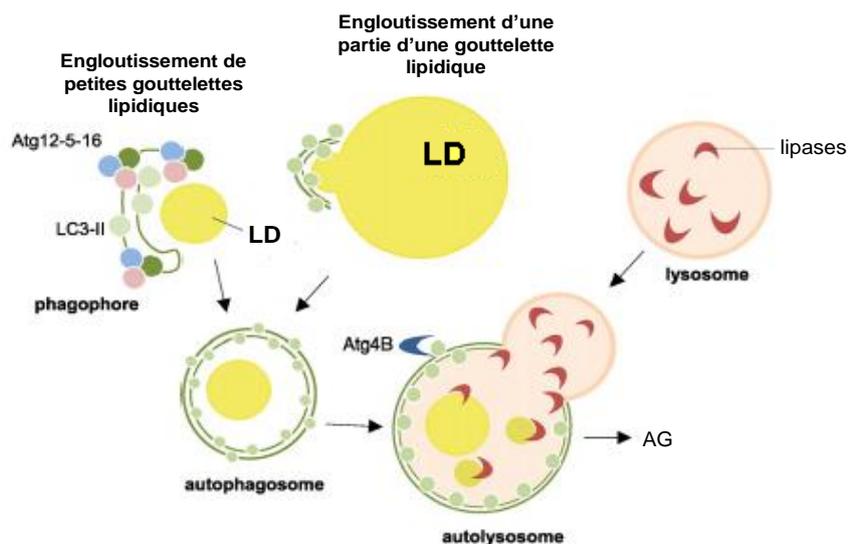
Par ce processus, l'entérocyte est ainsi capable de mobiliser les TG contenus dans les LD qui, sous la forme d'AG, vont pouvoir devenir des substrats de la voie de Clark et Hubscher et celle de Kennedy pour la re-synthèse de TG et l'assemblage de CM au niveau du RE.

#### **2.2.6.4.3. Mise en évidence de la lipophagie**

Des hépatocytes en conditions basales ou exposés à de l'acide oléique, dans lesquels l'autophagie a été inhibée, soit avec l'inhibiteur 3-méthyladénine (3-MA) qui bloque l'activité de la PI3K classe III soit avec un shRNA dirigé contre ATG5, présentent un contenu en LD cytosoliques augmenté (Singh, *Nature*, 2009). Le même constat est fait dans des fibroblastes embryonnaires murins invalidés pour ATG5, sans que la synthèse des TG ne soit augmentée. Grâce à la microscopie électronique, Singh *et al.* montrent aussi la séquestration des LD dans des structures membranaires possédant le marquage LC3. Enfin des expériences de co-localisation en microscopie confocale leur permettent de mettre en évidence une interaction entre les LD (marquées par le Bodipy 493/503), les autophagosomes (marqués par LC3) et les lysosomes (marqués par LAMP1). Ces travaux démontrent un rôle fondamental de l'autophagie et des lysosomes dans la mobilisation des LD. La validation *in vivo* de ces résultats se fait grâce au modèle de souris invalidées pour ATG7 spécifiquement dans le foie et qui présentent une stéatose hépatique non-alcoolique. De plus, ce travail met en évidence que dans le foie, la lipophagie est induite, non seulement en conditions de carence nutritionnelle, mais également en réponse à une charge lipidique. L'autophagie induite par l'acide oléique a également été montrée dans des neurones hypothalamiques mis en culture, suggérant qu'il s'agit d'un processus ubiquitaire observé dans de nombreux types cellulaires (Kaushik, *Cell Metab*, 2011).

#### **2.2.6.4.4. La lipophagie dans l'entérocyte**

La mise en évidence de la lipophagie (figure 11) dans l'entérocyte a été faite par Khaldoun *et al* en 2014. Ils montrent, dans un premier temps, qu'une charge lipidique induit une augmentation de la quantité de la protéine LC3-II dans le jéjunum de souris mais aussi dans le modèle Caco-2/TC7 (Khaldoun, *Mol Biol Cell*, 2014). Grâce à la microscopie électronique, ils mettent en évidence des LD séquestrées dans des autophagosomes dans des cellules Caco-2/TC7 incubées pendant 24 heures en présence de micelles lipidiques. Enfin, grâce à la microscopie confocale, ils rapportent une co-localisation entre les LD, LC3 et LAMP1. Ils quantifient également les pools de LD positives pour le marquage LC3 et/ou LAMP1 et mettent en évidence la dynamique élevée du processus lipophagique en réponse à des micelles lipidiques. De plus, ils montrent que l'invalidation d'acteurs clés de l'autophagie par siRNA dans les cellules Caco-2/TC7 (siBECLIN1 et siVPS34) présentent une accumulation de LD cytosoliques.



**Figure 11 : Mécanismes moléculaires de la lipophagie**

Adapté de Ward, *Biochem Biophys Acta*, 2016

Toutes ces données suggèrent donc que les LD sont des cibles spécifiques du processus autophagique. La lipophagie apparaît alors comme un régulateur des niveaux de TG dans différents types cellulaires, et plus particulièrement dans ceux qui font face à l'arrivée de grandes quantités de lipides, comme c'est le cas des entérocytes pendant la période post-prandiale.

Il a été montré que l'apolipoprotéine B (ApoB) est une cible putative pour la dégradation autophagique dans les cellules hépatiques Huh7 (Christian, *Biochem Biophys Acta*, 2013). Le rôle de la lipophagie dans l'assemblage des VLDL au niveau du foie reste cependant flou. Cependant, il est tentant de faire l'hypothèse qu'en contrôlant la mobilisation des TG et la disponibilité en ApoB dans l'entérocyte, l'autophagie régule la sécrétion intestinale de LRT, que je vais vous détailler maintenant dans la prochaine partie.

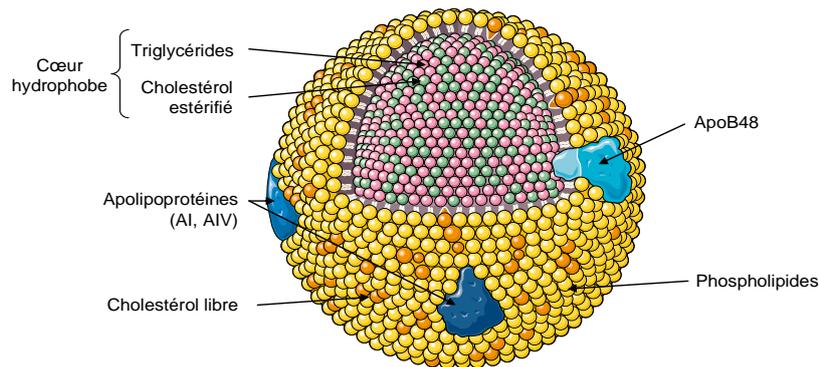
### **2.2.7. Production et sécrétion des chylomicrons**

L'intestin sécrète 3 types de lipoprotéines : les HDL, les VLDL et les CM. En période post-prandiale, ce sont les CM et les HDL qui sont majoritairement synthétisés puis sécrétés. En période inter-prandiale, l'intestin produit des LRT de plus petite taille, les VLDL. En accord avec ce qui a été développé depuis le début du manuscrit, je vais détailler, dans cette partie, les mécanismes de synthèse et de sécrétion des CM.

#### **2.2.7.1. Généralités sur les chylomicrons**

Les chylomicrons (figure 12) sont des lipoprotéines légères ( $d < 0,95$  g/ml) et de grande taille (leur taille varie de 75 à 1200 nm de diamètre) produites par l'intestin qui

permettent le transport des lipides alimentaires jusqu'aux tissus périphériques, en vue de leur utilisation ou de leur stockage. Les CM sont composés de ~80-95% de TG et ~3-5% d'esters de cholestérol, qui constituent le cœur hydrophobe, et de ~7-9% de phospholipides, ~1-3% de cholestérol libre (non-estérifié) et ~1-2% de protéines, qui constituent la surface hydrophile. Chaque CM possède 1 molécule d'apolipoprotéine B48 (ApoB48) et d'autres apolipoprotéines majeures telles que l'ApoAI et l'ApoAIV. On y trouve également des traces d'ApoE et d'ApoC (II et III).



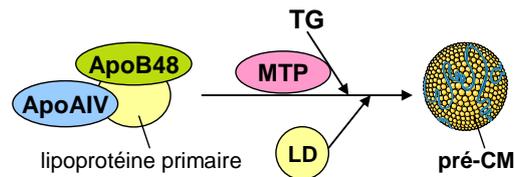
**Figure 12 : Structure d'un chylomicron**

La synthèse des CM se déroule en plusieurs étapes. Elle débute par l'assemblage des pré-chylomicrons (pré-CM) au niveau du RE, puis se poursuit par leur transport vers l'appareil de Golgi pour leur maturation avant d'être sécrétées dans la lymphe.

#### **2.2.7.2. Assemblage des pré-CM**

L'assemblage des pré-CM se déroule en 2 étapes indépendantes (Cartwright et Higgins, *J Biol Chem*, 2001). La première étape consiste en la production d'une lipoprotéine primaire au niveau du RE rugueux, contenant de l'ApoB48, de l'ApoAIV, des phospholipides, du cholestérol et une petite quantité de TG transloqués sur cette particule grâce à l'action de la Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP). La deuxième étape est la fusion de ces particules primaires avec des gouttelettes riches en TG et en esters de cholestérol dépourvues d'apolipoprotéines, qui conduit à la formation des pré-CM.

Les deux protéines limitantes de la formation des pré-CM (figure 13) sont : l'ApoB48 et la MTP, que je vais donc détailler. Je vais également développer une partie sur l'ApoAIV dont les études récentes montrent qu'elle joue un rôle important dans la synthèse des CM mais aussi dans la régulation de la MTP.



**Figure 13 : Protéines limitantes de l'assemblage des pré-CM**

#### 2.2.7.2.1. ApoB48

L'ApoB est primordiale pour la synthèse et la sécrétion des LRT et joue un rôle structural majeur lors de leur assemblage. L'absence d'ApoB, comme c'est le cas dans les hypobétalipoprotéinémies familiales causées par une mutation homozygote du gène APOB, conduit à des niveaux plasmatiques extrêmement bas de TG et de cholestérol ainsi qu'une altération de l'absorption intestinale lipidique (Patel, *Atherosclerosis*, 1994).

L'ApoB existe sous deux formes : l'ApoB48 et l'ApoB100. Ces deux protéines sont codées par le même gène APOB. Le gène APOB est principalement exprimé dans les hépatocytes et les entérocytes (Pan et Hussain, *Biochim Biophys Acta*, 2012). Il est essentiel au développement embryonnaire puisque son invalidation chez la souris est létale (Farese, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995). Dans le foie, l'ARNm du gène APOB conduit à la traduction de la protéine ApoB100, composée de 4536 acides aminés. Cependant, l'ARNm du gène APOB subit, spécifiquement dans l'intestin, une réaction post-transcriptionnelle d'édition, qui introduit un codon stop et aboutit à la traduction de la protéine ApoB48, forme tronquée de l'ApoB100 (48 % de la partie N terminale). Il s'agit d'une désamination spécifique d'une cytidine en uracile au niveau du nucléotide 6666 de l'ARNm de l'APOB. Ce processus est modulé par un complexe enzymatique, nommé éditosome dont plusieurs facteurs ont été identifiés, principalement l'ApoB mRNA editing catalytic component 1 (ApoBec1) et l'ApoBec1 Complementation Factor (A1CF) (Anant et Davidson, *Trends Cardiovasc Med*, 2002). Chez l'Homme, l'ApoB48 est uniquement synthétisée au niveau intestinal tandis que chez les rongeurs qui expriment ApoBec1 dans l'intestin mais aussi dans le foie, elle est également sécrétée au niveau hépatique. L'importance de l'ApoBec1 a été récemment mise en évidence par le fait que son invalidation spécifiquement dans l'intestin de souris conduit à une altération de la production des CM et une accumulation de TG dans l'entérocyte (Blanc, *J Lipid Res*, 2012).

L'ApoB48 semble être synthétisée en permanence mais sa quantité sécrétée est finement régulée puisqu'elle est rapidement dégradée après sa synthèse par le système ubiquitine-protéasome si la quantité de lipides présente est insuffisante pour la lipider par l'intermédiaire de la MTP (Mansbach et Siddiqi, *Annu Rev Physiol*, 2010). La régulation du

nombre de molécules d'ApoB48 est donc très importante puisque c'est elle qui va conditionner le nombre de CM (une molécule d'ApoB48 pour un CM). Plusieurs études mettent en évidence que l'ApoB peut également être dégradée par le mécanisme d'autophagie et notamment dans les hépatocytes (Christian, *Biochem Biophys Acta*, 2013).

#### **2.2.7.2.2. MTP**

La MTP qui est l'enzyme responsable de l'activité de transfert des lipides (TG et esters de cholestérol) sur l'ApoB, est localisée au niveau de la lumière de RE des entérocytes et hépatocytes. L'expression de la MTP suit un gradient décroissant crânio-caudal dans l'intestin avec l'expression la plus forte au niveau des villosités duodéno-jéjunales, zone préférentielle de l'absorption lipidique (Swift, *Histochem Cell Biol*, 2005). Son expression et son activité enzymatique sont régulées par l'alimentation et la présence de lipides (Tran, *J Biol Chem*, 2011) mais aussi au cours du rythme nyctéméral (Pan, *Cell Metab*, 2010). Nous détaillerons ce point dans le dernier chapitre de cette introduction.

D'un point de vue structural, la protéine MTP est un hétérodimère composé de 2 sous-unités : la première (97 kDa) porte l'activité catalytique et permet la liaison et le transfert des lipides ; la seconde (55 kDa) possède une activité isomérase di-sulfide (PDI) qui permet le maintien de la MTP au niveau de la membrane du RE (Pan et Hussain, *Biochim Biophys Acta*, 2012).

En absence de MTP, l'ApoB ne peut être lipidée, elle est donc dégradée et les LRT ne sont pas sécrétées. Son invalidation totale chez la souris est, comme pour l'APOB, létale (Raabe, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998). Son invalidation partielle (souris hétérozygotes) (Iqbal, *J Lipid Res*, 2010) ou totale mais spécifiquement dans l'intestin de souris (Xie, *J Biol Chem*, 2006) conduit à une diminution drastique de la sécrétion de CM.

#### **2.2.7.2.3. ApoAIV**

L'ApoAIV est une apolipoprotéine de 46 kDa également présente à la surface des pré-CM (Dvorin, *J Lipid Res*, 1985). Chez l'Homme, l'ApoAIV est une protéine synthétisée uniquement par l'intestin grêle, tandis que chez les rongeurs, elle est également synthétisée par le foie, même si l'intestin contribue majoritairement au niveau d'ApoAIV circulante (Wu et Windmueller, *J Biol Chem*, 1979). Au niveau intestinal, l'expression de l'ApoAIV suit un gradient décroissant crânio-caudal et un gradient croissant selon l'axe crypto-villositaire. Comme pour la MTP, son expression est également régulée au cours du rythme nyctéméral (Pan, *J Biol Chem*, 2013).

La transcription et la synthèse de la protéine ApoAIV au niveau de l'entérocyte est fortement stimulée par l'absorption de lipides. Sa transcription est notamment augmentée

par l'incubation avec des micelles lipidiques, dans le modèle Caco-2/TC7 (Beaslas, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008).

Sa participation à l'absorption intestinale des lipides et la sécrétion de CM est soutenue par plusieurs arguments de la littérature. Dans un modèle de cellules entérocytaires porcines (IPEC-1), la surexpression d'ApoAIV augmente la sécrétion de TG et favorise la formation de CM de grande taille (Lu, *J Biol Chem*, 2006). Cette action de l'ApoAIV sur la taille des CM pourrait résulter de son action stabilisatrice de l'interface entre les lipides et le milieu aqueux, lors de la formation des CM. De plus, son invalidation chez la souris entraîne une diminution de la sécrétion de TG suite à un bolus d'huile, uniquement pendant la phase sombre du rythme nyctéméral (Pan, *J Biol Chem*, 2013). Les souris invalidées pour l'ApoAIV présentent également une diminution des niveaux de MTP, suggérant que l'ApoAIV régule l'expression et l'activité de la protéine MTP. Ces mêmes observations ont été retrouvées dans le modèle entérocytaire Caco-2 (Pan, *J Biol Chem*, 2013).

Durant l'hydrolyse des CM au niveau de la circulation sanguine, l'ApoAIV est libérée et constituerait un signal de satiété, participant à la régulation de la prise alimentaire (Tso et Liu, *Physiol Behav*, 2004).

### **2.2.7.3. Transport des pré-CM, maturation et exocytose des CM**

Le transport intracellulaire des pré-CM a été précisé par les travaux de Mansbach *et al.* Ils ont montré que les pré-CM sont exportés du RE par des vésicules d'un diamètre d'environ 250nm appelés « Prechylomicron Transport Vesicles » (PCTV). Outre l'ApoB48 et l'ApoAIV des pré-CM, les PCTV contiennent les protéines du complexe COPII, VAMP7, CD36 et FABP1. La biogénèse des PCTV requiert également l'activité de la PKC $\zeta$  (Mansbach et Siddiqi, *Am J Physiol Gastrointest Physiol*, 2016).

Après leur sortie du RE, les PCTV fusionnent avec le *cis*-Golgi grâce à l'interaction de VAMP7 avec des protéines de la membrane de l'appareil de Golgi. Les pré-CM subissent alors un processus de maturation caractérisé par des phénomènes de glycosylation de l'ApoB48 (Berriot-Varoqueaux, *Gastroenterology*, 2001) et l'ajout d'apolipoprotéines telles que l'ApoCII, l'ApoCIII et l'ApoAI ((Mansbach et Gorelick, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007) ; (Mansbach et Siddiqi, *Annu Rev Physiol*, 2010)).

Après leur maturation dans le Golgi, les CM sont acheminés du *trans*-Golgi vers la membrane baso-latérale de l'entérocyte, où ils sont exocytés dans l'espace intercellulaire. Puis les CM gagnent le canal chylifère central de la villosité intestinale et sont transportés dans la lymphe avant de rejoindre la circulation sanguine.

Ces lipoprotéines subiront alors des remaniements tels que l'hydrolyse des TG et des échanges d'apolipoprotéines avec d'autres lipoprotéines. L'hydrolyse des TG des CM est

assurée par la lipoprotéine lipase (LPL). Cette enzyme, activée par l'ApoCII et inhibée par l'ApoCIII, libère ainsi des acides gras qui seront utilisés comme source énergétique par les tissus périphériques. Finalement, les remnants de CM sont captés via les récepteurs aux LDL et dégradés par le foie.

## **2.2.8. Hypertriglycéridémie post-prandiale et pathologies associées**

### **2.2.8.1. Réponse lipémique post-prandiale et risque cardiovasculaire**

Suite à la prise d'un repas, l'afflux des CM dans la circulation générale induit une augmentation transitoire de la triglycéridémie appelée réponse lipémique post-prandiale. Dans le diabète (Hogue, *J Lipid Res*, 2007) et l'obésité, on assiste à une réponse lipémique post-prandiale anormale caractérisée par l'augmentation de l'amplitude et de la durée de l'hypertriglycéridémie. Les patients atteints de diabète de type 2 présentent une sécrétion augmentée d'ApoB48 (Hogue, *J Lipid Res*, 2007) ainsi qu'une expression augmentée de la MTP au niveau de leur duodénum (Lally, *Diabetologia*, 2006).

Trois études épidémiologiques prospectives ont mis en avant une forte corrélation entre le taux de TG chez des individus non à jeun, qui est principalement lié à la présence de remnants de CM, et le risque de complications cardiovasculaires ((Bansal, *JAMA*, 2007) ; (Nordestgaard, *JAMA*, 2007) ; (Lindman, *Eur J Epidemiol*, 2010)). L'hypertriglycéridémie post-prandiale constitue ainsi un facteur de risque cardiovasculaire du fait de son caractère pro-athérogène et inflammatoire. En effet, bien que les CM, de par leur taille, ne puissent pénétrer dans l'intima des artères, ce n'est pas le cas des remnants de CM qui s'accumulent alors dans les lésions athéromateuses. Bien qu'essentiellement vue comme la conséquence d'une clairance retardée par le foie, des données émergentes présentent la surproduction de CM par l'intestin comme un contributeur majeur de la dyslipidémie chez l'insulino-résistant (Arca M, *Atheroscler Suppl*, 2015). Ainsi, l'intestin est une cible thérapeutique potentielle pour corriger la dyslipémie post-prandiale du diabétique (Xiao, *Atherosclerosis*, 2014).

### **2.2.8.2. Régulation de la réponse lipémique post-prandiale**

#### **2.2.8.2.1. Quantité et nature des lipides alimentaires**

Il est clairement démontré que la réponse lipémique post-prandiale augmente de façon dose-dépendante avec le contenu en lipides des repas (entre 15 et 50g de lipides) (Dubois, *Am J Clin Nutr*, 1998). L'augmentation de la quantité de lipides consommés conduit ainsi à une augmentation de la taille des CM sécrétés par l'intestin.

De plus, la taille des CM semble être augmentée par des repas riches en AG mono-insaturés par rapport aux AG saturés (Jackson, *Am J Clin Nutr*, 2000). De même, la supplémentation chronique en acide palmitique (AG saturé) diminue la sécrétion de TG

comparé à l'acide oléique (AG mono-insaturé) dans le modèle Caco-2 (Bateman, *Biochim Biophys Acta*, 2007). Cela pourrait s'expliquer par des effets cytotoxiques dus à l'incubation avec l'AG saturé menant notamment à une désorganisation morphologique et à un phénotype immature des cellules Caco-2.

#### **2.2.8.2.2. Insuline**

Lorsque la voie de signalisation de l'insuline est intacte dans l'entérocyte, elle diminue la sécrétion des CM, comme la sécrétion des VLDL dans l'hépatocyte (Au, *Metabolism*, 2004). L'incubation de cellules intestinales humaines issues d'explants de jéjunum avec de l'insuline diminue la sécrétion de CM (Levy, *FEBS Lett*, 1996). De plus, *in vivo*, la production de CM est diminuée par l'insuline, chez des hamsters insulino-sensibles sous régime chow (Federico, *Diabetes*, 2006). Le mécanisme par lequel l'insuline diminue la sécrétion de LRT est aujourd'hui peu documenté.

Chez des hamsters rendus insulino-résistants par un régime riche en fructose (60%), on assiste à une augmentation du nombre de petites lipoprotéines contenant de l'ApoB48 (Haidari, *J Biol Chem*, 2002). Ainsi, la production intestinale de CM augmentée en cas d'insulino-résistance serait la conséquence d'un défaut de sensibilité de l'intestin à l'insuline et non de l'hyperinsulinémie qui l'accompagne souvent.

#### **2.2.8.2.3. GLP-1 et GLP-2**

Le GLP-1 et le GLP-2 sont des peptides hormonaux produits à partir du polypeptide proglucagon par les cellules entéro-endocrines de type L et sécrétés en quantité équimolaire en réponse à la prise d'un repas. Bien que co-sécrétés, leurs effets sur la sécrétion de CM est opposé.

Le GLP-1 réduit la sécrétion de CM en période post-prandiale. Par exemple, chez des patients atteints de diabète de type 2, l'exénatide (agoniste du récepteur au GLP-1) améliore l'hypertriglycémie post-prandiale (Schwartz, *Clin Ther*, 2008). Dans le modèle d'hamsters rendus insulino-résistants par un régime riche en fructose mais aussi chez la souris sous régime chow, le traitement par exendin-4 (agoniste du récepteur au GLP-1) et sitagliptin (inhibiteur de DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4)) diminue la sécrétion post-prandiale de TG et de lipoprotéines à ApoB48 (Hsieh, *Diabetologia*, 2010).

Le GLP-2 induit au contraire l'augmentation de l'absorption des AG à longue chaîne et de la production des CM. Chez le hamster, l'administration de GLP-2 augmente la sécrétion de lipoprotéines à ApoB48 et riches en TG. De plus, l'incubation *ex vivo* d'explants de jéjunum de souris avec le peptide GLP-2 humain augmente la sécrétion de LRT et d'ApoB48 et ce, de manière CD36-dépendante (Hsieh, *Gastroenterology*, 2009).

La co-injection prolongée des 2 incrétines résulte néanmoins en un effet prédominant du GLP-1, c'est-à-dire une diminution de la production de CM (Hein, *Diabetes*, 2013).

### **2.2.8.3. Prise en charge de l'hypertriglycéridémie post-prandiale**

Outre les recommandations médicales liées à un changement de style de vie (repas plus équilibrés et exercice physique), il existe, aujourd'hui, différents traitements pharmacologiques de l'hypertriglycéridémie post-prandiale.

Certaines molécules comme les statines, qui sont des inhibiteurs de la HMG-CoA reductase (HMGCR) (simvastatin utilisée en association avec l'ézétimibe, atorvastatin) ou les fibrates, qui sont des agonistes du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  (fénofibrate) sont déjà utilisées pour traiter les diabétiques de type 2 et montrent des effets prometteurs, notamment sur les niveaux circulants d'ApoB48 (Xiao et Lewis, *Biochim Biophys Acta*, 2012). Ces molécules semblent agir davantage sur la clairance des LRT par le foie que sur la composante intestinale. Une étude chez la souris montre néanmoins que l'ézétimibe seule améliore l'hypertriglycéridémie post-prandiale en agissant directement sur la formation des lipoprotéines à ApoB48 au niveau de l'entérocyte (Sandoval, *J Atheroscler Thromb*, 2010).

De par le rôle prépondérant de la MTP dans l'assemblage des CM décrit dans la partie précédente (2.2.7.2.2.), des inhibiteurs de la MTP spécifiquement dans l'intestin sont actuellement en phase d'essai clinique afin de cibler uniquement la composante intestinale de l'hypertriglycéridémie post-prandiale et d'éviter ainsi l'accumulation de TG dans le foie ((Hata, *J Pharmacol Exp Ther*, 2011); (Kim, *J Pharmacol Exp Ther*, 2011); (Mera, *J Pharmacol Exp Ther*, 2011).

Enfin, également pour diminuer la production de CM par l'intestin, des inhibiteurs de DGAT1 sont actuellement en phase d'essai clinique (Birch, *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2010).

## **2.3. Excrétion trans-intestinale du cholestérol (TICE)**

J'ai choisi de développer une partie sur cet autre aspect du métabolisme intestinal lipidique qu'est l'excrétion trans-intestinale du cholestérol car nous avons mis en évidence l'existence d'un processus « TICE-like » dans la lignée cellulaire Caco-2/TC7, c'est-à-dire un transport rétrograde du cholestérol, du pôle baso-latéral au pôle apical des entérocytes. Cette étude a fait l'objet d'une publication qui se trouve en Annexe. L'utilisation de ce modèle cellulaire pour étudier les mécanismes moléculaires entérocytaires du TICE pourrait permettre l'identification de cibles thérapeutiques pour augmenter l'excrétion fécale du cholestérol et lutter contre les dyslipidémies athérogènes chez le patient diabétique.

### 2.3.1. Le cholestérol

La molécule de cholestérol comprend 4 cycles carbonés (noyau stérol) et une tête polaire hydrophile composée par un groupement hydroxyle sur le carbone 3 (figure 14).

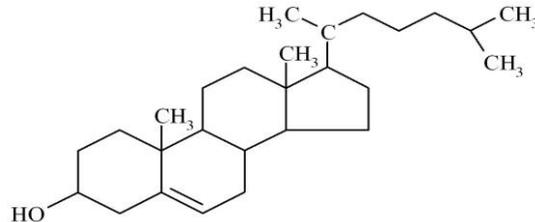


Figure 14 : Structure du cholestérol

Le cholestérol n'est pas un substrat énergétique. Il est un constituant majeur des membranes cellulaires et contribue à leur stabilité. Il est également un précurseur pour de nombreuses molécules telles que la vitamine D3, les acides biliaires et les hormones stéroïdiennes (corticoïdes et hormones sexuelles).

Le cholestérol est distribué dans tout l'organisme bien qu'il soit présent en plus grande quantité au niveau du cerveau, de la moelle épinière et du foie. Le cholestérol circule dans les fluides biologiques en association à l'albumine et aux lipoprotéines. L'homéostasie du cholestérol et des lipoprotéines résulte d'un équilibre entre son absorption par les entérocytes, sa biosynthèse endogène au niveau des tissus périphériques et son élimination fécale.

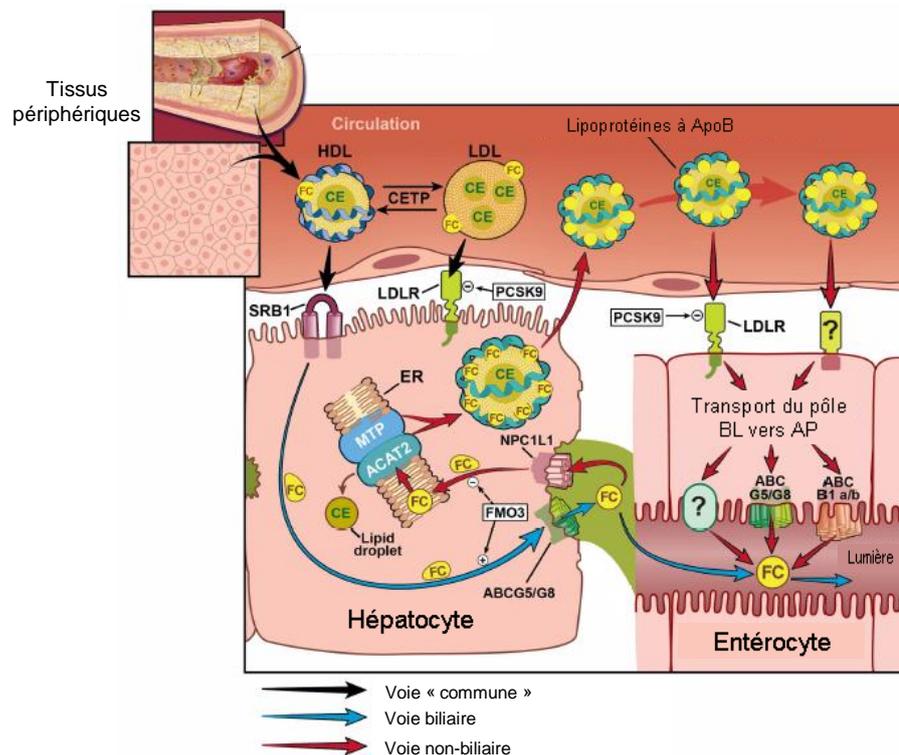
### 2.3.2. TICE et athérosclérose

Les perturbations de l'homéostasie du cholestérol et des lipoprotéines favorisent le développement de l'athérosclérose. Les dyslipidémies les plus athérogènes sont celles caractérisées par une concentration plasmatique élevée du cholestérol associé aux lipoprotéines de type LDL, par une hypertriglycémie et une concentration plasmatique basse du cholestérol associé aux lipoprotéines de type HDL (Babiak et Rudel, *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 1987). L'athérosclérose est initiée par l'accumulation de lipides dans les macrophages (cellules spumeuses) infiltrés dans la paroi des vaisseaux et se caractérise par des dépôts de lipides et d'éléments fibreux dans la paroi des grosses et moyennes artères, qui entravent la circulation sanguine (Lusis, *Nature*, 2000).

L'efflux du cholestérol des macrophages et son excrétion dans les fèces sont donc des éléments cruciaux pour empêcher l'accumulation de cholestérol dans la paroi des artères et le développement de l'athérosclérose. Plusieurs stratégies thérapeutiques visent à augmenter l'efflux du cholestérol des macrophages (agonistes de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$

(Peroxisome Proliferator Activated Receptor) (Chinetti, *Nat Med*, 2001) ou de LXR (Liver X Receptor) (Bultel, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008)), le taux de HDL dans la circulation (analogues de l'apo-AI (Redondo, *Lipids Health Dis*, 2011), ou la clairance du cholestérol plasmatique par le foie (statines, inhibiteurs de PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9)).

Le transport inverse du cholestérol (RCT) a longtemps été défini comme le phénomène par lequel le cholestérol en excès dans les tissus périphériques, tels que les macrophages de la paroi des vaisseaux, est transporté jusqu'au foie par les lipoprotéines de type HDL puis secrété dans l'intestin par la voie biliaire en vue de son élimination de l'organisme (Glomset, *J Lipid Res*, 1968). Ce modèle a récemment été remis en question suite aux études de Temel *et al* qui démontrent l'implication d'un autre processus nommé excrétion trans-intestinale de cholestérol (TICE) dans le RCT des macrophages (Temel, *Cell Metab*, 2010). Un nouveau modèle a donc été proposé (figure 15), prenant en compte à la fois la voie biliaire et la voie non-biliaire ou TICE, dans le RCT (Temel et Brown, *Trends Pharmacol Sci*, 2015).



**Figure 15 : Nouveau modèle intégré du transport inverse du cholestérol**

Adapté de Temel et Brown, *Trends Pharmacol Sci*, 2015

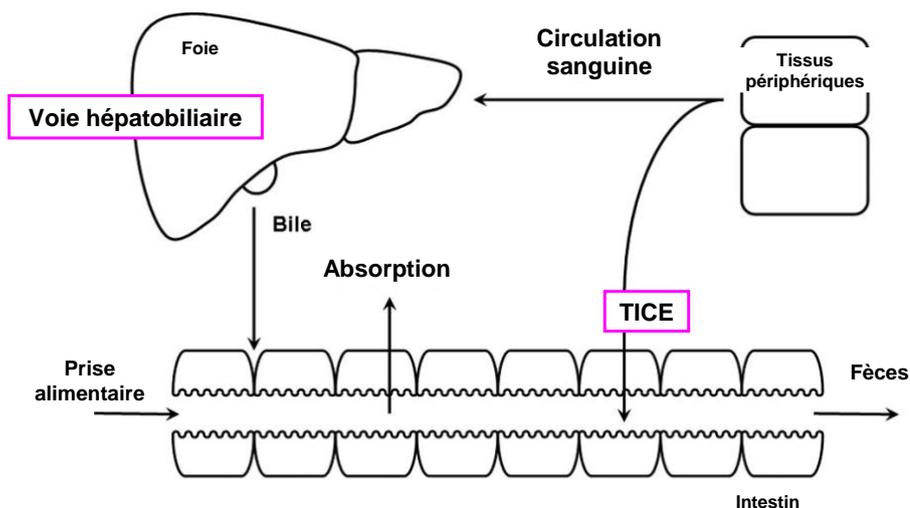
ABCB1 : ATP Binding Cassette subfamily A member 1 ; ABCG5/G8 : ATP Binding Cassette subfamily G member 5/8 ; ACAT2 : Acetyl-CoA Acetyltransferase 2 ; CE : Cholesterol esters ; CETP : Cholesterylester transfer protein ; ER : endoplasmic reticulum ; FC : Free cholesterol ; FMO3 : **Flavin-containing monooxygenase 3** ; HDL : High Density Lipoprotein ; LDL : Low Density Lipoprotein ; LDLR : LDL Receptor ; MTP : Microsomal Triglyceride Transfer Protein ; NPC1L1 : Niemann-Pick C1-Like 1 ; PCSK9 : Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9 ; SR-B1 : Scavenger Receptor class B type 1.

Le TICE est aujourd'hui reconnu comme un processus multi-organes impliquant d'autres organes que l'intestin, comme le foie et le système circulatoire, et qui contribue au RCT et à l'excrétion fécale du cholestérol (figure 15). La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le TICE, notamment au sein de l'entérocyte, est donc primordiale pour mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'augmenter le RCT et lutter contre l'athérosclérose. De plus, augmenter le TICE apparaît comme une stratégie thérapeutique attractive puisque la stimulation de la voie biliaire peut entraîner la formation de calculs biliaires (Temel et Brown, *Curr Opin Lipidol*, 2012).

Dans les parties suivantes, je vais détailler comment le TICE a été mis en évidence et quelles en sont les étapes limitantes dans l'entérocyte. Nous verrons alors que les mécanismes moléculaires entérocytaires du TICE sont aujourd'hui encore trop peu caractérisés bien que le TICE, de par son caractère modulable, représente une cible thérapeutique prometteuse pour augmenter l'excrétion fécale du cholestérol.

### **2.3.3. Mise en évidence de l'excrétion trans-intestinale du cholestérol**

Il a récemment été montré que la voie hépatobiliaire n'explique pas, à elle seule, l'excrétion fécale des stérols neutres et qu'il faut considérer un phénomène de passage actif du cholestérol des tissus périphériques à la lumière intestinale, au travers de la barrière épithéliale (figure 16). Dès la première partie du XXe siècle, l'équipe de Sperry montrait que la diversion du canal biliaire chez la souris ne réduisait pas l'excrétion fécale des stérols neutres (Sperry, *J Biol Chem*, 1927). Le même type d'observation chez le chien (Pertsemlidis, *J Clin Invest*, 1973) ou le rat (Bandsma, *Biochem J*, 1998) chez lesquels la diversion du canal biliaire induit une augmentation de 2 à 7 fois du contenu des fèces en stérols neutres suggérait l'existence d'une voie additionnelle pour l'excrétion fécale du cholestérol chez les mammifères, inductible en situation d'insuffisance de la voie biliaire.



**Figure 16 : Voies d'excrétion fécale du cholestérol**

Adapté de Brufau, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011

Ce n'est que récemment que des preuves expérimentales soutenant l'existence de cette voie appelée Excrétion Trans-Intestinale du Cholestérol (TICE) se sont accumulées en particulier en utilisant des modèles murins caractérisés par un déficit sévère de l'excrétion biliaire du cholestérol. Dans ces modèles (ABCG5/G8<sup>-/-</sup>, Mdr2<sup>-/-</sup>, NPC1L1<sup>-LiverTg</sup>), le contenu des fèces en stérols neutres n'est que très modestement diminué (Yu, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002) voire strictement inchangé ((Kruit, *Gastroenterology*, 2005) ; (Temel, *J Clin Invest*, 2007)). Bien que la plupart de ces données aient été produites chez la souris, des données soutiennent l'idée que ce phénomène de TICE existe également chez l'Homme. En effet, des patients atteints de carcinomes de la tête du pancréas, et présentant une obstruction complète de la voie biliaire, continuent à excréter des quantités importantes de stérols neutres (Cheng et Stanley, *Proc Soc Exp Biol Med*, 1959). On estime maintenant que l'excrétion du cholestérol au travers de la barrière intestinale représenterait chez l'homme 1/3 de la sécrétion biliaire (van der Velde, *Curr Opin Lipidol*, 2010).

Deux méthodes récemment développées chez la souris ont permis de mettre en évidence *in vivo* et de quantifier le flux du cholestérol associé au TICE : la première repose sur la perfusion d'anses intestinales isolées chez la souris (van der Velde, *Gastroenterology*, 2007) et la seconde sur la quantification de la provenance des stérols neutres dans les fèces grâce à l'utilisation d'isotopes (van der Veen, *J Biol Chem*, 2009). Une autre technique consiste en l'étude du passage du cholestérol du pôle baso-latéral au pôle apical de la muqueuse intestinale, sur des explants intestinaux, grâce à l'utilisation de chambres de Ussing (Le May, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013). Grâce à cette méthode, Le May *et al* ont mis en évidence ce processus dans du tissu humain.

D'un point de vue quantitatif, cette voie non-biliaire rend compte de 20 à 50% du contenu total des fèces en stérols neutres endogènes chez la souris sous régime chow (van der Veen, *J Biol Chem*, 2009) tandis qu'elle représenterait, chez l'Homme, de 20 à 30% du cholestérol fécal d'origine endogène (van der Velde, *Curr Opin Lipidol*, 2010).

Le TICE se produit tout au long de l'intestin grêle avec cependant un gradient décroissant crânio-caudal, tout comme l'absorption (van der Velde, *Gastroenterology*, 2007). Cependant, la connaissance des mécanismes moléculaires entérocytaires du TICE reste, à ce jour, très limitée. Elle souligne cependant l'existence de 4 étapes limitantes dans le processus entérocytaire du TICE, que je vais donc vous décrire dans les parties qui suivent.

### 2.3.4. Grandes étapes du TICE au niveau de l'entérocyte

Ces 4 étapes limitantes (figure 17) sont relatives à 1) la disponibilité dans le plasma de donneurs de cholestérol issus du métabolisme des lipoprotéines, 2) l'expression, au pôle baso-latéral des entérocytes, de récepteurs membranaires compétents pour la capture du cholestérol, 3) le trafic du cholestérol dans l'entérocyte et 4) l'expression, au pôle apical des entérocytes, de protéines compétentes pour l'efflux apical du cholestérol vers la lumière intestinale.

Le caractère limitant de chacune de ces étapes, les unes par rapport aux autres, est une question totalement ouverte à ce jour ; tout comme l'est celui des processus intestinaux par rapport aux processus se déroulant dans les autres tissus impliqués dans le TICE.

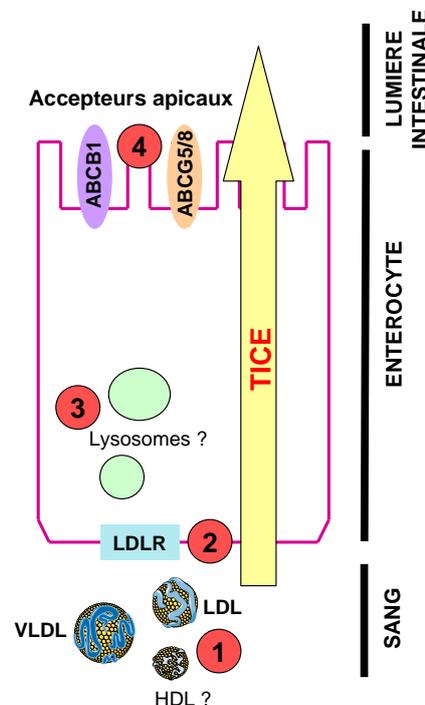


Figure 17 : Grandes étapes du TICE dans l'entérocyte

#### **2.3.4.1. Métabolisme intravasculaire et lipoprotéines compétentes**

L'identification des lipoprotéines donneuses de cholestérol pour le TICE, au pôle baso-latéral des entérocytes, représente une question importante autant d'un point de vue fondamental que dans le cadre de la recherche de cibles thérapeutiques.

Bien que les HDL jouent un rôle essentiel d'accepteurs efficaces dans l'efflux du cholestérol cellulaire dans les tissus périphériques (première étape du RCT), elles ne représentent pas un caractère limitant pour le TICE. En effet, dans des modèles de souris caractérisés par un taux effondré de HDL dans le plasma (modèles de souris ABCA1<sup>-/-</sup> (Vrins, *J Lipid Res*, 2012)) ou apoA1<sup>-/-</sup> (Jolley, *J Lipid Res*, 1998), ni la voie biliaire ni le TICE ne sont diminués.

A l'inverse des HDL, les lipoprotéines d'origine hépatique contenant l'ApoB (VLDL, LDL) constituent de bons candidats donneurs de cholestérol ciblant l'intestin. D'une part, il est possible d'augmenter le TICE chez la souris en facilitant la capture par l'épithélium intestinal du cholestérol de ces particules (modèle de souris ACAT2<sup>-/-Liver</sup> dans lequel l'estérification du cholestérol au niveau du foie est inhibée (Brown, *J Biol Chem*, 2008)), ou de diminuer le TICE dans un modèle déficient pour la production de ces lipoprotéines (modèle Mttp<sup>-/-Liver</sup> (Temel, *Curr Opin Lipidol*, 2012)). D'autres travaux sont cependant nécessaires pour déterminer les mécanismes par lesquels les lipoprotéines contenant l'ApoB transfèrent leur contenu en cholestérol à la membrane baso-latérale de l'entérocyte.

#### **2.3.4.2. Récepteurs aux lipoprotéines et transporteurs baso-latéraux**

Les études menées chez la souris visant à évaluer le rôle du récepteur des HDL, SR-BI, à la membrane des entérocytes aboutissent à la conclusion qu'il n'est pas impliqué dans le mécanisme du TICE, et supportent donc les données rejetant les HDL comme particules « compétentes » dans le phénomène du TICE. En particulier des études menées dans un modèle de souris SR-BI<sup>-/-</sup> mettent en évidence un TICE augmenté (van der Velde, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008). La surexpression de SR-BI, spécifiquement dans l'intestin, n'a pas d'effet sur le TICE (Temel, *Curr Opin Lipidol*, 2012).

Les entérocytes expriment à la membrane baso-latérale, différents membres de la famille du récepteur aux LDL (LDLR). La protéine PCSK9 est un inhibiteur circulant du LDLR. Elle réduit la présence de LDLR dans la membrane baso-latérale des entérocytes en provoquant sa dégradation dans les lysosomes (Maxwell et Breslow, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004). En utilisant des souris PCSK9<sup>-/-</sup> ou en injectant du PCSK9 recombinant, l'équipe de Le May montre que le niveau de TICE est modulé dans le même sens que le niveau du LDLR dans la membrane des entérocytes, suggérant son implication dans la capture du cholestérol plasmatique par l'intestin (Le May, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013).

#### **2.3.4.3. Trafic entérocytaire du cholestérol**

Le transport intracellulaire du cholestérol est le résultat de mécanismes vésiculaires et non vésiculaires, non exclusifs l'un de l'autre, mais qui restent encore mal définis et ceci quelque soit le type cellulaire.

Si les lipoprotéines de basse densité (LDL) sont impliquées dans le transfert à l'intestin du cholestérol plasmatique, alors il est probable que ces lipoprotéines soient endocytées par la voie des puits recouverts de clathrine et aboutissent dans les lysosomes des entérocytes. Les données expérimentales concernant cette voie dans le TICE se limitent à des analyses chez la souris traitée par un agoniste de PPAR $\beta/\delta$  qui montrent une corrélation positive entre le niveau d'expression de deux protéines des lysosomes (rab9 et LIMP2) dans l'intestin et l'amplitude du TICE (Vrins, *J Lipid Res*, 2009).

Les moyens disponibles pour l'étude du transport rétrograde du cholestérol dans l'entérocyte, du pôle baso-latéral au pôle apical, étaient inexistantes jusqu'alors. Nos travaux, visibles en Annexe, ont permis la caractérisation de la lignée entérocytaire humaine Caco-2/TC7 comme modèle d'étude des processus entérocytaires liés au TICE et devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires liés au trafic entérocytaire du cholestérol lors du TICE.

#### **2.3.4.4. Efflux apical du cholestérol**

Après son trafic du pôle baso-lateral au pôle apical des entérocytes, le cholestérol fait vraisemblablement l'objet d'un phénomène d'efflux stimulé par des composants présents dans la lumière de l'intestin. En effet, la sécrétion du cholestérol dans la lumière intestinale requiert des accepteurs de cholestérol spécifiques composés de phospholipides et d'acides biliaires (2mM PC (phosphatidylcholine) / 10mM TC (taurocholate)). Dans des expériences de perfusion intestinale chez la souris, la présence de phospholipides est un paramètre limitant pour l'excrétion luminale du cholestérol (van der Velde, *Gastroenterology*, 2007).

De plus, concernant les transporteurs au pôle apical responsable de l'efflux du cholestérol lors du TICE, les hémi-transporteurs ABCG5 et ABCG8, présents à la membrane apicale des entérocytes, ont la capacité de pomper les stérols (phytostérols et cholestérol) de la cellule en direction de la lumière intestinale, faisant d'eux de bons candidats. Des données obtenues dans des modèles ABCG5<sup>-/-</sup> (van der Veen, *J Biol Chem*, 2009) et sur-exprimant les 2 hémi-transporteurs (Yu, *J Clin Invest*, 2002) démontrent leur implication dans le TICE. D'autres travaux portent sur ABCB1 (P-gp), une floppase présente dans la membrane apicale des entérocytes. Les études réalisées dans des souris ABCB1<sup>-/-</sup> ou en présence de l'inhibiteur spécifique de ABCB1 (PSC-833) indiquent que l'inactivation de ce

gène réduit l'excrétion fécale des stérols neutres et diminue l'amplitude du TICE (Le May, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013).

### **2.3.5. Régulation du TICE**

Le TICE est un processus inductible, ce qui en fait une cible intéressante pour augmenter l'excrétion fécale du cholestérol et lutter contre l'athérosclérose. Cette voie non biliaire d'excrétion du cholestérol est très sensible à des interventions diététiques et pharmacologiques.

Ainsi, des souris soumises à un régime de type « Western » ou riche en graisses présentent une augmentation de leur TICE. Cependant, celles qui reçoivent un régime seulement riche en cholestérol ne présentent pas de modification de leur TICE (van der Velde, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008). De plus, en 2011, Brufau *et al* ont montré qu'en plus de réduire l'absorption intestinale du cholestérol, les phytostérols stimulent le TICE (Brufau, *PLoS One*, 2011).

D'un point de vue pharmacologique, plusieurs agonistes de récepteurs nucléaires ont été mis en évidence comme modulateurs du TICE. L'activation des récepteurs nucléaires LXR et PPAR $\beta/\delta$  augmente de façon importante la contribution du TICE à l'excrétion fécale des stérols neutres en modifiant ou non la contribution biliaire ((van der Veen, *J Biol Chem*, 2009) ; (Vrins, *J Lipid Res*, 2009)). Il en est de même pour les drogues hypocholestérolémiantes comme les statines et l'ézétimibe qui sont rapportées comme stimulant le TICE ((Jakulj, *FEBS Lett*, 2010) ; (Le May, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013) ; (Schonewille, *J Lipid Res*, 2016)). Enfin, le peptide 4F, qui est un mimétique de l'ApoAI, a récemment été décrit comme modulateur du TICE (Meriwether, *J Lipid Res*, 2016).

## 3. Le récepteur nucléaire Rev-erba/NR1D1

### 3.1. Généralités sur les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription : ce sont des protéines sensibles aux signaux biologiques, capables de fixer un ligand, et qui se lient au promoteur de gènes dits « cibles » qui leur sont spécifiques, afin de réguler leur activité transcriptionnelle.

On compte 49 récepteurs nucléaires chez l'Homme, qui peuvent être classés soit en fonction de critères phylogénétiques (nomenclature officielle) (Robinson-Rechavi, *J Cell Sci*, 2003), de critères d'interaction avec l'ADN (Mangelsdorf, *Cell*, 1995), ou encore de critères physiologiques (McKenna, *Mol Endocrinol*, 2009).

Malgré une homologie structurale, les récepteurs nucléaires sont impliqués dans de multiples fonctions telles que la différenciation, la reproduction et le maintien de l'homéostasie énergétique.

#### 3.1.1. Structure

Les récepteurs nucléaires possèdent une organisation structurale conservée (figure 18) comprenant, pour la plupart, 6 domaines fonctionnels, appelés A, B, C, D, E et F (Pawlak, *Curr Top Med Chem*, 2012).

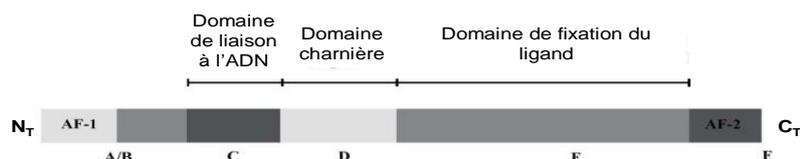
Le domaine A/B, situé en N-terminal, constitue la partie la plus variable du récepteur en termes de taille et de séquence. Il contient une fonction de trans-activation indépendante du ligand appelée AF-1 et confère une activité spécifique à chaque isoforme d'un récepteur nucléaire.

Le domaine C ou DNA Binding Domain (DBD) constitue le site de liaison à l'ADN et est très conservé entre les différents récepteurs nucléaires. Il confère la capacité au récepteur nucléaire de reconnaître et de fixer une séquence cible spécifique appelée « élément de réponse aux récepteurs nucléaires » (NRRE).

Le domaine D est une région charnière entre les domaines C et E et n'est pas très conservé.

Le domaine E ou Ligand Binding Domain (LBD), situé en C-terminal, constitue le site de fixation du ligand. Il est formé de 12 hélices  $\alpha$  conservées (H1 à H12) et de trois feuillets  $\beta$  superposés qui forment une poche hydrophobe. On retrouve, dans ce domaine, le motif AF-2, responsable de l'activation transcriptionnelle dépendante du ligand.

Le domaine F, dont la présence est variable d'un récepteur nucléaire à l'autre, est situé en C-terminal. Sa fonction précise n'a pas encore été élucidée.



**Figure 18 : Structure générale d'un récepteur nucléaire**

Adapté de Pawlak, *Curr Top Med Chem*, 2012

### 3.1.2. Mode de fonctionnement

En tant que facteur de transcription, les récepteurs nucléaires ont le pouvoir de moduler positivement la transcription de leurs gènes cibles par des mécanismes dits de trans-activation ou négativement via des mécanismes dits de trans-répression.

La trans-activation implique d'abord la fixation d'un ligand au niveau du LDB, puis la fixation directe du récepteur nucléaire sous forme de monomère, d'homodimère ou d'hétérodimère avec RXR (Retinoid X Receptor), au niveau de son élément de réponse. Cela s'accompagne du recrutement de co-activateurs au niveau de la chromatine.

La trans-répression est un processus qui implique le recrutement de complexes co-répresseurs tels que NCoR (Nuclear receptor Co-Repressor) ou SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptor) (Xu, *Curr Opin Genet Dev*, 1999). Le fonctionnement de ces complexes co-répresseurs implique des modifications des histones (désacétylation, par exemple) et de l'ADN (méthylation, par exemple), ce qui conduit à la compaction de l'ADN et le rend moins accessible pour sa transcription.

### 3.1.3. Récepteurs nucléaires et métabolisme intestinal lipidique

Le rôle des récepteurs nucléaires de l'intestin dans le métabolisme énergétique lipidique et glucidique a été démontré, pour partie, au sein du laboratoire.

En particulier, l'activation du récepteur nucléaire LXR dans l'intestin régule l'expression de NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1) (Duval, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006), ce qui pourrait expliquer la diminution de l'absorption de cholestérol observée quand ce récepteur nucléaire est activé (Repa, *Science*, 2000). De plus, PPAR $\alpha$  dans l'intestin est impliqué dans le contrôle de la production des HDL (Colin, *Eur Heart J*, 2012), ce qui fait de l'intestin une cible thérapeutique intéressante contre l'athérosclérose. Tout récemment, nous avons montré que l'activation de LXR dans la lignée entérocytaire Caco-2/TC7 et chez la souris diminue la sécrétion de CM par un mécanisme SR-B1-dépendant (Briand, *Gastroenterology*, 2016). De plus, comme cela est indiqué dans la partie précédente portant sur le métabolisme intestinal lipidique, les agonistes de LXR et PPAR $\beta/\delta$  modulent le TICE.

D'autre part, l'activation de PPAR $\beta/\delta$  augmente la production de GLP-1 par les cellules entéro-endocrines de type L, ce qui contribue au contrôle du métabolisme glucidique

(Daoudi, *Gastroenterology*, 2011) tandis que FXR (Farnesoid X Receptor) inhibe la production de GLP-1 par ces cellules (Trabelsi, *Nature Com*, 2015). Le GLP-1 participant à la régulation de la production des CM, on peut se demander si ces 2 récepteurs nucléaires sont également impliqués dans le métabolisme intestinal des CM.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au récepteur nucléaire Rev-erb $\alpha$  dont le rôle dans le métabolisme intestinal n'a pas encore été élucidé.

## **3.2. Le récepteur nucléaire Rev-erb $\alpha$**

### **3.2.1. Présentation**

Rev-erb $\alpha$  ou NR1D1 (Nuclear Receptor subfamily 1, group D, member 1), appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Découvert en 1989, son gène se situe sur le chromosome 17, sur le brin reverse du gène codant pour le récepteur nucléaire aux hormones thyroïdiennes (TR $\alpha$ ), d'où son nom (Lazar, *Mol Cell Biol*, 1989). Un récepteur nucléaire hautement similaire (~96% d'homologie du DBD) appelé Rev-erb $\beta$  (NR1D2) a été identifié en 1994 ((Dumas, *Mol Endocrinol*, 1994) ; (Retnakaran, *Mol Endocrinol*, 1994) ; (Forman, *Mol Endocrinol*, 1994)). Des études plus récentes ont montré que Rev-erb $\alpha$  et Rev-erb $\beta$  partagent les mêmes fonctions autant dans le contrôle du rythme circadien que dans le contrôle du métabolisme énergétique ((Bugge, *Genes Dev*, 2012) ; (Cho, *Nature*, 2012)).

Rev-erb $\alpha$  est exprimé de manière ubiquitaire, en particulier dans les organes métaboliques majeurs tels que le foie, le tissu adipeux, le muscle et l'intestin (Duez et Staels, 2009).

### **3.2.2. Ligands**

#### **3.2.2.1. L'hème, ligand naturel des Rev-erb**

L'hème, constituant de l'hémoglobine, est une structure aromatique contenant un atome de fer. L'hème possède un large anneau organique appelé porphyrine qui permet d'accueillir un gaz diatomique, comme l'oxygène. En se combinant de façon réversible à l'oxygène, il permet son transport des poumons jusqu'aux tissus. La synthèse de l'hème suit un rythme circadien et son étape limitante est catalysée par l'enzyme ALAS (5-Aminolevulinic acid synthase-1).

C'est en 2007 qu'a sonné la fin de l'orphelinat pour les récepteurs Rev-erb avec l'identification de l'hème comme leur agoniste naturel ((Yin, *Science*, 2007) ; (Raghuram, *Nat Struct Mol Biol*, 2007)). Cela a été rendu possible suite à la purification des domaines LBD des Rev-erb et la mise en évidence de leur interaction avec l'hème par spectrométrie de masse. Cette interaction est requise pour le recrutement du complexe co-represseur NCoR

puisque la mutation du domaine LBD de Rev-erb $\alpha$  entraîne la perte de la fixation de l'hème, du recrutement de NCoR et de l'activité trans-répressive de Rev-erb $\alpha$ .

Il est possible de moduler la concentration intracellulaire en hème. L'apport exogène d'hème permet son augmentation alors que le succinyl acétone, en empêchant l'incorporation de fer dans l'hème, la diminue. Ainsi, l'hème diminue l'expression en ARNm du gène cible le mieux caractérisé de Rev-erb $\alpha$  : Bmal1, dans des cellules de la lignée HepG2 (cellules hépatiques) alors que le succinyl acétone l'augmente.

### **3.2.2.2. Développement de ligands synthétiques pour les Rev-erb**

Suite à la découverte de l'hème comme ligand naturel, des ligands synthétiques pour les Rev-erb ont été développés. Parmi eux, plusieurs agonistes comme le GSK4112 (Grant, *ACS Chem Biol*, 2010), le SR9009 et le SR9011 (Solt, *Nature*, 2012), qui augmentent l'interaction avec le complexe co-represseur NCoR et l'activité trans-répressive de Rev-erb $\alpha$ .

Il existe, à ce jour, également un antagoniste des Rev-erb : le SR8278 (Kojetin, *ACS Chem Biol*, 2011), qui entraîne l'augmentation de l'expression en ARNm des gènes cibles des Rev-erb.

### **3.2.2.3. Stabilité de la protéine Rev-erb $\alpha$**

L'expression de Rev-erb $\alpha$  peut également être modulée au niveau protéique. En effet, l'enzyme GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) permet la phosphorylation et la stabilisation de la protéine Rev-erb $\alpha$  (Yin, *Science*, 2006). Ainsi, le lithium, en inhibant l'activité de la GSK3, entraîne la dégradation protéasomale de la protéine Rev-erb $\alpha$  suite à son ubiquitination par des enzymes de type E3 ligases (Arf-bp1 et Pam) (Yin, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010).

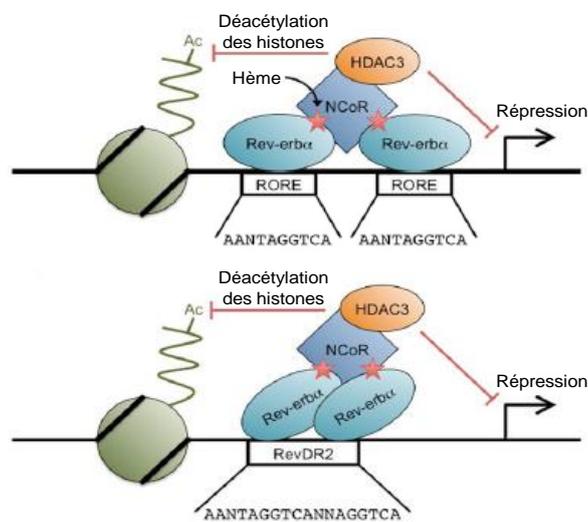
De plus, une étude de screening a permis d'identifier la protéine Siah2 comme une des ubiquitines de la voie protéasomale, responsable de la dégradation de la protéine Rev-erb $\alpha$  (DeBruyne, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015). Ces résultats ont été validés suite à l'inactivation de Siah2 dans les cellules de la lignée U2OS qui conduit à une diminution de la dégradation de la protéine Rev-erb $\alpha$ .

### **3.2.3. Mécanisme d'action**

Rev-erb $\alpha$  ne possède ni le domaine F ni le motif AF-2 au niveau du domaine E. Cela entraîne l'absence de la 12<sup>ème</sup> hélice  $\alpha$  (H12) qui est pourtant cruciale pour le recrutement de co-activateurs (Xu, *Curr Opin Genet Dev*, 1999). Il agit donc uniquement en tant que répresseur transcriptionnel (Harding, *Mol Cell Biol*, 1995) en interagissant avec des complexes co-répresseurs tels que NCoR et plus rarement SMRT (NCoR2) au niveau de son extrémité C-terminal (Downes, *Nucleic Acids Res*, 1996), qui vont permettre le

recrutement de HDAC3 (Yin, *Science*, 2007). HDAC3 (Histone Deacetylase 3), en désacétylant les histones, va alors induire un remodelage de la chromatine et créer un environnement répressif pour la transcription des gènes cibles de Rev-erba (Sun, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2011).

Rev-erba, sous forme de monomère, se fixe à l'ADN au niveau d'une région riche en A/T suivie de la séquence consensus AGGTCA (RORE ou RevRE) (Harding, *Mol Cell Biol*, 1993). Rev-erba peut également se fixer à l'ADN sous forme d'homodimère et ce, soit au niveau de 2 RORE indépendants soit au niveau d'une répétition de 2 RORE séparée par 2 nucléotides (RevDR2) (Harding, *Mol Cell Biol*, 1995) (figure 19).



**Figure 19 : Modes de fixation à l'ADN de Rev-erba**

Adapté de Everett et Lazar, *Trends Endocrinol Metab*, 2014

HDAC3 : Histone Deacetylase 3 ; NCoR : Nuclear receptor Co-Repressor.

Cependant, une étude récente (Zhang, *Science*, 2015) a montré que Rev-erba était capable de se fixer sur d'autres régions du génome. Ces régions diffèrent selon le tissu étudié. Par exemple, Rev-erba est capable de fixer, en plus des RORE et RevDR2, des motifs HNF4A (Hepatocyte Nuclear Factor 4A) et HNF6 au niveau du foie. Cette étude n'étudie malheureusement pas les autres motifs liés par Rev-erba dans l'intestin. Les auteurs suggèrent, dans cette étude, que le rôle de Rev-erba dans le maintien de l'horloge circadienne s'exercerait davantage via sa fixation sur les motifs de type RORE et RevDR2 et son rôle dans le métabolisme énergétique plutôt via sa fixation sur ces autres motifs tissu-spécifiques.

### 3.2.4. Rôles de Rev-erba

Rev-erba est impliqué d'une part dans le contrôle du métabolisme énergétique et d'autre part dans le maintien du rythme circadien, en inhibant la transcription de Bmal1.

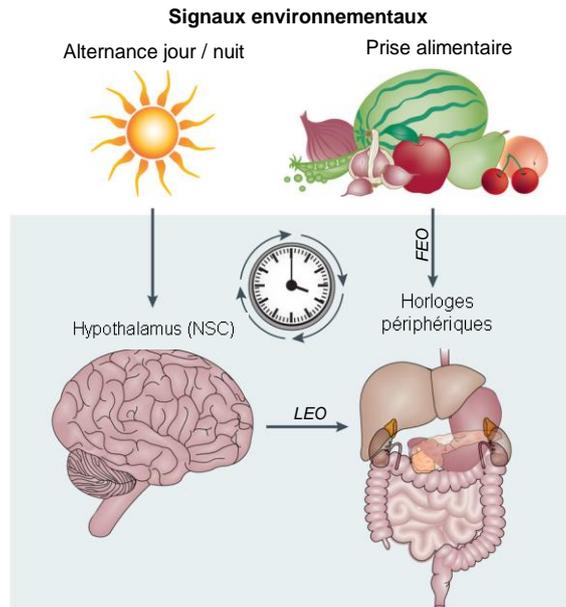
#### 3.2.4.1. Rythme circadien

##### 3.2.4.1.1. Définition du rythme circadien

La vie sur Terre est soumise à un rythme nyctéméral, de par la rotation de la Terre. La plupart des organismes possèdent une horloge circadienne qui leur permet d'anticiper ces variations journalières puis la mise en place de processus biologiques adaptés (Dibner, *Annu Rev Physiol*, 2010). Le rythme circadien (du latin *circa diem*, environ un jour) regroupe l'ensemble des processus biologiques dont l'oscillation est d'environ 24 heures. Ce rythme est généré par une horloge moléculaire présente au sein de chacune de nos cellules.

Il est, chaque jour, ré-entraîné grâce à la lumière, qui est le principal régulateur de notre horloge dite centrale. Cette horloge centrale est située au niveau des noyaux supra-chiasmatiques de l'hypothalamus (figure 20) et génère un LEO (Light Entrainable Oscillator) qui va coordonner les horloges dites périphériques présentes dans tous les organes (Hussain et Pan, *Trends Endocrinol Metabol*, 2009). Ce LEO peut être médié par un signal hormonal ou neuronal.

Cependant, le rythme circadien n'est pas contrôlé uniquement par l'alternance jour/nuit. La nourriture permet également de coordonner les horloges périphériques, notamment celles des tissus métaboliques, en générant un FEO (Food Entrainable Oscillator) (Stephan, *J BiolRhythms*, 2002). Le métabolisme énergétique peut ainsi entraîner le rythme circadien et cela, grâce à des mécanismes dépendants des voies AMPK et SIRT1 (Huang, *J Clin Invest*, 2011).



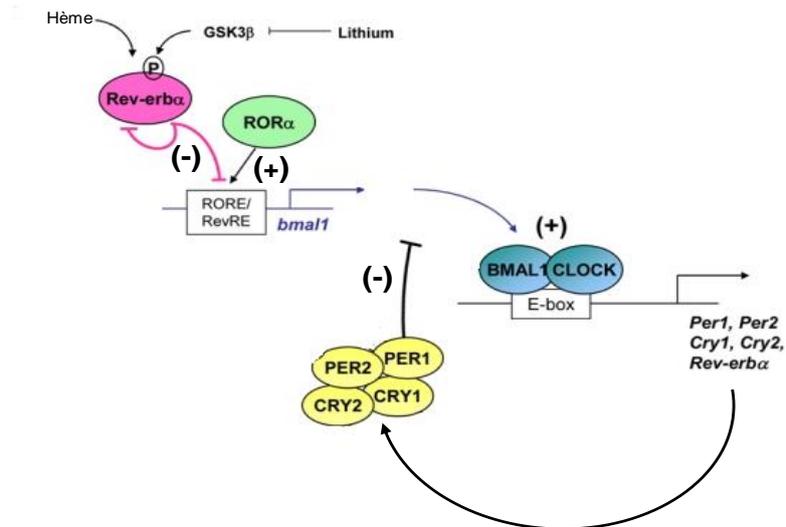
**Figure 20 : Horloge centrale et horloges périphériques**

Adapté de Tahara et Shibata, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016

FEO : Food Entrainable Oscillator ; LEO : Light Entrainable Oscillator ; NSC : Noyau supra-chiasmatique.

#### 3.2.4.1.2. Mécanismes moléculaires et rôle de Rev-erba

Les mécanismes moléculaires à l'origine de l'horloge circadienne sont bien caractérisés (Dibner, *Annu Rev Physiol*, 2010) et sont composés d'un système complexe de boucles de transcription (figure 21). La première boucle de transcription implique d'une part, les facteurs de transcription activateurs Clock et Bmal1, qui s'hétérodimérisent, se fixent sur des séquences E-box et activent la transcription de leur gènes cibles (Per, Cry, Rev-erb, ROR). D'autre part, les répresseurs Per et Cry vont alors s'hétérodimériser, entrer dans le noyau afin de diminuer l'activité transcriptionnelle du complexe Clock/Bmal1. La seconde boucle de transcription implique les récepteurs nucléaires Rev-erb et ROR qui, respectivement, diminuent et augmentent la transcription de Bmal1.



**Figure 21 : Mécanismes moléculaires du rythme circadien**

Adapté de Duez et Staels, *J Appl Physiol*, 2009

GSK3 $\beta$  : Glycogen Synthase Kinase 3  $\beta$  ; RevRE : Rev-erb Response Element.

C'est en 1998 que Balsalobre *et al* ont montré, grâce à la synchronisation par choc sérum de cellules hépatiques et de fibroblastes, que l'expression de Rev-erb $\alpha$  oscille suivant un rythme circadien (Balsalobre, *Cell*, 1998). Cela a ensuite été vérifié *in vivo* dans différents tissus. L'expression de Rev-erb $\alpha$  et de Rev-erb $\beta$  suivent un rythme nyctéméral avec une expression protéique maximale à ZT10 (Zeitgeber Time) dans le foie, chez la souris, donc en phase claire et de repos (Bugge, *Genes Dev*, 2012). L'inactivation de Rev-erb $\alpha$  chez la souris n'induit pas d'altérations majeures du rythme circadien (Preitner, *Cell*, 2002). De même, l'inactivation de Rev-erb $\alpha$  dans des fibroblastes de souris ou celle de Rev-erb $\beta$  n'a pas d'effets majeurs sur l'expression des gènes de l'horloge circadienne. Par contre, l'inactivation simultanée de Rev-erb $\alpha$  et Rev-erb $\beta$  entraîne l'abrogation de la rythmicité circadienne de leur expression (Bugge, *Genes Dev*, 2012), suggérant à nouveau une fonction redondante de ces deux récepteurs nucléaires appartenant à la même famille.

### 3.2.4.1.3. Désordres métaboliques associés

Les perturbations du rythme circadien se produisent lorsque la synchronisation entre les éléments de l'environnement et les processus physiologiques est perdue. Chez l'Homme, cela inclut le travail posté et le décalage horaire. Plusieurs études épidémiologiques ont montré que le travail posté était associé avec un risque élevé d'obésité, de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires ainsi qu'une hypertriglycéridémie et un niveau bas de HDL-cholestérol ((Karlsson, *Occup Environ Med*, 2001) ; (Pan, *PLoS Med*, 2011)). Le décalage

horaire lui, induit des troubles du sommeil, des troubles de l'humeur ainsi que des perturbations gastro-intestinales (Waterhouse, *Lancet*, 2007). De plus, plusieurs études ont identifié une association entre des polymorphismes des gènes de l'horloge, tels que Clock (Scott, *Int J Obes*, 2008), Bmal1 (Woon, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007) et Rev-erba (Goumidi, *Int J Obes*, 2013), et l'obésité, l'hyperglycémie et le diabète de type 2. Enfin, il est maintenant bien reconnu que notre poids corporel n'est pas seulement corrélé à la quantité de nourriture ingérée mais aussi au moment auquel on l'ingère.

Chez les rongeurs également, de nombreuses études ont mis en évidence le couplage de l'horloge circadienne avec le statut métabolique. Notamment, l'induction de mutations ou l'inactivation de gènes de l'horloge induit une altération du rythme circadien ainsi qu'un phénotype métabolique (pour revue, Eckel-Mahan et Sassone-Corsi, *Physiol Rev*, 2013). De plus, la prise de nourriture influence l'horloge. L'administration d'un régime riche en graisses entraîne un dérèglement de l'horloge et un décalage de la prise alimentaire (Kohsaka, *Cell Metab*, 2007). Lorsque les souris n'ont accès à la nourriture qu'en période de sommeil, elles prennent plus de poids que celles qui en ont l'accès en période de veille (Arble, *Obesity*, 2009).

#### **3.2.4.1.4. Rythme circadien et métabolisme intestinal lipidique**

Plusieurs fonctions intestinales telles que la motilité, la vidange gastrique, le renouvellement des cellules épithéliales sont soumises à un rythme circadien (Hussain, *Trends Endocrinol Metab*, 2009). Parmi elles, on retrouve également l'absorption des nutriments, et plus particulièrement l'absorption des lipides alimentaires.

Les gènes de l'horloge sont bien exprimés dans l'intestin et selon un gradient croissant crânio-caudal, plus particulièrement dans les cellules épithéliales (Pan, *J Lipid Res*, 2009). Ces gènes présentent également une expression diurnale dans l'intestin, similaire à celle dans le foie, chez des souris nourries *ad libitum*. Les auteurs montrent également qu'une restriction d'accès à la nourriture pendant 2 heures modifie l'expression des gènes de l'horloge dans l'intestin, suggérant que ces gènes sont aussi soumis à un FEO dans l'intestin.

Des études mesurant l'absorption intestinale des lipides *in vivo*, sur des anses intestinales ou dans des entérocytes primaires ont montré que l'absorption lipidique (TG + cholestérol) est maximale pendant la phase sombre chez la souris et le rat (période de veille) et plus faible pendant la phase claire (période de sommeil) (Pan, *J Biol Chem*, 2007). Cette augmentation de l'absorption de lipides est associée à une augmentation des niveaux plasmatiques d'ApoB48. Plusieurs gènes impliqués dans la synthèse des triglycérides et le

transport des lipides dans l'intestin sont soumis à la fois à un LEO et un FEO (ACAT2, ApoB, ApoAIV, DGAT2, FAS, MTP, SCD-1) (Pan, *J Lipid Res*, 2009).

Si on altère l'horloge biologique, on perturbe la régulation circadienne de l'absorption lipidique intestinale. Ceci est montré avec la mutation du gène Clock (Clock<sup>Δ19</sup>) chez la souris, qui entraîne l'expression d'un dominant négatif. Ces souris mutées ne présentent plus d'expression diurnale des gènes impliqués dans l'absorption intestinale des lipides (Pan, *J Lipid Res*, 2009). De plus, des études fonctionnelles sur des anses intestinales ou dans des entérocytes primaires montrent que la mutation de Clock entraîne une altération du rythme circadien de l'absorption intestinale des lipides : ces souris absorbent autant de lipides en période de sommeil qu'en période de veille. De plus, l'expression et l'activité diurnale de la protéine MTP, acteur clé de la production de CM, sont altérées chez ces souris. Dans des cellules hépatiques de la lignée Huh-7, l'inactivation de Clock par siRNA entraîne une augmentation de l'expression et de l'activité de la protéine MTP et une diminution de l'expression de SHP (Small Heterodimer Partner) ; l'expression de SHP est ainsi inversement corrélée à celle de la protéine MTP. La MTP serait donc directement régulée par Clock, dans le foie, par un mécanisme dépendant de SHP (Pan, *Cell Metab*, 2010)

L'ApoAIV a également été mise en évidence comme régulant le caractère circadien de l'absorption lipidique intestinale. Les souris invalidées pour ApoAIV ne présentent aucune altération de l'expression diurnale des gènes de l'horloge mais absorbent moins de TG en période sombre que leurs contrôles et en accumulent plus dans leurs entérocytes (Pan, *J Biol Chem*, 2013). Elles présentent également une diminution de l'expression et de l'activité de la protéine MTP. Les auteurs font les mêmes observations dans la lignée cellulaire Caco-2, suggérant que l'ApoAIV pourrait réguler l'expression et l'activité de la MTP. Les mécanismes moléculaires de cette régulation ont été caractérisés dans la lignée Huh-7 et semblent impliquer les facteurs de transcription FoxA2 et FoxO1 (Pan, *J Biol Chem*, 2013).

Enfin, la Nocturnin est également impliquée dans le contrôle du rythme circadien de l'absorption intestinale des lipides (Douris, *Curr Biol*, 2011). La Nocturnin est une déadénylase qui contrôle la stabilité des ARNm, la déadénylation conduisant à leur dégradation et l'inhibition de leur transcription. Chez la souris, son expression est rythmique, anti-phasique à celle de Bmal1 et induite par un bolus d'huile. Les souris invalidées pour la Nocturnin absorbent moins de lipides (TG + cholestérol) et en accumulent plus dans leurs entérocytes, sous la forme de LD de plus grosse taille.

#### **3.2.4.2. Métabolisme énergétique**

Des études ont montré qu'il existait une association entre les polymorphismes de Rev-erba et l'obésité ((Goumidi, *Int J Obes*, 2013) ; (Ruano, *PLoS One*, 2014)). Rev-erba, en plus

de son rôle dans le maintien du rythme circadien, est impliqué dans le contrôle du métabolisme énergétique (figure 22).

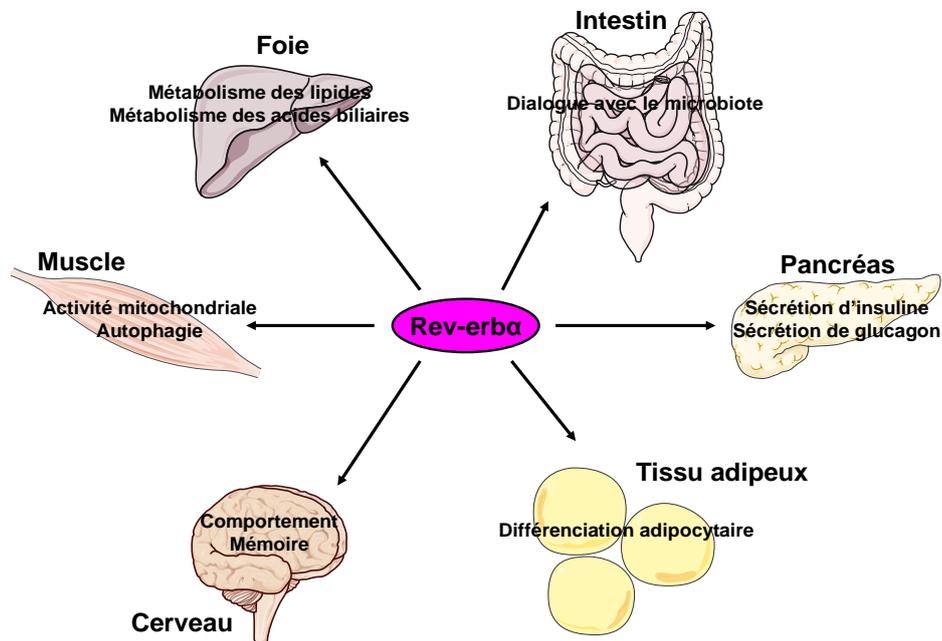


Figure 22 : Rôles de Rev-erba dans le métabolisme énergétique

Adapté de Everett et Lazar, *Trends Endocrinol Metab*, 2014

#### 3.2.4.2.1. Rev-erba dans le tissu adipeux

Peu de temps après sa découverte, des études ont montré l'implication de Rev-erba dans le métabolisme énergétique notamment dans le tissu adipeux. En effet, l'expression de Rev-erba est induite lors de la différenciation adipocytaire (Chawla, *J Biol Chem*, 1993). De plus, Rev-erba possédant un élément de réponse aux récepteurs nucléaires PPAR au niveau de son promoteur (Laitinen, *Biochimie*, 2005), il a été montré que Rev-erba était un médiateur de la différenciation adipocytaire induite par PPAR $\gamma$ .

Une autre étude montre le rôle de Rev-erba dans le tissu adipeux brun (Gerhart-Hines, *Nature*, 2013). Rev-erba est impliqué dans la thermogénèse en contrôlant l'expression de UCP1 (Uncoupling Protein 1). Ainsi, l'inactivation de Rev-erba chez la souris améliore la tolérance à l'exposition à des températures très froides, suggérant que l'activité Rev-erba est fondamentale à la réponse au froid.

#### 3.2.4.2.2. Rev-erba dans le foie

Rev-erba est particulièrement impliqué, dans le foie, dans le contrôle du métabolisme lipidique. D'une part, Rev-erba régule le métabolisme des acides biliaires et du cholestérol (Le Martelot, *PLoS Biol*, 2009). En effet, Rev-erba participe, via le contrôle de la transcription de *Insig2*, à la modulation de l'activité de SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) et donc de l'expression des gènes cibles de SREBP impliqués dans le métabolisme du cholestérol (HMGCR) et des acides biliaires (FAS, ELOVL3, ELOVL6). De plus, Rev-erba est également impliqué dans la régulation de la synthèse des acides biliaires par l'intermédiaire de deux de ses gènes cibles, SHP et E4BP4, qui inhibent l'expression de la CYP7A1 (Duez, *Gastroenterology*, 2008). Ainsi, les souris invalidées pour Rev-erba présentent une synthèse biliaire diminuée et une excrétion biliaire altérée.

D'autre part, l'ApoC-III a également été identifiée comme un autre gène cible direct de Rev-erba dans le foie (Raspé, *J Lipid Res*, 2002). L'ApoC-III est un constituant majeur des lipoprotéines riches en TG et inhibe l'activité de la LPL. Les souris invalidées pour Rev-erba présentent ainsi une hypertriglycéridémie associée à un niveau de VLDL augmenté.

Une étude a permis de mettre en avant le cistrome de Rev-erba dans le foie, c'est-à-dire l'ensemble de ses sites de liaison à l'ADN (Feng, *Science*, 2011). Parmi ces sites, beaucoup sont associés au métabolisme lipidique. Les souris invalidées pour Rev-erba ou pour HDAC3 présentent d'ailleurs une accumulation de TG dans le foie et donc une stéatose hépatique. Une autre étude de 2015 a d'ailleurs confirmé ces résultats (Zhang, *Science*, 2015).

Rev-erba contrôle également le métabolisme des phospholipides dans le foie, plus particulièrement celui de la phosphatidylcholine, de par son action répressive directe sur la transcription de la choline kinase  $\alpha$  (*Chk $\alpha$* ) impliquée dans la production hépatique de phosphatidylcholine (Gréchez-Cassiau, *Chronobiol Int*, 2015).

Outre son rôle dans le métabolisme lipidique hépatique, il a été montré, dans des hépatocytes primaires et la lignée cellulaire HepG2, que Rev-erba agit en tant que répresseur de la néoglucogénèse hépatique via le contrôle de la transcription de deux de ses gènes clés : G6Pase et PEPCK (Yin, *Science*, 2007). De plus, il a été montré que l'ApoAIV jouait également un rôle répresseur de la néoglucogénèse hépatique via son interaction physique directe avec Rev-erba au niveau du foie (Li, *J BiolChem*, 2014).

De plus, il a été montré dans les cellules HepG2 que l'expression de PAI-1 était elle aussi directement régulée par Rev-erba, faisant ainsi de Rev-erba un modulateur potentiel de la susceptibilité à l'infarctus du myocarde.

#### 3.2.4.2.3. Rev-erba dans le muscle squelettique

Comme cela a été montré pour les adipocytes, Rev-erb $\alpha$  est également impliqué dans la différenciation des muscles (Downes, *Mol Endocrinol*, 1995). Cela a également été montré pour Rev-erb $\beta$ , un an plus tard (Burke, *Nucleic Acids Res*, 1996). Rev-erb $\beta$  régule également l'expression de gènes impliqués dans l'absorption des lipides, comme FABP3, FABP4, CD36 et SCD-1, dans le modèle cellulaire C2C12 (Ramakrishnan, *J Biol Chem*, 2005).

Une étude menée au laboratoire a mis en évidence que les souris invalidées pour Rev-erb $\alpha$  présentent une diminution du nombre de mitochondries et de l'activité mitochondriale au niveau du muscle squelettique et une capacité à l'effort diminuée (Woldt, *Nature Med*, 2013). De plus, la surexpression de Rev-erb $\alpha$  dans la lignée cellulaire C2C12 entraîne un phénotype opposé, une augmentation de l'activité mitochondriale. Le contrôle de la biogénèse mitochondriale par Rev-erb $\alpha$  a été relié à la voie de signalisation AMPK/SIRT1. De plus, il a été montré que Rev-erb $\alpha$  est également impliqué dans le contrôle de la clairance mitochondriale par l'autophagie au niveau du muscle squelettique, en contrôlant directement l'expression de gènes tels que ATG5, ULK1, BECLIN-1 et BNIP3.

#### **3.2.4.2.4. Rev-erb $\alpha$ dans le pancréas**

Des études ont montré que des îlots pancréatiques isolés sécrétaient plus d'insuline en réponse au glucose, au pic d'expression de Rev-erb $\alpha$ , suggérant un rôle de Rev-erb $\alpha$  dans le contrôle de la sécrétion d'insuline. L'inactivation de Rev-erb $\alpha$  par siRNA dans des cellules pancréatiques  $\beta$  primaires ou dans la lignée cellulaire MIN-6, entraîne une altération de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, une diminution de l'expression de gènes clés de la lipogénèse (FAS) et une inhibition de la prolifération des cellules  $\beta$  (Vieira, *Endocrinology*, 2012).

De plus, Rev-erb $\alpha$  contrôle la sécrétion de glucagon dans les cellules pancréatiques  $\alpha$  primaires et celles de la lignée alphaTC1-9 (Vieira, *PLoS One*, 2013). Ce processus pourrait être médié par la voie de signalisation AMPK/SIRT1.

#### **3.2.4.2.5. Rev-erb $\alpha$ dans le cerveau**

Les souris invalidées pour Rev-erb $\alpha$  présentent des déficits de mémoire à court et long termes, suggérant une altération de la fonction de l'hippocampe chez ces souris (Jager, *Mol Endocrinol*, 2014). En 2014, une étude a d'ailleurs montré que Rev-erb $\alpha$  est impliqué dans le contrôle de la neurogenèse de l'hippocampe (Schnell, *PLoS One*, 2014).

Les souris invalidées pour Rev-erb $\alpha$  présentent également une altération de la fonction dopaminergique et se montrent agressives, anxieuses voire dépressives (Chung, *Cell*, 2014).

#### **3.2.4.2.6. Rev-erb $\alpha$ dans l'intestin**

Il a été montré que la balance ROR/Rev-erb est altérée (en faveur des Rev-erb) dans des cellules épithéliales isolées d'iléon provenant de souris ayant un microbiote dépleté suite au traitement par des antibiotiques, suggérant l'existence d'un dialogue entre le microbiote et l'horloge circadienne (Mukherji, *Cell*, 2013). Rev-erb $\alpha$  contribue à cette communication par le contrôle direct de la transcription des TLR au niveau de l'intestin. Aucune autre fonction de Rev-erb $\alpha$  dans l'intestin n'est connue, à ce jour. De par son rôle notable dans le métabolisme lipidique au niveau du foie, nous nous sommes intéressés, pendant ma thèse, au rôle de Rev-erb $\alpha$  dans le contrôle du métabolisme intestinal lipidique.

# **RESULTATS EXPERIMENTAUX**

## **Etude n°1 : Le transport rétrograde du cholestérol dans la lignée entérocytaire humaine Caco-2/TC7 : un modèle pour l'étude *in vitro* de la contribution de l'excrétion trans-intestinale du cholestérol aux dyslipidémies athérogènes**

### **Résumé**

Les perturbations de l'homéostasie du cholestérol et des lipoprotéines favorisent le développement de l'athérosclérose. Les dyslipidémies les plus athérogènes sont celles caractérisées par une concentration plasmatique élevée en LDL-cholestérol associée à une hypertriglycéridémie et un HDL-cholestérol bas. Les stratégies thérapeutiques visant à augmenter l'excrétion fécale du cholestérol permettent ainsi de diminuer le risque cardiovasculaire. Il a récemment été montré que l'excrétion trans-intestinale du cholestérol (TICE) contribue à l'excrétion fécale du cholestérol, aux côtés de la voie hépatobiliaire. De plus, le TICE est un processus modulable, ce qui en fait une cible thérapeutique attractive. Cependant, les mécanismes moléculaires entérocytaires du TICE sont, à ce jour, inconnus. L'objectif de cette étude est de développer un modèle cellulaire permettant d'identifier *in vitro* les mécanismes moléculaires entérocytaires impliqués dans le TICE.

Pour cela, les cellules de la lignée entérocytaire humaine Caco-2/TC7 sont différenciées sur inserts permettant de reproduire un modèle de barrière intestinale, et incubées en présence de plasma humain dans le compartiment baso-latéral (mimant le compartiment sanguin) et de micelles lipidiques dans le compartiment apical (mimant la lumière intestinale). Des traceurs de cholestérol radioactifs et fluorescents sont incorporés au plasma afin d'étudier la captation baso-latérale, la distribution intracellulaire et l'excrétion apicale du cholestérol provenant du compartiment baso-latéral.

Les résultats de cette étude montrent que le cholestérol placé dans le compartiment baso-latéral est capté par l'entérocyte et excrété dans le compartiment apical. Ces processus sont bloqués lorsque les cellules sont placées à 4°C, ce qui suggère un phénomène actif. De plus, ce transport rétrograde du cholestérol (du pôle baso-latéral au pôle apical) dans l'entérocyte présente plusieurs des caractéristiques du TICE jusqu'alors évaluées *in vivo*. Tout d'abord, dans le modèle Caco-2/TC7, le transport rétrograde du cholestérol est diminué suite à l'incubation avec la protéine recombinante PCSK9 mais aussi par l'inhibition du transporteur ABCB1 par le PSC-833. De plus, l'excrétion apicale du cholestérol provenant du compartiment baso-latéral est facilitée par la présence de micelles lipidiques d'une composition bien précise dans le compartiment apical. Nous proposons donc que le transport rétrograde du cholestérol dans la lignée entérocytaire Caco-2/TC7 est un modèle d'étude des mécanismes moléculaires entérocytaires impliqués dans le TICE. Grâce

à l'utilisation de ce modèle, nous avons d'ailleurs identifié la contribution des endosomes et des microtubules au transport intracellulaire du cholestérol provenant du compartiment baso-latéral en vue de son excrétion apicale.

En conclusion, la lignée entérocytaire humaine Caco-2/TC7 apparaît comme un bon modèle *in vitro* pour l'étude des mécanismes moléculaires entérocytaires du TICE et pourrait donc permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour augmenter l'excrétion fécale du cholestérol et corriger les dyslipidémies athérogènes.

## **Résultats**

Manuscrit accepté pour publication, visible en Annexe.

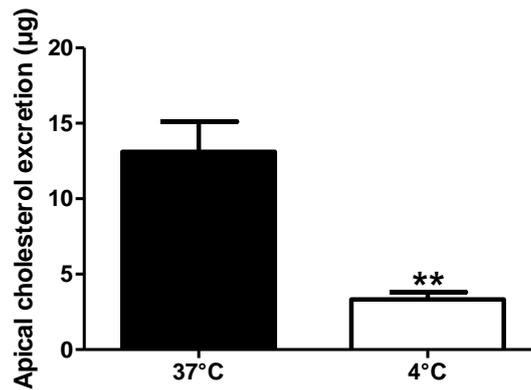
Camille Dugardin, Olivier Briand, Véronique Touche, Marleen Schonewille, François Moreau, Cédric Le May, Albert K Groen, Bart Staels, Sophie Lestavel. Retrograde cholesterol transport in the human Caco-2/TC7 cell line: a model to study trans-intestinal cholesterol excretion in atherogenic and diabetic dyslipidemia. *Acta Diabetologica*. 2016.

## **Données supplémentaires**

Dans cette première étude visant à caractériser la lignée cellulaire humaine Caco-2/TC7 comme modèle d'étude des processus entérocytaires liés au TICE, nous avons obtenu des résultats supplémentaires qui ne figurent pas dans le manuscrit accepté pour publication et que je souhaite, tout de même, discuter dans cette partie.

### **Masse de cholestérol excrété dans le compartiment apical**

Grâce à la spectrométrie de masse, nous avons montré que lorsque nous apportons ~100 µg de cholestérol dans le compartiment baso-latéral sous forme de plasma humain, nous retrouvons, au bout de 6 heures, un enrichissement de  $\sim 12,7 \pm 4$  µg de cholestérol dans le compartiment apical. De plus, lorsque cette même expérience est réalisée à 4°C, seulement  $\sim 3,3 \pm 0,5$  µg de cholestérol est retrouvé dans le compartiment apical ([figure supplémentaire 1](#)).



**Figure supplémentaire 1 : L'excrétion apicale de cholestérol dans le modèle Caco-2/TC7 est un phénomène actif**

*Les cellules Caco-2/TC7 sont différenciées sur inserts et incubées, pendant 6 heures, en présence de plasma humain dans le compartiment baso-latéral et de micelles 2mM PC/10mM TC dans le compartiment apical, à 37°C ou à 4°C. Quantité de cholestérol contenue dans le compartiment apical au terme des 6 heures, déterminée par spectrométrie de masse. Moyenne  $\pm$  écart-type de 3 puits indépendants (\*\*  $p < 0,01$  – Test Student).*

Pour évaluer la part de cholestérol présent dans le compartiment apical provenant du compartiment baso-latéral, nous avons marqué le plasma présent dans le compartiment baso-latéral avec du [<sup>3</sup>H]-cholestérol. Les résultats indiquent alors que les cellules captent ~1% du cholestérol provenant du milieu baso-latéral. La quantité de radioactivité retrouvée dans le compartiment apical représente, quant à elle, ~0,2% du cholestérol provenant du milieu baso-latéral. De plus, nous retrouvons les mêmes valeurs, par spectrométrie de masse, lorsque le plasma est marqué avec du [D7]-cholestérol.

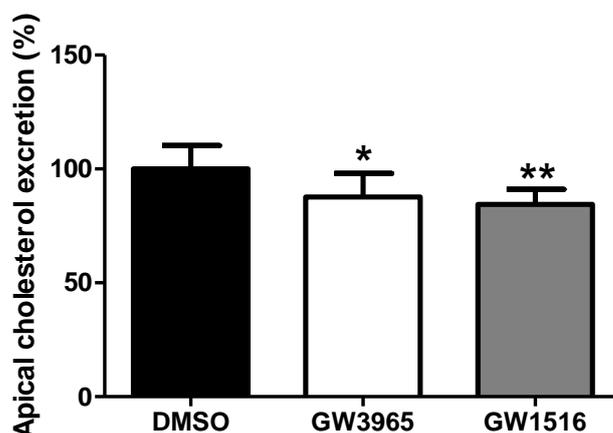
En comparant ces valeurs aux précédentes, il semble donc que, bien que les cellules Caco-2/TC7 sont capables d'excréter, dans leur milieu apical, du cholestérol provenant du compartiment baso-latéral, le cholestérol présent dans le compartiment apical au bout de 6 heures provienne, en majeure partie, de pools intracellulaires. Notre hypothèse est que les cellules Caco-2/TC7 excrètent, dans un premier temps, majoritairement mais pas exclusivement du cholestérol issu de pools intracellulaires, suggérant que le cholestérol capté à la membrane baso-latérale est transporté, avec un certain retard, jusqu'à la surface apicale de l'entérocyte. Cependant, nous excluons que cela puisse provenir d'une mort cellulaire puisque 1) les surnageants apicaux sont débarrassés des débris cellulaires par centrifugation avant leur analyse et 2) la monocouche cellulaire garde son intégrité de barrière (évaluée grâce au test lucifer yellow). Nous envisageons donc de mener des expériences de « pulse-chase » ou sur des cellules cultivées en absence de SVF pendant 24 à 48 heures, afin de mesurer la dynamique du transport intracellulaire du cholestérol du pôle baso-latéral au pôle apical.

## Absence de régulation du transport rétrograde du cholestérol par les récepteurs nucléaires LXR et PPAR $\beta/\delta$

L'activation des récepteurs nucléaires LXR (van der Veen, *J Biol Chem*, 2009) et PPAR $\beta/\delta$  (Vrins, *J Lipid Res*, 2009) chez la souris augmente de façon importante la contribution du TICE à l'excrétion fécale des stérols neutres.

Des cellules Caco-2/TC7 différenciées sur inserts, préalablement incubées en présence d'un agoniste synthétique de LXR (GW3965 5  $\mu$ M) et de PPAR $\beta/\delta$  (GW501516 5  $\mu$ M) pendant 48 heures, sont placées en présence de plasma marqué au [ $^3$ H]-cholestérol dans le compartiment baso-latéral et de micelles PC/TC (2 mM/10 mM) dans le compartiment apical, pendant 6 heures. Les résultats obtenus indiquent que l'excrétion apicale de cholestérol provenant du compartiment baso-latéral tend à diminuer (~12% et ~15%) en réponse à l'activation respective de LXR et PPAR $\beta/\delta$  (figure supplémentaire 2). Ces résultats ne sont donc pas en accord avec les données de la littérature obtenues *in vivo*.

Cependant, le TICE est aujourd'hui reconnu comme un processus multi-organes impliquant d'autres organes que l'intestin, comme le foie et le système circulatoire (Temel et Brown, *Trends Pharmacol Sci*, 2015). Notre hypothèse est donc que les récepteurs nucléaires LXR et PPAR $\beta/\delta$  exercent des effets extra-intestinaux qui résultent, *in vivo*, en une augmentation du TICE mais qui est alors sans effet dans notre modèle *in vitro* basé sur la lignée entérocytaire Caco-2/TC7. De ce point de vue, notre modèle cellulaire pourrait permettre de décrypter les cibles intestinales et extra-intestinales dans la régulation du TICE.



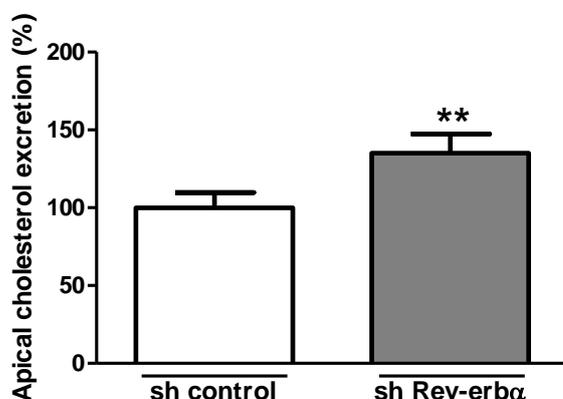
**Figure supplémentaire 2 : L'activation des récepteurs nucléaires LXR et PPAR $\beta/\delta$  entraîne une diminution de l'excrétion apicale du cholestérol provenant du compartiment baso-latéral dans le modèle Caco-2/TC7**

Les cellules Caco-2/TC7 sont différenciées sur inserts et incubées pendant 48 heures en présence d'un agoniste synthétique de LXR (GW3965 - 5 $\mu$ M) et de PPAR $\beta/\delta$  (GW501516 - 5 $\mu$ M). Suite à cela, les cellules sont incubées, pendant 6 heures, en présence de plasma humain marqué au [ $^3$ H]-cholestérol dans le compartiment baso-latéral et de micelles 2mM PC/10mM TC dans le compartiment apical. Quantité de radioactivité contenue dans le compartiment apical au terme des 6 heures et exprimée par rapport à la condition de référence « DMSO » mise à 100%. Moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences indépendantes (\*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$  – One-way ANOVA – Bonferroni post-test).

### Régulation du transport rétrograde du cholestérol dans une lignée Caco-2/TC7 invalidée pour Rev-erb $\alpha$

Rev-erb $\alpha$  est un récepteur nucléaire particulièrement impliqué dans le contrôle du métabolisme lipidique au niveau du foie (Zhang, *Science*, 2015). Dans cette thèse, nous nous sommes interrogés sur le rôle du récepteur nucléaire Rev-erb $\alpha$  dans le contrôle du métabolisme lipidique au niveau de l'intestin et nous avons donc développé une lignée Caco-2/TC7 invalidée pour l'expression de Rev-erb $\alpha$  (sh Rev-erb $\alpha$ ) par infection lentivirale. Dans le cadre de cette première étude, nous avons évalué l'excrétion apicale de cholestérol provenant du compartiment baso-latéral dans la lignée sh Rev-erb $\alpha$  en comparaison à une lignée sh control, après une incubation en présence de plasma marqué au [<sup>3</sup>H]-cholestérol dans le compartiment baso-latéral et de micelles PC/TC (2mM/10mM) dans le compartiment apical, pendant 6 heures. Les résultats indiquent que l'invalidation de Rev-erb $\alpha$  dans la lignée Caco-2/TC7 entraîne une augmentation de la quantité de radioactivité excrétée dans le milieu apical (figure supplémentaire 3) et suggèrent donc un rôle du récepteur nucléaire Rev-erb $\alpha$  au sein de l'entérocyte dans la modulation du TICE.

Sur la base de ce résultat d'expérience *in vitro*, il serait intéressant de mesurer le TICE dans des souris Rev-erb $\alpha$ <sup>-/-</sup> par les différentes méthodes qui ont été développées.



**Figure supplémentaire 3 : L'invalidation de Rev-erb $\alpha$  entraîne une augmentation de l'excrétion apicale du cholestérol provenant du compartiment baso-latéral dans le modèle Caco-2/TC7**

Les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erb $\alpha$  sont différenciées sur inserts et incubées, pendant 6 heures, en présence de plasma humain marqué au [<sup>3</sup>H]-cholestérol dans le compartiment baso-latéral et de micelles 2mM PC/10mM TC dans le compartiment apical. Quantité de radioactivité contenue dans le compartiment apical au terme des 6 heures et exprimée par rapport à la condition de référence « sh control » mise à 100%. Moyenne  $\pm$  écart-type de 2 expériences indépendantes (\*\*  $p < 0,01$  – Test Student).

## **Etude n°2 : Le récepteur nucléaire Rev-erba régule la sécrétion intestinale de lipoprotéines riches en triglycérides via le contrôle de la lipophagie**

### **Objectif de l'étude**

Bien qu'essentiellement vue comme la conséquence d'une clairance retardée, des données émergentes présentent la surproduction de chylomicrons par l'intestin comme un contributeur majeur de la dyslipémie chez l'insulino-résistant (Arca, *Atheroscler Suppl*, 2015). Ainsi, l'intestin est une cible thérapeutique potentielle pour corriger l'hypertriglycéridémie post-prandiale du diabétique.

La compréhension des mécanismes régissant l'absorption des lipides alimentaires par les entérocytes est donc cruciale. Elle implique un certain nombre d'acteurs permettant d'abord la captation apicale d'acides gras, par diffusion passive ou grâce à des transporteurs, qui seront ensuite activés et convertis en triglycérides (TG) et phospholipides au niveau du réticulum endoplasmique (Pan et Hussain, *Biochim Biophys Acta*, 2012). Puis, il existe une balance au sein de l'entérocyte entre l'utilisation de ces triglycérides pour leur liaison à l'ApoB48 et l'assemblage de chylomicrons (CM) ou pour un stockage transitoire sous forme de gouttelettes lipidiques cytosoliques (Demignot, *Biochimie*, 2014). Enfin, les chylomicrons sont sécrétés au pôle baso-latéral des entérocytes vers la circulation sanguine. L'absorption des lipides alimentaires est un processus hautement régulé, notamment par les récepteurs nucléaires comme cela a été décrit pour PPAR $\alpha$  (Colin, *Eur Heart J*, 2012) et LXR (Briand, *Gastroenterology*, 2016).

Le récepteur nucléaire Rev-erba (NR1D1), en se fixant sur son élément de réponse présent sur ses gènes cibles (RORE/ RevRE), agit en tant que répresseur transcriptionnel (Duez et Staels, *J Appl Physiol*, 2009). Rev-erba est fortement exprimé dans le foie, le tissu adipeux, le muscle squelettique, le cœur mais aussi dans l'intestin. Rev-erba intervient d'une part dans le contrôle du rythme circadien en réprimant la transcription de Bmal1. D'autre part, il intervient dans la régulation de voies métaboliques en contrôlant l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, glucidique et des acides biliaires mais aussi dans la fonction mitochondriale au niveau du muscle squelettique (Woldt, *Nature Med*, 2013). Rev-erba est particulièrement impliqué dans le métabolisme lipidique hépatique en contrôlant directement l'expression de gènes comme APOC3 (Raspé, *J Lipid Res*, 2002). Les souris Rev-erba<sup>-/-</sup> présentent d'ailleurs une hypertriglycéridémie ainsi qu'une stéatose hépatique (Feng, *Science*, 2011).

L'objectif de cette étude est d'évaluer le rôle de Rev-erba dans le métabolisme lipidique de l'intestin. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle de Rev-erba dans

l'absorption des lipides alimentaires par les entérocytes. Pour cela, nous avons utilisé, en grande partie dans cette étude, la lignée entérocytaire humaine Caco-2/TC7. Les cellules de cette lignée, une foisensemencées sur inserts, permettent de reproduire un modèle de barrière intestinale non-perméable. L'utilisation de cette lignée cellulaire nous a permis de mettre en évidence un rôle de Rev-erba dans le contrôle de la re-mobilisation des lipides des gouttelettes lipidiques via la lipophagie et ainsi dans la balance chylomicrons/gouttelettes lipidiques au sein de l'entérocyte.

## **Matériels et méthodes**

### **Culture cellulaire de la lignée entérocytaire humaine Caco-2/TC7**

Ces cellules proviennent de l'unité INSERM U505 de Paris du Pr Jean Chambaz. La lignée est entretenue quotidiennement en flacons de 25 cm<sup>2</sup> dans du milieu complet composé de DMEM Glutamax (Life Technologies, réf 61965-026) supplémenté avec 20% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté, 1% pénicilline-streptomycine et 1% d'acides aminés non-essentiels. Les cellules sont maintenues sous atmosphère humide à 10% de CO<sub>2</sub> et à 37°C.

Pour obtenir le modèle de barrière intestinale, les cellules sontensemencées sur des inserts/filtres (BD Falcon™, réf 353091) à raison de 250 000 cellules par insert. Elles sont entretenues dans du milieu complet pendant 8 jours avant d'atteindre la confluence. Elles sont ensuite cultivées et différenciées pendant 15 jours en condition « asymétrique » (le compartiment apical recevant du milieu sans SVF et le compartiment basal du milieu complet). Toutes les expériences sont faites 21 jours après l'ensemencement. Lorsque cela est indiqué, les cellules sont incubées en présence d'hémimine 10 µM (Sigma, réf H9039) ou de SR9009 10 µM (Calbiochem, réf 554726) dans le milieu apical.

### **Invalidation génique de NR1D1 dans la lignée cellulaire Caco-2/TC7**

Un vecteur lentiviral (MISSION® shRNA Lentiviral Transduction Particles SHCLNV, Sigma, réf TRCN0000022176) est utilisé pour intégrer un sh RNA (short hairpin RNA) dans la lignée cellulaire entérocytaire Caco-2/TC7, permettant l'obtention d'une lignée stable invalidée pour l'expression de NR1D1 (sh Rev-erba) après sélection des cellules infectées par le virus grâce à la puromycine. La séquence du sh Rev-erba est CCGGGCGCTTTGCTTCGTTGTTCAACTCGAGTTGAACAACGAAGCAAAGCGCTTTTT.

Un vecteur lentiviral comportant un sh RNA non-ciblé (MISSION® SHC002V, Sigma), servant de sh control, est également incorporé dans l'étude.

Les Caco-2/TC7 sont ensemencées sur plaque 12 puits à raison de 70 000 cellules par puits et sont infectées 48 heures après. L'infection se fait en présence de polybrène (8 µg/mL). La MOI (Multiplicity of infection) utilisée est de 2. La sélection commence 48 heures après l'infection, en ajoutant 10 µg/mL de puromycine (Sigma, réf P8833) au milieu de culture des cellules.

### **Mesure de l'intégrité de la barrière formée par les cellules Caco-2/TC7**

Afin de vérifier l'intégrité des jonctions serrées, les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erba différenciées sur insert sont incubées ou non pendant 2 heures en présence de micelles lipidiques dans le compartiment apical puis sont équilibrées pendant 10 minutes dans un milieu HBSS – HEPES (Gibco) et incubées en présence de lucifer yellow (100 µM – Sigma Aldrich) dans le milieu apical pendant une heure. Les milieux apicaux et baso-latéraux sont ensuite récupérés puis analysés grâce au spectrophotomètre à fluorescence ( $\lambda$  excitation 432nm /  $\lambda$  émission 538nm – Infinite 200 Pro NanoQuant, TECAN). Le coefficient de perméabilité apparente ( $<1 \times 10^{-6}$  cm.sec<sup>-1</sup>) a ensuite été déterminé grâce à l'équation suivante :  $P_{app} = J/A.C_0$ , où J est le taux d'apparition de la lucifer yellow dans le compartiment baso-latéral,  $C_0$  la concentration initiale de lucifer yellow dans le compartiment apical et A, la surface de l'insert (4,2 cm<sup>2</sup>). La  $P_{app}$  de la lignée sh control est de  $2,9 \pm 0,2 \times 10^{-8}$  cm.sec<sup>-1</sup> et celle de la lignée sh Rev-erba est de  $3,2 \pm 0,3 \times 10^{-8}$  cm.sec<sup>-1</sup>, attestant ainsi de l'intégrité de la monocouche cellulaire.

### **Transfection**

Les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erba sont trypsinées et comptées. Pour un insert, 1µL de siRNA (si control (Dharmacon, ON-TARGETplus Non-targeting Pool, réf D-001810-10) et siBNIP3 (Dharmacon, SMARTpool: ON-TARGETplus siRNA, réf L-004636)), dont la concentration initiale est 20 µM, est repris dans 250µL d'OptiMEM puis mélangé à 20µL de Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher, réf 13778) reprise, elle aussi, dans 250µL d'OptiMEM. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, les cellules des différentes lignées (3 millions de cellules pour un insert) sont ajoutées à ce mix de transfection. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, les cellules sont ensemencées à haute densité sur des inserts (3 millions de cellules / insert) et le milieu apical contenant alors de l'OptiMEM est remplacé au bout de 6 heures par du milieu complet sans antibiotique. Les cellules sont entretenues dans du milieu complet pendant un jour puis en condition « asymétrique » pendant 8 jours.

## **Préparation des micelles lipidiques post-prandiales**

Pour mimer la situation physiologique de l'absorption des lipides alimentaires, les cellules Caco-2/TC7 sont incubées dans leur compartiment apical, avec des micelles lipidiques qui ont la même composition que les micelles duodénales post-prandiales (Chateau, *J Cell Physiol*, 2005). Les solutions mères d'acide oléique (OA, Sigma, réf O1383), de lysophosphatidylcholine (LPC, Sigma, réf L4129) et de 2-monooleoylglycérol (2-MG, Sigma, réf M7765) sont préparées à 100 mM et celle du cholestérol (Sigma, réf C3045) à 25 mM dans un mélange chloroforme/méthanol (2v/1v). Une solution mère de taurocholate (TC, Sigma, T9034) est préparée à 24 mM dans du DMEM Glutamax (Life Technologies, réf 61965-026) supplémenté avec 1% pénicilline-streptomycine et 1% d'acides aminés non-essentiels.

Pour obtenir 1,5 mL de micelles lipidiques post-prandiales, 9 µl d'OA (0,6 mM), 3 µl de LPC (0,2 mM), 3 µl de 2-MG (0,2 mM) et 3 µl de cholestérol (0,05 mM) sont transférés dans un flacon en verre stérile. Les solvants sont évaporés sous azote puis l'extrait sec est repris par 125 µL de TC (2 mM), dans un volume final de 1,5 mL de DMEM Glutamax supplémenté avec 1% pénicilline-streptomycine et 1% d'acides aminés non-essentiels. La préparation est placée au bain à ultrasons pendant 5 minutes puis mise en agitation 2 heures à 37°C.

Lorsque cela est indiqué et afin de suivre le devenir des lipides provenant des micelles lipidiques, celles-ci sont radio-marquées avec du <sup>3</sup>H-acide oléique (2 µCi/mL) ou <sup>14</sup>C-acide oléique (0,7 µCi/mL).

## **Analyse Lipoprint**

Les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erba sont différenciées sur inserts et incubées pendant 24 heures à 37°C en présence de micelles lipidiques dans le compartiment apical et de DMEM dans le compartiment baso-latéral. A la fin de l'expérience, le milieu provenant du compartiment baso-latéral est collecté. La concentration en VLDL et LDL dans le milieu baso-latéral est déterminée grâce à la technologie Lipoprint® (Lipoprint® LDL Subfractions Test, Quantimetrix), grâce à la collaboration avec le Dr Laurent Martinez et le Dr Laetitia Lichtenstein (INSERM U1048 Équipe 5, Toulouse).

## **ELISA ApoB**

Les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erba sont différenciées sur inserts et incubées pendant 2 ou 24 heures à 37°C en présence de micelles lipidiques dans le compartiment apical et de DMEM dans le compartiment baso-latéral. A la fin de l'expérience, le milieu provenant du compartiment baso-latéral est collecté. La concentration en ApoB humaine dans le milieu baso-latéral est mesurée grâce à un kit commercial ELISA sandwich (Mabtech, réf 3715-1HP-2).

### **Mesure de la radioactivité**

Les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erba sont différenciées sur inserts et incubées pendant 15 minutes, 2 heures ou 24 heures à 37°C en présence de micelles lipidiques radio-marquées dans le compartiment apical et de DMEM dans le compartiment baso-latéral. Lorsque cela est indiqué, les cellules sont incubées en présence de bafilomycine 100 nM (Sigma, réf B1793), de 3-méthyladenine 5 mM (Sigma, réf M9281) ou de wortmaninn 1 µM (Sigma, réf W1628).

A la fin de l'expérience, le milieu provenant du compartiment baso-latéral est collecté, les inserts lavés puis les cellules lysées dans 1 mL de Solvable (PerkinElmer, réf 6NE9100), à 4°C, toute la nuit. 100 µL d'extraits cellulaires et 100 µL de milieu baso-latéral respectivement sont combinés à 1 mL de scintillateur Microscint-40 (PerkinElmer). La radioactivité est comptée puis exprimée en cpm (coups par minute) grâce à l'appareil TopCount NXT v2.13.

### **Chromatographie sur couche mince**

Les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erba sont différenciées sur inserts et incubées pendant 2 heures à 37°C en présence de micelles lipidiques radio-marquées (<sup>14</sup>C-acide oléique) dans le compartiment apical et de DMEM dans le compartiment baso-latéral.

A la fin de l'expérience, le milieu provenant du compartiment baso-latéral est collecté et les lipides en sont extraits par la méthode de Folch (chloroforme/méthanol (2v/1v)). Les échantillons sont ensuite déposés sur une plaque de silice grâce au déposeur automatique Camag ATS4. La migration se fait dans un mélange hexane / diéthyléther / acide acétique (80v/20v/1v) et la révélation grâce au PharosFX™ (Bio-Rad).

### **Isolement des cellules de la muqueuse intestinale chez la souris**

Des souris femelles WT (n=3) et Rev-erba<sup>-/-</sup> (n=4) (fond génétique C57Bl6) sont sacrifiées à ZT6. Après prélèvement de l'intestin, le jéjunum de ces souris est délicatement reversé puis découpé en petits morceaux qui sont ensuite incubés dans 3 mL de Cell Recovery Solution (Corning, réf 354253) toute la nuit. Après agitation, le mélange est passé sur un tamis afin de ne conserver que les cellules de la muqueuse intestinale. Après centrifugation (1500 rpm, 10 min, 4°C), le culot cellulaire résultant est séparé en deux puis repris soit dans 1 mL d'Extract-all® en vue d'une extraction d'ARN, soit dans 1 mL de tampon de lyse en vue d'une préparation d'extraits cellulaires post-nucléaires.

## **Immunofluorescence**

Les cellules sont lavées au PBS, fixées par le paraformaldéhyde (PFA 4%) pendant 20 minutes à température ambiante, puis incubées pendant 1 heure à 4°C dans une solution de L-lysine 0,1 M. Elles sont ensuite perméabilisées par une incubation de 10 minutes à 37°C dans du Tris 20 mM – NaCl 0,5 M, pH 7,4 (TN) contenant 0,1% de Triton X-100. Après 3 lavages au TN, les cellules sont incubées pendant 30 minutes, à température ambiante et en chambre humide, avec le milieu de blocage (Image-iT FX Signal Enhancer, Invitrogen). Après lavages, l'anticorps primaire dirigé contre LC3B (abcam 51520) dilué au 1/500<sup>ème</sup> dans du TN est incubé pendant 2 heures en chambre humide. Les cellules sont ensuite incubées en chambre humide avec l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin Alexa 568 (Molecular probe) dilué au 1/400<sup>ème</sup> dans du TN pendant 1 heure à température ambiante.

Pour les études de co-localisation de la protéine LC3B et des gouttelettes lipidiques, ce protocole est suivi d'un marquage des gouttelettes lipidiques au Bodipy 493/503 : après 3 lavages au PBS, les cellules sont incubées pendant 10 min dans une solution de Bodipy 493/503 à 0,2 µg/mL (Thermofisher, réf D3922).

Après lavage, le montage entre lame et lamelle est réalisé à l'aide du liquide de montage Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, réf P36930) contenant 1 µg/mL de Hoechst 33258, pentahydrate (Invitrogen, réf H3569). Les lames sont observées au microscope confocal Zeiss LSM 710 (Plateforme d'imagerie cellulaire BICEL-IFR114, Lille).

## **Microscopie électronique**

Cette analyse est faite avec l'aide de Anne Loyens (UMR-S 1172, Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert, Lille).

Les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erba sont différenciées sur inserts et incubées pendant 2 heures à 37°C en présence de micelles lipidiques dans le compartiment apical et de DMEM dans le compartiment baso-latéral. A la fin de l'expérience, les cellules sont lavées dans un tampon phosphate 0,1 M puis fixées par un mélange paraformaldéhyde 2% / glutaraldéhyde 2% pendant 20 minutes. Après plusieurs lavages, la post-fixation se fait pendant 30 minutes en tampon imidazole 0,2 M contenant 4% d'acide osmique. Les cellules, toujours sur leur insert, sont ensuite déshydratées, imprégnées 3 fois 15 minutes dans un mélange résine Epoxy EPON 812 / éthanol absolu (1v/1v) puis mises en moule de silicone avec EPON 812 pur, jusqu'au lendemain. La polymérisation totale se fait ensuite en étuve à 56°C, pendant 24 heures. Après coupe des échantillons, les grilles subissent un double contraste : acétate d'uranyle 2% / citrate de plomb (Reynolds solution) et sont observées au microscope électronique Zeiss EM 900.

## Extraction d'ARN, dosage et RT-qPCR

Les cellules Caco-2/TC7 sont lysées par addition d'Extract-all® (Eurobio). L'ajout de chloroforme permet l'extraction des ARN totaux de la préparation. Après centrifugation (13 000 rpm, 20 minutes, 4°C), l'homogénat forme deux phases. L'ARN est isolé dans la phase aqueuse supérieure à laquelle on ajoute de l'isopropanol afin de procéder à la précipitation des ARN. Après une nouvelle centrifugation (13 000 rpm, 20 minutes, 4°C), le culot d'ARN précipité est lavé à l'éthanol 70%, séché puis repris dans un volume d'eau PPI. Le dosage des ARN s'effectue grâce à l'appareil Nanodrop ND-1000 et la rétrotranscription selon les recommandations du fournisseur (Applied biosystems, réf 4368814).

Les ADNc sont quantifiés par qPCR sur un appareil Mx3000P (Stratagène) utilisant le Master Mix SYBR Green Brilliant II Fast (Agilent), avec des amorces spécifiques obtenues chez Eurogentec ([tableau 1](#)).

Gène	Espèce	Amorce sens	Amorce anti-sens
<b>ACTINE</b>	-	GCT CAT TGT AGA AGG TGT GG	CAT CCT CAC CCT GAA GTA CC
<b>ACAT2</b>	Humaine	GTG TCG GGT CCA TTG TAC C	CGT CTG CAG AGG ACA GAA G
<b>ACAT2</b>	Murine	GAC TTG GTG CAA TGG ACT CG	GGT CTT GCT TGT AGA ATC TGG
<b>APOA4</b>	Humaine	AGC CAG GAC AAG ACT CTC TC	TCT CAC CTC CCA CTG GAC
<b>APOA4</b>	Murine	CAG TGA GGA GCC CAG GAT GTT	TCT ACA GCC TCC TTG GCA TT
<b>ARNTL</b>	Humaine	CAG ACA AAG ATG ACC CTC ATG GA	CGA CGC CGC TTT TCA ATC T
<b>ARNTL</b>	Murine	CTC AGG GCA GCA GAT GGA TT	GGC CAA TAA GGT CAT TCT GGC T
<b>BNIP3</b>	Humain	CAT GAG GAA CAC GAG CGT CA	CTG GTG GAG GTT GTC AGA CG
<b>BNIP3</b>	Murine	GCT CCT GGG TAG AAC TGC AC	GCT GGG CAT CCA ACA GTA TT
<b>MTTP</b>	Humaine	TTC AGC ACC TCA GGA CTG C	GTC TGA GGT CTG AGC AGA G
<b>MTTP</b>	Murine	GCT CCC TCA GCT GGT GGA T	CAG GAT GGC TTC TAG CGA GTC T
<b>NR1D1</b>	Humaine	CGT GTA TGC AGC CCC AGA AG	GCA GGG TGA CTT GGT CAT GC
<b>NR1D1</b>	Murine	GTG CCC CAC CCA CGT ATA TT	TGT TCA TGG GAC ATG CCA GC
<b>NR1D2</b>	Humaine	TGC GAA GGC TGT AAG GGT TT	GCG ACA TTG CTG ACA TCT GTT
<b>NR1D2</b>	Murine	AAA ACC AGT GCT CCT GGC AT	CCG AAA GAA ACC CTT ACA GCC

**Tableau 1** : Séquences des amorces utilisées en qPCR

## Puce à ADN

Les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erba différenciées sur inserts sont lysées par addition d'Extract-all® (Eurobio) et leur ARN extrait. 300 ng d'ARN total sont utilisés afin de préparer de l'ADNc simple brin grâce à un kit commercial (GeneChip® WT PLUS

Reagent Kit, Affymetrix). L'ADNc simple brin est ensuite hybridé sur la puce GeneChip® Human Transcriptome Array 2.0 (Affymetrix), pendant 16 heures à 45°C.

Toutes les manipulations de liquides se font grâce à la station fluidique GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix) et les puces sont scannées avec le GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) et grâce au logiciel Command Console v4.1.2. L'analyse des puces est réalisée grâce au logiciel Partek.

### **Immunoprécipitation de la chromatine**

48 heures après leur ensemencement à haute densité, les cellules Caco-2/TC7 sont fixées par le formaldéhyde 1% pendant 10 minutes à température ambiante, puis incubées pendant 5 minutes dans une solution de glycine 125 mM. Après deux lavages dans du PBS froid, les cellules sont grattées dans 1,8 mL de PBS et centrifugées à 500g, pendant 5 minutes. L'isolement de la chromatine se fait grâce à l'incubation successive des cellules dans deux tampons différents, pendant 10 minutes, à 4°C. Le premier tampon contient Hepes 10 mM (pH 6,5), EDTA 10 mM, EGTA 0,5 mM, Triton X-100 0,25%, DTT 1 mM et de l'inhibiteur de protéases (Complete, Roche). Le second tampon contient Hepes 10 mM (pH 6,5), EDTA 1 mM, EGTA 0,5 mM, NaCl 200 mM, DTT 1 mM et de l'inhibiteur de protéases (Complete, Roche). La chromatine est ensuite reprise dans du tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM (pH 8), EDTA 10 mM, SDS 1%, DTT 1 mM et inhibiteur de protéases (Complete, Roche)) puis soniquée pendant 20 minutes (bioruptor Diagenode, High Power, cycles 30sec/30sec). Après fragmentation, les échantillons sont centrifugés à 16000g pendant 10 minutes. Après dosage au Nanodrop ND-1000, 200 µg de chromatine sont dilués 10 fois dans du tampon de dilution (Tris-HCl 20 mM (pH 8,1), NaCl 150 mM, EDTA 2 mM et Triton X-100 1%) puis incubés avec 5 µL d'anticorps anti-NR1D1 (Cell Signaling, réf 13418), sous agitation rotative, à 4°C, toute la nuit. Le jour suivant, 10 µL d'un mélange A/G de billes magnétiques (Dynabeads, Thermofisher) et 10 µL d'ARNt de levure à 10 mg/mL (Sigma) sont ajoutés aux échantillons puis incubés pendant 3 heures, sous agitation rotative, à 4°C. Les billes sont ensuite lavées 4 fois et l'ADN retenu sur les billes élué dans une solution contenant SDS 1% et NaHCO<sub>3</sub> 100 mM puis incubé à 65°C, toute la nuit. Le jour suivant, l'ADN est purifié grâce au kit PCR Clean-up Gel extraction (Macherey Nagel).

### **Préparation d'extraits cellulaires post-nucléaires**

Les cellules Caco-2/TC7 sont lavées deux fois dans du PBS puis grattées dans 250 µL de tampon de lyse (PBS contenant 1% de Nonidet P-40, 0,5% de déoxycholate de sodium, 0,1% de SDS et 1% d'inhibiteur de protéases (Complete, Roche). Les échantillons sont ensuite soumis aux ultra-sons (bioruptor Diagenode) pendant 5 minutes à 4°C, à puissance

élevée et sur des cycles 30 secondes/30 secondes. Les homogénats sont centrifugés 10 minutes à 13 000 rpm et à 4°C et les surnageants collectés.

### Western Blot

Le dosage des protéines totales est réalisé par la méthode colorimétrique BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoScientific).

La séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire s'effectue dans un SDS-PAGE à 10% ou à 15% (LC3B). Des marqueurs de taille de la société Fermentas (PageRuler Prestained Protein Ladder) sont également déposés. La migration se fait dans un tampon Tris 250 mM, glycine 0,192 M, SDS 0,1% sous une tension de 80V puis 120V pendant une heure. La séparation est suivie par un transfert à froid des protéines sur une membrane de nitrocellulose, pendant 1h30 à 400mA. La membrane de nitrocellulose est alors saturée par incubation dans un tampon Tris 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM contenant 0,05% de Tween-20 et 5% de lait (TBS-T/lait), pendant au moins une heure, à température ambiante et sous agitation. Elle est ensuite incubée en présence de l'anticorps primaire ([tableau 2](#)) dilué dans du TBS-T/lait toute la nuit, à 4°C et sous agitation. La membrane est lavée 3 fois 5 minutes dans du TBS-T puis incubée avec l'anticorps secondaire ([tableau 2](#)) dilué dans le TBS-T/lait pendant une heure, à température ambiante, sous agitation et à l'abri de la lumière. La membrane est à nouveau lavée 3 fois 5 minutes avant d'être révélée par réaction chimioluminescente (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, ThermoFisher) l'appareil G :BOX équipé d'une caméra CCD Charge Coupled Device 12 bits.

Anticorps primaire			Anticorps secondaire	
Marquage	Désignation	Dilution	Désignation	Dilution
<b>LC3B</b>	Abcam 51520 Lapin	1/1000	Chemicon AP132P Anti-IgG lapin – HRP	1/1000
<b>NR1D1</b>	Cell Signaling 13418 Lapin	1/1000	Chemicon AP132P Anti-IgG lapin – HRP	1/1000
<b>Actine</b>	Santa Cruz 1616 Chèvre	1/1000	Chemicon AP107P Anti-IgG chèvre – HRP	1/2000
<b>P-AKT</b>	Cell Signaling 9271 Lapin	1/1000	Chemicon AP132P Anti-IgG lapin – HRP	1/2000
<b>AKT</b>	Cell Signaling 9272 Lapin	1/1000	Chemicon AP132P Anti-IgG lapin – HRP	1/2000

**Tableau 2** : Anticorps utilisés en Western Blot

## **Analyse statistique**

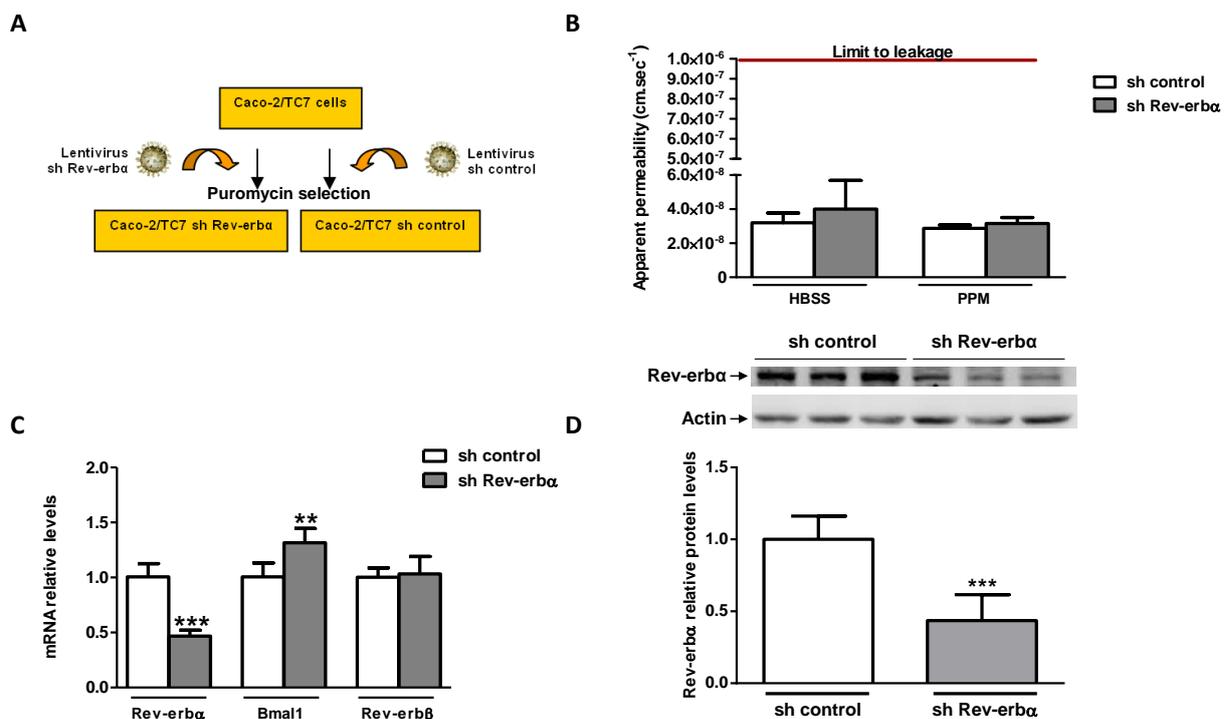
Les résultats numériques issus des différentes expériences sont exprimés sous forme d'une moyenne avec un écart-type. La significativité des différences est évaluée grâce au test statistique approprié (t-test, One-way ANOVA, Two-way ANOVA) réalisé grâce au logiciel GraphPad Prism (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## Résultats

### Développement d'une lignée entérocytaire invalidée pour Rev-erba

Pour l'étude du rôle de Rev-erba dans le métabolisme lipidique intestinal, une lignée Caco-2/TC7 invalidée pour Rev-erba (sh Rev-erba) a été développée par infection lentivirale (figure 1A). Les cellules sh Rev-erba présentent une diminution significative de l'expression de Rev-erba en ARNm (figure 1C) et en protéine (figure 1D). De plus, ces cellules présentent une expression en ARNm augmentée du gène cible le mieux caractérisé de Rev-erba : Bmal1 (figure 1C). Enfin, aucune différence d'expression de Rev-erbβ n'est observée dans les cellules sh Rev-erba, suggérant l'absence de compensation (figure 1C).

La fonction de barrière de la monocouche obtenue avec les cellules sh control et sh Rev-erba a été vérifiée par le test à la Lucifer Yellow (perméabilité apparente <math>1 \times 10^{-6}</math> cm/sec ; figure 1B).



**Figure 1 : Développement d'une lignée invalidée pour l'expression de Rev-erba**

(A) Les cellules de la lignée Caco-2/TC7 sont infectées avec des particules lentivirales contenant un short hairpin RNA ciblant Rev-erba (sh Rev-erba) ou ne ciblant aucune séquence (sh control). La sélection se fait grâce à la puromycine. (B) Les cellules sh control et sh Rev-erba sont différenciées sur inserts et leur perméabilité apparente évaluée par le test à la Lucifer Yellow dans des conditions de culture « normale » (HBSS) ou de culture en présence de micelles lipidiques dans le compartiment apical pendant 24 heures (PPM). (C) Niveaux d'ARNm de Rev-erba, Bmal1 et Rev-erbβ dans les cellules sh control et sh Rev-erba différenciées sur inserts. Les niveaux d'ARNm sont normalisés à l'Actine et exprimés par rapport à la condition de référence « sh control » mise à 1. (D) Western Blot représentatif et quantification de la protéine Rev-erba dans les cellules sh control et sh Rev-erba différenciées sur inserts. Les niveaux protéiques sont normalisés à l'Actine et exprimés par rapport à la condition de référence « sh control » mise à 1. Moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences indépendantes (\*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  - Test Student).

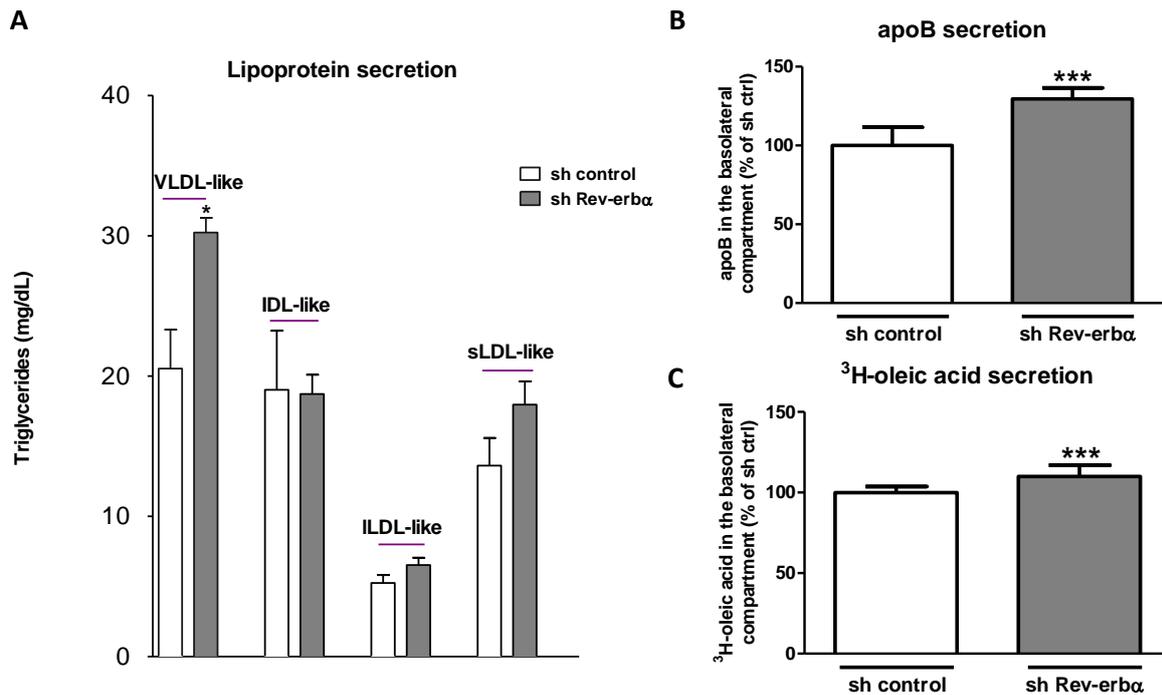
## **L'invalidation de Rev-erba *in vitro* entraîne une augmentation de la sécrétion de lipoprotéines riches en triglycérides**

Nous avons ensuite évalué l'impact fonctionnel de l'absence de Rev-erba *in vitro* sur l'absorption des acides gras et notamment la sécrétion baso-latérale de lipoprotéines.

Des cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erba ont donc étéensemencées sur inserts et cultivées pendant 3 semaines afin d'obtenir le modèle de barrière intestinale. Pour l'étude de l'absorption lipidique, des micelles lipidiques dont la composition mime les micelles duodénales post-prandiales (Chateau, *J Cell Physiol*, 2005), sont placées dans le compartiment apical pendant 24 heures.

La sécrétion de lipoprotéines dans le compartiment baso-latéral est évaluée grâce à l'analyse du milieu baso-latéral par la technologie Lipoprint® et la mesure de la quantité de protéine ApoB sécrétée dans le milieu baso-latéral par ELISA. Les résultats indiquent que l'invalidation de Rev-erba dans la lignée Caco-2/TC7 entraîne une augmentation de la sécrétion de grosses lipoprotéines riches en TG (VLDL-like) dans le compartiment baso-latéral (figure 2A) ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'ApoB dans le milieu baso-latéral (figure 2B). Ces résultats suggèrent que Rev-erba contrôle le métabolisme entérocytaire des lipoprotéines de type CM.

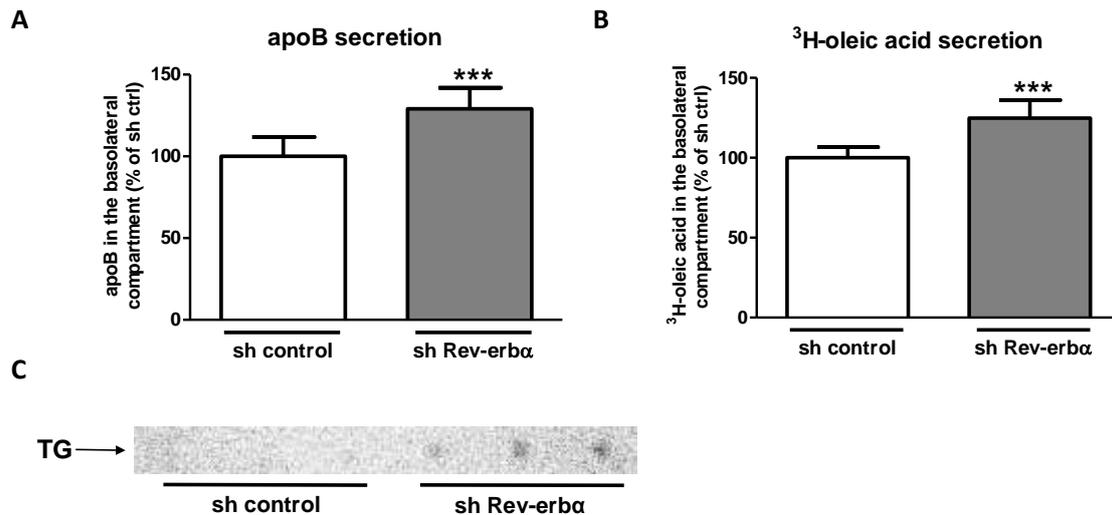
Afin de vérifier que l'augmentation de la sécrétion baso-latérale de lipoprotéines dans la lignée sh Rev-erba se fait aux dépens des lipides apportés dans le compartiment apical, les micelles lipidiques sont marquées avec un traceur radioactif, de l'acide oléique tritié. Après 24 heures d'incubation avec des micelles lipidiques radio-marquées, nous retrouvons également une augmentation de la radioactivité dans le compartiment baso-latéral de la lignée sh Rev-erba.



**Figure 2 : L'inactivation de Rev-erb $\alpha$  *in vitro* entraîne une augmentation de la sécrétion de lipoprotéines riches en triglycérides après 24 heures d'incubation avec des micelles lipidiques dans le compartiment apical**

Les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erb $\alpha$  sont différenciées sur inserts puis incubées pendant 24 heures en présence de micelles lipidiques radio-marquées (<sup>3</sup>H-acide oléique) (C) ou non-marquées (A et B) dans le compartiment apical et de DMEM dans le compartiment baso-latéral. Le milieu provenant du compartiment baso-latéral est collecté. (A) Quantité de triglycérides associés aux lipoprotéines sécrétées dans le milieu baso-latéral mesurée par la technologie Lipoprint. Moyenne  $\pm$  écart-type de 3 puits indépendants (\*  $p < 0,05$  - Test Student). (B) Concentration en protéine ApoB dans le milieu baso-latéral déterminée par ELISA et exprimée par rapport à la condition de référence « sh control » mise à 100%. (C) Quantité de radioactivité contenue dans le milieu baso-latéral comptée grâce à l'appareil TopCount NXT v2.13 et exprimée par rapport à la condition de référence « sh control » mise à 100%. Moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences indépendantes (\*\*\*)  $p < 0,001$  - Test Student).

Afin de mimer davantage la situation physiologique post-prandiale, les mêmes expériences ont été reproduites après seulement 2 heures d'incubation avec des micelles lipidiques dans le compartiment apical. Les résultats obtenus indiquent que dès 2 heures, la lignée sh Rev-erb $\alpha$  présente une augmentation de la sécrétion baso-latérale de la protéine ApoB (figure 3A) et de lipides provenant du milieu apical (figure 3B). Des expériences préliminaires de caractérisation de ces lipides par chromatographie sur couche mince indiquent qu'il s'agit majoritairement de TG (figure 3C).

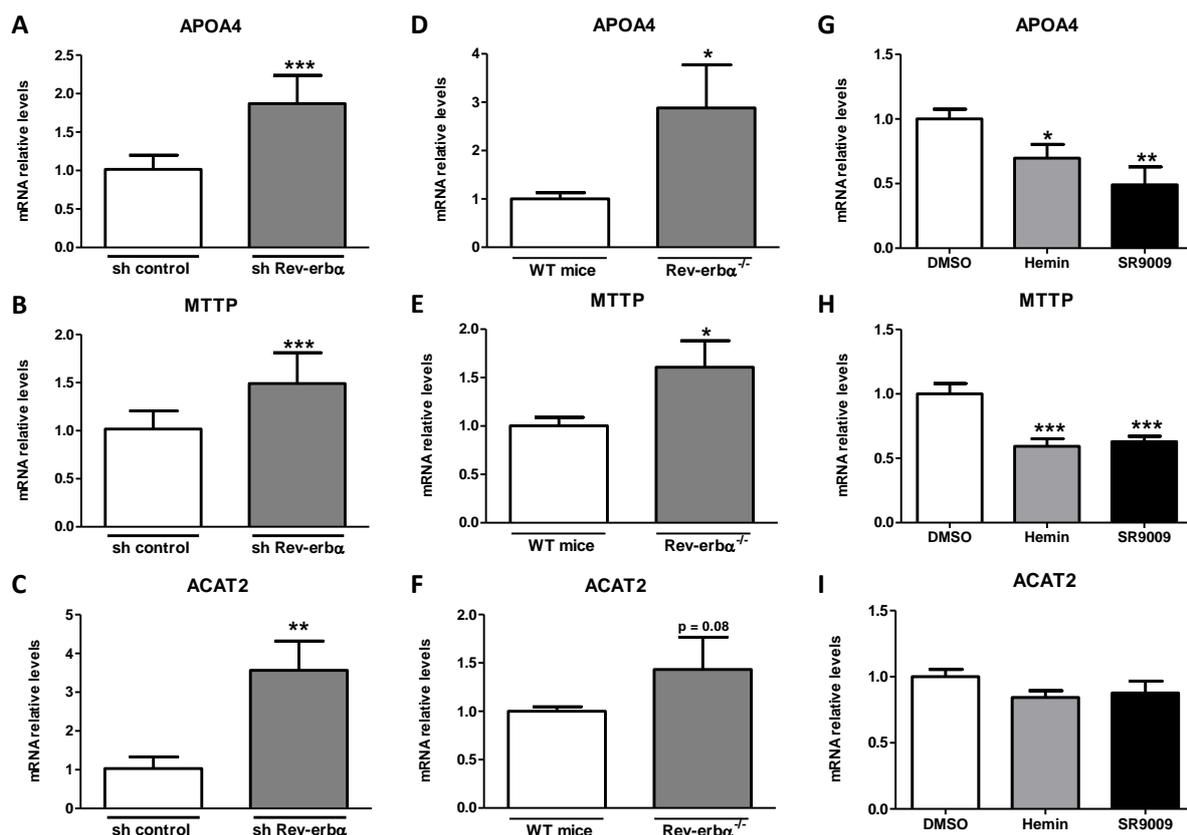


**Figure 3 : L'inactivation de Rev-erb $\alpha$  *in vitro* entraîne une augmentation de la sécrétion de lipoprotéines riches en triglycérides après 2 heures d'incubation avec des micelles lipidiques dans le compartiment apical**

Les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erb $\alpha$  sont différenciées sur inserts puis incubées pendant 2 heures en présence de micelles lipidiques radio-marquées (<sup>3</sup>H-acide oléique (B) ou <sup>14</sup>C-acide oléique (C)) ou non-marquées (A) dans le compartiment apical et de DMEM dans le compartiment baso-latéral. Le milieu provenant du compartiment baso-latéral est collecté. (A) Concentration en protéine ApoB dans le milieu baso-latéral déterminée par ELISA et exprimée par rapport à la condition de référence « sh control » mise à 100%. (B) Quantité de radioactivité contenue dans le milieu baso-latéral comptée grâce à l'appareil TopCount NXT v2.13 et exprimée par rapport à la condition de référence « sh control » mise à 100%. Moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences indépendantes (\*\*\*)  $p < 0,001$  - Test Student). (C) Analyse des TG radio-marqués sécrétés dans le milieu baso-latéral par chromatographie sur couche mince.

### L'inactivation de Rev-erb $\alpha$ entraîne une augmentation de l'expression de gènes clés de l'assemblage des CM

Grâce aux puces à ADN réalisées dans la lignée sh control et la lignée sh Rev-erb $\alpha$ , nous avons pu mettre en évidence et vérifier par qPCR l'augmentation de l'expression en ARNm de gènes majeurs impliqués dans l'assemblage des chylomicrons tels que APOA4 (figure 4A), MTP (figure 4B) et ACAT2 (figure 4C) dans la lignée sh Rev-erb $\alpha$ . Cette augmentation pourrait expliquer en partie l'augmentation de la sécrétion baso-latérale de lipoprotéines riches en TG dans la lignée sh Rev-erb $\alpha$ . De plus, lorsque l'expression en ARNm de ces 3 gènes est analysé par qPCR dans des cellules épithéliales isolées provenant du jéjunum de souris WT et Rev-erb $\alpha$ <sup>-/-</sup>, nous retrouvons les mêmes régulations (figures 4D, 4E et 4F). Enfin, le traitement de cellules Caco-2/TC7 avec deux agonistes de Rev-erb $\alpha$  (hémine et SR9009) conduit à un effet miroir, c'est-à-dire une diminution de l'expression en ARNm de APOA4 (figure 4G), MTP (figure 4H) et une tendance à la diminution de l'expression en ARNm de ACAT2 (figure 4I).



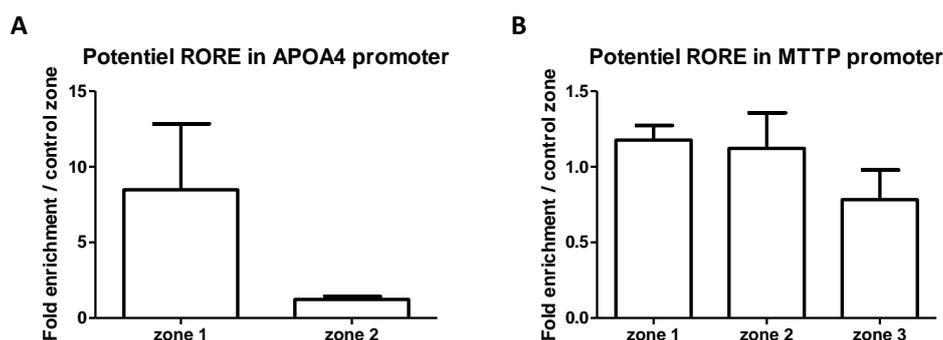
**Figure 4 : L'inactivation de Rev-erbα entraîne une augmentation de l'expression de gènes clés de l'assemblage des CM**

(A, B et C) Niveaux d'ARNm de APOA4 (A), MTTP (B) et ACAT2 (C) dans les cellules sh control et sh Rev-erbα différenciées sur inserts. Les niveaux d'ARNm sont normalisés à l'Actine et exprimés par rapport à la condition de référence « sh control » mise à 1. Moyenne ± écart-type de 3 expériences indépendantes (\*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  - Test Student).

(D, E et F) Niveaux d'ARNm de APOA4 (D), MTTP (E) et ACAT2 (F) dans les cellules épithéliales isolées du jéjunum de souris WT et Rev-erbα<sup>-/-</sup> et sacrifiées à ZT6 ( $n=3/4$ ). Les niveaux d'ARNm sont normalisés à l'Actine et exprimés par rapport à la condition de référence « WT mice » mise à 1. Moyenne ± écart-type (\*  $p < 0,05$  - Test Student).

(G, H et I) Niveaux d'ARNm de APOA4 (G), MTTP (H) et ACAT2 (I) dans les cellules Caco-2/TC7 différenciées sur inserts et incubées en présence d'hémine 10μM ou de SR9009 10μM dans le milieu apical pendant 20 heures. Les niveaux d'ARNm sont normalisés à l'Actine et exprimés par rapport à la condition de référence « DMSO » mise à 1. Moyenne ± écart-type de 3 puits indépendants. (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  - One-Way ANOVA).

Rev-erbα étant un répresseur transcriptionnel, nous avons émis l'hypothèse que APOA4 et MTTP sont des gènes cibles directs de Rev-erbα. Après analyse bioinformatique des promoteurs de APOA4 et de MTTP (humain), nous avons trouvé respectivement 2 et 3 RORE/RevRE potentiels que nous avons testés pour leur capacité à lier la protéine Rev-erbα dans la lignée Caco-2/TC7, par ChIP-qPCR. Les résultats montrent un recrutement de la protéine Rev-erbα au niveau d'un RORE potentiel identifié dans le promoteur de APOA4 (figure 5A) mais pas au niveau du promoteur de MTTP (figure 5B). Ces données suggèrent que APOA4 est un gène cible direct de Rev-erbα.



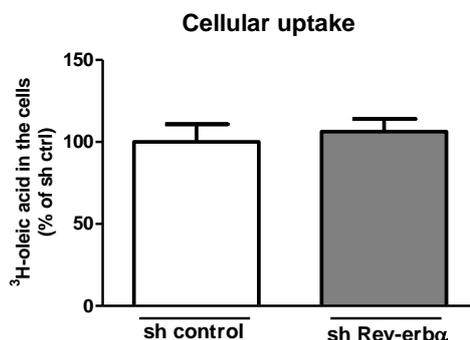
### Figure 5 : APOA4 est un gène cible potentiel de Rev-erba

Analyse par ChIP-qPCR du recrutement de la protéine Rev-erba sur des RORE potentiels situés dans le promoteur du gène APOA4 (A) et du gène MTTP (B), dans la lignée Caco-2/TC7. Les résultats sont exprimés par rapport au recrutement de la protéine Rev-erba sur une zone contrôle ne liant aucun facteur de transcription mis à 1. Moyenne  $\pm$  écart-type de 2 expériences indépendantes.

### L'invalidation de Rev-erba *in vitro* n'entraîne pas de modification de la captation entérocytaire d'acides gras

Puisque l'invalidation de Rev-erba entraîne une augmentation de la sécrétion basolatérale de lipides provenant du compartiment apical, nous avons évalué l'étape d'absorption/captation entérocytaire d'acides gras dans les lignées sh control et sh Rev-erba.

Pour cela, les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erba sont incubées pendant seulement 15 minutes en présence de micelles lipidiques radio-marquées (acide oléique tritié) dans le compartiment apical. La mesure de la radioactivité contenue dans les cellules indique qu'il n'y a pas de différence entre les 2 lignées (figure 6) et suggère donc l'absence de modification d'absorption/captage entérocytaire dans la lignée sh Rev-erba.

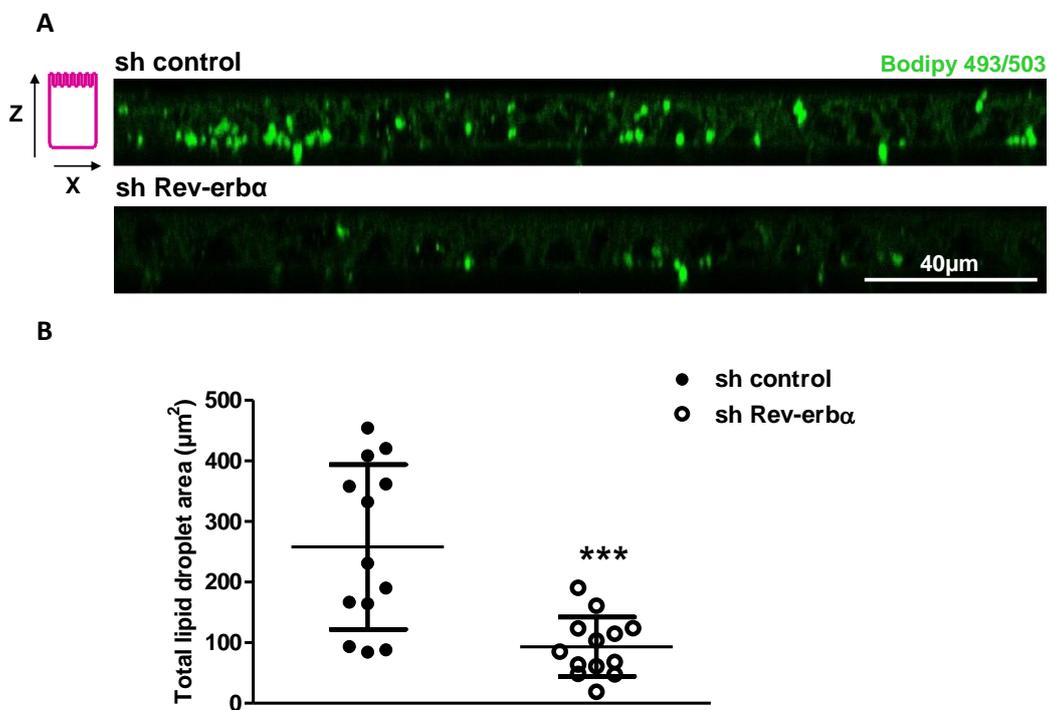


### Figure 6 : L'invalidation de Rev-erba *in vitro* n'entraîne pas de modification de la captation entérocytaire d'acides gras

Les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erba sont différenciées sur inserts puis incubées pendant 15 minutes en présence de micelles lipidiques radio-marquées (<sup>3</sup>H-acide oléique) dans le compartiment apical et de DMEM dans le compartiment baso-latéral. Les cellules sont lavées, lysées dans 1mL de Solvable (PerkinElmer, réf 6NE9100) et la quantité de radioactivité contenue dans les cellules comptée grâce à l'appareil TopCount NXT v2.13 et exprimée par rapport à la condition de référence « sh control » mise à 100%. Moyenne  $\pm$  écart-type de 2 expériences indépendantes.

## L'invalidation de Rev-erb $\alpha$ *in vitro* entraîne une diminution de la quantité de gouttelettes lipidiques cytosoliques

Il existe, au sein de l'entérocyte, une balance entre l'utilisation des lipides absorbés pour l'assemblage des CM et pour le stockage intracellulaire sous forme de gouttelettes lipidiques (Demignot, *Biochimie*, 2014). Face au phénotype lipidique de la lignée sh Rev-erb $\alpha$ , nous avons donc évalué la quantité de gouttelettes cytosoliques grâce à leur marquage par le Bodipy 493/503 (lipides neutres) suivie d'une analyse au microscope confocal. Après 2 heures d'incubation avec des micelles lipidiques dans le compartiment apical, les résultats indiquent une diminution de la quantité de gouttelettes lipidiques cytosoliques dans les cellules sh Rev-erb $\alpha$  par rapport aux cellules sh control (figures 7A et 7B).



**Figure 7 : L'invalidation de Rev-erb $\alpha$  *in vitro* entraîne une diminution de la quantité de gouttelettes lipidiques cytosoliques**

Les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erb $\alpha$  sont différenciées sur inserts puis incubées pendant 2 heures en présence de micelles lipidiques dans le compartiment apical et de DMEM dans le compartiment baso-latéral. Les cellules sont lavées, fixées par la paraformaldéhyde puis les gouttelettes lipidiques cytosoliques sont marquées par le Bodipy 493/503. L'observation des lames se fait grâce au microscope confocal Zeiss LSM 710. (A) Vues transversales (XZ) représentatives et (B) quantification de la surface occupé par les gouttelettes lipidiques dans chacune des 2 lignées. Moyenne  $\pm$  écart-type de 2 expériences indépendantes (\*\*\*)  $p < 0,001$  - Test Student).

Ces résultats montrent donc que l'utilisation des lipides absorbés est dérégulée dans la lignée sh Rev-erba en faveur de l'assemblage et de la sécrétion de CM et suggère donc que Rev-erba participe au contrôle de cette balance dans l'entérocyte.

### **L'invalidation de Rev-erba *in vitro* entraîne une augmentation de l'autophagie et plus précisément de la lipophagie**

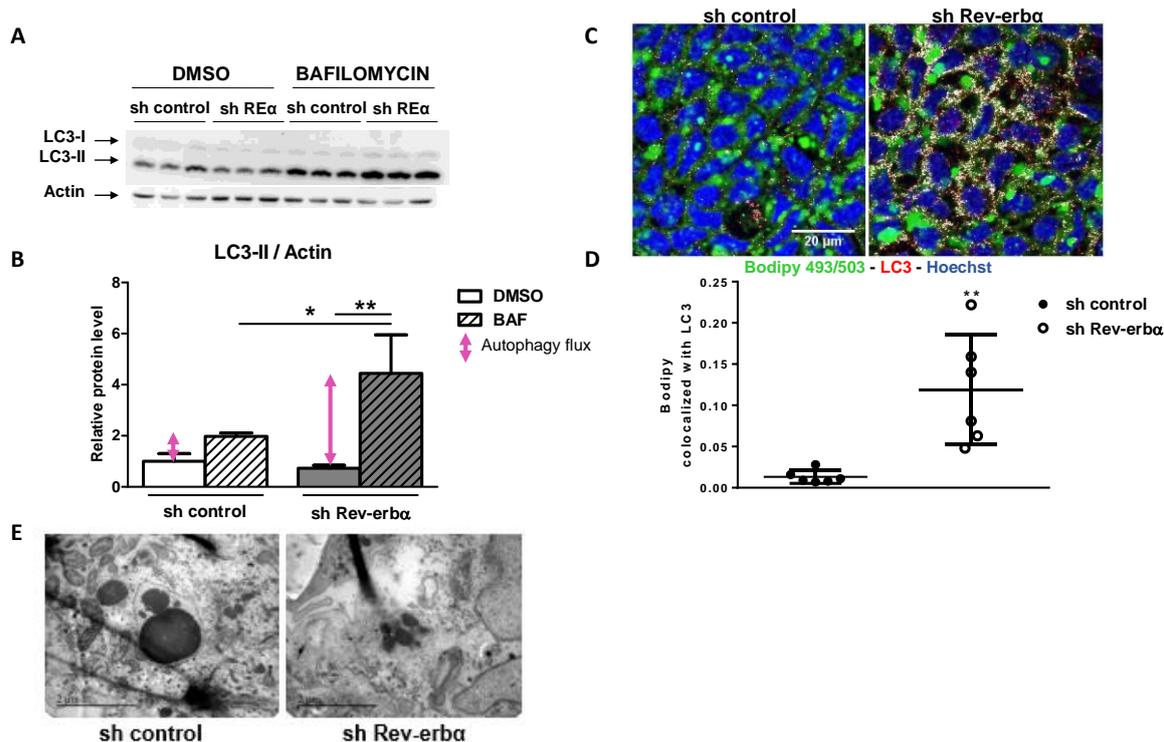
Notre hypothèse est donc que la re-mobilisation des stocks cytosoliques de lipides est augmentée dans la lignée sh Rev-erba en faveur de leur utilisation dans l'assemblage des CM.

Il a récemment été montré que la lipophagie, qui désigne l'autophagie spécifique des gouttelettes lipidiques, contribue de façon significative à l'homéostasie des gouttelettes lipidiques dans l'entérocyte (Khaloun, *Mol Biol Cell*, 2014). De plus, un rôle de Rev-erba dans l'autophagie a été mis en évidence au niveau du muscle squelettique (Woldt, *Nature Med*, 2013). Nous avons donc étudié l'autophagie et plus particulièrement, la lipophagie dans les 2 lignées sh control et sh Rev-erba.

De par l'absence de marqueur spécifique de la lipophagie, nous avons, dans un premier temps, évalué l'activité autophagique dans les 2 lignées. Pour cela, nous avons mesuré le flux autophagique dans la lignée sh control et sh Rev-erba en évaluant l'accumulation de la protéine LC3-II (MAP1LC3, Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3), qui est la signature moléculaire de l'autophagosome, suite au blocage de la fusion autophagosome/lysosome par la bafilomycine (inhibiteur tardif de l'autophagie). Les résultats indiquent une plus grande accumulation de LC3-II suite au traitement par la bafilomycine et donc une plus grande activité autophagique dans la lignée sh Rev-erba par rapport à la lignée sh control (figures 8A et 8B).

De plus, pour mettre en évidence plus précisément la lipophagie, une analyse de co-localisation des gouttelettes lipidiques (marquées par le Bodipy 493/503) et de la protéine LC3 (marqueur de l'autophagosome) a été effectuée et montre que la co-localisation est plus forte dans la lignée sh Rev-erba par rapport à la lignée sh control (figures 8C et 8D).

Grâce à la microscopie électronique, nous avons pu observer l'existence de structures à double membrane qui ressemblent à des autophagosomes qui encerclent des gouttelettes lipidiques dans les lignées sh control et sh Rev-erba (figure 8E). Les photographies prises dans les 2 lignées semblent montrer que les gouttelettes lipidiques retenues dans ces structures à double membrane sont plus petites dans la lignée sh Rev-erba (figure 8E), suggérant l'existence d'un processus de dégradation plus actif dans cette lignée.



**Figure 8 : L'inactivation de Rev-erba *in vitro* entraîne une augmentation du flux autophagique et de marques de lipophagie**

(A et B) Analyse des niveaux protéiques de LC3-II dans les cellules sh control et sh Rev-erba différenciées sur inserts et incubées pendant 2 heures en absence (DMSO) ou en présence de bafilomycine 100nM dans le compartiment apical. (A) Western blot représentatif et (B) niveaux protéiques normalisés à l'Actine et exprimés par rapport à la condition de référence « sh control - DMSO » mise à 1. Moyenne  $\pm$  écart-type de 2 expériences indépendantes (\*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$  – Two-way ANOVA).

(C et D) Les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erba sont différenciées sur inserts puis incubées pendant 2 heures en présence de micelles lipidiques et de bafilomycine 100nM dans le compartiment apical et de DMEM dans le compartiment baso-latéral. Les gouttelettes lipidiques cytosoliques sont marquées par le Bodipy 493/503 (vert) et la protéine LC3B par immunofluorescence (rouge). Les noyaux sont contre-marqués par l'Hoechst (bleu). L'observation des lames se fait grâce au microscope confocal Zeiss LSM 710. (C) Vues longitudinales (XY) représentatives et (D) quantification de la co-localisation entre le Bodipy 493/503 et LC3B. Moyenne  $\pm$  écart-type de 2 expériences indépendantes (\*\*  $p < 0,01$  – Test Student).

(E) Les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erba sont différenciées sur inserts puis incubées pendant 2 heures en présence de micelles lipidiques dans le compartiment apical et de DMEM dans le compartiment baso-latéral. Vues au microscope électronique Zeiss EM 900.

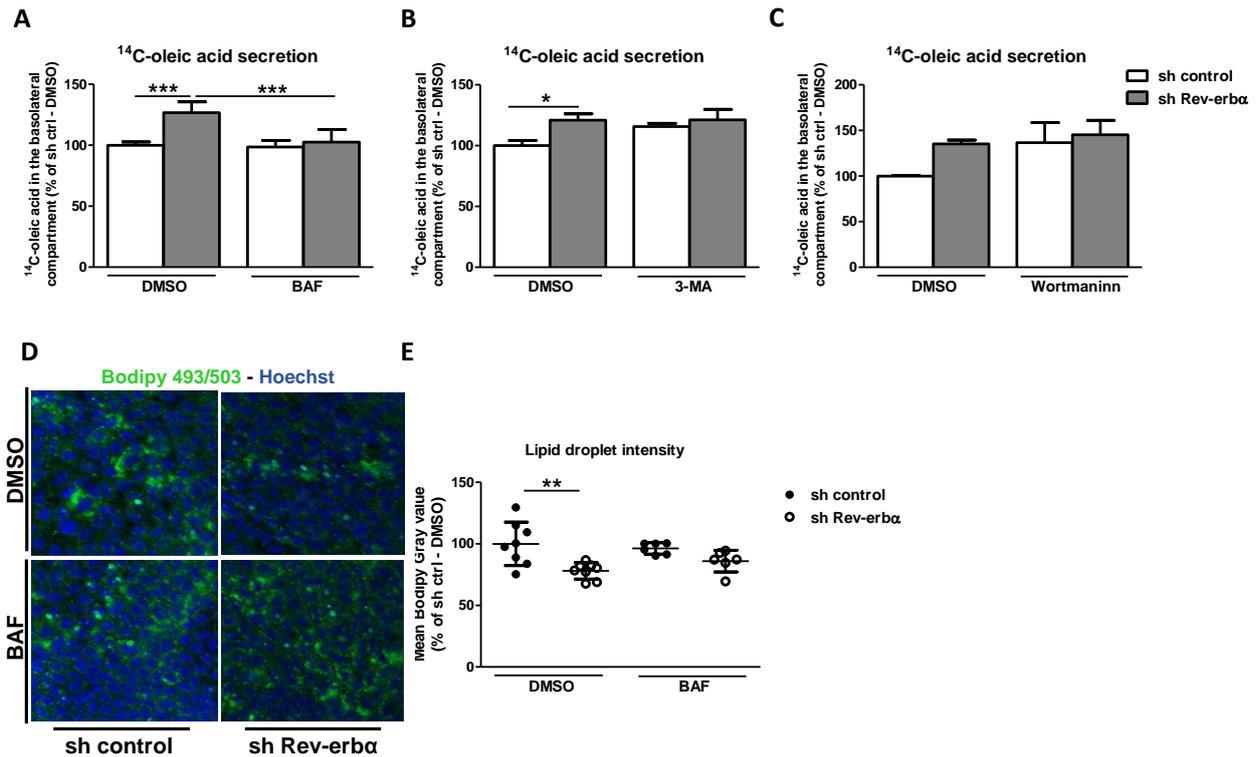
Ces résultats sont donc en faveur d'une augmentation de la lipophagie dans la lignée sh Rev-erba qui pourrait être à l'origine de la re-mobilisation des lipides des gouttelettes lipidiques en vue de leur assemblage dans des CM.

### L'inhibition de l'autophagie restaure le phénotype lipidique de la lignée sh Rev-erba

Pour évaluer la contribution de l'autophagie au phénotype lipidique observé dans la lignée sh Rev-erba, nous avons incubé des cellules sh control et sh Rev-erba avec des micelles lipidiques radio-marquées dans le compartiment apical pendant 2 heures et ce, en

présence de différents inhibiteurs de l'autophagie (bafilomycine, 3-MA et wortmannin). Les résultats montrent que l'inhibition de l'autophagie dans la lignée sh Rev-erba restaure la sécrétion baso-latérale de lipides provenant du milieu apical au même niveau que la lignée sh control (figures 9A, 9B et 9C).

De plus, l'inhibition de l'autophagie par la bafilomycine restaure également le stockage intracellulaire de gouttelettes lipidiques dans la lignée sh Rev-erba au même niveau que la lignée sh control (figures 9D et 9E).



**Figure 9 : L'inhibition de l'autophagie restaure le phénotype lipidique de la lignée sh Rev-erba**

Les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erba sont différenciées sur inserts puis incubées pendant 2 heures en présence de micelles lipidiques radio-marquées ( $^{14}\text{C}$ -acide oléique) (A, B et C) ou non-marquées (D et E) dans le compartiment apical et de DMEM dans le compartiment baso-latéral. Pendant ces 2 heures d'incubation, les cellules sont traitées en absence (DMSO) ou en présence de bafilomycine 100nM (A, D et E), 3-méthyladenine 5mM (3-MA) (B) ou wortmannin 1 $\mu\text{M}$  (C). (A, B et C) Quantité de radioactivité contenue dans le milieu baso-latéral comptée grâce à l'appareil TopCount NXT v2.13 et exprimée par rapport à la condition de référence « sh control - DMSO » mise à 100%. Moyenne  $\pm$  écart-type de 2 expériences indépendantes (\*  $p < 0,05$  et \*\*\*  $p < 0,001$  – Two-way ANOVA). (D) Vues longitudinales (XY) représentatives et (E) quantification des gouttelettes lipidiques après marquage par le Bodipy 493/503. L'observation des lames se fait grâce au microscope confocal Zeiss LSM 710. Moyenne  $\pm$  écart-type de 3 puits indépendants (\*\*  $p < 0,01$  - Two-way ANOVA).

Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la lipophagie dans la lignée sh Rev-erba est le processus qui est à l'origine de la dérégulation de la balance de l'utilisation des TG absorbés en faveur de leur sécrétion sous forme de CM.

## Discussion

La surproduction de chylomicrons par l'intestin est un contributeur majeur de la dyslipémie chez l'insulino-résistant (Arca, *Atheroscler Suppl*, 2015). L'intestin constitue donc une cible thérapeutique pour corriger l'hypertriglycéridémie post-prandiale du diabétique. L'absorption des lipides alimentaires est un processus hautement régulé, notamment par certains récepteurs nucléaires comme PPAR $\alpha$  (Colin, *Eur Heart J*, 2012) et LXR (Briand, *Gastroenterology*, 2016). Le récepteur nucléaire Rev-erba (NR1D1) est un répresseur transcriptionnel (Duez et Staels, *J Appl Physiol*, 2009) particulièrement impliqué dans le métabolisme lipidique hépatique (Raspé, *J Lipid Res*, 2002). Cependant, son rôle dans le métabolisme lipidique intestinal et l'absorption des lipides alimentaires n'est pas élucidé.

La lignée Caco-2 est issue d'un adénocarcinome colique humain et représente la seule lignée intestinale dont les cellules sont capables de se différencier spontanément en entérocytes matures (Zweibaum, *Bull Acad Natl Med*, 1993). Grâce à sa culture sur inserts, elle est aujourd'hui reconnue comme modèle d'étude de la perméabilité intestinale et de l'absorption des lipides (Hidalgo, *Gastroenterology*, 1989). Suite à l'invalidation du récepteur nucléaire Rev-erba dans la lignée Caco-2/TC7 par infection lentivirale (sh Rev-erba), nous avons pu étudier le rôle de Rev-erba sur le métabolisme entérocytaire des lipides.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'invalidation de Rev-erba dans la lignée Caco-2/TC7 entraîne une augmentation de la sécrétion de lipoprotéines à ApoB riches en TG dans le milieu baso-latéral dès 2 heures d'incubation avec des micelles post-prandiales (Chateau, *J Cell Physiol*, 2005) dans le compartiment apical. Cette observation coïncide avec l'augmentation de l'expression en ARNm de trois acteurs clés dans l'assemblage des CM dans l'entérocyte, que sont l'ApoAIV, la MTP et ACAT2 et ce, dans le modèle Caco-2/TC7 mais aussi chez la souris. En effet, l'invalidation de ApoA4 chez la souris mais aussi dans la lignée Caco-2 entraîne une diminution de la sécrétion de TG suite à l'apport de lipides (Pan, *J Biol Chem*, 2013). De plus, l'invalidation de Mttp spécifiquement dans l'intestin de souris (Xie, *J Biol Chem*, 2006) conduit à une diminution drastique de la sécrétion de CM. Le récepteur nucléaire Rev-erba étant un répresseur transcriptionnel, notre hypothèse a donc été que APOA4 et MTTP sont des gènes cibles directs de Rev-erba. De plus, une étude a mis en évidence l'existence d'une interaction physique entre la protéine ApoAIV et Rev-erba (Li, *J Biol Chem*, 2013). Nous avons donc recherché la présence d'éléments de réponse à Rev-erba (RORE/RevRE) dans le promoteur de APOA4 et MTTP (humain) par analyse bioinformatique et testé ces régions en CHIP-qPCR. Les résultats indiquent une fixation de la protéine Rev-erba sur une des régions possédant un

RORE/RevRE potentiel dans le promoteur de APOA4, suggérant que APOA4 est un gène cible direct de Rev-erb $\alpha$ . Cependant, aucune fixation de la protéine Rev-erb $\alpha$  n'a été mise en évidence sur le promoteur de MTTP. Cela peut s'expliquer par au moins deux raisons. La première raison est que MTTP n'est pas un gène cible direct de Rev-erb $\alpha$  et l'augmentation de son expression dans la lignée Caco-2/TC7 invalidée pour Rev-erb $\alpha$  est due à un mécanisme indirect. Notamment, il a été montré que l'inactivation de ApoA4 chez la souris ou dans la lignée Caco-2 entraîne également une diminution de l'expression de la protéine MTP (Pan, *J Biol Chem*, 2013), suggérant que l'ApoAIV régule l'expression et l'activité de la protéine MTP dans l'intestin. La deuxième raison repose sur l'étude de Zhang qui montre que la protéine Rev-erb $\alpha$  ne se fixe pas uniquement sur des RORE/RevRE mais également sur d'autres régions du génome (Zhang, *Science*, 2015). De plus, ces autres régions fixées par la protéine Rev-erb $\alpha$  semblent spécifiques selon le tissu mais malheureusement, elles n'ont pas été identifiées dans l'intestin. Seule l'analyse sans « à priori » des sites de fixation de la protéine Rev-erb $\alpha$  sur la chromatine de la lignée Caco-2/TC7 par ChIP suivie d'un séquençage (ChIP-seq) pourrait valider le fait que MTTP est un gène cible direct de Rev-erb $\alpha$  dans la lignée Caco-2/TC7.

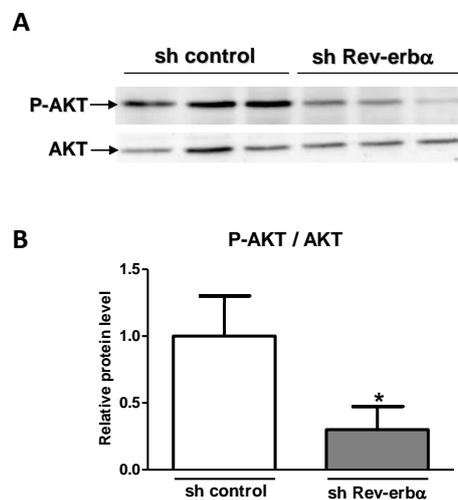
Outre l'augmentation de l'expression de APOA4 et de MTTP dans la lignée Caco-2/TC7 invalidée pour Rev-erb $\alpha$ , nous avons recherché si d'autres gènes impliqués dans l'assemblage des chylomicrons et la re-synthèse des TG au niveau du RE présentaient des niveaux d'expression différents entre les 2 lignées. Les résultats de la puce à ADN n'ont montré aucune différence d'expression de APOB entre les lignées sh control et sh Rev-erb $\alpha$ . Concernant la synthèse des TG par la voie de Clark et Hubscher ou voie du 2-MG, nous n'observons pas de différence d'expression de DGAT1 entre les 2 lignées. Cependant, l'expression de MGAT2 (voie de Clark et Hubscher) est diminuée dans la lignée sh Rev-erb $\alpha$  (données non-montrées). Néanmoins, lorsque les cellules Caco-2/TC7 sont traitées avec différents agonistes des Rev-erb comme l'hémine et le SR9009, l'expression de MGAT2 est également diminuée (données non-montrées) et nous n'obtenons donc pas d'effet miroir par les agonistes. De plus, la voie de Kennedy ou voie du glycérol-3-phosphate est la voie majoritaire de synthèse des TG dans le modèle Caco-2 (Levy, *FASEB J*, 1995) en comparaison à la voie de Clark et Hubscher. Les résultats de la puce à ADN n'ont cependant montré aucune différence d'expression des gènes impliqués dans la voie de Kennedy (GPAT, AGPAT, PAPs) entre les lignées sh control et sh Rev-erb $\alpha$ .

Il est maintenant admis que dans l'entérocyte, il existe une balance entre le stockage des TG néo-synthétisés sous forme de gouttelettes lipidiques cytosoliques et leur sécrétion baso-latérale sous forme de chylomicrons (Demignot, *Biochimie*, 2014). Cette balance

participe ainsi à la régulation de la triglycéridémie post-prandiale et inter-prandiale (Pauquai, *Biochem J*, 2006). Ayant écarté l'hypothèse d'une captation entérocytaire au pôle apical plus importante dans la lignée sh Rev-erb $\alpha$ , nous avons donc étudié le stockage intracellulaire des lipides dans les lignées sh control et sh Rev-erb $\alpha$  et avons mis en évidence une diminution de la quantité de lipides stockés dans l'entérocyte dans la lignée sh Rev-erb $\alpha$ , suggérant que la balance entérocytaire est dérégulée suite à l'invalidation de Rev-erb $\alpha$ . Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette diminution du stockage intracellulaire de lipides dans la lignée sh Rev-erb $\alpha$  : l'invalidation de Rev-erb $\alpha$  peut conduire à un défaut dans la formation des gouttelettes lipidiques ou à une re-mobilisation accrue des lipides stockés dans les gouttelettes lipidiques. Nous n'avons pas encore étudié la cinétique de formation des gouttelettes lipidiques. La re-mobilisation des lipides des gouttelettes lipidiques peut se faire via deux mécanismes dans l'entérocyte : la lipolyse ou l'autophagie des gouttelettes lipidiques appelée lipophagie. De par le rôle significatif de la lipophagie dans l'homéostasie des gouttelettes lipidiques de l'entérocyte (Khalidoun, *Mol Biol Cell*, 2014), nos recherches se sont d'abord orientées vers ce processus plutôt que la lipolyse. De plus, Rev-erb $\alpha$  est un régulateur de l'autophagie des mitochondries dans le muscle squelettique. Il y contrôle l'expression de gènes clés de l'autophagie comme ATG5, ULK1, BECLIN-1 et BNIP3 (Woldt, *Nature Med*, 2013). Cependant, l'utilisation d'un inhibiteur de la lipase ATGL (Mayer, *Nat Chem Biol*, 2013) tel que l'atglistatin, dans la lignée Caco-2/TC7 sh Rev-erb $\alpha$ , permettrait de déterminer si la lipolyse contribue ou non au phénotype lipidique observé.

Après avoir mis en évidence une activité autophagique plus importante et une co-localisation entre les gouttelettes lipidiques et les autophagosomes plus forte dans la lignée sh Rev-erb $\alpha$  par rapport à la lignée sh control, nous avons évalué la contribution de l'autophagie au phénotype lipidique de la lignée sh Rev-erb $\alpha$  grâce à l'utilisation de différents inhibiteurs de l'autophagie. Pour cela, nous avons utilisé la 3-méthyladénine et la wortmaninn qui sont des inhibiteurs des PI3K intéressants mais non-spécifiques du complexe PI3K de classe III impliqué dans l'induction de l'autophagie (Yu, *Autophagy*, 2015). Nous avons également utilisé la bafilomycine qui est un inhibiteur tardif de l'autophagie puisqu'elle inhibe la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. Quelque soit l'inhibiteur utilisé, les résultats indiquent que la sécrétion baso-latérale de lipoprotéines riches en TG est restaurée au même niveau dans la lignée sh control et la lignée sh Rev-erb $\alpha$ . Cependant, nous pouvons remarquer qu'avec la bafilomycine, la sécrétion baso-latérale de lipoprotéines riches en TG dans la lignée sh Rev-erb $\alpha$  est diminuée jusqu'au niveau de celle de la lignée sh control alors qu'avec la 3-méthyladénine et la wortmannin, la sécrétion baso-latérale de lipoprotéines riches en TG dans la lignée sh control est augmentée jusqu'au niveau de celle de la lignée sh Rev-erb $\alpha$ . En parallèle, nous avons évalué la voie de signalisation PI3K/AKT

dans les deux lignées et la lignée sh Rev-erb $\alpha$  présente une diminution drastique de la phosphorylation de AKT sur la sérine 473 (figure 10), suggérant ainsi une activité PI3K diminuée. Or, la voie PI3K/AKT inhibe l'autophagie en phosphorylant ULK1 sur la sérine 774 (Botti-Millet, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016). La diminution de la voie PI3K/AKT dans la lignée sh Rev-erb $\alpha$  pourrait donc expliquer l'augmentation de son activité autophagique. Nous pensons donc que la 3-méthyladénine et la wortmannin pourraient agir comme inhibiteurs de PI3K dans la voie AKT plutôt que comme inhibiteurs de PI3K de classe III dans notre système et dans les conditions testées. Cela pourrait expliquer pourquoi des inhibiteurs des PI3K comme la 3-méthyladénine et la wortmannin entraînent plutôt une augmentation de la sécrétion baso-latérale de lipoprotéines riches en TG dans la lignée sh control qu'une diminution dans la lignée sh Rev-erb $\alpha$ .



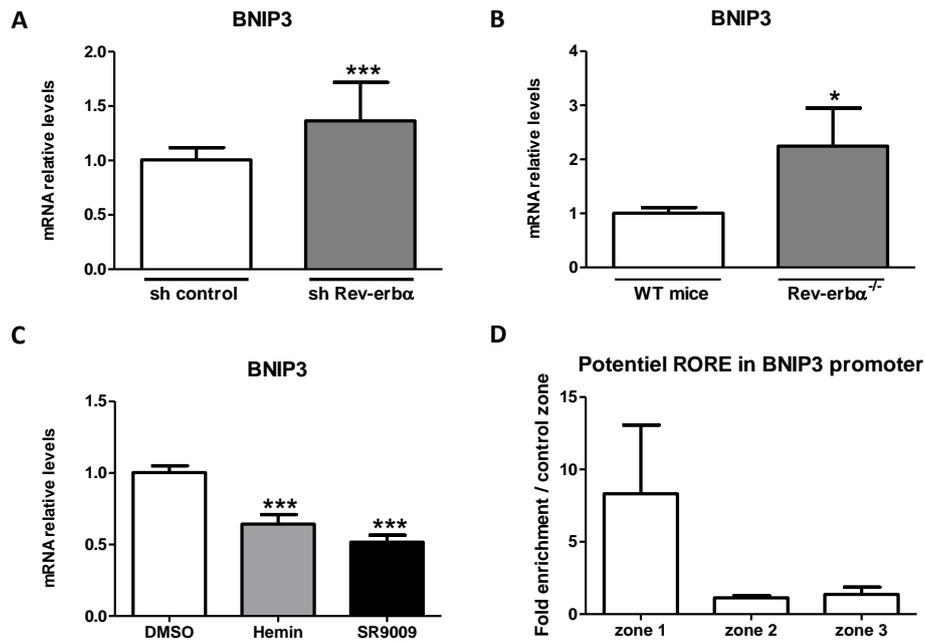
**Figure 10 : L'inactivation de Rev-erb $\alpha$  *in vitro* entraîne une diminution de la phosphorylation de AKT sur la sérine 473**

Analyse des niveaux protéiques de P-AKT dans les cellules sh control et sh Rev-erb $\alpha$  différenciées sur inserts. (A) Western blot représentatif et (B) niveaux protéiques normalisés à AKT total et exprimés par rapport à la condition de référence « sh control » mise à 1. Moyenne  $\pm$  écart-type de 3 puits indépendants (\*  $p < 0,05$  – Test Student).

La voie PI3K/AKT est activée en réponse à l'insuline dans l'intestin de souris mais aussi dans la lignée Caco-2/TC7 (Tran, *J Biol Chem*, 2016). Grâce à l'analyse de la puce à ADN, nous avons pu mettre en évidence IQGAP2 (IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 2) comme un des gènes dont l'expression en ARNm est la plus augmentée dans la lignée sh Rev-erb $\alpha$  par rapport à la lignée sh control (expression 4 fois supérieure) et nous avons confirmé ces résultats par qPCR (données non-montrées). IQGAP2 est un modulateur de l'activité AKT dans différents modèles : les souris IQGAP2<sup>-/-</sup> présentent une augmentation de la phosphorylation de AKT sur la sérine 473 dans les hépatocytes en réponse à l'insuline

(Chiariello, *Regul Pept*, 2012), traduisant une amélioration de la sensibilité à l'insuline, ainsi qu'une diminution des niveaux de TG circulants. De même, la surexpression de IQGAP2 dans la lignée cellulaire prostatique DU145 entraîne une diminution de la phosphorylation de AKT sur la sérine 473 en réponse au SVF (Xie, *Biochim Biophys Acta*, 2012). Ainsi, IQGAP2, dont l'expression est augmentée dans la lignée sh Rev-erba, constitue un gène-candidat pour expliquer la diminution de la phosphorylation de AKT dans la lignée sh Rev-erba, qui pourrait, quant à elle, être à l'origine de l'augmentation de la lipophagie dans cette lignée. Des études en présence d'inhibiteurs de AKT mais aussi en invalidant IQGAP2 par siRNA dans les lignées Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erba sont en cours et pourront permettre d'évaluer la contribution respectivement de l'activité AKT et de IQGAP2 au phénotype lipidique de la lignée sh Rev-erba.

Grâce à la puce à ADN réalisée dans les lignées Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erba et face à l'absence de mécanisme propre à la lipophagie identifié, nous avons recherché si des gènes impliqués directement dans l'autophagie comme ceux de la famille ATG présentaient des niveaux d'expression différents entre les 2 lignées. Nous avons mis en évidence que l'expression de BNIP3 (BCL2/Adenovirus E1B 19kDa Interacting Protein 3) est augmentée dans la lignée sh Rev-erba (figure 11A). BNIP3 est une protéine impliquée dans l'autophagie des mitochondries et du réticulum endoplasmique (Hanna, *J Biol Chem*, 2012). De plus, les travaux de Woldt ont montré que Rev-erba contrôle directement l'expression de BNIP3 dans le muscle squelettique (Woldt, *Nature Med*, 2013). Son expression est également augmentée dans le jéjunum de souris Rev-erba<sup>-/-</sup> (figure 11B) et diminuée dans la lignée Caco-2/TC7 en réponse à des agonistes de Rev-erba comme l'hémimine et le SR9009 (figure 11C). Les résultats de CHIP-qPCR indiquent une fixation de la protéine Rev-erba sur une des régions possédant un potentiel RORE/RevRE dans le promoteur de BNIP3, suggérant que BNIP3 est un gène cible direct de Rev-erba (figure 11D).



**Figure 11 : BNIP3 est un gène cible potentiel de Rev-erba**

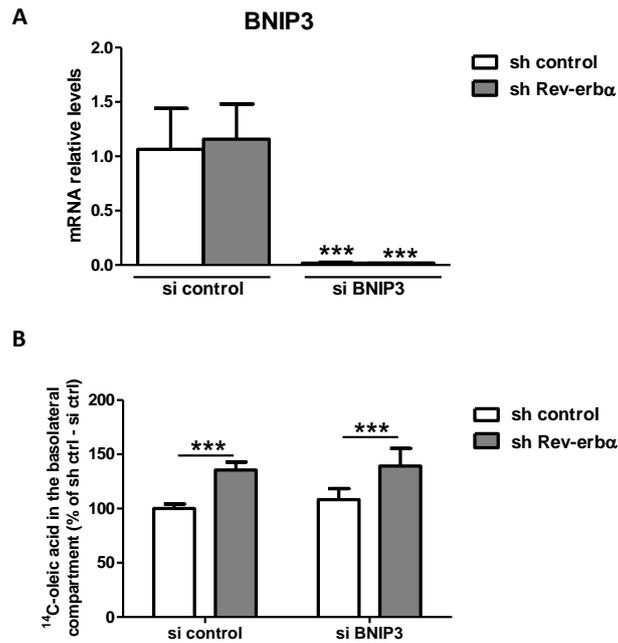
(A) Niveaux d'ARNm de BNIP3 dans les cellules sh control et sh Rev-erba différenciées sur inserts. Les niveaux d'ARNm sont normalisés à l'Actine et exprimés par rapport à la condition de référence « sh control » mise à 1. Moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences indépendantes (\*\*\*)  $p < 0,001$  - Test Student).

(B) Niveaux d'ARNm de BNIP3 dans les cellules épithéliales isolées du jéjunum de souris WT et Rev-erba<sup>-/-</sup> et sacrifiées à ZT6 (n=3/4). Les niveaux d'ARNm sont normalisés à l'Actine et exprimés par rapport à la condition de référence « WT mice » mise à 1. Moyenne  $\pm$  écart-type (\*  $p < 0,05$  - Test Student).

(C) Niveaux d'ARNm de BNIP3 dans les cellules Caco-2/TC7 différenciées sur inserts et incubées en présence d'hémine 10 $\mu$ M ou de SR9009 10 $\mu$ M dans le milieu apical pendant 20 heures. Les niveaux d'ARNm sont normalisés à l'Actine et exprimés par rapport à la condition de référence « DMSO » mise à 1. Moyenne  $\pm$  écart-type de 3 puits indépendants. (\*\*\*)  $p < 0,001$  - One-Way ANOVA).

(D) Analyse par CHIP-qPCR du recrutement de la protéine Rev-erba sur des RORE potentiels situés dans le promoteur du gène BNIP3, dans la lignée Caco-2/TC7. Les résultats sont exprimés par rapport au recrutement de la protéine Rev-erba sur une zone contrôle ne liant aucun facteur de transcription mis à 1. Moyenne  $\pm$  écart-type de 2 expériences indépendantes.

Nous avons donc invalidé BNIP3 par siRNA dans les lignées Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erba (figure 12A) afin d'évaluer sa contribution au phénotype lipidique de la lignée sh Rev-erba. Cependant, aucune différence de sécrétion baso-latérale de lipoprotéines riches en TG n'a pu être observée suite à l'invalidation de BNIP3 dans la lignée sh Rev-erba (figure 12B), suggérant ainsi que BNIP3 ne participe pas au phénotype lipidique de la lignée sh Rev-erba, bien qu'il semble être un gène cible direct de Rev-erba et potentiellement un modulateur de l'autophagie.



**Figure 12 : L'invalidation de BNIP3 par siRNA ne restaure pas le phénotype lipidique de la lignée sh Rev-erba**

Les cellules sh control et sh Rev-erba sont transfectées avec un si RNA ciblant BNIP3 (si BNIP3) ou ne ciblant aucune séquence (si control) puis différenciées sur inserts. (A) Niveaux d'ARNm de BNIP3. Les niveaux d'ARNm sont normalisés à l'Actine et exprimés par rapport à la condition de référence « sh control – si control » mise à 1. Moyenne  $\pm$  écart-type de 2 expériences indépendantes (\*\*\*)  $p < 0,001$  – Two-way ANOVA). (B) Les cellules sont incubées pendant 2 heures en présence de micelles lipidiques radio-marquées (<sup>14</sup>C-acide oléique) dans le compartiment apical et de DMEM dans le compartiment baso-latéral. Quantité de radioactivité contenue dans le milieu baso-latéral comptée grâce à l'appareil TopCount NXT v2.13 et exprimée par rapport à la condition de référence « sh control – si control » mise à 100%. Moyenne  $\pm$  écart-type de 2 expériences indépendantes (\*\*\*)  $p < 0,001$  – Two-way ANOVA).

En conclusion, cette étude montre donc que l'invalidation de Rev-erba dans la lignée Caco-2/TC7 conduit à une dérégulation de la balance chylomicrons/gouttelettes lipidiques dans l'entérocyte. Notre hypothèse est que cette dérégulation passe par deux mécanismes indépendants mais coopératifs : d'une part, l'augmentation de la lipophagie qui conduit à une re-mobilisation accrue des lipides contenus dans les gouttelettes lipidiques cytosoliques ; d'autre part, l'induction de l'expression de APOA4, MTTP et ACAT2, faisant que la machinerie d'assemblage des chylomicrons est particulièrement opérationnelle dans la lignée sh Rev-erba. Rev-erba pourrait donc avoir un rôle clé dans le contrôle de la triglycéridémie post-prandiale via le contrôle de la production de chylomicrons. Il pourrait ainsi représenter une cible thérapeutique afin de corriger les dyslipidémies post-prandiales chez l'obèse et le diabétique. La pertinence de ces résultats doit encore être apportée, dans un premier temps *in vivo* chez la souris, puis chez l'humain grâce à la mise en culture d'entéroïdes à partir de biopsies jéjunales.

## Perspectives

### **Evaluation de la pertinence des résultats dans un autre modèle**

La prochaine étape de ce travail sera d'évaluer, dans d'autres modèles, la pertinence des résultats obtenus dans la lignée Caco-2/TC7. Tout d'abord, l'objectif sera de comparer la sécrétion intestinale de chylomicrons et le stockage transitoire de lipides sous forme de gouttelettes lipidiques cytosoliques, après un bolus d'huile, chez des souris WT et Rev-erb $\alpha$ <sup>-/-</sup>. Des résultats préliminaires obtenus sur un nombre très limité de souris semblent indiquer une quantité moins importante de gouttelettes lipidiques dans le jéjunum des souris Rev-erb $\alpha$ <sup>-/-</sup>, 4 heures après un bolus d'huile. D'autres expériences seront donc menées afin de confirmer ces résultats prometteurs sur un nombre plus important de souris mais aussi chez des souris dont l'expression de Rev-erb $\alpha$  est invalidée spécifiquement dans l'intestin. Pour évaluer ensuite le rôle de Rev-erb $\alpha$  dans le contrôle de l'autophagie dans l'intestin (mesure du flux autophagique), nous envisageons de mettre en culture des entéroïdes issus de souris WT et Rev-erb $\alpha$ <sup>-/-</sup> ou issus de biopsies de jéjunum humain qui pourront être traités avec des agonistes des Rev-erb.

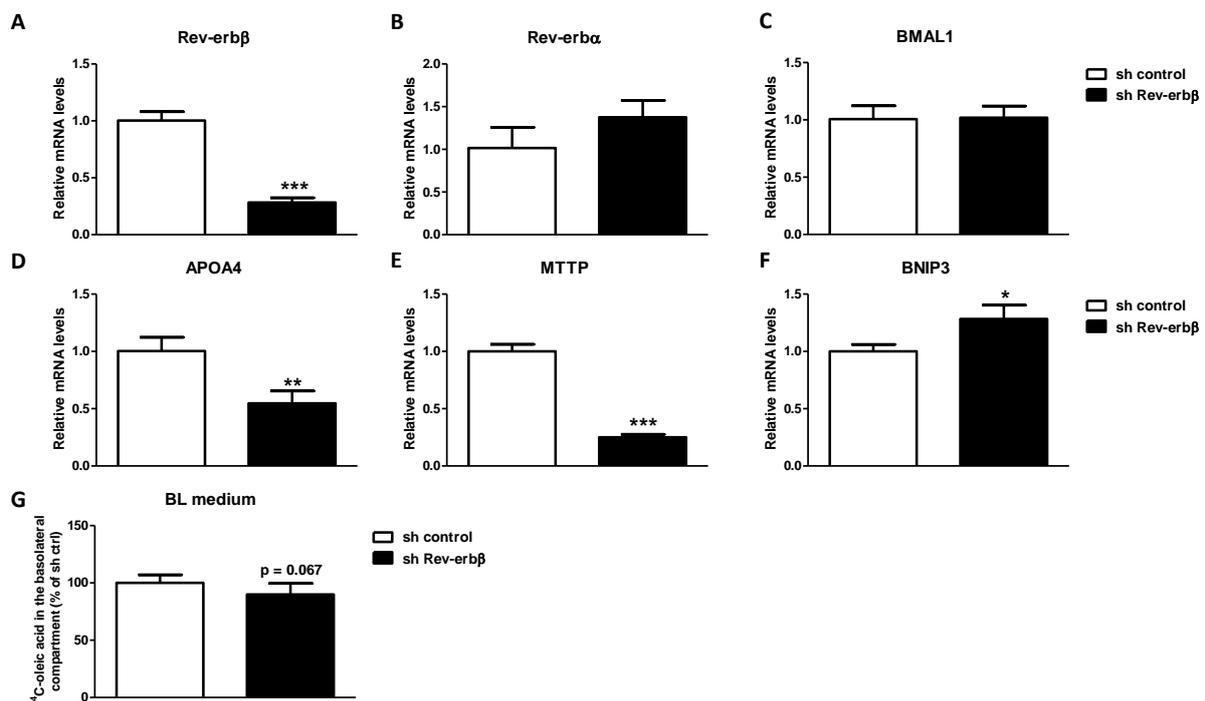
### **Identification des gènes cibles directs de Rev-erb $\alpha$ dans l'entérocyte**

Une des faiblesses de cette étude réside dans le fait qu'aucune cible directe de Rev-erb $\alpha$  en lien avec la lipophagie n'a été identifiée. Bien que IQGAP2 semble être une cible potentielle, seule l'analyse croisée des résultats de la puce à ADN et d'un CHIP-seq Rev-erb $\alpha$  dans la lignée Caco-2/TC7 nous permettra d'identifier de façon précise les gènes cibles directs de Rev-erb $\alpha$  dans l'entérocyte.

### **Evaluation du rôle de Rev-erb $\beta$ dans l'absorption entérocytaire des lipides alimentaires**

Plusieurs études ont mis en évidence que Rev-erb $\alpha$  et Rev-erb $\beta$  partagent certaines de leurs fonctions ((Bugge, *Genes Dev*, 2012) ; (Cho, *Nature*, 2012)). De plus, les approches pharmacologiques actuelles reposent sur des agonistes des Rev-erb non-spécifiques qui ne permettent pas de discriminer les rôles respectifs de Rev-erb $\alpha$  et de Rev-erb $\beta$ . Nous avons donc également développé une lignée Caco-2/TC7 invalidée pour Rev-erb $\beta$  par infection lentivirale (figure 13A). Cette lignée sh Rev-erb $\beta$  ne présente aucune différence d'expression de Rev-erb $\alpha$  (figure 13B) et Bmal1 (figure 13C). De façon opposée à la lignée sh Rev-erb $\alpha$ , l'expression en ARNm de APOA4 (figure 13D) et MTTP (figure 13E) est fortement diminuée dans la lignée sh Rev-erb $\beta$ . L'expression de BNIP3 est impactée de la même manière par l'invalidation de Rev-erb $\alpha$  et celle de Rev-erb $\beta$  dans la lignée Caco-2/TC7 (figure 13F). A l'heure de la rédaction de ce manuscrit, nous n'avons pas mesuré l'expression d'IQGAP2

dans la lignée sh Rev-erb $\beta$ . De façon cohérente avec la diminution de l'expression de APOA4 et MTTP, la sécrétion baso-latérale de lipoprotéines tend à diminuer mais de façon non-significative dans la lignée sh Rev-erb $\beta$  (figure 13G). Ces résultats semblent indiquer que Rev-erba et Rev-erb $\beta$  ne partagent pas les mêmes fonctions au sein de l'entérocyte en ce qui concerne le contrôle de la sécrétion de chylomicrons. D'autres études complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre le rôle de chacun de ces deux récepteurs nucléaires dans le métabolisme lipidique intestinal et de prédire l'impact de leur co-activation.



### Figure 13 : Développement d'une lignée invalidée pour l'expression de Rev-erb $\beta$

Les cellules de la lignée Caco-2/TC7 sont infectées avec des particules lentivirales contenant un sh RNA ciblant Rev-erb $\beta$  (sh Rev-erb $\beta$ ) ou ne ciblant aucune séquence (sh control). La sélection se fait grâce à la néomycine. (A à F) Niveaux d'ARNm de Rev-erb $\beta$  (A), Rev-erba (B), Bmal1 (C), APOA4 (D), MTTP (E) et BNIP3 (F) dans les cellules sh control et sh Rev-erb $\beta$  différenciées sur inserts. Les niveaux d'ARNm sont normalisés à l'Actine et exprimés par rapport à la condition de référence « sh control » mise à 1. Moyenne  $\pm$  écart-type de 2 expériences indépendantes (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  - Test Student). (G) Les cellules Caco-2/TC7 sh control et sh Rev-erb $\beta$  sont différenciées sur inserts puis incubées pendant 2 heures en présence de micelles lipidiques radio-marquées (<sup>14</sup>C-acide oléique) dans le compartiment apical et de DMEM dans le compartiment baso-latéral. . Quantité de radioactivité contenue dans le milieu baso-latéral comptée grâce à l'appareil TopCount NXT v2.13 et exprimée par rapport à la condition de référence « sh control » mise à 100%. Moyenne  $\pm$  écart-type de 2 expériences indépendantes.

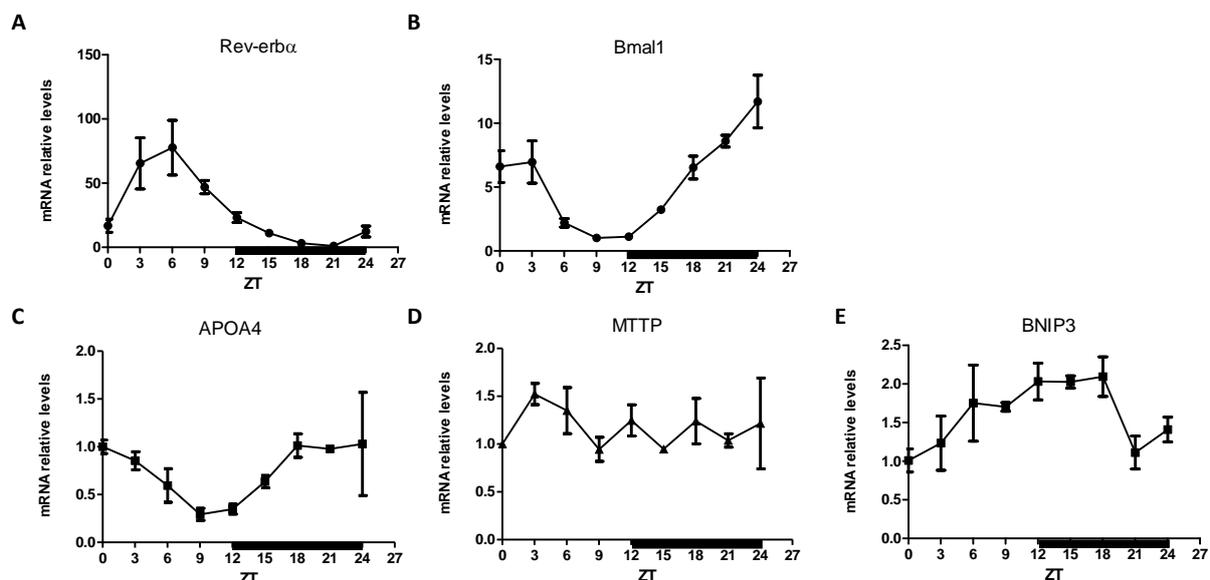
### Intégration de la composante « rythme circadien » dans cette étude

Outre son rôle dans le métabolisme énergétique, Rev-erba contrôle également le rythme circadien en inhibant la transcription du gène de l'horloge, Bmal1 (Duez et Staels, J

*Appl Physiol*, 2009). De plus, plusieurs fonctions intestinales dont l'absorption des lipides alimentaires sont soumises à un rythme circadien (Hussain, *Trends Endocrinol Metab*, 2009). Dans ce contexte, nous envisageons d'intégrer la composante « rythme circadien » dans cette étude du rôle de Rev-erba dans l'absorption entérocytaire des lipides.

L'expression de Rev-erba suit un rythme nycthéméral avec une expression maximale en phase claire chez la souris (Bugge, *Genes Dev*, 2012). Nous avons prélevé l'intestin de souris WT toutes les 3 heures, pendant 24 heures, et nous avons obtenu des résultats similaires à ceux de la littérature, c'est-à-dire une expression maximale de Rev-erba en phase claire et plus particulièrement le pic d'ARNm à ZT6 (figure 14A). De plus, l'expression de Bmal1 est bien anti-phasique à celle de Rev-erba (figure 14B).

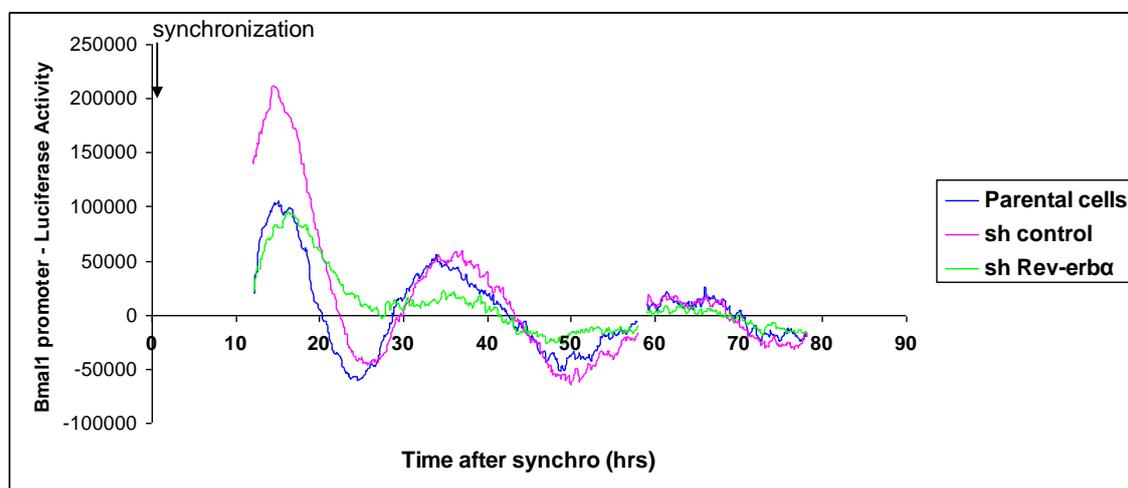
Nous avons donc évalué le profil d'expression nycthéméral de 3 des gènes cibles directs potentiels de Rev-erba identifiés dans cette étude : APOA4 (figure 14C), MTTP (figure 14D) et BNIP3 (figure 14E). Seul le profil de APOA4 est anti-phasique de celui de Rev-erba et semble donc cohérent avec le fait que ce soit un gène cible direct de Rev-erba. De plus, le profil d'expression obtenu pour APOA4 est conforme aux données de la littérature (Pan, *J Biol Chem*, 2013). Cependant, le profil d'expression de MTTP ne semble pas être influencé par le rythme nycthéméral et n'est donc pas conforme aux données de la littérature (Pan, *Cell Metab*, 2010). Le profil d'expression de BNIP3 semble, quant à lui, être influencé par le rythme nycthéméral chez la souris mais n'est pas anti-phasique à celui de Rev-erba.



**Figure 14 : Profils d'expression sur 24 heures de différents gènes chez la souris**

Profil d'expression en ARNm de Rev-erba (A), Bmal1 (B), APOA4 (C) et BNIP3 (D) dans le jéjunum de souris WT sacrifiées toutes les 3 heures sur 24 heures (n=4). Les niveaux d'ARNm sont normalisés à l'Actine. Moyenne  $\pm$  écart-type.

L'intégration de la composante « rythme circadien » est plus facile à effectuer *in vivo* que *in vitro*. En effet, l'étude du rythme circadien *in vitro* passe par la synchronisation des cellules, par exemple par « choc sérum » (Balsalobre, *Cell*, 1998). Nous avons testé la validité de la lignée Caco-2/TC7 pour l'étude du rythme circadien. Nous avons donc transfecté les cellules Caco-2/TC7 de la lignée parentale, de la lignée sh control et de la lignée sh Rev-erba avec un vecteur rapporteur contenant la luciférase placée sous le contrôle du promoteur de Bmal1 (figure 15). Les cellules sont ensuite synchronisées par « choc sérum » puis l'activité luciférase est mesurée sur plusieurs jours. La lignée Caco-2/TC7 parentale et la lignée sh control présentent des profils d'activité du promoteur de Bmal1 superposables. On observe une activité nyctémérale du promoteur de Bmal1, avec le premier pic 15 heures après la synchronisation (T0). Ces données sont cohérentes avec celles de la littérature (Dibner, *Annu Rev Physiol*, 2010). Alors que l'invalidation de Rev-erba chez la souris n'induit pas d'altérations majeures du rythme circadien (Preitner, *Cell*, 2002), le profil nyctéméral de l'activité du promoteur de Bmal1 semble impacté par l'invalidation de Rev-erba dans la lignée Caco-2/TC7 (figure 15). En effet, alors que les profils d'activité du promoteur de Bmal1 sont superposables dans les lignées parentale et sh control, on observe une réduction de l'amplitude des oscillations de l'activité du promoteur de Bmal1 dans la lignée sh Rev-erba.



**Figure 15 : Activité du promoteur de Bmal1 dans des cellules Caco-2/TC7 synchronisées par choc sérum**

Les cellules Caco-2/TC7 de la lignée parentale, de la lignée sh control et de la lignée sh Rev-erba sont transfectées avec un plasmide luciférase sous le contrôle du promoteur de Bmal1. Après synchronisation par choc sérum, l'activité luciférase est suivie pendant plusieurs jours grâce à la machine KRONOS.

Ces données suggèrent donc un rôle du récepteur nucléaire Rev-erb $\alpha$  dans le maintien du rythme « circadien » dans la lignée Caco-2/TC7 et encouragent à utiliser cette lignée afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle du métabolisme lipidique entérocytaire par l'horloge.

Néanmoins, nous pensons que la méthode de synchronisation des cellules par « choc sérum » qui consiste en une incubation en présence de sérum de cheval concentré à 50% pendant 2 heures, n'est pas optimale pour l'étude du métabolisme lipidique. D'autres méthodes alternatives de synchronisation doivent encore être testées.

## **CONCLUSION GENERALE**

L'athérosclérose est, aujourd'hui, la première cause de mortalité dans les pays occidentalisés et se caractérise par l'accumulation de lipides dans la paroi des grosses et moyennes artères, qui entravent la circulation sanguine. Les dyslipidémies les plus athérogènes sont celles caractérisées par une concentration plasmatique élevée de lipoprotéines à ApoB associée à une hypertriglycéridémie et à un HDL-cholestérol bas. De nombreuses études ont permis d'identifier des cibles thérapeutiques pour diminuer le risque cardiovasculaire et les traitements actuels dits « hypolipémiants » visent, en grande partie, à diminuer la concentration plasmatique de cholestérol. Le traitement de première intention est une monothérapie par les statines qui diminuent, d'une part, la synthèse endogène de cholestérol via l'inhibition de la HMG-CoA réductase et augmentent, d'autre part, la clairance du LDL-cholestérol par le foie en augmentant l'expression protéique du LDLR. L'ézétimibe qui diminue l'absorption intestinale du cholestérol en inhibant le transporteur NPC1L1, est souvent préconisé en association avec les statines pour un effet « hypolipémiant » encore plus marqué. Plus récemment, des stratégies thérapeutiques visant à inhiber PCSK9 ont vu le jour, également afin d'augmenter la clairance hépatique du cholestérol circulant. Les fibrates qui agissent comme ligands du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$ , réduisent, quant à eux, les triglycérides plasmatiques et augmentent la concentration en HDL-cholestérol.

En effet, les récepteurs nucléaires représentent, de par leur capacité à fixer des ligands, des cibles pharmacologiques intéressantes. De plus, plusieurs études démontrent le rôle des récepteurs nucléaires dans le métabolisme énergétique intestinal. Plus particulièrement dans le métabolisme lipidique intestinal, nous pouvons citer le rôle du récepteur nucléaire LXR dans la production de chylomicrons (Briand, *Gastroenterology*, 2016) et celui de PPAR $\alpha$  dans celle des HDL (Colin, *Eur Heart J*, 2012). Le récepteur nucléaire Rev-erba est impliqué dans le contrôle de l'homéostasie lipidique au niveau du foie mais son rôle dans le métabolisme lipidique au niveau de l'intestin est inconnu.

L'intestin est un organe clé dans le contrôle de l'homéostasie lipidique via deux processus qui se déroulent dans les entérocytes : l'excrétion trans-intestinale du cholestérol et l'absorption des lipides alimentaires suivie de la sécrétion de lipoprotéines à ApoB48, les chylomicrons. L'intestin contribue également à la production des HDL. Des données émergentes présentent la surproduction de chylomicrons par l'intestin comme un contributeur majeur de la dyslipidémie chez l'insulino-résistant. L'intestin constitue donc une cible thérapeutique intéressante pour corriger les dyslipidémies athérogènes et de nombreuses stratégies thérapeutiques sont en cours de développement afin de cibler spécifiquement le métabolisme intestinal lipidique. Notamment des inhibiteurs de la MTP spécifiquement dans l'intestin sont actuellement en phase d'essai clinique afin de cibler uniquement la composante intestinale de l'hypertriglycéridémie post-prandiale et d'éviter

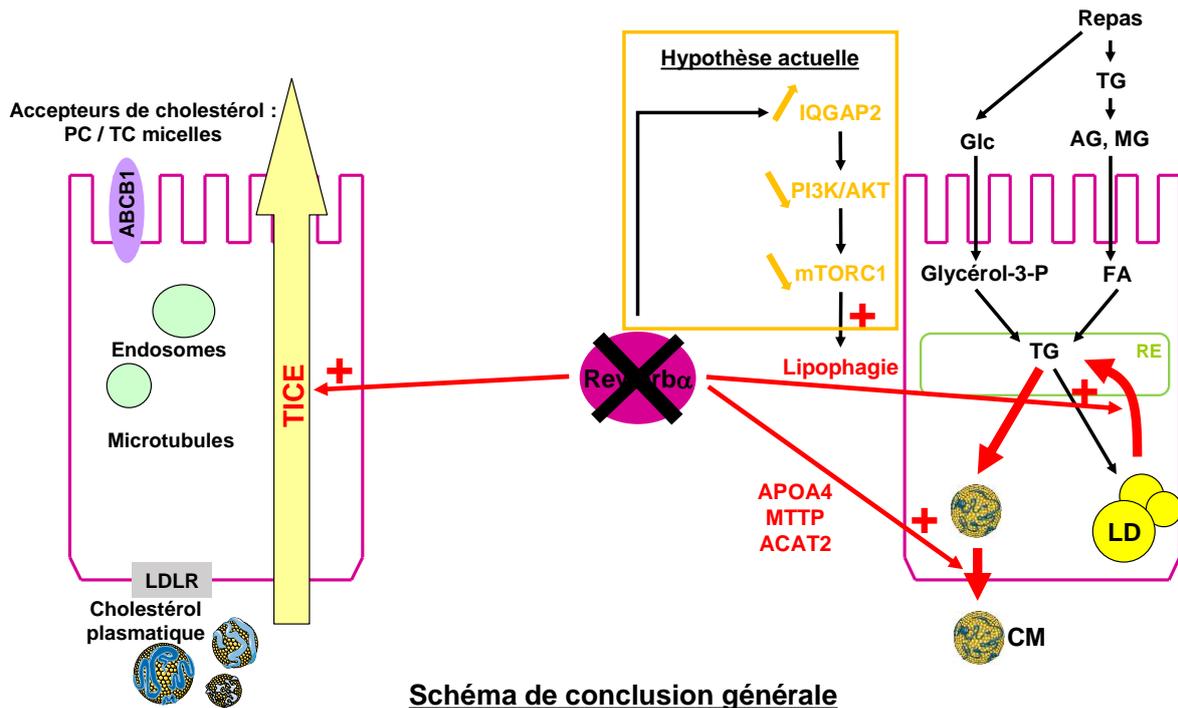
ainsi l'accumulation de TG dans le foie. De même, des inhibiteurs de DGAT1 sont actuellement en phase d'essai clinique en vue de diminuer la production de chylomicrons par l'intestin.

Les deux études présentées dans cette thèse permettent une meilleure compréhension des mécanismes liés au contrôle du métabolisme lipidique intestinal et identifient ainsi de nouvelles stratégies thérapeutiques pour corriger les dyslipidémies athérogènes.

La première étude a permis l'identification de la lignée entérocytaire humaine Caco-2/TC7 comme modèle d'étude des processus entérocytaires liés à l'excrétion trans-intestinale du cholestérol (TICE), qui étaient, jusqu'à présent, inconnus. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires entérocytaires du TICE devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles pour augmenter l'excrétion fécale du cholestérol et diminuer ainsi sa concentration plasmatique et le risque cardiovasculaire associé. De plus, des résultats préliminaires semblent indiquer que le récepteur nucléaire Rev-erb $\alpha$  joue un rôle dans ce processus entérocytaire.

La seconde étude montre que l'invalidation du récepteur nucléaire Rev-erb $\alpha$  dans la lignée Caco-2/TC7 entraîne une augmentation de la mobilisation des lipides contenus dans les gouttelettes lipidiques via le processus de la lipophagie, qui résulte en une augmentation de la sécrétion entérocytaire de lipoprotéines riches en triglycérides. Rev-erb $\alpha$  pourrait donc jouer un rôle clé dans le contrôle de triglycéridémie post-prandiale et représente donc une cible thérapeutique attractive pour corriger les dyslipidémies post-prandiales athérogènes.

Cette thèse permet donc de souligner, une nouvelle fois, la contribution directe de l'intestin aux dyslipidémies athérogènes et propose de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour diminuer le risque cardiovasculaire.



### Schéma de conclusion générale

ABCB1 : ATP Binding Cassette subfamily B member 1 ; ACAT2 : Acetyl-CoA Acetyltransferase 2 ; AG : Acide gras ; APOA4 : Apolipoprotéine AIV ; CM : Chylomicrons ; FA : Fatty Acids ; IQGAP2 : IQ motif containing GTPase activating protein 2 ; LD : Lipid droplets ; LDLR : LDL receptor ; MG : Monoglycéride ; mTORC1 : mammalian Target of Rapamycin Complex 1 ; MTP : Microsomal Triglyceride Transfer Protein ; PC : Phosphatidylcholine ; PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase ; RE : réticulum endoplasmique ; TC : Taurocholate ; TG : Triglycérides ; TICE : Trans Intestinal Cholesterol Excretion.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Anant, S. and Davidson, NO. (2002). Identification and regulation of protein components of the apolipoprotein b mRNA editing enzyme. a complex event. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**: 311-317.
- Arble, DM., Bass, J., Laposky, AD. et al. (2009). Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity (Silver Spring)* **17**: 2100-2102.
- Arca, M. (2015). Alterations of intestinal lipoprotein metabolism in diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Atheroscler Suppl* **17**: 12-16.
- Au, CS., Wagner, A., Chong, T. et al. (2004). Insulin regulates hepatic apolipoprotein b production independent of the mass or activity of akt1/pkbalpha. *Metab. Clin. Exp.* **53**: 228-235.
- Babiak, J. and Rudel, LL. (1987). Lipoproteins and atherosclerosis. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* **1**: 515-550.
- Bader, A., Hansen, T., Kirchner, G. et al. (2000). Primary porcine enterocyte and hepatocyte cultures to study drug oxidation reactions. *Br. J. Pharmacol.* **129**: 331-342.
- Baier, LJ., Sacchettini, JC., Knowler, WC. et al. (1995). An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **95**: 1281-1287.
- Baier, LJ., Bogardus, C. and Sacchettini, JC. (1996). A polymorphism in the human intestinal fatty acid binding protein alters fatty acid transport across caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 10892-10896.
- Balda, MS. and Matter, K. (2003). Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* **13**: 310-318.
- Balsalobre, A., Damiola, F. and Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* **93**: 929-937.
- Bandsma, RH., Stellaard, F., Vonk, RJ. et al. (1998). Contribution of newly synthesized cholesterol to rat plasma and bile determined by mass isotopomer distribution analysis: bile-salt flux promotes secretion of newly synthesized cholesterol into bile. *Biochem. J.* **329 ( Pt 3)**: 699-703.
- Bansal, S., Buring, JE., Rifai, N. et al. (2007). Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA* **298**: 309-316.
- Barker, N., van Es, JH., Kuipers, J. et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *lgr5*. *Nature* **449**: 1003-1007.
- Bateman, PA., Jackson, KG., Maitin, V. et al. (2007). Differences in cell morphology, lipid and apo b secretory capacity in caco-2 cells following long term treatment with saturated and monounsaturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1771**: 475-485.
- Beilstein, F., Bouchoux, J., Rousset, M. et al. (2013). Proteomic analysis of lipid droplets from caco-2/tc7 enterocytes identifies novel modulators of lipid secretion. *PLoS ONE* **8**: e53017.

- Berriot-Varoqueaux, N., Dannoura, AH., Moreau, A. et al. (2001). Apolipoprotein b48 glycosylation in abetalipoproteinemia and anderson's disease. *Gastroenterology* **121**: 1101-1108.
- Birch, AM., Buckett, LK. and Turnbull, AV. (2010). Dgat1 inhibitors as anti-obesity and anti-diabetic agents. *Curr Opin Drug Discov Devel* **13**: 489-496.
- Blanc, V., Xie, Y., Luo, J. et al. (2012). Intestine-specific expression of apobec-1 rescues apolipoprotein b rna editing and alters chylomicron production in apobec1 *-/-* mice. *J. Lipid Res.* **53**: 2643-2655.
- Booth, C., Patel, S., Bennion, GR. et al. (1995). The isolation and culture of adult mouse colonic epithelium. *Epithelial Cell Biol* **4**: 76-86.
- Botti-Millet, J., Nascimbeni, AC., Dupont, N. et al. (2016). Fine-tuning autophagy: from transcriptional to posttranslational regulation. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **311**: C351-62.
- Bouchoux, J., Beilstein, F., Pauquai, T. et al. (2011). The proteome of cytosolic lipid droplets isolated from differentiated caco-2/tc7 enterocytes reveals cell-specific characteristics. *Biol. Cell* **103**: 499-517.
- Brasaemle, DL. and Wolins, NE. (2012). Packaging of fat: an evolving model of lipid droplet assembly and expansion. *J. Biol. Chem.* **287**: 2273-2279.
- Briand, O., Touche, V., Colin, S. et al. (2016). Liver x receptor regulates triglyceride absorption through intestinal down-regulation of scavenger receptor class b, type 1. *Gastroenterology* **150**: 650-658.
- Brown, JM., Bell, TA3., Alger, HM. et al. (2008). Targeted depletion of hepatic acat2-driven cholesterol esterification reveals a non-biliary route for fecal neutral sterol loss. *J. Biol. Chem.* **283**: 10522-10534.
- Brufau, G., Kuipers, F., Lin, Y. et al. (2011). A reappraisal of the mechanism by which plant sterols promote neutral sterol loss in mice. *PLoS ONE* **6**: e21576.
- Brufau, G., Groen, AK. and Kuipers, F. (2011). Reverse cholesterol transport revisited: contribution of biliary versus intestinal cholesterol excretion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**: 1726-1733.
- Bugge, A., Feng, D., Everett, LJ. et al. (2012). Rev-erb $\alpha$  and rev-erb $\beta$  coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes Dev.* **26**: 657-667.
- Buhman, KK., Smith, SJ., Stone, SJ. et al. (2002). Dgat1 is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis. *J. Biol. Chem.* **277**: 25474-25479.
- Bultel, S., Helin, L., Clavey, V. et al. (2008). Liver x receptor activation induces the uptake of cholesteryl esters from high density lipoproteins in primary human macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**: 2288-2295.
- Burke, L., Downes, M., Carozzi, A. et al. (1996). Transcriptional repression by the orphan steroid receptor rvr/rev-erb beta is dependent on the signature motif and helix 5 in the e region: functional evidence for a biological role of rvr in myogenesis. *Nucleic Acids Res.* **24**: 3481-3489.

- Béaslas, O., Torreilles, F., Casellas, P. et al. (2008). Transcriptome response of enterocytes to dietary lipids: impact on cell architecture, signaling, and metabolism genes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **295**: G942-52.
- CHENG, SH. and STANLEY, MM. (1959). Secretion of cholesterol by intestinal mucosa in patients with complete common bile duct obstruction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **101**: 223-225.
- Cantley, JL., Yoshimura, T., Camporez, JPG. et al. (2013). Cgi-58 knockdown sequesters diacylglycerols in lipid droplets/er-preventing diacylglycerol-mediated hepatic insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**: 1869-1874.
- Cao, J., Lockwood, J., Burn, P. et al. (2003). Cloning and functional characterization of a mouse intestinal acyl-coa:monoacylglycerol acyltransferase, mgat2. *J. Biol. Chem.* **278**: 13860-13866.
- Cartwright, IJ., Plonné, D. and Higgins, JA. (2000). Intracellular events in the assembly of chylomicrons in rabbit enterocytes. *J. Lipid Res.* **41**: 1728-1739.
- Cartwright, IJ. and Higgins, JA. (2001). Direct evidence for a two-step assembly of apob48-containing lipoproteins in the lumen of the smooth endoplasmic reticulum of rabbit enterocytes. *J. Biol. Chem.* **276**: 48048-48057.
- Chateau, D., Pauquai, T., Delers, F. et al. (2005). Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein b48-containing lipoproteins by caco-2 cells. *J. Cell. Physiol.* **202**: 767-776.
- Chawla, A. and Lazar, MA. (1993). Induction of rev-erba alpha, an orphan receptor encoded on the opposite strand of the alpha-thyroid hormone receptor gene, during adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **268**: 16265-16269.
- Chiariello, CS., LaComb, JF., Bahou, WF. et al. (2012). Ablation of iggap2 protects from diet-induced hepatic steatosis due to impaired fatty acid uptake. *Regul. Pept.* **173**: 36-46.
- Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V. et al. (2001). Ppar-alpha and ppar-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the abca1 pathway. *Nat. Med.* **7**: 53-58.
- Cho, H., Zhao, X., Hatori, M. et al. (2012). Regulation of circadian behaviour and metabolism by rev-erb- $\alpha$  and rev-erb- $\beta$ . *Nature* **485**: 123-127.
- Christian, P., Sacco, J. and Adeli, K. (2013). Autophagy: emerging roles in lipid homeostasis and metabolic control. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**: 819-824.
- Chung, S., Lee, EJ., Yun, S. et al. (2014). Impact of circadian nuclear receptor rev-erba on midbrain dopamine production and mood regulation. *Cell* **157**: 858-868.
- Colin, S., Briand, O., Touche, V. et al. (2013). Activation of intestinal peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  increases high-density lipoprotein production. *Eur. Heart J.* **34**: 2566-2574.
- Cooper, SEJ., Wilson, S. and Feighery, CF. (2015). Twenty-four hour ex vivo culture of celiac duodenal biopsies. *Methods Mol. Biol.* **1326**: 47-51.

- Crosnier, C., Stamatakis, D. and Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* **7**: 349-359.
- Daoudi, M., Hennuyer, N., Borland, MG. et al. (2011). Ppar $\beta/\delta$  activation induces enteroendocrine I cell glp-1 production. *Gastroenterology* **140**: 1564-1574.
- DeBruyne, JP., Baggs, JE., Sato, TK. et al. (2015). Ubiquitin ligase siah2 regulates reverba degradation and the mammalian circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**: 12420-12425.
- 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.
- Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F. et al. (2010). The dynamic interaction of ambra1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J. Cell Biol.* **191**: 155-168.
- Dibner, C., Schibler, U. and Albrecht, U. (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu. Rev. Physiol.* **72**: 517-549.
- Dice, JF. and Chiang, HL. (1989). Lysosomal degradation of microinjected proteins. *Revis. Biol. Celular* **20**: 13-33.
- Donovan, MJ., Paulino, G. and Raybould, HE. (2007). Cck(1) receptor is essential for normal meal patterning in mice fed high fat diet. *Physiol. Behav.* **92**: 969-974.
- Douris, N., Kojima, S., Pan, X. et al. (2011). Nocturnin regulates circadian trafficking of dietary lipid in intestinal enterocytes. *Curr. Biol.* **21**: 1347-1355.
- Downes, M., Carozzi, AJ. and Muscat, GE. (1995). Constitutive expression of the orphan receptor, rev-erba alpha, inhibits muscle differentiation and abrogates the expression of the myod gene family. *Mol. Endocrinol.* **9**: 1666-1678.
- Downes, M., Burke, LJ. and Muscat, GE. (1996). Transcriptional repression by rev-erba alpha is dependent on the signature motif and helix 5 in the ligand binding domain: silencing does not involve an interaction with n-cor. *Nucleic Acids Res.* **24**: 3490-3498.
- Downes, M., Burke, LJ., Bailey, PJ. et al. (1996). Two receptor interaction domains in the corepressor, n-cor/rip13, are required for an efficient interaction with rev-erba alpha and rvr: physical association is dependent on the e region of the orphan receptors. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4379-4386.
- Drover, VA., Ajmal, M., Nassir, F. et al. (2005). Cd36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J. Clin. Invest.* **115**: 1290-1297.
- Dubois, C., Beaumier, G., Juhel, C. et al. (1998). Effects of graded amounts (0-50 g) of dietary fat on postprandial lipemia and lipoproteins in normolipidemic adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**: 31-38.
- Duez, H., van der Veen, JN., Duhem, C. et al. (2008). Regulation of bile acid synthesis by the nuclear receptor rev-erbalpha. *Gastroenterology* **135**: 689-698.
- Duez, H. and Staels, B. (2009). Rev-erb-alpha: an integrator of circadian rhythms and metabolism. *J Appl Physiol (1985)* **107**: 1972-1980.

- Dumas, B., Harding, HP., Choi, HS. et al. (1994). A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily closely related to rev-erb. *Mol. Endocrinol.* **8**: 996-1005.
- Duval, C., Touche, V., Tailleux, A. et al. (2006). Niemann-pick c1 like 1 gene expression is down-regulated by lxr activators in the intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**: 1259-1263.
- Dvorin, E., Mantulin, WW., Rohde, MF. et al. (1985). Conformational properties of human and rat apolipoprotein a-iv. *J. Lipid Res.* **26**: 38-46.
- Eckel-Mahan, K. and Sassone-Corsi, P. (2013). Metabolism and the circadian clock converge. *Physiol. Rev.* **93**: 107-135.
- Eskelinen, E. (2005). Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells. *Autophagy* **1**: 1-10.
- Evans, GS., Flint, N., Somers, AS. et al. (1992). The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. *J. Cell. Sci.* **101 ( Pt 1)**: 219-231.
- Everett, LJ. and Lazar, MA. (2014). Nuclear receptor rev-erb $\alpha$ : up, down, and all around. *Trends Endocrinol. Metab.* **25**: 586-592.
- Farese, RVJ., Ruland, SL., Flynn, LM. et al. (1995). Knockout of the mouse apolipoprotein b gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 1774-1778.
- Federico, LM., Naples, M., Taylor, D. et al. (2006). Intestinal insulin resistance and aberrant production of apolipoprotein b48 lipoproteins in an animal model of insulin resistance and metabolic dyslipidemia: evidence for activation of protein tyrosine phosphatase-1b, extracellular signal-related kinase, and sterol regulatory element-binding protein-1c in the fructose-fed hamster intestine. *Diabetes* **55**: 1316-1326.
- Feng, D., Liu, T., Sun, Z. et al. (2011). A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism. *Science* **331**: 1315-1319.
- Forman, BM., Chen, J., Blumberg, B. et al. (1994). Cross-talk among ror alpha 1 and the rev-erb family of orphan nuclear receptors. *Mol. Endocrinol.* **8**: 1253-1261.
- Foulke-Abel, J., In, J., Kovbasnjuk, O. et al. (2014). Human enteroids as an ex-vivo model of host-pathogen interactions in the gastrointestinal tract. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **239**: 1124-1134.
- Gerhart-Hines, Z., Feng, D., Emmett, MJ. et al. (2013). The nuclear receptor rev-erb $\alpha$  controls circadian thermogenic plasticity. *Nature* **503**: 410-413.
- Glomset, JA. (1968). The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J. Lipid Res.* **9**: 155-167.
- Gordon, JI., Alpers, DH., Ockner, RK. et al. (1983). The nucleotide sequence of rat liver fatty acid binding protein mrna. *J. Biol. Chem.* **258**: 3356-3363.
- Goumidi, L., Grechez, A., Dumont, J. et al. (2013). Impact of rev-erb alpha gene polymorphisms on obesity phenotypes in adult and adolescent samples. *Int J Obes (Lond)* **37**: 666-672.

Grant, D., Yin, L., Collins, J.L. et al. (2010). Gsk4112, a small molecule chemical probe for the cell biology of the nuclear heme receptor rev-erba. *ACS Chem Biol* **5**: 925-932.

Gréchez-Cassiau, A., Feillet, C., Guérin, S. et al. (2015). The hepatic circadian clock regulates the choline kinase  $\alpha$  gene through the bmal1-rev-erba axis. *Chronobiol. Int.* **32**: 774-784.

Haidari, M., Leung, N., Mahbub, F. et al. (2002). Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and apob48-containing lipoprotein overproduction. *J. Biol. Chem.* **277**: 31646-31655.

Hamilton, R.L., Wong, J.S., Cham, C.M. et al. (1998). Chylomicron-sized lipid particles are formed in the setting of apolipoprotein b deficiency. *J. Lipid Res.* **39**: 1543-1557.

Hanna, R.A., Quinsay, M.N., Orogo, A.M. et al. (2012). Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (lc3) interacts with bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *J. Biol. Chem.* **287**: 19094-19104.

Hansen, G.H., Niels-Christiansen, L., Immerdal, L. et al. (2003). Scavenger receptor class b type i (sr-bi) in pig enterocytes: trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption. *Gut* **52**: 1424-1431.

Harding, H.P. and Lazar, M.A. (1993). The orphan receptor rev-erba alpha activates transcription via a novel response element. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 3113-3121.

Harding, H.P. and Lazar, M.A. (1995). The monomer-binding orphan receptor rev-erb represses transcription as a dimer on a novel direct repeat. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 4791-4802.

Hata, T., Mera, Y., Ishii, Y. et al. (2011). Jtt-130, a novel intestine-specific inhibitor of microsomal triglyceride transfer protein, suppresses food intake and gastric emptying with the elevation of plasma peptide yy and glucagon-like peptide-1 in a dietary fat-dependent manner. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **336**: 850-856.

Hauri, H.P., Sterchi, E.E., Bienz, D. et al. (1985). Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* **101**: 838-851.

He, L., Yin, Y., Li, T. et al. (2013). Use of the ussing chamber technique to study nutrient transport by epithelial tissues. *Front Biosci (Landmark Ed)* **18**: 1266-1274.

Hein, G.J., Baker, C., Hsieh, J. et al. (2013). Glp-1 and glp-2 as yin and yang of intestinal lipoprotein production: evidence for predominance of glp-2-stimulated postprandial lipemia in normal and insulin-resistant states. *Diabetes* **62**: 373-381.

Hidalgo, I.J., Raub, T.J. and Borchardt, R.T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **96**: 736-749.

Hiramine, Y. and Tanabe, T. (2011). Characterization of acyl-coenzyme a:diacylglycerol acyltransferase (dgat) enzyme of human small intestine. *J. Physiol. Biochem.* **67**: 259-264.

- Hirsch, D., Stahl, A. and Lodish, HF. (1998). A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 8625-8629.
- Hogue, J., Lamarche, B., Tremblay, AJ. et al. (2007). Evidence of increased secretion of apolipoprotein b-48-containing lipoproteins in subjects with type 2 diabetes. *J. Lipid Res.* **48**: 1336-1342.
- Hsieh, J., Longuet, C., Maida, A. et al. (2009). Glucagon-like peptide-2 increases intestinal lipid absorption and chylomicron production via cd36. *Gastroenterology* **137**: 997-1005, 1005.e1-4.
- Hsieh, J., Longuet, C., Baker, CL. et al. (2010). The glucagon-like peptide 1 receptor is essential for postprandial lipoprotein synthesis and secretion in hamsters and mice. *Diabetologia* **53**: 552-561.
- Huang, W., Ramsey, KM., Marcheva, B. et al. (2011). Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J. Clin. Invest.* **121**: 2133-2141.
- Hussain, MM. and Pan, X. (2009). Clock genes, intestinal transport and plasma lipid homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* **20**: 177-185.
- Iqbal, J., Li, X., Chang, BH. et al. (2010). An intrinsic gut leptin-melanocortin pathway modulates intestinal microsomal triglyceride transfer protein and lipid absorption. *J. Lipid Res.* **51**: 1929-1942.
- Jackson, KG., Zampelas, A., Knapper, JM. et al. (2000). Differences in glucose-dependent insulinotropic polypeptide hormone and hepatic lipase in subjects of southern and northern europe: implications for postprandial lipemia. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 13-20.
- Jager, J., O'Brien, WT., Manlove, J. et al. (2014). Behavioral changes and dopaminergic dysregulation in mice lacking the nuclear receptor rev-erba. *Mol. Endocrinol.* **28**: 490-498.
- Jakulj, L., Vissers, MN., van Roomen, CP. et al. (2010). Ezetimibe stimulates faecal neutral sterol excretion depending on abcg8 function in mice. *FEBS Lett.* **584**: 3625-3628.
- Jolley, CD., Woollett, LA., Turley, SD. et al. (1998). Centripetal cholesterol flux to the liver is dictated by events in the peripheral organs and not by the plasma high density lipoprotein or apolipoprotein a-i concentration. *J. Lipid Res.* **39**: 2143-2149.
- Jung, CH., Jun, CB., Ro, S. et al. (2009). Uik-atg13-fip200 complexes mediate mtor signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* **20**: 1992-2003.
- Karlsson, B., Knutsson, A. and Lindahl, B. (2001). Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? results from a population based study of 27,485 people. *Occup Environ Med* **58**: 747-752.
- Kaushik, S., Rodriguez-Navarro, JA., Arias, E. et al. (2011). Autophagy in hypothalamic agrp neurons regulates food intake and energy balance. *Cell Metab* **14**: 173-183.
- Khaldoun, SA., Emond-Boisjoly, M., Chateau, D. et al. (2014). Autophagosomes contribute to intracellular lipid distribution in enterocytes. *Mol. Biol. Cell* **25**: 118-132.
- Khatun, I., Clark, RW., Vera, NB. et al. (2016). Characterization of a novel intestinal glycerol-3-phosphate acyltransferase pathway and its role in lipid homeostasis. *J. Biol. Chem.* **291**: 2602-2615.

- Kim, E., Campbell, S., Schueller, O. et al. (2011). A small-molecule inhibitor of enterocytic microsomal triglyceride transfer protein, slx-4090: biochemical, pharmacodynamic, pharmacokinetic, and safety profile. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **337**: 775-785.
- Kohsaka, A., Laposky, AD., Ramsey, KM. et al. (2007). High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab* **6**: 414-421.
- Kojetin, D., Wang, Y., Kamenecka, TM. et al. (2011). Identification of sr8278, a synthetic antagonist of the nuclear heme receptor rev-erb. *ACS Chem Biol* **6**: 131-134.
- Kruit, JK., Plösch, T., Havinga, R. et al. (2005). Increased fecal neutral sterol loss upon liver x receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology* **128**: 147-156.
- Kulinski, A., Rustaeus, S. and Vance, JE. (2002). Microsomal triacylglycerol transfer protein is required for lumenal accretion of triacylglycerol not associated with apob, as well as for apob lipidation. *J. Biol. Chem.* **277**: 31516-31525.
- L'Hirondel, C., Doe, WF. and Peters, TJ. (1975). Proceedings: use of an improved jejunal culture system for the study of normal and coeliac mucosa. *Gut* **16**: 392.
- Lagakos, WS., Gajda, AM., Agellon, L. et al. (2011). Different functions of intestinal and liver-type fatty acid-binding proteins in intestine and in whole body energy homeostasis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **300**: G803-14.
- Lairon, D. (2008). Macronutrient intake and modulation on chylomicron production and clearance. *Atheroscler Suppl* **9**: 45-48.
- Laitinen, S., Fontaine, C., Fruchart, JC. et al. (2005). The role of the orphan nuclear receptor rev-erb alpha in adipocyte differentiation and function. *Biochimie* **87**: 21-25.
- Lally, S., Tan, CY., Owens, D. et al. (2006). Messenger rna levels of genes involved in dysregulation of postprandial lipoproteins in type 2 diabetes: the role of niemann-pick c1-like 1, atp-binding cassette, transporters g5 and g8, and of microsomal triglyceride transfer protein. *Diabetologia* **49**: 1008-1016.
- Lazar, MA., Hodin, RA., Darling, DS. et al. (1989). A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat c-erba alpha transcriptional unit. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 1128-1136.
- Le Martelot, G., Claudel, T., Gatfield, D. et al. (2009). Rev-erbalpha participates in circadian srebp signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biol.* **7**: e1000181.
- Le May, C., Berger, JM., Lespine, A. et al. (2013). Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by pcsk9 and statin involving abcb1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**: 1484-1493.
- Lee, B., Zhu, J., Wolins, NE. et al. (2009). Differential association of adipophilin and tip47 proteins with cytoplasmic lipid droplets in mouse enterocytes during dietary fat absorption. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**: 1173-1180.
- Lehner, R., Lian, J. and Quiroga, AD. (2012). Lumenal lipid metabolism: implications for lipoprotein assembly. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**: 1087-1093.

- Levy, E., Mehran, M. and Seidman, E. (1995). Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J.* **9**: 626-635.
- Levy, E., Sinnett, D., Thibault, L. et al. (1996). Insulin modulation of newly synthesized apolipoproteins b-100 and b-48 in human fetal intestine: gene expression and mrna editing are not involved. *FEBS Lett.* **393**: 253-258.
- Levy, E., Ménard, D., Delvin, E. et al. (2001). The polymorphism at codon 54 of the fabp2 gene increases fat absorption in human intestinal explants. *J. Biol. Chem.* **276**: 39679-39684.
- Li, X., Xu, M., Wang, F. et al. (2014). Apolipoprotein a-iv reduces hepatic gluconeogenesis through nuclear receptor nr1d1. *J. Biol. Chem.* **289**: 2396-2404.
- Lindman, AS., Veierød, MB., Tverdal, A. et al. (2010). Nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular death in men and women from the norwegian counties study. *Eur. J. Epidemiol.* **25**: 789-798.
- Lu, S., Yao, Y., Cheng, X. et al. (2006). Overexpression of apolipoprotein a-iv enhances lipid secretion in ipec-1 cells by increasing chylomicron size. *J. Biol. Chem.* **281**: 3473-3483.
- Lusis, AJ. (2000). Atherosclerosis. *Nature* **407**: 233-241.
- Magnusson, B., Asp, L., Boström, P. et al. (2006). Adipocyte differentiation-related protein promotes fatty acid storage in cytosolic triglycerides and inhibits secretion of very low-density lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**: 1566-1571.
- Mangelsdorf, DJ., Thummel, C., Beato, M. et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**: 835-839.
- Mansbach, CM2. and Parthasarathy, S. (1982). A re-examination of the fate of glyceride-glycerol in neutral lipid absorption and transport. *J. Lipid Res.* **23**: 1009-1019.
- Mansbach, CM2. and Nevin, P. (1998). Intracellular movement of triacylglycerols in the intestine. *J. Lipid Res.* **39**: 963-968.
- Mansbach, CM2. and Gorelick, F. (2007). Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. ii. dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **293**: G645-50.
- Mansbach, CM. and Siddiqi, SA. (2010). The biogenesis of chylomicrons. *Annu. Rev. Physiol.* **72**: 315-333.
- Mansbach, CM2. and Siddiqi, S. (2016). Control of chylomicron export from the intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **310**: G659-68.
- Marenus, KD. and Sjöstrand, FS. (1982). Sequence of structural changes in columnar epithelium of small intestine during early stages of fat absorption. *J. Ultrastruct. Res.* **79**: 92-109.
- Martinez-Lopez, N. and Singh, R. (2015). Autophagy and lipid droplets in the liver. *Annu. Rev. Nutr.* **35**: 215-237.

- Mashek, DG., Li, LO. and Coleman, RA. (2006). Rat long-chain acyl-coa synthetase mrna, protein, and activity vary in tissue distribution and in response to diet. *J. Lipid Res.* **47**: 2004-2010.
- Mattes, RD. (2002). Oral fat exposure increases the first phase triacylglycerol concentration due to release of stored lipid in humans. *J. Nutr.* **132**: 3656-3662.
- Maxwell, KN. and Breslow, JL. (2004). Adenoviral-mediated expression of pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 7100-7105.
- Mayer, N., Schweiger, M., Romauch, M. et al. (2013). Development of small-molecule inhibitors targeting adipose triglyceride lipase. *Nat. Chem. Biol.* **9**: 785-787.
- McKenna, NJ., Cooney, AJ., DeMayo, FJ. et al. (2009). Minireview: evolution of nursa, the nuclear receptor signaling atlas. *Mol. Endocrinol.* **23**: 740-746.
- Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I. et al. (2010). Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res.* **20**: 748-762.
- Mera, Y., Odani, N., Kawai, T. et al. (2011). Pharmacological characterization of diethyl-2-({3-dimethylcarbamoyl-4-[(4'-trifluoromethylbiphenyl)-2-carbonyl]amino]phenyl}acetyloxymethyl)-2-phenylmalonate (jtt-130), an intestine-specific inhibitor of microsomal triglyceride transfer protein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **336**: 321-327.
- Meriwether, D., Sulaiman, D., Wagner, A. et al. (2016). Transintestinal transport of the anti-inflammatory drug 4f and the modulation of transintestinal cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* **57**: 1175-1193.
- Miled, N., Canaan, S., Dupuis, L. et al. (2000). Digestive lipases: from three-dimensional structure to physiology. *Biochimie* **82**: 973-986.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y. (2011). The role of atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**: 107-132.
- Mukherji, A., Kobiita, A., Ye, T. et al. (2013). Homeostasis in intestinal epithelium is orchestrated by the circadian clock and microbiota cues transduced by tirs. *Cell* **153**: 812-827.
- Nassir, F., Wilson, B., Han, X. et al. (2007). Cd36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J. Biol. Chem.* **282**: 19493-19501.
- Nauli, AM., Nassir, F., Zheng, S. et al. (2006). Cd36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology* **131**: 1197-1207.
- Neeli, I., Siddiqi, SA., Siddiqi, S. et al. (2007). Liver fatty acid-binding protein initiates budding of pre-chylomicron transport vesicles from intestinal endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **282**: 17974-17984.
- Nelson, DW., Gao, Y., Yen, M. et al. (2014). Intestine-specific deletion of acyl-coa:monoacylglycerol acyltransferase (mgat) 2 protects mice from diet-induced obesity and glucose intolerance. *J. Biol. Chem.* **289**: 17338-17349.

- Niot, I., Poirier, H., Tran, TTT. et al. (2009). Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Prog. Lipid Res.* **48**: 101-115.
- Nordestgaard, BG., Benn, M., Schnohr, P. et al. (2007). Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* **298**: 299-308.
- PALAY, SL. and KARLIN, LJ. (1959). An electron microscopic study of the intestinal villus. ii. the pathway of fat absorption. *J Biophys Biochem Cytol* **5**: 373-384.
- Pageot, LP., Perreault, N., Basora, N. et al. (2000). Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. *Microsc. Res. Tech.* **49**: 394-406.
- Pan, X. and Hussain, MM. (2007). Diurnal regulation of microsomal triglyceride transfer protein and plasma lipid levels. *J. Biol. Chem.* **282**: 24707-24719.
- Pan, X. and Hussain, MM. (2009). Clock is important for food and circadian regulation of macronutrient absorption in mice. *J. Lipid Res.* **50**: 1800-1813.
- Pan, X., Zhang, Y., Wang, L. et al. (2010). Diurnal regulation of mtp and plasma triglyceride by clock is mediated by shp. *Cell Metab* **12**: 174-186.
- Pan, A., Schernhammer, ES., Sun, Q. et al. (2011). Rotating night shift work and risk of type 2 diabetes: two prospective cohort studies in women. *PLoS Med.* **8**: e1001141.
- Pan, X. and Hussain, MM. (2012). Gut triglyceride production. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**: 727-735.
- Pan, X., Munshi, MK., Iqbal, J. et al. (2013). Circadian regulation of intestinal lipid absorption by apolipoprotein aiv involves forkhead transcription factors a2 and o1 and microsomal triglyceride transfer protein. *J. Biol. Chem.* **288**: 20464-20476.
- Patel, S., Pessah, M., Beucler, I. et al. (1994). Chylomicron retention disease: exclusion of apolipoprotein b gene defects and detection of mrna editing in an affected family. *Atherosclerosis* **108**: 201-207.
- Pauquai, T., Bouchoux, J., Chateau, D. et al. (2006). Adaptation of enterocytic caco-2 cells to glucose modulates triacylglycerol-rich lipoprotein secretion through triacylglycerol targeting into the endoplasmic reticulum lumen. *Biochem. J.* **395**: 393-403.
- Pawlak, M., Lefebvre, P. and Staels, B. (2012). General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Curr Top Med Chem* **12**: 486-504.
- Peiffer, I., Guignot, J., Barbat, A. et al. (2000). Structural and functional lesions in brush border of human polarized intestinal caco-2/tc7 cells infected by members of the afa/dr diffusely adhering family of escherichia coli. *Infect. Immun.* **68**: 5979-5990.
- Perreault, N. and Beaulieu, JF. (1996). Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp. Cell Res.* **224**: 354-364.
- Perreault, N. and Beaulieu, JF. (1998). Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **245**: 34-42.
- Pertsemliadis, D., Kirchman, EH. and Ahrens, EHJ. (1973). Regulation of cholesterol metabolism in the dog. i. effects of complete bile diversion and of cholesterol feeding on

absorption, synthesis, accumulation, and excretion rates measured during life. *J. Clin. Invest.* **52**: 2353-2367.

Poirier, H., Degrace, P., Niot, I. et al. (1996). Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (fat) in the small intestine. comparison with fatty acid-binding proteins (fabp). *Eur. J. Biochem.* **238**: 368-373.

Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L. et al. (2002). The orphan nuclear receptor rev-erbalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* **110**: 251-260.

Raabe, M., Flynn, LM., Zlot, CH. et al. (1998). Knockout of the abetalipoproteinemia gene in mice: reduced lipoprotein secretion in heterozygotes and embryonic lethality in homozygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 8686-8691.

Radner, FPW. and Fischer, J. (2014). The important role of epidermal triacylglycerol metabolism for maintenance of the skin permeability barrier function. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**: 409-415.

Raghuram, S., Stayrook, KR., Huang, P. et al. (2007). Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors rev-erbalpha and rev-erbbeta. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**: 1207-1213.

Ramakrishnan, SN., Lau, P., Burke, LJ. et al. (2005). Rev-erbbeta regulates the expression of genes involved in lipid absorption in skeletal muscle cells: evidence for cross-talk between orphan nuclear receptors and myokines. *J. Biol. Chem.* **280**: 8651-8659.

Raspè, E., Mautino, G., Duval, C. et al. (2002). Transcriptional regulation of human rev-erbalpha gene expression by the orphan nuclear receptor retinoic acid-related orphan receptor alpha. *J. Biol. Chem.* **277**: 49275-49281.

Raspé, E., Duez, H., Mansén, A. et al. (2002). Identification of rev-erbalpha as a physiological repressor of apoc-iii gene transcription. *J. Lipid Res.* **43**: 2172-2179.

Redondo, S., Martínez-González, J., Urraca, C. et al. (2011). Emerging therapeutic strategies to enhance hdl function. *Lipids Health Dis* **10**: 175.

Repa, JJ., Turley, SD., Lobaccaro, JA. et al. (2000). Regulation of absorption and abc1-mediated efflux of cholesterol by rxr heterodimers. *Science* **289**: 1524-1529.

Retnakaran, R., Flock, G. and Giguère, V. (1994). Identification of rvr, a novel orphan nuclear receptor that acts as a negative transcriptional regulator. *Mol. Endocrinol.* **8**: 1234-1244.

Robertson, MD., Parkes, M., Warren, BF. et al. (2003). Mobilisation of enterocyte fat stores by oral glucose in humans. *Gut* **52**: 834-839.

Robinson-Rechavi, M., Escriva Garcia, H. and Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *J. Cell. Sci.* **116**: 585-586.

Ruano, EG., Canivell, S. and Vieira, E. (2014). Rev-erb alpha polymorphism is associated with obesity in the spanish obese male population. *PLoS ONE* **9**: e104065.

Sailaja, BS., He, XC. and Li, L. (2016). The regulatory niche of intestinal stem cells. *J. Physiol. (Lond.)* **594**: 4827-4836.

- Sandoval, JC., Nakagawa-Toyama, Y., Masuda, D. et al. (2010). Molecular mechanisms of ezetimibe-induced attenuation of postprandial hypertriglyceridemia. *J. Atheroscler. Thromb.* **17**: 914-924.
- Sato, T., Vries, RG., Snippert, HJ. et al. (2009). Single lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**: 262-265.
- Schnell, A., Chappuis, S., Schmutz, I. et al. (2014). The nuclear receptor rev-erb $\alpha$  regulates fabp7 and modulates adult hippocampal neurogenesis. *PLoS ONE* **9**: e99883.
- Schonewille, M., Freark de Boer, J., Mele, L. et al. (2016). Statins increase hepatic cholesterol synthesis and stimulate fecal cholesterol elimination in mice. *J. Lipid Res.* **57**: 1455-1464.
- Schwartz, SL., Ratner, RE., Kim, DD. et al. (2008). Effect of exenatide on 24-hour blood glucose profile compared with placebo in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, two-arm, parallel-group, placebo-controlled, 2-week study. *Clin Ther* **30**: 858-867.
- Scott, EM., Carter, AM. and Grant, PJ. (2008). Association between polymorphisms in the clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *Int J Obes (Lond)* **32**: 658-662.
- Seyer, A., Cantiello, M., Bertrand-Michel, J. et al. (2013). Lipidomic and spatio-temporal imaging of fat by mass spectrometry in mice duodenum during lipid digestion. *PLoS ONE* **8**: e58224.
- Shi, Y. and Burn, P. (2004). Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nat Rev Drug Discov* **3**: 695-710.
- Shim, J., Moulson, CL., Newberry, EP. et al. (2009). Fatty acid transport protein 4 is dispensable for intestinal lipid absorption in mice. *J. Lipid Res.* **50**: 491-500.
- Siddiqi, S., Saleem, U., Abumrad, NA. et al. (2010). A novel multiprotein complex is required to generate the prechylomicron transport vesicle from intestinal er. *J. Lipid Res.* **51**: 1918-1928.
- Simmonds, WJ., Hofmann, AF. and Theodor, E. (1967). Absorption of cholesterol from a micellar solution: intestinal perfusion studies in man. *J. Clin. Invest.* **46**: 874-890.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y. et al. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* **458**: 1131-1135.
- Smith, SJ., Cases, S., Jensen, DR. et al. (2000). Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking dgat. *Nat. Genet.* **25**: 87-90.
- Solt, LA., Wang, Y., Banerjee, S. et al. (2012). Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic rev-erb agonists. *Nature* **485**: 62-68.
- Stahl, A., Hirsch, DJ., Gimeno, RE. et al. (1999). Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol. Cell* **4**: 299-308.
- Stephan, FK. (2002). The "other" circadian system: food as a zeitgeber. *J. Biol. Rhythms* **17**: 284-292.
- Stone, SJ., Myers, HM., Watkins, SM. et al. (2004). Lipopenia and skin barrier abnormalities in dgat2-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **279**: 11767-11776.

- Sukhotnik, I., Gork, AS., Chen, M. et al. (2001). Effect of low fat diet on lipid absorption and fatty-acid transport following bowel resection. *Pediatr. Surg. Int.* **17**: 259-264.
- Sun, Z., Feng, D., Everett, LJ. et al. (2011). Circadian epigenomic remodeling and hepatic lipogenesis: lessons from hdac3. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **76**: 49-55.
- Swift, LL., Jovanovska, A., Kakkad, B. et al. (2005). Microsomal triglyceride transfer protein expression in mouse intestine. *Histochem. Cell Biol.* **123**: 475-482.
- Tahara, Y. and Shibata, S. (2016). Circadian rhythms of liver physiology and disease: experimental and clinical evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **13**: 217-226.
- Tanida, I., Ueno, T. and Kominami, E. (2004). Lc3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**: 2503-2518.
- Temel, RE., Tang, W., Ma, Y. et al. (2007). Hepatic niemann-pick c1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *J. Clin. Invest.* **117**: 1968-1978.
- Temel, RE., Sawyer, JK., Yu, L. et al. (2010). Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport. *Cell Metab* **12**: 96-102.
- Temel, RE. and Brown, JM. (2012). Biliary and nonbiliary contributions to reverse cholesterol transport. *Curr. Opin. Lipidol.* **23**: 85-90.
- Temel, RE. and Brown, JM. (2015). A new model of reverse cholesterol transport: enticing strategies to stimulate intestinal cholesterol excretion. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**: 440-451.
- Trabelsi, M., Daoudi, M., Prawitt, J. et al. (2015). Farnesoid x receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine I cells. *Nat Commun* **6**: 7629.
- Tran, TTT., Poirier, H., Clément, L. et al. (2011). Luminal lipid regulates cd36 levels and downstream signaling to stimulate chylomicron synthesis. *J. Biol. Chem.* **286**: 25201-25210.
- Tran, TTT., Postal, BG., Demignot, S. et al. (2016). Short term palmitate supply impairs intestinal insulin signaling via ceramide production. *J. Biol. Chem.* **291**: 16328-16338.
- Tso, P. and Liu, M. (2004). Apolipoprotein a-iv, food intake, and obesity. *Physiol. Behav.* **83**: 631-643.
- van der Veen, JN., van Dijk, TH., Vrans, CLJ. et al. (2009). Activation of the liver x receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *J. Biol. Chem.* **284**: 19211-19219.
- van der Velde, AE., Vrans, CLJ., van den Oever, K. et al. (2007). Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology* **133**: 967-975.
- van der Velde, AE., Vrans, CLJ., van den Oever, K. et al. (2008). Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **295**: G203-G208.
- van der Velde, AE., Brufau, G. and Groen, AK. (2010). Transintestinal cholesterol efflux. *Curr. Opin. Lipidol.* **21**: 167-171.

- Vieira, E., Marroquí, L., Batista, TM. et al. (2012). The clock gene *rev-erba* regulates pancreatic  $\beta$ -cell function: modulation by leptin and high-fat diet. *Endocrinology* **153**: 592-601.
- Vrins, CLJ., van der Velde, AE., van den Oever, K. et al. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation leads to increased transintestinal cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* **50**: 2046-2054.
- Vrins, CLJ., Ottenhoff, R., van den Oever, K. et al. (2012). Trans-intestinal cholesterol efflux is not mediated through high density lipoprotein. *J. Lipid Res.* **53**: 2017-2023.
- Wang, TY., Liu, M., Portincasa, P. et al. (2013). New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *Eur. J. Clin. Invest.* **43**: 1203-1223.
- Ward, C., Martinez-Lopez, N., Otten, EG. et al. (2016). Autophagy, lipophagy and lysosomal lipid storage disorders. *Biochim. Biophys. Acta* **1861**: 269-284.
- Waterhouse, J., Reilly, T., Atkinson, G. et al. (2007). Jet lag: trends and coping strategies. *Lancet* **369**: 1117-1129.
- Wilfling, F., Haas, JT., Walther, TC. et al. (2014). Lipid droplet biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **29**: 39-45.
- Woldt, E., Sebti, Y., Solt, LA. et al. (2013). Rev-erb- $\alpha$  modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat. Med.* **19**: 1039-1046.
- Woon, PY., Kaisaki, PJ., Bragança, J. et al. (2007). Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (*bmal1*) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**: 14412-14417.
- Wu, AL. and Windmueller, HG. (1979). Relative contributions by liver and intestine to individual plasma apolipoproteins in the rat. *J. Biol. Chem.* **254**: 7316-7322.
- Xiao, C. and Lewis, GF. (2012). Regulation of chylomicron production in humans. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**: 736-746.
- Xiao, C., Dash, S., Morgantini, C. et al. (2014). New and emerging regulators of intestinal lipoprotein secretion. *Atherosclerosis* **233**: 608-615.
- Xie, Y., Newberry, EP., Young, SG. et al. (2006). Compensatory increase in hepatic lipogenesis in mice with conditional intestine-specific *mttp* deficiency. *J. Biol. Chem.* **281**: 4075-4086.
- Xie, Y., Yan, J., Cutz, J. et al. (2012). *Iqgap2*, a candidate tumour suppressor of prostate tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**: 875-884.
- Xu, L., Glass, CK. and Rosenfeld, MG. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 140-147.
- Yen, CE., Stone, SJ., Cases, S. et al. (2002). Identification of a gene encoding *mgat1*, a monoacylglycerol acyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 8512-8517.
- Yen, CE. and Farese, RVJ. (2003). *Mgat2*, a monoacylglycerol acyltransferase expressed in the small intestine. *J. Biol. Chem.* **278**: 18532-18537.

- Yin, L., Wang, J., Klein, PS. et al. (2006). Nuclear receptor rev-erb $\alpha$  is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. *Science* **311**: 1002-1005.
- Yin, L., Wu, N., Curtin, JC. et al. (2007). Rev-erb $\alpha$ , a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. *Science* **318**: 1786-1789.
- Yin, L., Joshi, S., Wu, N. et al. (2010). E3 ligases arf-bp1 and pam mediate lithium-stimulated degradation of the circadian heme receptor rev-erb $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 11614-11619.
- Yu, L., Hammer, RE., Li-Hawkins, J. et al. (2002). Disruption of abcg5 and abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 16237-16242.
- Yu, L., Li-Hawkins, J., Hammer, RE. et al. (2002). Overexpression of abcg5 and abcg8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J. Clin. Invest.* **110**: 671-680.
- Yu, X., Long, YC. and Shen, H. (2015). Differential regulatory functions of three classes of phosphatidylinositol and phosphoinositide 3-kinases in autophagy. *Autophagy* **11**: 1711-1728.
- Zachos, NC., Kovbasnjuk, O., Foulke-Abel, J. et al. (2016). Human enteroids/colonoids and intestinal organoids functionally recapitulate normal intestinal physiology and pathophysiology. *J. Biol. Chem.* **291**: 3759-3766.
- Zakim, D. (2000). Thermodynamics of fatty acid transfer. *J. Membr. Biol.* **176**: 101-109.
- Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, TO. et al. (2012). Fat signals--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab* **15**: 279-291.
- Zehmer, JK., Huang, Y., Peng, G. et al. (2009). A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic. *Proteomics* **9**: 914-921.
- Zhang, Y., Fang, B., Emmett, MJ. et al. (2015). Gene regulation. discrete functions of nuclear receptor rev-erb $\alpha$  couple metabolism to the clock. *Science* **348**: 1488-1492.
- Zucco, F., Batto, A., Bises, G. et al. (2005). An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of caco-2 cell lines. *Altern Lab Anim* **33**: 603-618.
- Zweibaum, A., Hauri, HP., Sterchi, E. et al. (1984). Immunohistological evidence, obtained with monoclonal antibodies, of small intestinal brush border hydrolases in human colon cancers and foetal colons. *Int. J. Cancer* **34**: 591-598.
- Zweibaum, A. (1993). [differentiation of human colon cancer cells: a new approach to colon cancer]. *Bull. Acad. Natl. Med.* **177**: 63-71; discussion 71-3.

# **ANNEXE**

**Title:** Retrograde cholesterol transport in the human Caco-2/TC7 cell line: a model to study trans-intestinal cholesterol excretion in atherogenic and diabetic dyslipidemia

Camille Dugardin <sup>1\*</sup>, Olivier Briand <sup>1\*</sup>, Véronique Touche <sup>1</sup>, Marleen Schonewille <sup>2</sup>, François Moreau<sup>4</sup>, Cédric Le May<sup>4</sup>, Albert K Groen <sup>2,3</sup>, Bart Staels <sup>1</sup>, Sophie Lestavel <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011 - EGID, F-59000 Lille, France.

<sup>2</sup> University of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of Pediatrics, Groningen, The Netherlands.

<sup>3</sup> Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands.

<sup>4</sup> INSERM, UMR 1087, CNRS UMR 6291, Nantes, F-44000 France.

\* Camille Dugardin & Olivier Briand contributed equally to this study.

**Corresponding Author:**

Bart Staels

Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette BP 245 F59019 Lille cedex

Tel: +33 320877388, Fax: +33 320877360,

Email: bart.staels@pasteur-lille.fr

**Running Title:** Basolateral to apical cholesterol trafficking in enterocytes

**Abbreviations**

<b>NBD-cholesterol</b>	Nitrobenzoxadiazol-cholesterol
<b>PC</b>	Phosphatidylcholine
<b>PCSK9</b>	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
<b>PFA</b>	Paraformaldehyde
<b>TC</b>	Taurocholate
<b>TICE</b>	Trans Intestinal Cholesterol Excretion

## **Abstract**

### **Aims**

The dyslipidemia associated with type 2 diabetes is a major risk factor for the development of atherosclerosis. Trans Intestinal Cholesterol Excretion (TICE) has recently been shown to contribute, together with the classical hepatobiliary route, to fecal cholesterol excretion and cholesterol homeostasis. The aim of this study was to develop an *in vitro* cell model to investigate enterocyte-related processes of TICE.

### **Methods**

Differentiated Caco-2/TC7 cells were grown on transwells and incubated basolaterally (blood side) with human plasma and apically (luminal side) with lipid micelles. Radioactive and fluorescent cholesterol tracers were used to investigate cholesterol uptake at the basolateral membrane, intracellular distribution and apical excretion.

### **Results**

Our results show that cholesterol is taken up at the basolateral membrane, accumulates intracellularly as lipid droplets and undergoes a cholesterol acceptor-facilitated and progressive excretion through the apical membrane of enterocytes. The overall process is abolished at 4°C, suggesting a biologically active phenomenon. Moreover, this trans-enterocytic retrograde cholesterol transport displays some TICE features like modulation by PCSK9 and an ABCB1 inhibitor. Finally, we highlight the involvement of microtubules in the transport of plasma cholesterol from basolateral to apical pole of enterocytes.

### **Conclusions**

The human Caco-2/TC7 cell line appears a good *in vitro* model to investigate the enterocytic molecular mechanisms of TICE, which may help to identify intestinal molecular targets to enhance reverse cholesterol transport and fight against dyslipidemia.

**Keywords:** Lipid, Efflux, Intracellular cholesterol trafficking, Microtubules

## Introduction

Elevation of apolipoprotein B (apoB)-containing lipoproteins is a major component of diabetic dyslipidemia (1) leading to cholesterol accumulation in the arterial wall. Lowering of LDL-cholesterol reduces the risk of cardiovascular diseases (2), especially in type 2 diabetic patients (3). Enhancing fecal cholesterol excretion might thus be a good approach to prevent atherosclerosis in type 2 diabetic patients.

Until 2007, the hepatobiliary route was considered the sole way for fecal cholesterol excretion. However, the amount of cholesterol entering the small intestine via diet and bile minus the amount of cholesterol that is absorbed in the intestine does not always equal the amount of cholesterol excreted in the feces, suggesting the existence of an alternative pathway (4) (5). By using an *in situ* intestinal perfusion method in mice, van der Velde *et al* demonstrated the direct luminal secretion of plasma-derived cholesterol by enterocytes, identifying this pathway as a contributor to the cholesterol balance (6). This non-biliary route called trans intestinal cholesterol excretion (TICE) is estimated to contribute 20-30% of fecal neutral sterol excretion in chow-fed mice (7). Moreover, TICE can be pharmacologically modulated, for instance by ezetimibe (8) and statins (9) (10) in mice. Using genetically modified mice, TICE was established as a multi-organ process involving cholesterol and lipoprotein metabolism not only in the intestine but also in the liver and the circulation (11). However, TICE culminates in the proximal part of the small intestine (6), in which the rate-limiting steps of the overall process are thought to occur. Especially, TICE relies mainly on apoB-containing lipoprotein uptake at the basolateral membrane of enterocytes, and luminal excretion through the apical transporters ABCG5/G8 (12) (13) (14) and ABCB1 (9). TICE is moreover facilitated by the presence of cholesterol acceptors composed of phospholipids and/or bile salts in the intestinal lumen (6). At present, the molecular mechanisms behind the trans-enterocytic process of TICE are still unknown, especially the steps sustaining cholesterol entry, trafficking and efflux in enterocytes. Moreover, except intestinal explants mounted in Ussing chambers (9), there are no *ex vivo* nor *in vitro* models allowing the study of the contribution of the intestine to the control of the overall TICE pathway.

Polarized human enterocytic Caco-2/TC7 cells are largely used as a model to study intestinal epithelial transport, lipid absorption and lipoprotein synthesis (15) (16) (17) (18) (19). When differentiated on transwells, Caco-2/TC7 cells spontaneously form an intestinal epithelial monolayer delineating two distinct compartments: an apical compartment mimicking the intestinal lumen and a basolateral compartment representing the lymph/blood circulation. In the present study, we aimed to characterize the Caco-2/TC7 cell line as a model to study the enterocyte-related processes of TICE. We show that upon basolateral incubation with human plasma

and apical incubation with lipid micelles, differentiated Caco-2/TC7 cells mimic some of the *in vivo* TICE features. Using this *in vitro* model, we identify a key role of microtubules in the process.

## **Materials and Methods**

### **Caco-2/TC7 cell culture**

Caco-2/TC7 cells (from Pr. Rousset, INSERM UMR 872, Paris, France) were cultured and grown on microporous polyethylene terephthalate (PET) membrane insert transwells (BD Falcon) as previously described (17). All experiments were performed 21 days after seeding. The epithelial barrier integrity was checked by Lucifer Yellow permeability test (supplemental Materials and Methods).

When indicated, Caco-2/TC7 cells were pre-incubated for 24 hours with recombinant human proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (rPCSK9) protein 2.5µg/mL (AcroBiosystems, PC9-H5223) in the basolateral compartment. The treatment was renewed during the 6 hr-incubation period of the “*in vitro* TICE” experiments.

When indicated, Caco-2/TC7 cells were incubated with PSC-833 10µM (Sigma, SML0572), colchicine 2.5µM (Sigma, C9754) and nocodazole 5µM (Sigma, M1404) in the apical and basolateral compartments, during the 6 hr-incubation period of the “*in vitro* TICE” experiments.

### **Cholesterol acceptor mixture preparation**

Phospholipid/bile salt micelles containing 2mM phosphatidylcholine (PC)/10mM taurocholate (TC) were prepared as described (6). For more details, see supplemental Materials and Methods.

### **Measurement of the mass of apical-excreted cholesterol**

Differentiated Caco-2/TC7 cells grown on transwells were incubated for 6 hours at 37°C with 2.5mL DMEM containing human plasma (1/40; vol/vol) in the basolateral compartment and 1.5mL of the indicated phospholipid/bile salt micelles in the apical compartment. Apical media were then recovered and centrifuged (1,000rpm - 5min). After Folch lipid extraction, cholesterol mass was determined by gas chromatography–mass spectrometry.

### **Incorporation of a cholesterol tracer in human plasma**

Human plasma (total cholesterol: 230 ± 42mg/dL (Biomerieux enzymatic test)) was obtained from non-fasting healthy donors (French Blood Service) and labelled either with [<sup>3</sup>H]-cholesterol (42µCi per mg of plasma cholesterol) or nitrobenzoxadiazol-cholesterol (NBD-cholesterol) (1.6mg per mg of plasma cholesterol). For more details, see supplemental Materials and Methods.

### **Measurement of cellular content and apical excretion of plasma-derived cholesterol**

Differentiated Caco-2/TC7 cells grown on transwells were incubated for 6 hours at 37°C with 2.5mL DMEM containing [<sup>3</sup>H]-cholesterol-labelled plasma (1/40; vol/vol) in the basolateral compartment and 1.5mL of the indicated phospholipid/bile salt micelles in the apical compartment. Apical media were sampled (85µL) at different time points and centrifuged (1,000rpm - 5min). At the end of the experiment, cells were washed with ice-cold PBS then harvested in 1mL Solvable (PerkinElmer). Radioactivity was counted using the TopCount NXT v2.13 (Perkin Elmer). Protein content in cell homogenates was determined according to the Lowry method modified by Peterson (20).

### **Statistical analysis**

Data are reported as mean ± SD and statistical significance was established at p< 0.05. Student's t-test and non-parametric variance analysis followed by multiple comparisons were performed as appropriate (Graphpad Prism).

## Results

### **Basolateral uptake and apical excretion of plasma-derived cholesterol by differentiated Caco-2/TC7 cells are biologically active processes**

To determine whether polarized human enterocytic Caco-2/TC7 cells can perform a retrograde (i.e. basolateral to apical) transport of plasma-derived cholesterol, differentiated cells grown on transwells were incubated with diluted human plasma (1:40) in the basolateral medium for 6 hours, corresponding to ~100 $\mu$ g cholesterol input in the basolateral compartment. As cholesterol acceptors in the luminal side of enterocytes have been reported to facilitate TICE (6), phosphatidylcholine (PC) / taurocholate (TC) (2mM/10mM) micelles were added in the apical compartment. At the end of the incubation period, mass spectrometry analysis performed on apical medium measured  $\sim 12.7 \pm 4\mu$ g cholesterol in the apical compartment.

To evaluate whether this cholesterol derives from the cells or from a retrograde transport from the basolateral to the apical side of enterocytes, [ $^3$ H]-cholesterol was added to the plasma in the basolateral medium as a tracer. The radioactivity counted in the apical medium at 2, 4 and 6 hours of incubation revealed a continuous excretion of plasma-derived cholesterol through the cellular monolayer (figure 1A). Performing the experiment at 4°C (figure 1A) led to a severe decrease in plasma-derived cholesterol content in the apical medium, suggesting that this trans-enterocytic retrograde transport of plasma-derived cholesterol may rely on a biologically active process.

After a 6 hour-incubation period, radioactivity counts in the cells were normalized to cellular proteins. ~1% of the [ $^3$ H]-cholesterol provided at the basolateral compartment was found associated to the cell homogenates. Performing the same experiment once more at 4°C resulted in a drastic decrease of the plasma-derived cholesterol content in cell homogenates (figure 1B).

To assess the directional-specific feature of this trans-cellular transport, the experiment was also performed in the opposite direction, i.e. [ $^3$ H]-cholesterol-labelled plasma in the apical compartment and PC/TC (2mM/10mM) micelles in the basolateral compartment. In both cases, radioactivity counts into the receiving compartment (containing PC/TC micelles) were normalized to cell-associated radioactivity, thus representing plasma-derived cholesterol efflux efficiency. Comparison of plasma-derived cholesterol efflux efficiency in both experimental setups revealed a more efficient cholesterol efflux in the retrograde (i.e. basolateral to apical) direction in Caco-2/TC7 cells (figure 1C).

## **Trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in differentiated Caco-2/TC7 cells mimics some *in vivo* enterocyte-related features of TICE**

To investigate the relevance of the trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in the Caco-2/TC7 cell line to the intestinal cholesterol pathway sustaining TICE, we next challenged this *in vitro* model with physiological and pharmacological TICE modulators reported in the literature.

PCSK9 was reported to modulate the trans-intestinal excretion of blood-derived cholesterol in murine models (9). Incubation of Caco-2/TC7 cells with recombinant human PCSK9 (rPCSK9) resulted in a 20% decrease of the LDLR protein in whole cell homogenates (figure 2A), as previously reported (21). rPCSK9 pre-treated cells were then incubated at 37°C for 6 hours with [<sup>3</sup>H]-cholesterol-labelled plasma in the basolateral compartment and PC/TC (2mM/10mM) micelles in the apical compartment. Compared to untreated cells, rPCSK9 pre-treated cells displayed a significant 28% decrease of plasma-derived cholesterol excretion through the apical membrane (figure 2B) and a 17% decrease of plasma-derived cholesterol content in cell homogenates (figure 2C). These data reveal that the retrograde transport of plasma-derived cholesterol in Caco-2/TC7 cells is modulated by rPCSK9 treatment.

Since intestinal ABCB1 on the brush border membrane is reported to be involved in the luminal excretion of blood-derived cholesterol in the TICE process (9), we tested the effect of the ABCB1 inhibitor PSC-833 on the trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in Caco-2/TC7 cells. PSC-833 treatment significantly decreased (-20%) plasma-derived cholesterol excretion through the apical membrane (figure 2D), without modifying the [<sup>3</sup>H]-cholesterol content in cell homogenates (figure 2E), supporting a role of ABCB1 in plasma-derived cholesterol retrograde transport in Caco-2/TC7 cells.

We conclude that Caco-2/TC7 differentiated cells mimic crucial enterocyte-related features of TICE reported *in vivo* in mice, i.e. modulation by PCSK9 at the basolateral side and involvement of ABCB1 on the brush border membrane. It may thus serve as a suitable *in vitro* model to study enterocyte-regulation of TICE and to decipher specific signalling pathways potentially controlling the intracellular trafficking of cholesterol in enterocytes.

## **Mobilization of plasma-derived cholesterol to subapical compartments and its apical excretion are stimulated by apical exposure to PC/TC micelles**

Since luminal cholesterol acceptors composed of phospholipids and bile salts were reported to facilitate TICE in intestinal perfusion studies (6), we studied the influence of the apical medium composition on the

basolateral uptake and apical excretion of plasma-derived cholesterol in this *in vitro* model. Differentiated Caco-2/TC7 cells were incubated with [<sup>3</sup>H]-cholesterol-labelled plasma in the basolateral compartment and varying apical medium contents. Compared to DMEM in the apical compartment, incubation with PC/TC (2mM/10mM) micelles led to a 2.6-fold increase of the plasma-derived cholesterol excretion through the apical membrane (figure 3A). However, incubation with PC/TC (0.2mM/10mM) mixture, consisting of mainly vesicles and TC monomers instead of micelles (22), was less efficient (1.8 fold compared to 2.6 fold with PC/TC (2mM/10mM)) (figure 3A). By contrast, adding HDL in the apical compartment did not modify plasma-derived [<sup>3</sup>H]-cholesterol content in the apical medium, compared to DMEM (figure 3A). Conversely, regardless of apical medium composition, the plasma-derived [<sup>3</sup>H]-cholesterol content in cell homogenates remained unchanged (figure 3B). These data suggest that the presence of lipid micelles composed of a defined mixture of phospholipids and bile salts (PC/TC (2mM/10mM)) in the apical medium facilitates plasma-derived cholesterol excretion through the apical membrane in Caco-2/TC7 cells, thus again resembling TICE *in vivo* (6).

To visualize the retrograde transport of cholesterol, [<sup>3</sup>H]-cholesterol was substituted by fluorescent cholesterol (NBD-cholesterol). Cells were PFA-fixed after a 6 hour-incubation period in the previously described conditions, followed by confocal microscopy analysis. The basolateral uptake of plasma-derived cholesterol in Caco-2/TC7 cells was confirmed by the presence of fluorescent lipid droplets inside the cells (figure 3C). Compared to other apical medium contents, PC/TC (2mM/10mM) micelles led to less accumulation of fluorescent lipid droplets at the basolateral side of enterocytes (figure 3C) and a larger intracellular distribution of plasma-derived NBD-cholesterol (figures 3C and 3D). These data suggest that the presence of PC/TC micelles in the apical medium as cholesterol acceptors stimulates the intracellular trafficking of cholesterol from the basolateral to the apical pole of enterocytes. Moreover, there is an increased colocalization between plasma-derived NBD-cholesterol and the early endosome marker EEA1 (figure 3E), thus highlighting early endosomes as transit compartments of the trans-enterocytic retrograde route for cholesterol in the human Caco-2/TC7 cell line.

### **TICE-like trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in differentiated Caco-2/TC7 cells involves microtubules**

As the microtubule network plays a central role in vesicular trafficking (23), we evaluated its contribution to the trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in differentiated Caco-2/TC7 cells. Therefore, colchicine (2.5µM) and nocodazole (5µM), inhibitors of microtubule polymerization, were added during the 6 hour-

incubation period with [<sup>3</sup>H]-cholesterol-labelled plasma in the basolateral compartment and PC/TC (2mM/10mM) micelles in the apical compartment. Colchicine and nocodazole both significantly decreased plasma-derived cholesterol apical excretion (figure 4A) and plasma-derived cholesterol content in cell homogenates (figure 4B).

To study the contribution of microtubules in the PC/TC micelle-stimulated intracellular trafficking of cholesterol from the basolateral to the apical pole of enterocytes, the [<sup>3</sup>H]-cholesterol was substituted by NBD-cholesterol and cells were PFA-fixed after a 6 hour-incubation period, followed by confocal microscopy analysis. Colchicine and nocodazole treatment lowered plasma-derived NBD-cholesterol staining throughout the cells upon PC/TC micelle exposure (figures 4C and 4D), suggesting that microtubule polymerization inhibitors blunt the PC/TC micelle-stimulated intracellular trafficking of cholesterol from the basolateral to the apical pole of enterocytes.

These results highlight a role of microtubule network in the trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in differentiated Caco-2/TC7 cells.

## Discussion

The TICE pathway is a major non-biliary contributor to fecal neutral sterol excretion and macrophage reverse cholesterol transport in mice (5). The direct intestinal excretion of plasma-derived cholesterol to the intestinal lumen through enterocytes is the last decisive step in this multiorgan process. TICE occurs mainly in the proximal part of the intestine and is facilitated by the presence of cholesterol acceptors composed of phospholipid and/or bile salt micelles in the intestinal lumen (6). Compared to the stimulation of the hepatobiliary route, which may promote gallstone formation (24), enhancing fecal cholesterol excretion by the TICE pathway is an attractive approach to prevent atherosclerosis in type 2 diabetic patients (25). Indeed, several physiological and pharmacological modulators have been experimentally shown to increase TICE *in vivo* through the use of two distinct methodologies: the *in situ* intestinal perfusion method (6) and isotopic-assisted determination of the sources of fecal neutral sterols (12). More recently, Le May *et al* have proposed an *ex vivo* method based on intestinal explants mounted in Ussing chambers and demonstrated, for the first time, the presence of TICE in the human intestine (9). Nevertheless, these methods allow neither proper investigation of the direct contribution of the intestine in the overall TICE process nor mechanistic studies on the enterocyte-related processes of TICE, which remain poorly characterized.

In this paper, we demonstrate that the human Caco-2/TC7 cell line may be useful as an *in vitro* model to study enterocyte-related molecular steps of TICE. Indeed, the results of our study show that differentiated Caco-2/TC7 cells take up plasma-derived cholesterol through the basolateral membrane and then excrete it through the apical membrane. This retrograde cholesterol transport is observed at 37°C and severely blunted at 4°C, a temperature which leads to a drastic decrease in both the basolateral uptake and the apical excretion of plasma-derived cholesterol, indicating a biologically active process.

Despite low level of ABCG5/G8 ((26) and personal data) which were shown to take part in TICE (12) (13) (14), Caco-2/TC7 cells recapitulate some enterocyte-related characteristics of TICE, i.e. modulation by rPCSK9 treatment (9), involvement of ABCB1 (9) and facilitation by the presence of PC/TC micelles at the apical membrane (6).

On the basis of this *in vitro* model, we next investigated enterocyte-related mechanisms of TICE and particularly intracellular cholesterol trafficking which was completely unknown. We have shown by confocal microscopy, that PC/TC micelles (2mM/10mM) in the apical compartment modify the intracellular distribution of plasma-derived cholesterol, facilitate its transport from sub-basolateral to sub-apical areas of the enterocyte and increase its colocalization index with early endosomes in sub-apical areas (EEA1-positive staining). These

results suggest the existence of a feedback mechanism initiated by PC/TC micelles and controlling vesicular cholesterol trafficking from basolateral side to early endosomes at the apical side of enterocytes.

It is well established that the microtubule cytoskeleton is important for endocytosis and the endosome-lysosome pathway in polarized epithelial cells (27). By using colchicine and nocodazole in our *in vitro* model, we found that microtubule disruption blunts both plasma-derived cholesterol subcellular distribution in response to PC/TC micelles and its apical excretion, suggesting the involvement of microtubules in the enterocyte-related processes of TICE. Further studies on the role of microtubules *in vivo* are warranted.

Contrary to the well-known classical endosome-lysosome pathway (23), we could not find any modification of plasma-derived cholesterol excretion at the apical membrane when Caco-2/TC7 cells were treated with chloroquine, a lysosome inhibitor (data not shown). Some alternative lysosome-independent pathways such as caveolae-mediated endocytosis or transcytosis (28) could thus explain the intracellular route for retrograde cholesterol transport in enterocytes, as shown for LDL uptake in endothelial cells (29).

Although ezetimibe (8) and statins (9) (10) increase TICE *in vivo*, whether anti-diabetic drugs, especially those targeting the intestine like metformin and bile acid sequestrants, modulate TICE has not been studied yet. Combination of studies in the Caco-2/TC7 cell line with studies in mice could allow assessment whether TICE contributes to the cardiovascular protective effect of these anti-diabetic drugs.

In conclusion, this study demonstrates a retrograde transport of plasma-derived cholesterol in the human Caco-2/TC7 cell line mimicking the enterocyte-related part of TICE. It identifies this cell line as a suitable *in vitro* model to investigate, by pharmacological or molecular challenges and cell biology approaches, new molecular pathways sustaining the ultimate steps of TICE in enterocytes. Identification of the molecular mechanisms of TICE pathway may help to identify new molecular targets to induce fecal neutral sterol excretion in order to combat atherogenic dyslipidemia associated with diabetes.

**Acknowledgments:**

We thank Beatrice Duthoit for her technical support on cell culture and Meryem Tardivel of the BICeL-IFR114 Facility for access to systems and technical advice. B. Staels is a member of the Institut Universitaire de France.

**Grant Support:**

This work was supported by grants from “European Genomic Institute for Diabetes” (E.G.I.D., ANR-10-LABX-46) and European Commission, Fondation Leducq “Transatlantic Networks of Excellence in Cardiovascular Research” (10CVD04). Camille Dugardin PhD was funded 50% Région Hauts de France / 50% Université Lille 2.

**Disclosures:**

Conflict of Interest: none.

**Statement of Human and Animal Rights:**

This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by the any of the authors.

## References

1. Grundy SM. Metabolic syndrome update. *Trends Cardiovasc. Med.* (2016) **26**: pp. 364-373.
2. Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, Bhalra N, Peto R, Barnes EH, Keech A, Simes J & Collins R. Efficacy and safety of more intensive lowering of ldl cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet* (2010) **376**: pp. 1670-1681.
3. Szalat A, Durst R & Leitersdorf E. Managing dyslipidaemia in type 2 diabetes mellitus. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* (2016) **30**: pp. 431-444.
4. Kruit JK, Plösch T, Havinga R, Boverhof R, Groot PHE, Groen AK & Kuipers F. Increased fecal neutral sterol loss upon liver x receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology* (2005) **128**: pp. 147-156.
5. Temel RE, Sawyer JK, Yu L, Lord C, Degirolamo C, McDaniel A, Marshall S, Wang N, Shah R, Rudel LL & Brown JM. Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport. *Cell Metab* (2010) **12**: pp. 96-102.
6. van der Velde AE, Vrans CLJ, van den Oever K, Kunne C, Oude Elferink RPJ, Kuipers F & Groen AK. Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology* (2007) **133**: pp. 967-975.
7. Brufau G, Groen AK & Kuipers F. Reverse cholesterol transport revisited: contribution of biliary versus intestinal cholesterol excretion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2011) **31**: pp. 1726-1733.
8. Uto-Kondo H, Ayaori M, Sotherden GM, Nakaya K, Sasaki M, Yogo M, Komatsu T, Takiguchi S, Yakushiji E, Ogura M, Nishida T, Endo Y & Ikewaki K. Ezetimibe enhances macrophage reverse cholesterol transport in hamsters: contribution of hepato-biliary pathway. *Biochim. Biophys. Acta* (2014) **1841**: pp. 1247-1255.
9. Le May C, Berger JM, Lespine A, Pillot B, Prieur X, Letessier E, Hussain MM, Collet X, Cariou B & Costet P. Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by pcsk9 and statin involving abcb1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2013) **33**: pp. 1484-1493.
10. Schonewille M, Freark de Boer J, Mele L, Wolters H, Bloks VW, Wolters JC, Kuivenhoven JA, Tietge UJF, Brufau G & Groen AK. Statins increase hepatic cholesterol synthesis and stimulate fecal cholesterol elimination in mice. *J. Lipid Res.* (2016) **57**: pp. 1455-1464.
11. Temel RE & Brown JM. A new model of reverse cholesterol transport: enticing strategies to stimulate intestinal cholesterol excretion. *Trends Pharmacol. Sci.* (2015) **36**: pp. 440-451.
12. van der Veen JN, van Dijk TH, Vrans CLJ, van Meer H, Havinga R, Bijsterveld K, Tietge UJF, Groen AK & Kuipers F. Activation of the liver x receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *J. Biol. Chem.* (2009) **284**: pp. 19211-19219.
13. Jakulj L, Vissers MN, van Roomen CP, van der Veen JN, Vrans CLJ, Kunne C, Stellaard F, Kastelein JJP & Groen AK. Ezetimibe stimulates faecal neutral sterol excretion depending on abcg8 function in mice. *FEBS Lett.* (2010) **584**: pp. 3625-3628.
14. Brufau G, Kuipers F, Lin Y, Trautwein EA & Groen AK. A reappraisal of the mechanism by which plant sterols promote neutral sterol loss in mice. *PLoS ONE* (2011) **6**: p. e21576.
15. Hidalgo IJ, Raub TJ & Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* (1989) **96**: pp. 736-749.
16. Briand O, Touche V, Colin S, Brufau G, Davalos A, Schonewille M, Bovenga F, Carrière V, de Boer JF, Dugardin C, Riveau B, Clavey V, Tailleux A, Moschetta A, Lasunción MA, Groen AK, Staels B & Lestavel S. Liver x receptor regulates triglyceride absorption through intestinal down-regulation of scavenger receptor class b, type 1. *Gastroenterology* (2016) **150**: pp. 650-658.
17. Colin S, Briand O, Touche V, Wouters K, Baron M, Pattou F, Hanf R, Tailleux A, Chinetti G, Staels B & Lestavel S. Activation of intestinal peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  increases high-density lipoprotein production. *Eur. Heart J.* (2013) **34**: pp. 2566-2574.

18. Chateau D, Pauquai T, Delers F, Rousset M, Chambaz J & Demignot S. Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein b48-containing lipoproteins by caco-2 cells. *J. Cell. Physiol.* (2005) **202**: pp. 767-776.
19. Bouchoux J, Beilstein F, Pauquai T, Guerrero IC, Chateau D, Ly N, Alqub M, Klein C, Chambaz J, Rousset M, Lacorte J, Morel E & Demignot S. The proteome of cytosolic lipid droplets isolated from differentiated caco-2/tc7 enterocytes reveals cell-specific characteristics. *Biol. Cell* (2011) **103**: pp. 499-517.
20. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* (1977) **83**: pp. 346-356.
21. Rashid S, Tavori H, Brown PE, Linton MF, He J, Giunzioni I & Fazio S. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 promotes intestinal overproduction of triglyceride-rich apolipoprotein b lipoproteins through both low-density lipoprotein receptor-dependent and -independent mechanisms. *Circulation* (2014) **130**: pp. 431-441.
22. Donovan JM, Timofeyeva N & Carey MC. Influence of total lipid concentration, bile salt:lecithin ratio, and cholesterol content on inter-mixed micellar/vesicular (non-lecithin-associated) bile salt concentrations in model bile. *J. Lipid Res.* (1991) **32**: pp. 1501-1512.
23. Maxfield FR & Wüstner D. Intracellular cholesterol transport. *J. Clin. Invest.* (2002) **110**: pp. 891-898.
24. Admirand WH & Small DM. The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *J. Clin. Invest.* (1968) **47**: pp. 1043-1052.
25. Temel RE & Brown JM. Biliary and nonbiliary contributions to reverse cholesterol transport. *Curr. Opin. Lipidol.* (2012) **23**: pp. 85-90.
26. Nakano T, Inoue I, Takenaka Y, Ono H, Katayama S, Awata T & Murakoshi T. Ezetimibe promotes brush border membrane-to-lumen cholesterol efflux in the small intestine. *PLoS ONE* (2016) **11**: p. e0152207.
27. Apodaca G. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* (2001) **2**: pp. 149-159.
28. Kiss AL & Botos E. Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation?. *J. Cell. Mol. Med.* (2009) **13**: pp. 1228-1237.
29. Frank PG, Pavlides S & Lisanti MP. Caveolae and transcytosis in endothelial cells: role in atherosclerosis. *Cell Tissue Res.* (2009) **335**: pp. 41-47.

## Legends

### **Figure 1: Trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in differentiated Caco-2/TC7 cells is an active process**

Differentiated Caco-2/TC7 cells grown on transwells were incubated at 37°C with [<sup>3</sup>H]-cholesterol-labelled human plasma in the basolateral compartment and with 2mM PC/10mM TC micelles in the apical compartment. Media were sampled in apical compartment at the indicated incubation-times and cells were harvested at 6 hrs.

(A and B) Effect of incubation temperature on [<sup>3</sup>H]-cholesterol content in apical media (A) and in cell homogenates (B). Radioactivity counts were normalized to cellular protein content and expressed as percent of the 2mM PC/10mM TC condition at 6 hours. Data are mean ± SD from at least 2 independent experiments in triplicate. \* p<0.05 ; \*\*\* p<0.001 in comparison to 37°C. # p<0.05 ; ### p<0.001 in comparison to previous time point in panel A (Two-way ANOVA, Bonferroni post-test (A), t-test (B)).

(C) Differentiated Caco-2/TC7 cells grown on transwells were incubated at 37°C for 6 hours with [<sup>3</sup>H]-cholesterol-labelled human plasma either in the basolateral compartment (“blood to lumen”) or in the apical compartment (“lumen to blood”) and with 2mM PC/10mM TC micelles in the opposite compartment (receiving compartment). Media were sampled and cells harvested. Efflux efficiency corresponds to the [<sup>3</sup>H]-cholesterol content in the receiving compartment expressed as % of [<sup>3</sup>H]-cholesterol content in cell homogenates. Data are mean ± SD from at least 2 independent experiments in triplicate (t-test, \*\*\* p<0.001).

### **Figure 2: Trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in differentiated Caco-2/TC7 cells mimics some enterocyte-related features of TICE *in vivo***

(A to C) Differentiated Caco-2/TC7 cells grown on transwells were pre-incubated for 24 hrs at 37°C with or without addition of human recombinant PCSK9 (2.5µg/mL) in the basolateral compartment. Subsequently, cells were incubated for 6 hrs with [<sup>3</sup>H]-cholesterol-labelled human plasma in the basolateral compartment and 2mM PC/10mM TC micelles in the apical compartment. (A) Representative western blot of LDLR (LP02, Oncogene) and β-Actin (SC-1616, Santa Cruz) in whole cell homogenates prepared at the end of the pre-incubation period. (B and C) Effect of rPCSK9 on the [<sup>3</sup>H]-cholesterol content in apical media (B) and in cell homogenates (C). Radioactivity counts were normalized to cellular protein content and expressed as percent of the control condition. Data are mean ± SD from at least 2 independent experiments in triplicate (t-test, \* p<0.05).

(D and E) PSC-833 (10 $\mu$ M) was added to the media during the 6 hour-incubation period. Effect on [<sup>3</sup>H]-cholesterol content in apical media (D) and in cell homogenates (E). Radioactivity counts were normalized to cellular protein content and expressed as percent of the DMSO condition at 6 hours. Data are mean  $\pm$  SD from at least 2 independent experiments in triplicate (t-test, \*  $p < 0.05$ ).

**Figure 3: Mobilization of plasma-derived cholesterol to subapical compartments and its apical excretion are stimulated by apical exposure to PC/TC micelles**

Differentiated Caco-2/TC7 cells grown on transwells were incubated at 37°C with diluted human plasma labelled either with [<sup>3</sup>H]-cholesterol or NBD-cholesterol in the basolateral compartment and either with DMEM, 2mM PC / 10mM TC micelles, 0.2mM PC / 10mM TC mixture or HDL 35 $\mu$ g/mL in the apical compartment. Media were sampled in apical compartment and cells were either PFA-fixed or harvested at 6 hrs.

(A and B) Effect of apical media composition on [<sup>3</sup>H]-cholesterol content in apical media (A) and in cell homogenates (B). 2mM PC/10mM TC condition was set at 100%. Data are mean  $\pm$  SD from at least 2 independent experiments in triplicate. (C and D) Effect of apical media composition on NBD-cholesterol subcellular distribution. (C) Pseudo-colored transversal confocal views for NBD-cholesterol staining. Nuclei are stained in blue (Hoechst). (D) NBD-cholesterol subcellular distribution assessed by integrated density and expressed as percent of the 2mM PC/10mM TC condition. (E) Mander's coefficients of colocalization between NBD-cholesterol and EEA1 (BD Transduction Laboratories, ref 610456). Data are mean  $\pm$  SD from at least 2 independent experiments. \*  $p < 0.05$  ; \*\*\*  $p < 0.001$  in comparison to DMEM ; *a*  $p < 0.05$  in comparison to 10mM TC / 2mM PC micelles (One-way ANOVA, Bonferroni post-test).

**Figure 4: TICE-like trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in differentiated Caco-2/TC7 cells involves microtubules**

Differentiated Caco-2/TC7 cells grown on transwells were incubated at 37°C with diluted human plasma labelled either with [<sup>3</sup>H]-cholesterol or NBD-cholesterol in the basolateral compartment and 2mM PC / 10mM TC micelles in the apical compartment. Colchicine (2.5 $\mu$ M) and nocodazole (5 $\mu$ M) were added in the media during the 6 hour-incubation period. Media were sampled in apical compartment and cells were either PFA-fixed or harvested at 6 hrs.

(A and B) Effect of microtubule polymerization inhibition on [<sup>3</sup>H]-cholesterol content in apical media (A) and in cell homogenates (B). Radioactivity counts in apical media were normalized to cellular protein content and expressed as percent of the DMSO condition. Data are mean ± SD from at least 2 independent experiments in triplicate (One-way ANOVA, Bonferroni post-test, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001).

(C and D) Effect of microtubule polymerization inhibition on NBD-cholesterol subcellular distribution in PFA-fixed cells. (C) Pseudo-colored transversal confocal views for NBD-cholesterol staining. Nuclei are stained in blue (Hoechst). (D) NBD-cholesterol subcellular distribution assessed by integrated density and expressed as percent of the 2mM PC/10mM TC condition. Data are mean ± SD from at least 2 independent wells (Two-way ANOVA, Bonferroni post-test, \* p<0.05 ; \*\*\* p<0.001).

Figure 1

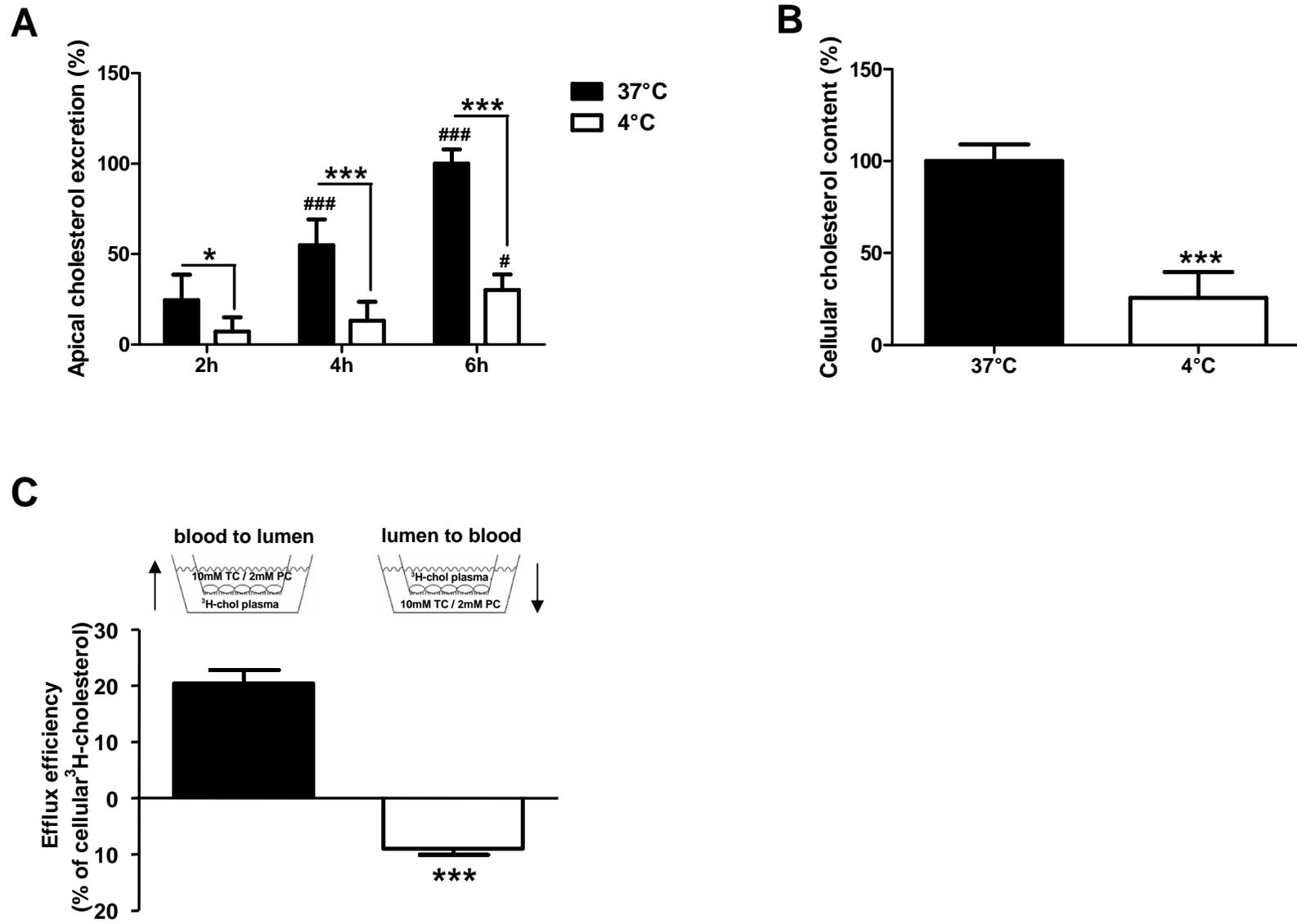
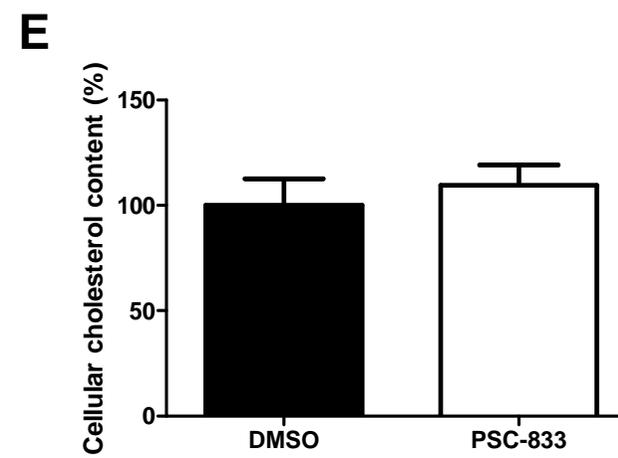
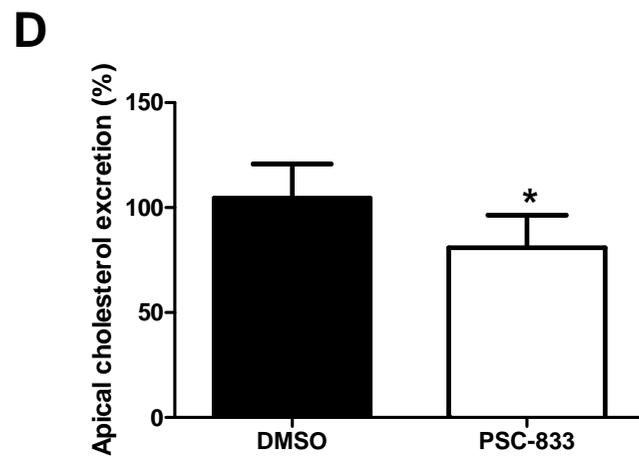
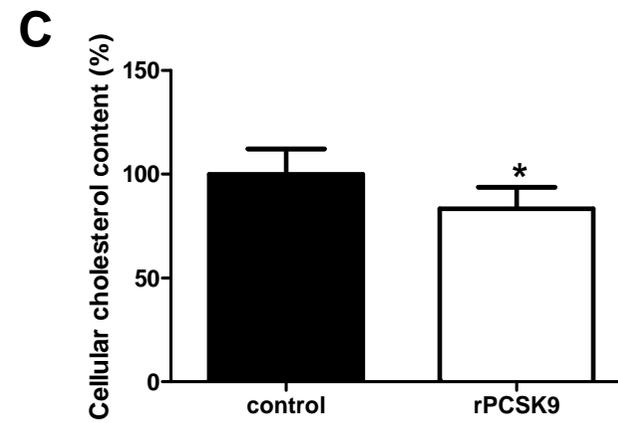
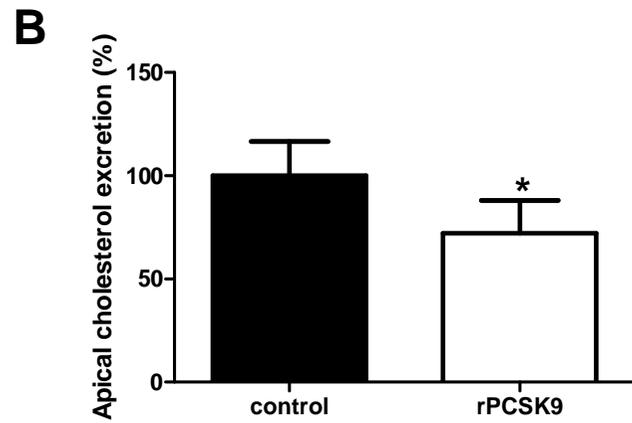
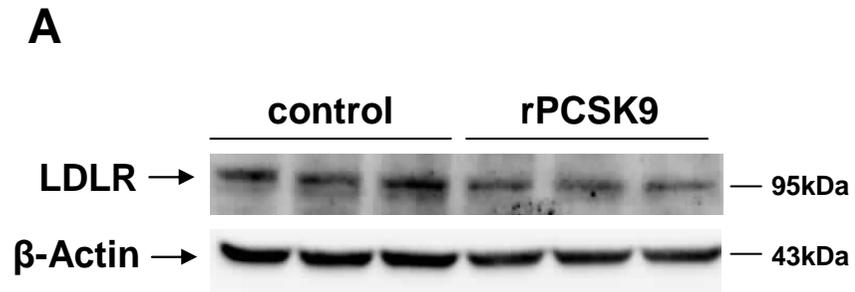


Figure 2



# Figure 3

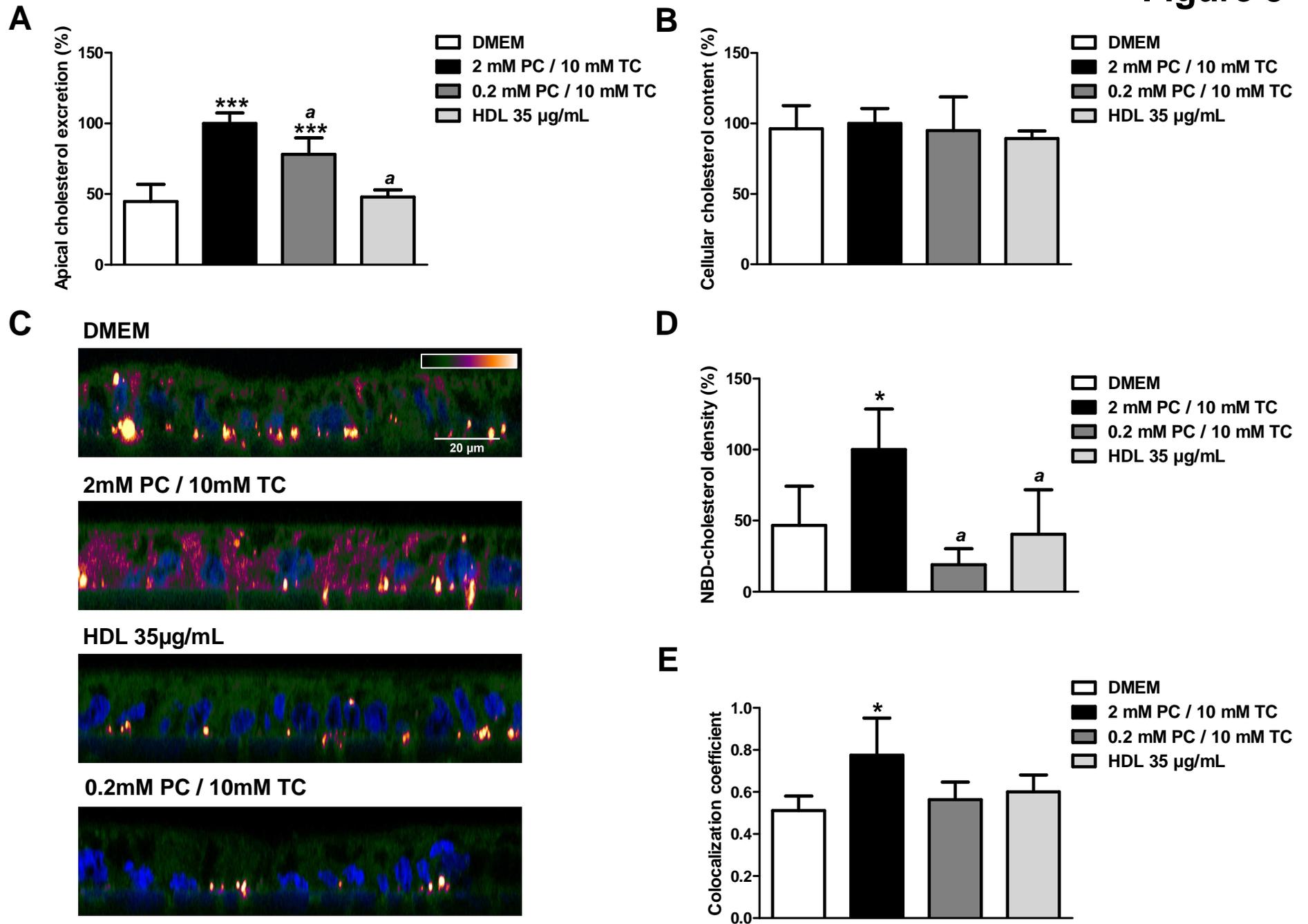
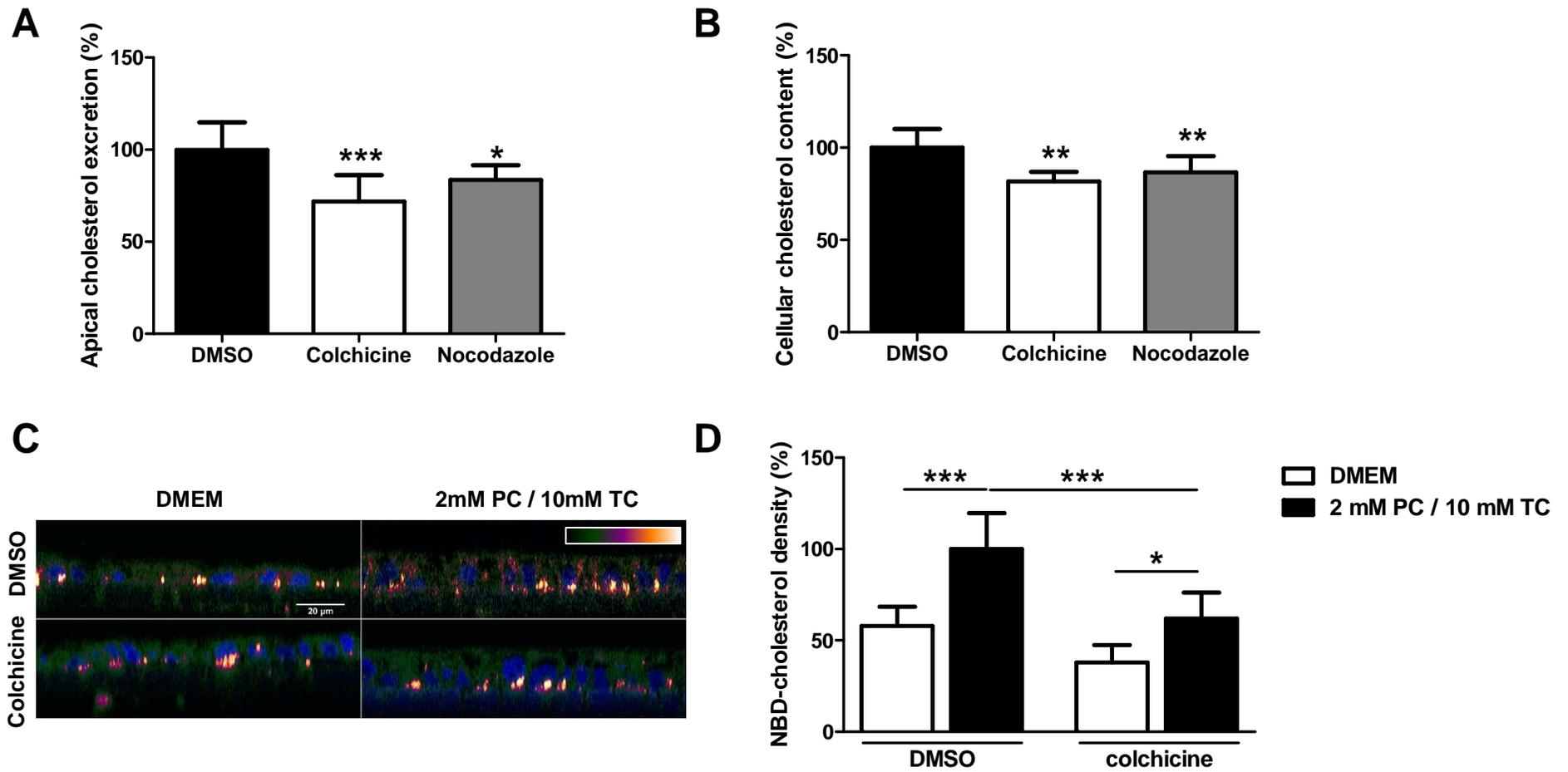


Figure 4



## Supplemental Materials and Methods

### Control of epithelial barrier integrity

In order to check the integrity of tight junctions at the end of the 6 hour-incubation period with plasma and phospholipid/bile salt micelles, Caco-2/TC7 cells were equilibrated for 10 minutes in HBSS – HEPES (Gibco) and Lucifer yellow (100 $\mu$ M – Sigma-Aldrich) was added on the apical side of the cells for 1 hour at 37°C. Apical and basolateral media were recovered and analysed by fluorescence spectrophotometry ( $\lambda$ excitation 432nm /  $\lambda$ emission 538nm – Infinite 200 Pro NanoQuant, TECAN). The apparent permeability coefficient ( $P_{app}$  <1x10<sup>-6</sup>cm.sec<sup>-1</sup>) was determined according to the equation:  $P_{app} = J/A.C_0$ , where J is the rate of appearance of the lucifer yellow in the basolateral compartment, C<sub>0</sub> is the initial concentration in the apical medium and A, the surface area of the insert (4.2cm<sup>2</sup>).  $P_{app}$  was calculated to be 3.1  $\pm$  2.9x10<sup>-7</sup>cm.sec<sup>-1</sup>, assessing the tight feature of the cellular monolayer and absence of paracellular leakage (28).

### Cholesterol acceptor mixture preparation

Phospholipid/bile salt micelles containing 2mM phosphatidylcholine (PC)/10mM taurocholate (TC) were prepared as described (6). Briefly, for a final volume of 10mL, 200 $\mu$ L of a PC (100mM) stock solution in chloroform/methanol (2vol/1vol) were transferred in a glass bottle and dried using nitrogen gas. 4.2mL of a TC (24mM) stock solution, extemporaneously prepared in DMEM, and 5.8mL DMEM were added in the glass bottle, then sonicated (Ultrasonic cleaner) for 5 minutes and shaken at 37°C for 2 hours.

### Incorporation of a cholesterol tracer in human plasma

Human plasma (total cholesterol: 230  $\pm$  42mg/dL (Biomerieux enzymatic test)) was obtained from non-fasting healthy donors (French Blood Service), heat-inactivated, 0.22 $\mu$ m-filtered then distributed in aliquots and stored at -20°C until utilization. Labelling procedure was as follow: [<sup>3</sup>H]-cholesterol (42 $\mu$ Ci per mg of plasma cholesterol) or nitrobenzoxadiazol-cholesterol (NBD-cholesterol) (1.6mg per mg of plasma cholesterol) was transferred in a glass tube and dried using nitrogen gas. Human plasma was added and incubated overnight at 37°C. The specific activity of tritiated plasma was ~14.9x10<sup>6</sup>cpm per mg of cholesterol.

### HDL preparation

Human plasma was obtained from non-fasting healthy donors (French Blood Service). HDL (d=1.12-1.21 g/ml) were prepared by sequential ultracentrifugation. Protein content was determined using Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher).

### Fluorescent microscopy analysis

Differentiated Caco-2/TC7 cells were incubated at 37°C for 6 hours with 2.5mL DMEM containing NBD-cholesterol-labelled plasma (1/40; vol/vol) in the basolateral compartment and 1.5mL of the indicated phospholipid/bile salt micelles in the apical compartment. Cells were then washed twice with ice-cold PBS, incubated with paraformaldehyde (PFA) 4% for 20 minutes then with L-lysine 0.1M for 1 hour. Fixed cells were permeabilized with 0.1% TritonX-100 in PBS at 37°C for 10 minutes. The transwell membrane was then

Dugardin, Briand et al: Retrograde cholesterol transport in the human Caco-2/TC7 cell line: a model to study trans-intestinal cholesterol excretion in atherogenic and diabetic dyslipidemia

detached from the insert, non-specific site blocked with Image-iT FX Signal Enhancer (Invitrogen), incubated overnight with primary anti-EEA1 antibody (BD Transduction Laboratories, ref 610456) then with secondary anti-mouse antibody (ThermoFisher, ref A10037) and mounted in fluorescent mounting medium (Dako) containing Hoechst 1:1,000 (Sigma-Aldrich). Preparations were analyzed with a Zeiss LSM 710 confocal microscope. Staining and colocalization Mander's coefficients were quantified using Image J software (<http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016).

### **Post-nuclear cellular extract preparation and western blot analysis**

Caco-2/TC7 cells were washed twice in PBS and harvested in lysis buffer (1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and protease inhibitor cocktail Complete (Roche) in PBS). Samples were sonicated for 5 minutes (Bioruptor, Diagenode). Homogenates were centrifuged (16,000g - 10min) and the supernatants stored at -20°C. Protein concentration was determined using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). 40µg of cellular proteins were separated on a 10% SDS-PAGE then transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was then incubated overnight with LDLR (LP02, Oncogene - 1:100) or β-Actin (SC-1616, Santa Cruz - 1:1,000) antibodies. After a 1 hour-incubation period with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Sigma-Aldrich - 1:2,000), protein revelation was performed using the SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) by chemiluminescence (Camera Gbox, SynGene) and band intensity was measured (GeneTools software, SynGene).