



**HAL**  
open science

# Fonction mitochondriale des cellules épithéliales intestinales et homéostasie intestinale chez l'obèse

Thomas Guerbette

► **To cite this version:**

Thomas Guerbette. Fonction mitochondriale des cellules épithéliales intestinales et homéostasie intestinale chez l'obèse. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2023. Français. NNT : 2023URENB006 . tel-04449602

**HAL Id: tel-04449602**

**<https://theses.hal.science/tel-04449602>**

Submitted on 9 Feb 2024

**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.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 637  
*Sciences de la vie et de la santé*  
Spécialité : *Nutrition et Pathologies Métaboliques*

Par

**Thomas GUERBETTE**

**Fonction mitochondriale des cellules épithéliales intestinales et  
homéostasie intestinale chez l'obèse**

**Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 8 Février 2023**

**Unité de recherche : NuMeCan (Nutrition, Métabolismes et Cancer), UMR INRAE 1341, UMR INSERM 1317,  
Université de Rennes**

## **Rapporteurs avant soutenance :**

Isabelle Niot

Professeure Universitaire, UMR INSERM 1231 Lipides Nutrition Cancer (LNC), L'Institut Agro Dijon

Moïse Coëffier

Professeur Universitaire, Praticien Hospitalier, UMR INSERM 1073, Université de Rouen

## **Composition du Jury :**

Présidente :

Dominique Lagadic-Gossmann

Directrice de recherche, IRSET INSERM UMR\_S1085

Examineur :

François Blachier

Directeur de Recherche, Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (PNCA) UMR INRAE-AgroParisTech Paris 0914

Dir. de thèse : Gaëlle Boudry

Directrice de Recherche, NuMeCan UMR INRAE 1341, UMR INSERM 1317 Université de Rennes

Co-enc. de thèse : Annaïg Lan

Maître de Conférences, PNCA UMR INRAE-AgroParisTech Paris 0914 NuMeCan UMR INRAE 1341, UMR INSERM 1317, Université de Rennes

## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier Isabelle Niot et Moïse Coëffier pour avoir accepté d'évaluer ce manuscrit de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie également Dominique Lagadic-Gossmann et François Blachier pour leur participation à ce jury de thèse.

Un grand merci à mes encadrantes Gaëlle Boudry et Annaïg Lan pour ces 3 années (plus ou moins quelques mois !) d'encadrement de thèse. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée en retenant ma candidature à ce projet et pour l'autonomie que vous m'avez laissée pour mener à bien ce projet de thèse. Merci également pour votre soutien tant dans les expérimentations que sur le plan personnel qui m'ont permis d'avancer et de prendre de plus en plus confiance en moi au cours de cette thèse. Merci également pour m'avoir permis d'accomplir un rêve en passant plusieurs jours à Tokyo ! Ce congrès international a été l'occasion de découvrir la culture japonaise et à la fois d'échanger avec des personnes de tout horizon.

Je remercie Véronique Douard, Malgorzata Rak et Frédérique Dessauge pour leur participation active au sein du comité de suivi individuel, pour leurs conseils et leur intérêt dans ce projet de recherche.

Un grand merci aux membres de l'équipe EAT pour leur accueil et pour leur grande aide dans les expérimentations et notamment merci à Gwénaëlle Randuineau, Régis Janvier, Patrice Dahirel et Mégane Bostoën pour leur importante contribution dans l'organisation des expérimentations, la préparation des échantillons, le suivi des souris et les expérimentations *in vitro*. Merci à Nicole Gueguen pour avoir assuré toutes mes commandes. Ça aura vraiment été agréable de travailler avec vous ! Merci également à tous les membres de l'équipe EXPRES pour leur accueil, déjà depuis le M2 sous la direction d'Orlando Musso, et tous nos échanges qui ont permis de faire avancer cette thèse. Merci également à Bernard Fromenty grâce à qui j'ai appris énormément de choses sur la fonction mitochondriale.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de Biochimie et Nutrition humaine de l'Institut Agro et notamment Vincent Rioux, Daniel Catheline et Philippe Legrand. Vous m'avez tout d'abord donné goût à la biochimie des lipides et au métabolisme dès les bancs de l'Agro. Merci à Vincent Rioux pour tous nos échanges entre le master et la thèse, pour m'avoir dirigé vers ce sujet de thèse et pour toutes nos discussions et ta grande collaboration dans ce projet. Un grand merci également à Daniel Catheline pour ton aide, tes connaissances et ta bonne humeur dans les expérimentations tout comme dans les séances de TP.

Merci à Martin Beaumont pour sa collaboration dans ce projet de thèse, son accueil à Toulouse, et pour l'obtention et l'analyse d'un certain nombre de résultats présentés dans cette thèse.

Merci à Mireille Andriamihaja pour tous nos échanges et pour le partage de ta connaissance ainsi que pour ta collaboration dans ce projet de recherche.

Merci aux membres de la plateforme H2P2, et notamment Roselyne Viel et Alain Fautrel, pour leurs conseils et leur importante participation dans l'analyse des tissus présentés dans ce manuscrit. Merci également à Agnès Burel de la plateforme MRic pour la prise en charge des échantillons et les sessions d'acquisition des images de microscopie électronique. Merci aux membres de l'animalerie ARCHE pour leur aide dans la réalisation des expérimentations animales.

Merci à Kilian Petitjean pour ta grande aide pour mener à bien ce projet de thèse et pour m'avoir sorti d'un certain nombre de soucis techniques. Merci de m'avoir initié au Nile red et à la  $\beta$ -oxydation pour faire des lipides !! Parce qu'après l'effort, le réconfort, merci pour toutes nos parties et nos LAN en mer, pour les soirées au bar comme pour les après-midis raclette et jeux !

Merci à Thomas Gautier pour tous ces moments où nous avons pu évacuer la pression ! On aura quand même bien rigolé pendant nos thèses entre nos sorties au bar, nos balades nocturnes dans Rennes, nos moments plaintes pour se raconter nos problèmes et nos concours de blagues foireuses ! Comment on fait là ?!



Merci à Elise Lelou pour ta bonne humeur (je dirais même qu'elle est égale) au cours des soirées Koh-Lanta et films ainsi que pour tes conseils déjà depuis mon M2 à NuMeCan !

Merci à Youenn Launay et Lise Desquilles pour leur bonne humeur quotidienne dans le légendaire bureau 105 ! Merci à Hanadi Nahas, Kévin Maunand, Fabien Foucher et Hugo Coppens pour être venus nous rendre visite et pour tous les bons moments passés ensemble au bowling et au bar (c'est pas bon pour le sport) !

Merci à Sarah Rochdi pour tous nos échanges et pour ton aide dans un certain nombre de manips !

Merci également aux doctorants que j'ai croisés durant mon séjour à NuMeCan, et notamment Yoann Daniel, Julien Allard, Yann Verres, Kévin Bevant, Clémence Penhoat, Lucille Moutaux et Matthiau Horeau.

Un grand merci aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer au cours de cette thèse, pour leur bonne humeur et leur importante contribution dans l'obtention des résultats. Un grand merci donc à Jean-Baptiste Perrin (« un lipide c'est un lipide »), à Manon Brien, à Marine Buraud et à Marie Lemetayer.

Un énorme merci à Vincent Ciesielski pour m'avoir accompagné durant toute cette thèse et pour ton soutien moral ainsi que ton énergie positive au quotidien qui m'ont permis d'aller jusqu'au bout. Parce qu'en plus d'avoir été un soutien sans faille sur le plan personnel, tu as participé à l'obtention et la mise en forme d'un grand nombre de résultats de ce manuscrit ce qui m'a fait gagner un temps précieux ! Maintenant que tu as commencé une thèse toi aussi, j'ai aucun doute sur ta réussite future.

Merci à ma famille, et notamment mes parents, mon frère et grands-parents pour m'avoir soutenu durant ces 8 dernières années. Ça fait déjà plusieurs années que j'ai quitté Rouen sans que vous ne compreniez trop pourquoi mais avec ce manuscrit, vous allez savoir !

## Sommaire

---

Liste des publications et communications .....	5
Liste des abréviations .....	7
Liste des figures.....	9
Liste des tableaux.....	11
Introduction bibliographique .....	13
<b>I. L'obésité : origines et conséquences .....</b>	<b>14</b>
I.1. Définition de l'obésité selon l'indice de masse corporelle .....	14
I.2. Des indicateurs complémentaires à l'IMC dans la caractérisation de l'obésité .....	16
I.3. Implication de l'obésité dans le syndrome métabolique .....	16
I.4. Étiologie de l'obésité et régimes obésogènes .....	17
<b>II. L'intestin, un organe barrière en perpétuelle dynamique .....</b>	<b>20</b>
II.1. Une double organisation selon un axe proximal/distal et crypte/villosité .....	20
II.2. Des cellules épithéliales intestinales organisées selon un axe crypte/villosité .....	21
II.3. La dynamique de renouvellement épithélial.....	23
II.4. Différenciation des cellules progénitrices intestinales .....	24
II.5. L'épithélium intestinal : une barrière étanche et sélective .....	25
<b>III. Régime obésogène et effets sur l'endotoxémie, l'hyperperméabilité intestinale et l'inflammation.....</b>	<b>29</b>
III.1. Régime obésogène et endotoxémie .....	29
III.2. Perméabilité intestinale et régime obésogène.....	30
III.2.1. Perméabilité et passage du LPS.....	30
III.2.2. Perméabilité intestinale et régime obésogène .....	32
III.3. Inflammation intestinale de bas-grade et régime obésogène .....	34
<b>IV. La mitochondrie, source de l'énergie cellulaire.....</b>	<b>37</b>
IV.1. Structure des mitochondries.....	37
IV.2. Le génome mitochondrial .....	38
IV.3. Dynamique mitochondriale : biogenèse, fusion, fission, et mitopagie .....	39
IV.3.1. Biogénèse .....	39
IV.3.2. Fusion et fission.....	40
IV.3.3. Mitophagie .....	43
IV.3.4. Contrôle qualité de la mitochondrie par la <i>mitochondrial unfolded protein response</i> .....	43
IV.4. La bioénergétique mitochondriale .....	44
IV.5. Génération des espèces réactives de l'oxygène .....	47
<b>V. Homéostasie intestinale et fonction mitochondriale des cellules épithéliales intestinales.....</b>	<b>51</b>
V.1. Zonation de l'épithélium intestinal et activités métaboliques le long de l'axe crypte-villosité .....	51

V.1.1.	Activités métaboliques le long de l'axe crypte-villosité .....	51
V.1.2.	Implications des médiateurs mitochondriaux dans l'induction de la différenciation des cellules progénitrices .....	54
<b>V.2.</b>	<b>La fonction mitochondriale dans le contrôle de l'homéostasie des cellules souches intestinales .....</b>	<b>54</b>
<b>V.3.</b>	<b>Bioénergétique mitochondriale et hypoxie physiologique dans l'intestin .....</b>	<b>56</b>
<b>V.4.</b>	<b>Fonction mitochondriale et apoptose induite par les espèces réactives de l'oxygène mitochondriales .....</b>	<b>57</b>
<b>V.5.</b>	<b>Fonction mitochondriale et barrière intestinale .....</b>	<b>58</b>
<b>VI.</b>	<b>Substrats énergétiques non lipidiques, métabolites luminaux et conséquences métaboliques sur les CEI .....</b>	<b>60</b>
<b>VI.1.</b>	<b>Substrats énergétiques des cellules épithéliales intestinales.....</b>	<b>60</b>
<b>VI.2.</b>	<b>Effets des métabolites bactériens et des dérivés de nutriments ou de composés alimentaires sur la fonction mitochondriale des CEI .....</b>	<b>61</b>
VI.2.1.	Des métabolites substrats de la chaîne de respiration mitochondriale .....	63
VI.2.1.a.	<i>Glucose</i> .....	63
VI.2.1.b.	<i>Glutamine et glutamate</i> .....	64
VI.2.1.c.	<i>Butyrate</i> .....	65
VI.2.1.d.	<i>Polyamines</i> .....	67
VI.2.1.e.	<i>Sulfure d'hydrogène</i> .....	68
VI.2.2.	Des métabolites perturbateurs de la chaîne de respiration mitochondriale .....	70
VI.2.2.a.	<i>Sulfure d'hydrogène</i> .....	70
VI.2.2.b.	<i>Indole</i> .....	71
VI.2.2.c.	<i>Dérivés de la L-tyrosine : p-crésol et acide 4-hydroxyphénylacétique</i> .....	71
VI.2.2.d.	<i>Ammoniac</i> .....	72
VI.2.2.e.	<i>Acides biliaires</i> .....	72
VI.2.2.f.	<i>Delta-valerobetaine</i> .....	73
<b>VII.</b>	<b>Absorption des lipides et métabolisme dans l'entérocyte .....</b>	<b>74</b>
<b>VII.1.</b>	<b>Structure et nomenclature des acides gras .....</b>	<b>74</b>
<b>VII.2.</b>	<b>Digestion, absorption et export des lipides au niveau intestinal .....</b>	<b>75</b>
VII.2.1.	Une prédigestion dans l'estomac .....	75
VII.2.2.	La formation de micelles dans le duodénum .....	75
VII.2.3.	Absorption au niveau de l'entérocyte .....	76
VII.2.4.	Devenir des acides gras dans l'entérocyte .....	77
VII.2.5.	Les chylomicrons : structure d'export des lipides .....	79
VII.2.6.	Les gouttelettes lipidiques : un stockage de lipides en perpétuelle dynamique.....	80
VII.2.7.	Les voies de remobilisation des acides gras des gouttelettes lipidiques.....	82
<b>VII.3.</b>	<b>La <math>\beta</math>-oxydation des acides gras saturés .....</b>	<b>84</b>
VII.3.1.	L'activation des acides gras carnitine-dépendante .....	84
VII.3.2.	La $\beta$ -oxydation dans la matrice mitochondriale .....	85
<b>VIII.</b>	<b>Fonction mitochondriale des cellules épithéliales intestinales et régime riche en lipides .....</b>	<b>87</b>
<b>VIII.1.</b>	<b>Fonction mitochondriale des entérocytes lors de la consommation d'un HFD.....</b>	<b>87</b>
VIII.1.1.	Un shift métabolique vers le catabolisme des lipides .....	87
VIII.1.2.	Rôle du métabolisme lipidique des CEI dans l'apparition de l'obésité .....	88
VIII.1.3.	Catabolisme lipidique et risques de stress oxydant .....	89
VIII.1.4.	Évaluation de la fonction mitochondriale des CEI de l'intestin grêle dans un HFD.....	89

<b>IX.</b>	<b>Fonction mitochondriale des CEC, homéostasie intestinale et HFD.....</b>	<b>90</b>
IX.1.1.	Effets des régimes HFD sur la fonction mitochondriale des CEC in vivo .....	90
IX.1.2.	Effets des acides gras saturés sur la fonction mitochondriale de CEC in vitro .....	93
IX.1.3.	Influence de métabolites non-lipidiques dérivés du HFD.....	93
<b>IX.2.</b>	<b>Dysfonction mitochondriale des CEI et des CEC induite par un HFD et conséquences sur l'homéostasie intestinale.....</b>	<b>94</b>
<b>IX.3.</b>	<b>Dysfonction mitochondriale des CEI et dysbiose.....</b>	<b>96</b>
<b>Objectifs de la thèse .....</b>		<b>100</b>
<b>Partie I : Role de la fonction mitochondriale dans l'homeostasie de l'epithelium intestinal dans un contexte sain et d'obesite induite par un regime.....</b>		<b>103</b>
<b>Partie II : Impact d'une surcharge en lipides sur la fonction mitochondriale des CEI <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> et conséquences sur l'homéostasie jéjunale.....</b>		<b>123</b>
Partie II.1 : L'accumulation de lipides dans les CEI réduit la biogénèse mitochondriale, augmente la prolifération et la perméabilité intestinale chez la souris .....		128
Partie II.2 : La consommation d'un régime obésogène induit une stéatose entérocytaire, une diminution de l'expression de <i>Pgc1a</i> et une activation de la machinerie antioxydante dès 3 jours chez la souris.....		162
Partie II.3 : Un traitement avec des acides gras stéarique et oléique induit une accumulation lipidique et une dysfonction mitochondriale dans un modèle murin d'organoïdes de jéjunum en prolifération et différenciés. ....		167
Partie II.4 : Les acides gras du régime DIO et ceux stockés sous forme de triglycérides dans les cellules épithéliales intestinales des souris obèses sont essentiellement du C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0. ....		180
Partie II.5 : Caractérisation des effets seuls ou en mélange du C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0 sur la fonction mitochondriale, le métabolisme lipidique et la perméabilité intestinale du modèle <i>in vitro</i> d'entérocytes IPEC-J2. ....		186
Partie II.6 : La fucoxanthine purifiée, un caroténoïde issu des algues brunes, stimule la fonction mitochondriale, présente des effets antioxydants et diminue l'accumulation lipidique dans le modèle IPEC-J2.....		212
<b>Partie III : Modifications de l'environnement luminal colique induites par un régime obésogène et fonction mitochondriale des cellules épithéliales coliques .....</b>		<b>229</b>
<b>Discussion générale et perspectives.....</b>		<b>267</b>
I.	Shift métabolique dans l'entérocyte et fonction mitochondriale des CEI dans un contexte de DIO .....	268
II.	Métabolisme énergétique et régulation de l'expression de <i>Pgc1a</i> .....	269
III.	Homéostasie redox dans les CEI des souris DIO .....	271
IV.	Axes thérapeutiques contre les complications associées à l'obésité ciblant le métabolisme lipidique des CEI.....	272
V.	Homéostasie jéjunale et fonction mitochondriale .....	274
VI.	Effets des sulfures sur la fuite de protons de la chaîne de respiration mitochondriale dans le côlon.....	278
VII.	Sulfures et machinerie de détoxification des CEC.....	278

VIII. Sulfures, fonction mitochondriale et homéostasie de l'épithélium colique .....	279
IX. Influence de la durée du régime et de la quantité de lipides dans les altérations métaboliques des CEI .....	280
X. De l'importance du choix des régimes hyperlipidiques et de leurs contrôles .....	281
Conclusion.....	284
Références .....	285
Annexe.....	318
Communications affichées.....	320

## LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

---

### Publications :

Guerbette, T., Boudry, G. and Lan, A. (2022) 'Mitochondrial function in intestinal epithelium homeostasis and modulation in diet-induced obesity', *Molecular Metabolism*, p. 101546. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101546>.

Guerbette, T., Beaumont, M., Andriamihaja M., Ciesielski V., Perrin J., Janvier R., Randuineau G., Leroyer P., Loréal O., Rioux V., Boudry G., Lan A. 'Obesogenic diet leads to luminal overproduction of the complex IV inhibitor H<sub>2</sub>S and mitochondrial dysfunction in mouse colonocytes', *The FASEB Journal*. 2023; 37:e22853. <https://doi.org/10.1096/fj.202201971R>

Guerbette, T., Ciesielski, V., Brien, M., Catheline, D., Viel R., Bostoen, M., Perrin, J., Rioux, V., Burel, A., Janvier, R., Lan, A., Boudry, G. 'Dietary lipid excess reduces small intestinal epithelial cell mitochondrial biogenesis associated with enhanced proliferation and increased intestinal permeability in mice'

*En preparation.*

### Communications orales :

- 7èmes rencontres Nutrition-Alimentation-Métabolisme-Sport-Santé, Rennes, France, 2021  
**Thomas Guerbette**, Manon Brien, Roselyne Viel, Vincent Rioux, Daniel Catheline, Vincent Ciesielski, Agnès Burel, Annaïg Lan, Gaëlle Boudry. Effet d'un régime obésogène sur la fonction mitochondriale des cellules épithéliales intestinales chez la souris.
- Journées Francophones de Nutrition, Lille, France, 2021  
**Thomas Guerbette**, Manon Brien, Vincent Ciesielski, Régis Janvier, Annaïg Lan, Gaëlle Boudry. Effet d'un régime obésogène sur la fonction mitochondriale des cellules épithéliales intestinales chez la souris.
- 39<sup>ème</sup> réunion du Club d'Études des Cellules Épithéliales et Digestives, Lyon, France, 2022  
**Thomas Guerbette**, Martin Beaumont, Gwénaëlle Randuineau, Patricia Leroyer, Olivier Loréal, Gaëlle Boudry, Annaïg Lan. Modifications de l'environnement luminal et dysfonction mitochondriale des cellules épithéliales coliques chez la souris obèse. – **Prix de la meilleure communication.**
- 22nd IUNS-International Congress of Nutrition, Tokyo, Japon, 2022

**Thomas Guerbette**, Manon Brien, Vincent Ciesielski, Agnes Burel, Régis Janvier, Annaïg Lan, Gaëlle Boudry. Obesogenic diet consumption impairs mitochondrial function of intestinal epithelial cells in mice - *Young Investigator Excellent Abstract Award* et obtention de la Bourse de Voyage à l'International décernée par la Société Française de Nutrition

### **Communications affichées**

- Journées scientifiques de l'école doctorale Biologie-Santé, Brest, France, 2021  
**Thomas Guerbette**, Manon Brien, Vincent Ciesielski, Régis Janvier, Annaïg Lan, Gaëlle Boudry. Effect of western diet on mitochondrial function of intestinal epithelial cells in mice.
- 22nd IUNS-International Congress of Nutrition, Tokyo, Japon, 2022  
**Thomas Guerbette**, Martin Beaumont, Mireille Andriamihaja, Gwénaëlle Randuineau, Régis Janvier, Patricia Leroyer, Olivier Loréal, Gaëlle Boudry, Annaïg Lan. Changes in colon luminal environment and mitochondrial dysfunction of epithelial cells in obese mice.

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

- **ADP** : Adénosine diphosphate
- **AGCC** : Acide gras à chaîne courte
- **AICAR** : “Adenosine analog 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside”
- **Apo** : Apolipoprotéine
- **ATGL** : “adipose triglyceride lipase”
- **Atoh1** : “Atonal homolog 1”
- **ATP** : Adénosine triphosphate
- **BAX** : “Bcl-2-associated X protein”
- **Cat** : Catalase
- **CD36** : Cluster de différenciation 36
- **CEC** : Cellule épithéliale colique
- **CEI** : Cellule épithéliale intestinale
- **CHOP** : “C/EBP homologous protein”
- **CLD** : “Cytosolic lipid droplet »
- **CPT** : Carnitine palmitoyltransférase
- **CSI** : Cellule souche intestinale
- **CTE** : Chaîne de transport des électrons
- **DCA** : Acide deoxycholique
- **DG** : Diglycérade
- **DGAT** : Diacylglycerol acyltransférase
- **DIO** : “Diet-induced obesity”
- **DNP** : Dinitrophénol
- **DRP1** : “GTPase dynamin-related protein 1 »
- **Duox2** : “Dual oxidase 2”
- **E. Coli** : *Escherichia Coli*
- **ECAR** : Taux d’acidification extracellulaire
- **EIM** : Espace intermembranaire
- **ER** : Réticulum endoplasmique
- **ERO** : Espèces réactives de l’oxygène
- **Ethe1** : “Ethylmalonic encephalopathy 1”
- **FABP** : “Fatty acid binding protein”
- **FADH2** : “flavine adénine dinucleotide”
- **FAME** : Esters méthyliques d’acides gras
- **FATP4** : “Fatty acid transport protein 4”
- **FD4** : FITC-Dextran
- **FSS** : “Fluorescein sodium salt”
- **GC-MS** : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
- **GLUT** : Transporteur de glucose
- **GO\_BP** : “Gene ontology biological process”
- **Gpx** : “Glutathion peroxidase”
- **GTPase** : Guanosine triphosphatase
- **HDAC** : Histone désacétylase
- **HES** : Hématoxyline éosine safran
- **Hes1** : “Hairy and enhancer of split-1”
- **HFD** : High fat diet
- **HIF** : Hypoxia inducible factor
- **Hk1** : Hexokinase 1
- **HNF** : “Hepatocyte Nuclear Factor”
- **HRP** : “Horseradish peroxidase”
- **HSL** : “Hormone sensitive lipase”
- **Hsp** : “Heat shock protein”
- **IL** : Interleukine
- **IMC** : Indice de masse corporelle
- **IPEC-J2** : “Intestinal Porcine Epithelial Cells – Jejunum 2”
- **Klf4** : “Kruppel-like factor 4”
- **KO** : “Knock out”
- **Krt20** : Kératine 20
- **LBP** : “Lipopolysaccharides binding protein”
- **Lgr5** : “Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5”
- **LPS** : Lipopolysaccharides
- **MAM** : Membranes associées aux mitochondries
- **MAPK** : Mitogen-activated protein kinase
- **Mfn** : Mitofusine
- **MG** : Monoacyl-glycérol
- **Miro** : Rho-gtpase mitochondriale
- **MLCK** : “Myosin light chain kinase”
- **MME** : Membrane mitochondriale externe
- **MMI** : Membrane mitochondriale interne
- **Mt** : Mitochondrial
- **mTOR** : “Mammalian target of rapamycin”
- **MTP** : “Microsomal triglyceride transfert protein”
- **mtUPR** : “Mitochondrial unfolded protein response”
- **Muc** : Mucine
- **NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide
- **NAFLD** : “Nonalcoholic fatty liver diseases”
- **Nox1** : “NADPH oxidase 1”
- **Nqo1** : “NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1”
- **Nrf** : “Nuclear respiratory factor”
- **OCR** : Taux de consommation d’oxygène



- **ODC1** : Ornithine décarboxylase
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **Opa1** : "Optic atrophy 1"
- **OXPHOS** : Phosphorylation oxydative
- **Parkin** : "RBR E3 ubiquitin protein ligase"
- **PCTV** : Vésicule de transfert des préchylomicrons
- **PDH** : Pyruvate déshydrogénase
- **PER** : Taux d'efflux de protons
- **PGC1 $\alpha$**  : "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) coactivator1  $\alpha$ "
- **Pink1** : "Phosphatase and tensin homolog-induced kinase 1"
- **PL** : Phospholipides
- **PLIN** : Périlipine
- **Ppar** : "Peroxisome proliferator activated receptor"
- **PTP** : Pore de transition de perméabilité
- **RE** : Réticulum endoplasmique
- **Sglt1** : Cotransporteur Na<sup>+</sup>-glucose
- **Sirt** : Sirtuine
- **Sod** : "Superoxide dismutase"
- **SQOR** : Sulfure quinone oxydoréductase
- Cellules TA: Cellules amplificatrices de transit
- **TCA** : "Tricarboxylic acid cycle"
- **TEER** : Résistance électrique trans-épithéliale
- **Tfam** : "Mitochondrial transcription factor A"
- **TG** : Triglycérides
- **TLR** : "Toll like receptor »
- **Tnfa** : "Tumor necrosis factor  $\alpha$ "
- **TOMM** : "Translocase of outer mitochondrial membrane"
- **Tst** : Thiosulfate sulfure transférase
- **Ucp** : "Uncoupling protein"
- **VLDL** : Lipoprotéine de très faible densité
- **WD** : "Western Diet"
- **ZO** : "Zonula occludens"

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Étiologie de l'obésité .....	15
Figure 2. Proportion d'adultes en situation d'obésité ou de surpoids dans le monde en 2016 .....	15
Figure 3. Pathologies associées à l'obésité .....	16
Figure 4. Segments du tractus gastro-intestinal et organisation de la muqueuse intestinale.....	20
Figure 5. Organisation des cellules épithéliales intestinales le long de l'axe crypte/villosité dans l'intestin grêle et le long de la crypte colique .....	22
Figure 6. Facteurs régulant la différenciation des cellules épithéliales intestinales .....	24
Figure 7. Jonctions entre deux cellules épithéliales intestinales voisines et translocation du lipopolysaccharide .....	26
Figure 8. Mécanismes à l'origine de l'inflammation chronique de bas-grade chez l'obèse .....	29
Figure 9. Passage du LPS par la voie paracellulaire dans le cadre d'une augmentation de la perméabilité intestinale, notamment induite par la consommation d'un régime obésogène .....	31
Figure 10. Synthèse des effets potentiels de la consommation chronique d'un régime riche en lipides sur la barrière intestinale .....	36
Figure 11. Biogénèse mitochondriale et cascade de signalisation .....	40
Figure 12. Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la fusion et la fission mitochondriale .....	42
Figure 13. Bioénergétique mitochondriale des cellules épithéliales intestinales .....	46
Figure 14. Production d'espèces réactives de l'oxygène mitochondriales (mtERO) et principales voies de détoxification.....	47
Figure 15. Mécanismes possibles de formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) pendant la $\beta$ -oxydation.....	48
Figure 16. Fonction mitochondriale des cellules épithéliales intestinales et zonation métabolique le long de l'axe crypte-villosité.....	52
Figure 17. Maintien de l'hypoxie dans l'intestin et fonction mitochondriale des cellules épithéliales intestinales .....	57
Figure 18. Oxydation de la glutamine par les CEI .....	64
Figure 19. Oxydation du butyrate dans les mitochondries des colonocytes.....	66
Figure 20. Voies de formation du H <sub>2</sub> S .....	69
Figure 21. Détoxification mitochondriale du H <sub>2</sub> S et production d'énergie .....	70
Figure 22. Structure d'un triglycéride .....	74
Figure 23. Comparaison structurelle des chylomicrons et des gouttelettes lipidiques cytosoliques .....	79
Figure 24. Image de microscopie électronique d'un entérocyte de souris C57BL/6 2 heures après administration orale d'huile d'olive .....	81
Figure 25. Modèle actuel de formation des gouttelettes lipidiques cytosoliques .....	82
Figure 26. Lipolyse des gouttelettes lipidiques cytosoliques.....	83
Figure 27. Entrée des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie .....	84
Figure 28. Bilan du devenir des acides gras dans l'entérocyte .....	86
Figure 29. La consommation d'un régime obésogène dès 3 jours suffit à induire une stéatose entérocytaire associée à une induction de la machinerie antioxydante, une altération de la dynamique mitochondriale et la diminution du phénotype différencié.....	165
Figure 30. Caractérisation d'organoïdes jéjunaux et de leur état de différenciation en fonction des conditions de culture. ....	172
Figure 31. Évaluation qualitative de la stéatose dans des organoïdes jéjunaux murins en prolifération et différenciés après un traitement de 24h avec du C18:0 et du C18:1 (150 $\mu$ M chacun). ....	173
Figure 32. Expression génique de cibles du métabolisme lipidique des entérocytes sur des organoïdes en prolifération ou différenciés traités avec un mélange d'acides gras.....	174
Figure 33. Analyse du métabolisme énergétique des organoïdes en prolifération ou différenciés en réponse à un traitement de 24h avec un mélange d'acides gras.....	176
Figure 34. Expression génique du gène régulateur de la biogénèse mitochondriale <i>Pgc1a</i> et de gènes codant pour des sous-unités des complexes de la chaîne de respiration mitochondriale dans des organoïdes en prolifération ou différenciés traités avec un mélange d'acides gras.....	177

Figure 35. Expression relative de gènes impliqués dans la machinerie antioxydante dans des organoïdes en prolifération ou différenciés traités par un mélange d'acides gras.....	178
Figure 36. Profil d'acides gras issus des aliments CTRL et DIO. ....	182
Figure 37. Quantification des acides gras des triglycérides, des phospholipides et libres dans les cellules épithéliales intestinales. ....	183
Figure 38. Impact d'un mélange d'acides gras, avec ou sans acide palmitique, sur la stéatose entérocytaire, le métabolisme énergétique et le stress oxydant des IPEC-J2. ....	192
Figure 39. Évaluation de la viabilité et de la cytotoxicité en réponse à 3 jours de traitement aux acides gras. ....	193
Figure 40. Impact de l'acide laurique sur la stéatose entérocytaire, la fonction mitochondriale et le stress oxydant des IPEC-J2. ....	196
Figure 41. Impact de l'acide myristique sur la stéatose entérocytaire, la fonction mitochondriale et le stress oxydant des IPEC-J2. ....	199
Figure 42. Impact de l'acide palmitique sur la stéatose entérocytaire, la fonction mitochondriale et le stress oxydant des IPEC-J2. ....	202
Figure 43. Impact de l'acide stéarique sur la stéatose entérocytaire, la fonction mitochondriale et le stress oxydant des IPEC-J2. ....	205
Figure 44. Comparaison des effets de l'acide laurique, myristique, palmitique et stéarique sur la stéatose, la bioénergétique et la capacité de $\beta$ -oxydation des IPEC-J2.....	208
Figure 45. Effets des acides gras sur la perméabilité épithéliale des IPEC-J2.....	210
Figure 46. Évaluation de la cytotoxicité après traitement à la fucoxanthine.....	215
Figure 47. Bioénergétique cellulaire après un traitement à la fucoxanthine.....	216
Figure 48. Effet de la fucoxanthine sur l'activité des complexes mitochondriaux et la capacité oxydative. ..	218
Figure 49. Effet de la fucoxanthine sur la production de peroxydes et sur l'expression de gènes de la machinerie antioxydante. ....	219
Figure 50. Effet de la fucoxanthine sur la production de peroxydes et l'activation de la machinerie antioxydante des IPEC-J2 en situation de stress oxydant. ....	221
Figure 51. Effet de la fucoxanthine sur la bioénergétique cellulaire en situation de stress oxydant. ....	223
Figure 52. Effets de la fucoxanthine sur la stéatose entérocytaire des IPEC-J2 traitées avec un mélange d'acides gras. ....	224
Figure 53. Effet de la fucoxanthine sur la production de peroxydes des IPEC-J2 stéatosées en situations basale et de stress oxydant.....	225
Figure 54. Analyse par western blot de l'expression de l'AMPK dans les cellules épithéliales intestinales de souris obèses. ....	270
Figure 55. La consommation d'un régime obésogène pendant 22 semaines diminue la perméabilité transcellulaire chez la souris. ....	275
Figure 56. La consommation d'un régime obésogène pendant 22 semaines induit une augmentation de l'expression de I/22 dans la muqueuse jéjunale. ....	276
Figure 57. Mécanismes potentiels décrivant les liens entre perturbations métaboliques des CEI, l'augmentation de la prolifération et augmentation de la perméabilité intestinale. ....	277
Figure 58. Profil des acides gras en pourcentage des lipides totaux des régimes Diet-Induced Obesity (DIO ; D12331) et Western Diet (WD ; D12451).....	281
Figure 59. Schéma bilan des effets provoqués par la consommation d'un régime obésogène sur la fonction mitochondriale des cellules épithéliales jéjunales et coliques et l'homéostasie intestinale. ....	284

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1. Synthèse des critères de définition du syndrome métabolique .....	17
Tableau 2. Synthèse des études décrivant l'effet d'un régime riche en lipides sur la production de cytokines au niveau intestinal .....	35
Tableau 3. Description des complexes de la chaîne de respiration mitochondriale .....	38
Tableau 4. Etudes décrivant les métabolites bactériens retrouvés dans les fluides de sujets obèses .....	62
Tableau 5. Bilan de production d'ATP par glycolyse et oxphos .....	63
Tableau 6. Bilan de l'oxydation de la glutamine/glutamate .....	65
Tableau 7. Comparaison entre gouttelette lipidique de l'entérocyte et chylomicron .....	79
Tableau 8. Bilan de production d'ATP par la $\beta$ -oxydation d'un acide gras à 2N carbones .....	85
Tableau 9. Synthèse des études <i>in vivo</i> sur les effets de la consommation d'un hfd sur les paramètres métaboliques des cellules épithéliales intestinales .....	92
Tableau 10 : Liste des primers murins utilisés pour la RT-qPCR .....	170
Tableau 11. Quantités d'acides gras des triglycérides des cellules épithéliales intestinales exprimées en $\mu$ g par mg de protéines.....	184
Tableau 12 : Liste des primers porcins utilisés pour la RT-qPCR.....	188



## **INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

---

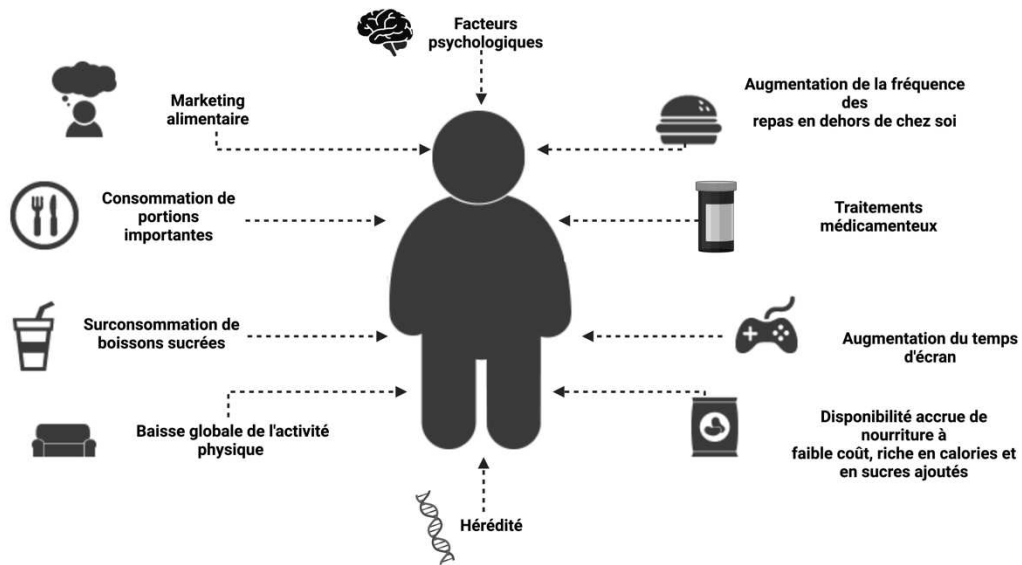
# I. L'OBESITE : ORIGINES ET CONSEQUENCES

---

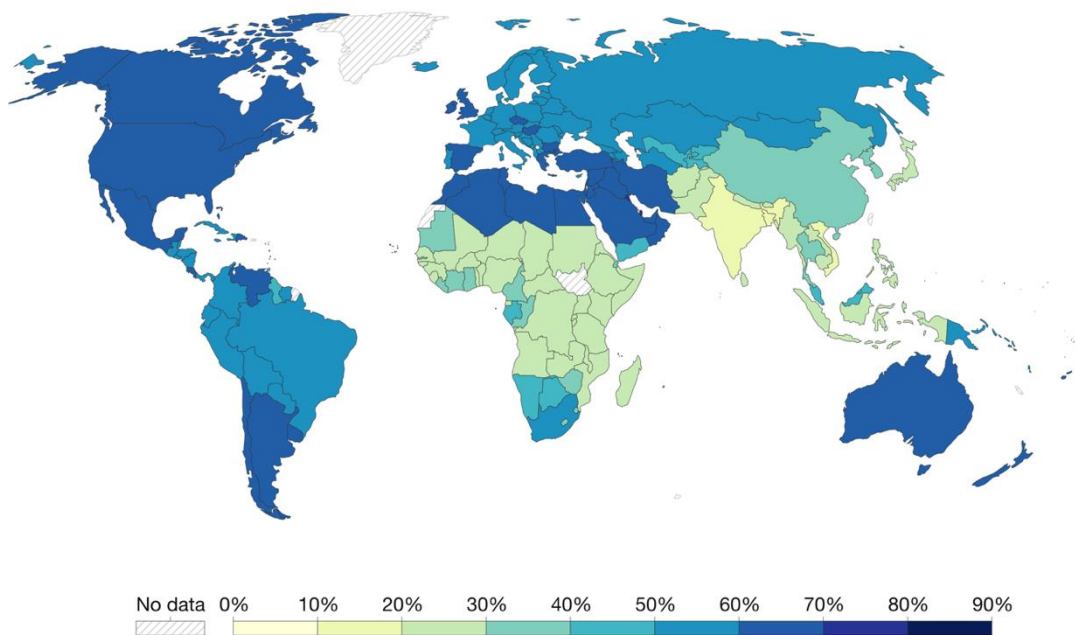
## I.1. Définition de l'obésité selon l'indice de masse corporelle

L'obésité et le surpoids se définissent par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme étant une « accumulation anormale ou excessive de graisse, qui nuit à la santé ». Cette accumulation repose sur un déséquilibre énergétique entre les calories consommées et les calories dépensées et résulte de l'intrication de plusieurs facteurs (**Figure 1**). Étant donné l'évolution des mœurs dans les pays développés, l'obésité et surpoids ne cessent d'augmenter année après année au point d'avoir triplés depuis 1975. En 2016, il a été évalué que 39% de la population adulte mondiale était en surpoids et 13% obèses, représentant 1,9 milliards d'individus en surpoids et 650 millions obèses ("Obésité et surpoids," 2022) (**Figure 2**).

Un individu adulte est considéré en surpoids lorsque son Indice de Masse Corporelle (IMC), exprimé en  $\text{kg/m}^2$ , est supérieur ou égal à  $25 \text{ kg/m}^2$  et obèse lorsque son IMC est supérieur à  $30 \text{ kg/m}^2$ . Après ce seuil, l'IMC classe l'obésité du stade modéré au stade massif en fonction de sa gravité. Cela étant, bien que l'IMC ne soit pas directement un indicateur d'adiposité, il permet d'approximer de manière non-invasive le stade d'obésité d'un individu. Cet indice est en effet fortement corrélé avec la masse grasse totale de l'individu ainsi que sa masse de tissu adipeux abdominal, dont l'augmentation présente le plus de risque pour la santé (Browning et al., 2011).



**FIGURE 1. ÉTIOLOGIE DE L'OBESITE**  
*Figure adaptée de ("Childhood obesity causes," 2022)*



Source: WHO, Global Health Observatory

OurWorldInData.org/obesity • CC BY

**FIGURE 2. PROPORTION D'ADULTES EN SITUATION D'OBESITE OU DE SURPOIDS DANS LE MONDE EN 2016**

*Données obtenues pour des femmes et des hommes dont l'âge est supérieur ou égal à 18 ans et dont l'indice de masse corporel est supérieur à 25 kg/m<sup>2</sup>. D'après l'OMS 2022.*

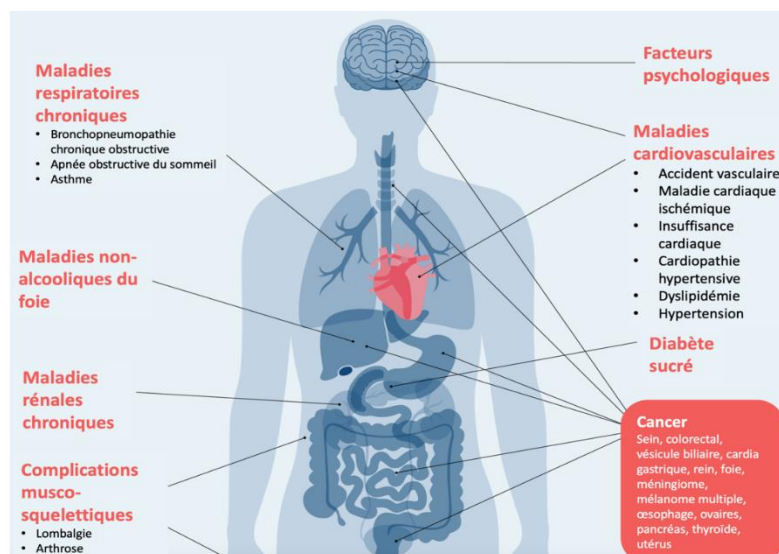


## I.2. Des indicateurs complémentaires à l'IMC dans la caractérisation de l'obésité

En complément de l'IMC, d'autres indicateurs ont été proposés dans la caractérisation de l'obésité afin d'évaluer la quantité de tissu adipeux viscéral abdominal. Le tour de taille ainsi que le diamètre sagittal abdominal, dont la mesure nécessite le recours à l'imagerie, ont été montrés comme étant caractéristiques du développement de la masse grasse abdominale. Une augmentation du tour du taille et du rapport taille/hanche est d'ailleurs fortement corrélée avec une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires, chez la femme comme chez l'homme (Pouliot et al., 1994), et ceci de façon indépendante de l'IMC (Lee et al., 2008; Yusuf et al., 2005). Il a alors été considéré qu'un tour de taille supérieur à 100 cm, ou un diamètre sagittal abdominal supérieur à 25 cm, était associé à des désordres métaboliques pouvant potentiellement causer des athéromes (Pouliot et al., 1994). Depuis 2000, l'OMS recommande donc de prendre en compte le tour de taille en plus de l'IMC pour prédire le risque d'apparition de comorbidités associées à l'obésité (OMS, 2000). De plus, la tomographie ou l'imagerie à résonance magnétique permettent de déterminer la masse grasse d'un individu de manière plus précise.

## I.3. Implication de l'obésité dans le syndrome métabolique

Outre l'accumulation de masse grasse, l'obésité et le surpoids constituent un risque majeur d'apparition de complications et de maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, les troubles musco-squelettiques et certains cancers, dont celui du côlon (**Figure 3**).



**FIGURE 3. PATHOLOGIES ASSOCIEES A L'OBESITE**  
Adapté de (OMS, 2022)

Les complications associées à l'obésité provoquent la mort de 4 millions de personnes chaque année (OMS, 2022). Parmi ces complications, le syndrome métabolique désigne l'association de plusieurs troubles d'origine lipidique, glucidique ou vasculaire dus à la présence d'un excès de graisse viscérale. Les personnes atteintes de syndrome métabolique présentent un tour de taille important et au moins deux troubles métaboliques parmi lesquels une hyperglycémie, une dyslipidémie (augmentation des concentrations circulantes des triglycérides (TG) et une diminution de celles des lipoprotéines de haute densité) et une hypertension artérielle. L'ensemble des critères permettant d'établir le diagnostic du syndrome métabolique sont repris dans le **Tableau 1**.

**TABLEAU 1. SYNTHÈSE DES CRITÈRES DE DÉFINITION DU SYNDROME MÉTABOLIQUE**

*Les critères ont été établis à partir de la National Cholesterol Education Program (NCEP) de l'Adult Treatment Program III (APT III), de l'OMS, du European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR) et de l'International Diabetes Federation. Adapté de (Huang, 2009).*

	NCEP APT III (Révision 2005)	OMS (1998)	EGIR (1999)	IDF (2005)
<b>Requis</b>	Aucun	Résistance à l'insuline*	Hyperinsulinémie*** (insuline plasmatique > 75e percentile)	Obésité abdominale <sup>§</sup> (tour de taille ≥ 94 cm (♂), ≥ 80 cm (♀))
<b>Critère</b>	Un des 5 critères ci-dessous	Résistance à l'insuline ou diabète, plus 2 des 5 critères ci-dessous	Hyperinsulinémie, plus 2 des 4 critères ci-dessous	Obésité, plus 2 des 4 critères ci-dessous
<b>Obésité</b>	Tour de taille : > 101,6 cm (♂), 88,9 cm (♀)	Rapport taille / hanche : > 0,90 (♂), > 0,85 (♀) ; ou IMC > 30 kg/m <sup>2</sup>	Tour de taille : ≥ 94 cm (♂), ≥ 80 cm (♀)	Obésité abdominale déjà requise
<b>Hyperglycémie</b>	Glycémie à jeun ≥ 100 mg/dL ou traitement pharmacologique	Résistance à l'insuline déjà requise	Résistance à l'insuline déjà requise	Glycémie à jeun ≥ 100 mg/dL
<b>Dyslipidémie</b>	TG ≥ 150 mg/dL ou traitement pharmacologique	TG ≥ 150 mg/dL ou HDL-C : < 35 mg/dL (♂), < 39 mg/dL (♀)	TG ≥ 177 mg/dL ou HDL-C < 39 mg/dL	TG ≥ 150 mg/dL ou traitement pharmacologique
<b>Dyslipidémie (critère secondaire)</b>	Cholestérol HDL : < 40 mg/dL (♂), < 50 mg/dL (♀) ; ou traitement pharmacologique			
<b>Hypertension</b>	Pression systolique > 130 mmHg ou pression diastolique > 85 mmHg ou traitement pharmacologique	≥ 140/90 mmHg	≥ 140/90 mmHg ou traitement pharmacologique	Pression systolique > 130 mmHg ou pression diastolique > 85 mmHg ou traitement pharmacologique
<b>Autres critères</b>		Microalbuminurie**		

\*Tolérance au glucose altérée ; glycémie à jeun altérée ; diabète de type 2 ; résistance à l'insuline ; autres critères dont des tests clamp euglycémique

\*\*Excretion de l'albumine urinaire ≥ 20 µg/min ou rapport albumine / créatine ≥ 30

\*\*\*Fiable seulement pour les patients sans diabète de type 2

§Valeurs sont données pour les femmes et hommes européens.

#### I.4. Étiologie de l'obésité et régimes obésogènes

Les causes de l'obésité sont multiples et résultent de l'intrication de plusieurs facteurs notamment liés à la consommation de régimes hyperlipidiques (ou *High Fat Diet* - HFD) ou hypercaloriques, associée à une diminution de l'activité physique. Une partie des cas d'obésité peut également être liée à des facteurs génétiques et donc héréditaires. Cette notion de génétique peut-être monogénique, impliquant alors la mutation d'un seul gène, et ne touche que 5% des cas d'obésité. Ces gènes, tels que MC4R (*Melanocortin 4 receptor*), PCSK1 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 1*) et POMC (proopiomélanocortine), sont impliqués dans le contrôle de l'appétit par la voie de la mélanocortine. Les études génétiques

de l'obésité ont par ailleurs conduit au développement de modèles animaux génétiquement obèses tels que les souris ob/ob, qui présentent une mutation sur le gène ob codant pour la leptine, une hormone satiétogène, ou encore les souris db/db, qui sont quant à elles résistantes à la leptine. Depuis 2006 en revanche, des centaines de variants sur plusieurs gènes ont été décrits comme impliqués dans l'obésité : il s'agit d'obésité polygénique et touche notamment les gènes ADRB3 (*Anti-β3-Adrenergic Receptor*), notamment impliquée dans la thermogénèse du tissu adipeux, BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), un facteur contrôlant la prise de poids et l'homéostasie énergétique dans plusieurs tissus, CNR1 (*Cannabinoid Receptor 1*), régule la prise alimentaire par action sur l'hypothalamus, MC4R, PCSK1 et PPARG (*peroxisome proliferator-activated receptor g*), entre autre impliqué dans la régulation des métabolismes lipidique et glucidique (Loos et al., 2022).

Outre la dimension génétique, l'obésité comporte une dimension alimentaire et environnementale qui évolue en même temps que la société occidentale. Ainsi le développement d'espaces urbanisés dans lesquels évoluent les peuples occidentaux tend à diminuer l'activité physique et augmenter l'accessibilité à de la nourriture bon marché mais néfaste pour la santé, notamment dans les quartiers défavorisés (Ezzati et al., 2005). Le monde occidental connaît ainsi une transition nutritionnelle en faveur d'une alimentation riche en lipides et en sucres. Ce régime occidental obésogène, également appelé *Western Diet* (WD), est principalement caractérisé par un fort apport en lipides, majoritairement des acides gras saturés et trans d'origine animale, un excès de sucres raffinés (les disaccharides lactose et saccharose ainsi que les monosaccharides glucose et fructose) notamment apportés par les sodas, de fortes teneurs en sel au détriment des fibres issues des fruits et des légumes (Cordain et al., 2005). Ainsi, dans le mode de consommation actuel chez l'Homme, un régime WD est caractérisé par une forte consommation énergétique, apportée en majorité par les lipides et les sucres.

La palatabilité du régime WD contribue aux troubles du comportement alimentaire impliquant une altération de la régulation hédonique au niveau cérébral (Finlayson, 2017). De plus, la consommation de ce WD est montrée comme étant à l'origine des comorbidités associées à l'obésité. Une forte consommation en acides gras saturés, notamment en acide laurique C12:0 (Mensink et al., 2003), provoque en effet une élévation des concentrations plasmatiques de cholestérol (Tholstrup et al., 2001; Turner et al., 1981), pouvant augmenter le risque de maladies cardiovasculaires (de Oliveira Otto et al., 2012; Guasch-Ferré et al., 2015) bien que plusieurs études montrent une absence d'association entre acides gras saturés et maladies cardiovasculaires (de Souza et al., 2015; Dehghan et al., 2017). Cette discordance proviendrait des effets divers des acides gras, liés à leur structure chimique, et de la quantité

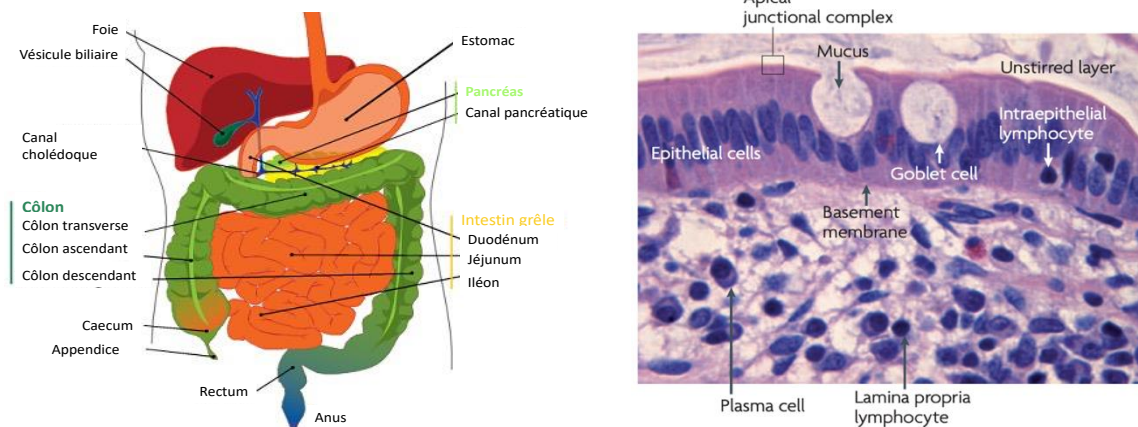
apportée. Ainsi, tandis que le lien entre acides gras saturés et risques de maladies cardiovasculaires n'est pas tout à fait clair, il est néanmoins recommandé de remplacer les acides gras saturés à longue chaîne par des poly ou monoinsaturés et de limiter à 10% au maximum l'apport calorique en acides gras saturés dans l'alimentation afin de limiter les risques d'apparition de pathologies métaboliques (Tsao et al., 2022). Le WD est par ailleurs caractérisé par un faible ratio d'acides gras polyinsaturés n-3 par rapport aux n-6 (voir la **partie VII.1** pour la nomenclature des acides gras). Or, il a été montré que la consommation d'acides gras polyinsaturés n-3 était associée à une diminution du risque de maladies cardiovasculaires (Kris-Etherton et al., 2002), probablement en raison de leurs effets anti-inflammatoires (Simopoulos, 2002) .

En outre, le syndrome métabolique associé à l'obésité est susceptible de survenir à la suite d'une inflammation systémique de bas grade (Calder et al., 2011; Minihane et al., 2015). En effet, en raison de la fonction endocrine majeure du tissu adipeux, et notamment dans la production d'adipokines (leptine, IL6, TNF $\alpha$ ), l'accumulation excessive de graisse chez les sujets obèses entraîne le recrutement de macrophages et de lymphocytes dans le tissu adipeux, favorisant la sécrétion de cytokines par ces cellules immunitaires, et d'adipokines par le tissu adipeux. Cependant, des perturbations de l'homéostasie intestinale, en particulier une augmentation de la perméabilité intestinale, associée à des altérations de la composition et/ou des activités métaboliques du microbiote intestinal, telles que décrites dans des modèles animaux (Cani et al., 2009; Hamilton et al., 2015; Serino et al., 2012) ainsi que chez l'Homme (Genser et al., 2018), concourent également à l'apparition et/ou à la perpétuation de l'inflammation systémique de bas grade (Cani et al., 2018).

## II. L'INTESTIN, UN ORGANE BARRIÈRE EN PERPETUELLE DYNAMIQUE

### II.1. Une double organisation selon un axe proximal/distal et crypte/villosité

L'intestin est organisé selon un axe antéro-postérieur et peut être divisé en deux grandes parties : l'intestin grêle, qui mesure environ 6 m de long chez l'Homme pour un diamètre de 2,5 à 3 cm, et le côlon, d'une longueur d'environ 1,5 m pour un diamètre de 6 à 7,5 cm. Ces deux parties sont elles-mêmes subdivisées en plusieurs segments. L'intestin grêle comporte, du proximal vers le distal, le duodénum, le jéjunum et l'iléon tandis que le côlon se divise en côlon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde (**Figure 4**).



**FIGURE 4. SEGMENTS DU TRACTUS GASTRO-INTESTINAL ET ORGANISATION DE LA MUQUEUSE INTESTINALE**

*Tiré de (Turner, 2009)*

L'épithélium de l'intestin grêle est organisé selon un axe crypte-villosité dans lequel les cellules épithéliales intestinales (CEI) différenciées se situent dans les domaines allongés vers la lumière, appelés villosités, et des domaines invaginés vers l'intérieur, appelés cryptes, qui contiennent des cellules souches intestinales (CSI). Le côlon, ne possédant pas de villosité, présente des cryptes, dans lesquelles sont nichées les CSI à leur base, et une surface épithéliale plate. Les CEI sont également dotées au niveau apical de microvillosités qui augmentent considérablement leur surface d'absorption. Il est ainsi estimé que la surface totale de la muqueuse intestinale est d'environ 32 m<sup>2</sup>, dont près de 2 m<sup>2</sup> correspondent au côlon (Helander et al., 2014).

D'un point de vue fonctionnel, l'intestin grêle absorbe les glucides, les protéines et les lipides issus de l'alimentation tandis que le côlon absorbe l'eau et les électrolytes (notamment

le sodium ainsi que les chlorures). Les composés qui n'ont pas été absorbés dans l'intestin grêle, polysaccharides indigestibles, protéines non digérées et éventuellement des lipides, franchissent la jonction iléocœcale pour se retrouver dans la lumière colique.

## II.2. Des cellules épithéliales intestinales organisées selon un axe crypte/villosité

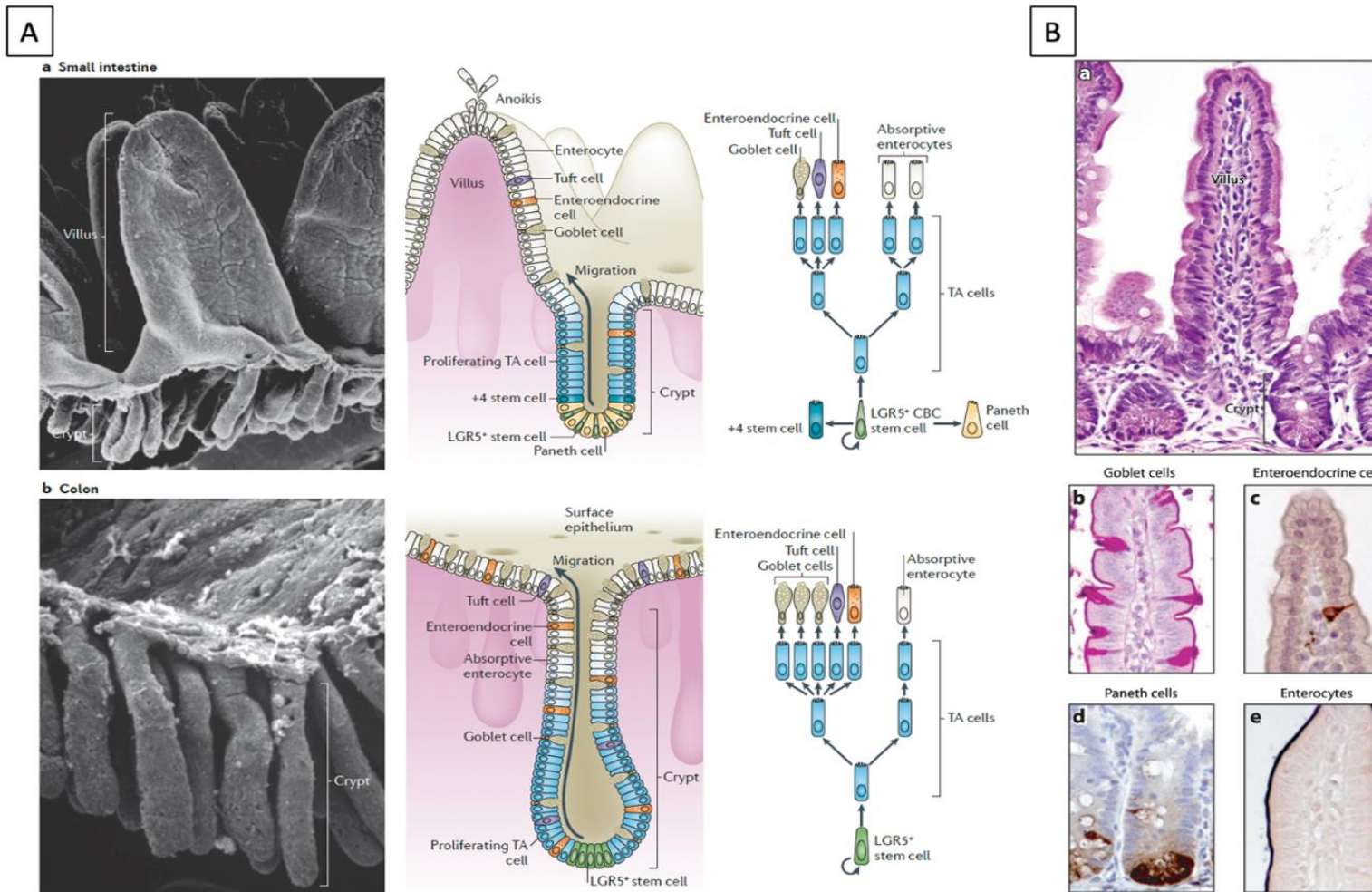
L'épithélium intestinal est composé de CSI dont la division asymétrique génère des cellules progénitrices (*transit amplifying cells* abrégées *TA cells*) qui se différencient en une grande diversité de types cellulaires dont la fonction contribue au maintien de l'homéostasie intestinale (**Figure 5**).

Alors que les cellules progénitrices migrent vers le haut de la crypte, les cellules de Paneth restent dans le fond de la crypte où elles exercent un rôle de défense antimicrobienne, notamment par le biais de la sécrétion de peptides anti-microbiens dans la lumière intestinale tels que Reg3 $\gamma$ , et de niche pour les CSI. Ce rôle de niche contrôle la prolifération des CSI en fournissant les facteurs de croissance WNT, *Notch ligand Delta-like 4* (DLL4), *epidermal growth factor* (EGF) et Noggin (Barker, 2014).

Les cellules entéroendocrines sont retrouvées tout au long du tractus gastro-intestinal et produisent les hormones et les peptides qui jouent un rôle important dans la satiété, notamment par le biais de la sécrétion d'hormones anorexigènes (cholécystokinine, glucagon-like peptide 1 et peptide tyrosine tyrosine) (Brennan et al., 2012) ou à l'inverse promeuvent l'appétit par la sécrétion d'hormones orexigènes (Ghréline et INSL5), la régulation de la sécrétion d'acide gastrique (Friis-Hansen et al., 1998) et dans la régulation de la sécrétion d'insuline par le *glucagon-like peptide-1* et la *gastric inhibitory polypeptide* (Nauck et al., 1993).

Les cellules caliciformes (ou cellules en gobelet, tiré de l'anglais *goblet cells*) sont les cellules qui produisent le mucus. Le mucus est structuré en deux couches dans l'intestin grêle avec une couche externe lâche, qui constitue un microhabitat pour le microbiote, et une couche adhérente aux CEI, ferme et quasiment dépourvue de bactéries, dont l'ensemble représente une épaisseur de 50 à 540  $\mu\text{m}$  chez l'Homme. Le mucus dans le côlon se décompose également en double couche avec une couche supérieure de 300 à 700  $\mu\text{m}$ , colonisée par le microbiote, et une couche inférieure adhérente et stratifiée, épaisse de 100 à 400  $\mu\text{m}$  (Allen and Carroll, 1985; Johansson et al., 2011). Le mucus tapisse l'épithélium intestinal d'un gel visqueux constitué de nombreuses glycoprotéines telles que les mucines, dont Muc2 qui est





**FIGURE 5. ORGANISATION DES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES LE LONG DE L'AXE CRYPTE/VILLOSITE DANS L'INTESTIN GRELE ET LE LONG DE LA CRYPTE COLIQUE**

**A.** Le renouvellement épithélial dans l'intestin grêle et le côlon est coordonné par les cellules souches LGR5+, situées à la base des cryptes, dont la division asymétrique génère des progéniteurs (TA cells) qui se différencieront en différents types de cellules épithéliales intestinales matures.

**B.** Clichés d'une coloration en hématoxyline et éosine de (a) l'épithélium intestinal, (b) des cellules calciformes par coloration à l'acide périodique de Schiff, (c) des cellules entéroendocrines par marquage anti-synaptophysine, (d) des cellules de Paneth par coloration des lysozymes et (e) des entérocytes par coloration des phosphatases alcalines. La figure A est adaptée de (Barker, 2014) et la B de (van der Flier and Clevers, 2009).

la plus abondante au niveau intestinal. Il lubrifie l'épithélium intestinal et joue un rôle de séparation entre l'hôte et le microbiote. En plus de sa densité importante, la couche adhérente de mucus contient également des immunoglobulines A et des peptides antimicrobiens qui limitent la pénétration des micro-organismes et leur croissance dans ce mucus (Johansson et al., 2011; Rogier et al., 2014).

Les cellules M (*microfold cells* en anglais) recouvrent le tissu lymphoïde associé à la muqueuse (*gut-associated lymphoid tissue* - GALT), notamment composé des plaques de Peyer dans l'intestin grêle, et jouent un rôle dans la régulation des réponses immunitaires intestinales. Les cellules M possèdent une couche de mucus moins épaisse que les autres CEI, des microvillosités réduites rendant ces cellules plus accessibles à la transcytose d'antigènes et de micro-organismes vers les plaques de Peyer ou follicules lymphoïdes isolés au niveau colique (Mantis et al., 2000).

Les cellules Tuft sont des cellules chimiosensitives qui seraient impliquées dans la réponse immunitaire. Bien que leur rôle soit incertain, elles joueraient un rôle dans la réponse anti-parasitaire en produisant de l'interleukine 25, favorisant le recrutement de cellules de la réponse immunitaire de type 2 (Th2) (von Moltke et al., 2016).

### **II.3. La dynamique de renouvellement épithélial**

L'épithélium intestinal est en dynamique constante et se renouvelle tous les 4-5 jours (van der Flier et al., 2009). Ce renouvellement est permis grâce aux CSI, situées au fond des cryptes, qui arborent le *Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5* (LGR5) comme marqueur spécifique (Tetteh et al., 2015). Les CSI réalisent des divisions asymétriques en continu, générant des cellules progénitrices TA ou sécrétoires. Grâce à de rapides cycles de prolifération en continu, les cellules progénitrices se déplacent progressivement vers le haut de la crypte et se différencient finalement en CEI absorbantes (entérocytes ou colonocytes) pour les cellules progénitrices TA ou en cellules de la lignée sécrétoire (comme les cellules caliciformes ou entéroendocrines) pour les cellules progénitrices sécrétoires (Merenda et al., 2020).

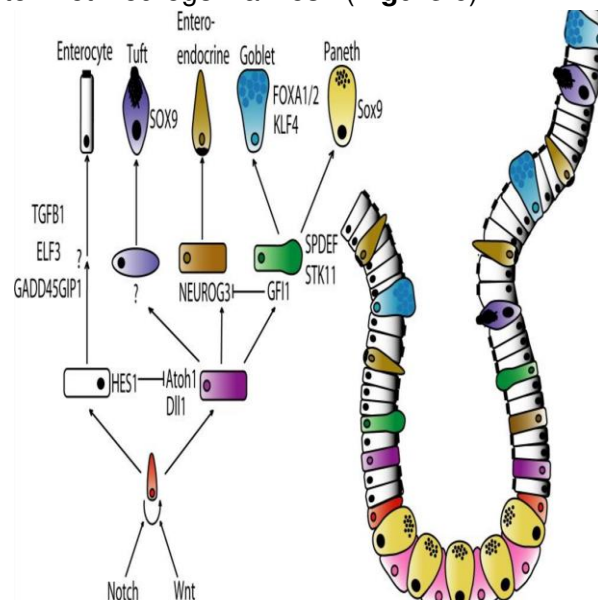
Dans l'intestin grêle, les CSI sont intercalées entre les cellules de Paneth. Ces dernières assurent à la fois un rôle de défense antimicrobienne ainsi qu'un rôle de niche pour les CSI. Les cryptes comprennent également des cellules +4, en référence à leur position par rapport aux cellules de Paneth les plus hautes dans les cryptes, qui constituent un pool de CSI quiescentes, capables de régénérer les CEI en cas de lésion (Tetteh et al., 2015). Bien que



les cellules de Paneth soient absentes du côlon, les cellules REG4+, également intercalées entre les CSI, jouent un rôle équivalent de niche des cellules LGR5+ coliques et produiraient les facteurs nécessaires au maintien de leur caractère souche (Sasaki et al., 2016). Au sommet de la villosité dans l'intestin grêle, ou à la surface épithéliale du côlon, l'anoikis des cellules sénescents dans la lumière intestinale est déclenchée par la perte de leur attachement à la membrane basale et aux cellules voisines (Dufour et al., 2004).

## II.4. Différenciation des cellules progénitrices intestinales

Le renouvellement épithélial et le devenir des cellules progénitrices est notamment coordonné par la cascade de signalisation Notch. Il a ainsi été montré que la fixation de Notch sur son récepteur membranaire déclenche le clivage du récepteur, via une  $\gamma$ -sécrétase, libérant la partie intra-cellulaire du récepteur. Cette partie est ensuite transloquée dans le noyau et déclenche l'expression de gènes cibles. Parmi eux, le *hairy and enhancer of split-1* (Hes1) est exprimé par les CSI et réprime l'expression de l'*atonal homolog 1* (Atoh1), impliqué dans la différenciation en phénotype sécrétoire (Yang et al., 2001), et de neurogenin 3 (Neurog3), impliqué dans la différenciation en cellule neuroendocrine (Jenny et al., 2002). *Hes1* favorise donc la différenciation des progéniteurs en cellules absorbantes sous l'influence de Notch qui inhibe Atoh1 et Neurog3 via Hes1 (**Figure 6**).

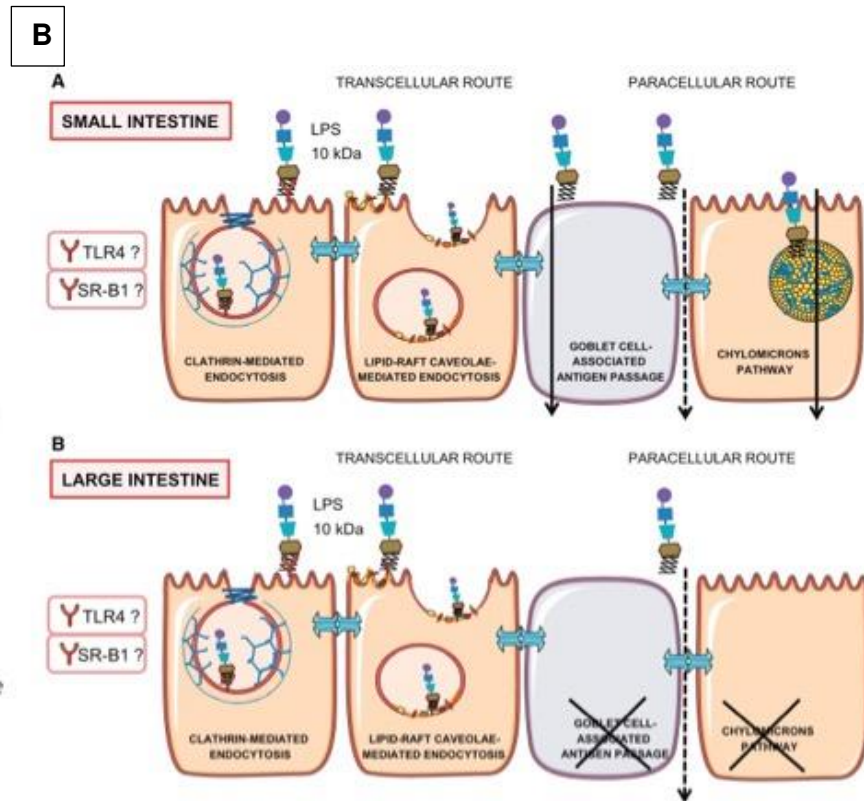
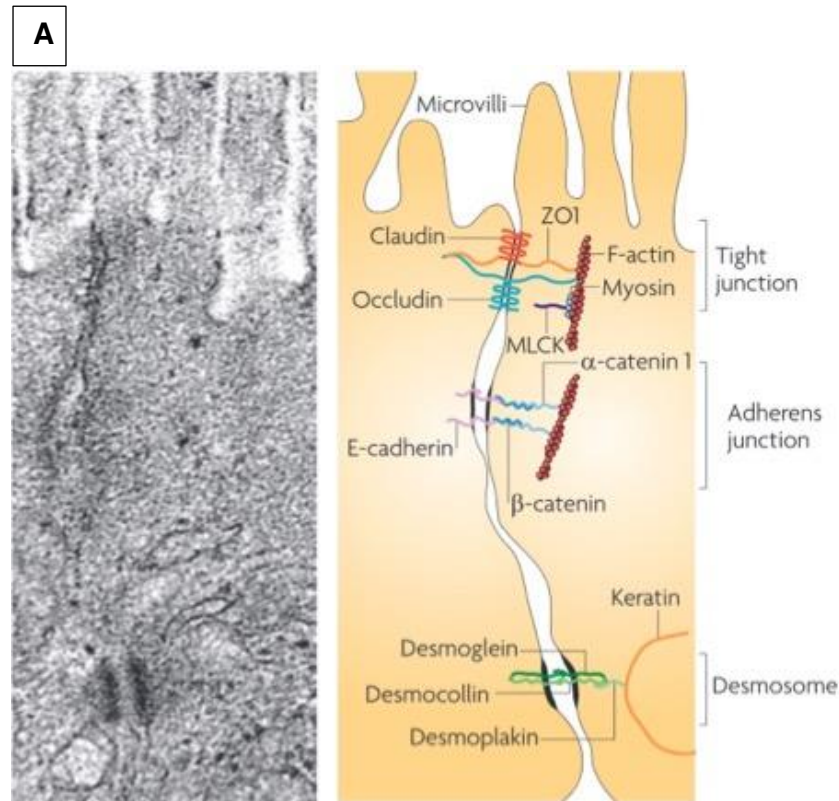


**FIGURE 6. FACTEURS REGULANT LA DIFFERENCIATION DES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES**  
 Les cellules souches (rouge) prolifèrent et se divisent de façon asymétrique pour donner des cellules progénitrices qui se différencieront en cellules absorbantes (blanc) si ces progéniteurs ont reçu un signal Notch qui permet l'expression de Hes1 et l'inhibition de Atoh1. Sinon, les progéniteurs (violet) qui expriment Atoh1 ainsi qu'un ligand de Notch (Dll1) se différencieront en cellules entéro-endocrines, si Neurog3 est exprimé, ou en cellules calciformes ou de Paneth, si GFI1 est exprimé. Tiré de (Noah et al., 2011).

## II.5.L'épithélium intestinal : une barrière étanche et sélective

Les entérocytes et colonocytes étant très représentés et joints entre eux par des jonctions serrées peu étanches, ils jouent un rôle majeur dans la cohésion intestinale et constituent une véritable barrière épithéliale (**Figure 7**). Le passage à travers l'épithélium intestinal est très sélectif et se décompose en deux voies : la voie paracellulaire et la voie transcellulaire.

La voie paracellulaire représente le passage entre les cellules de molécules hydrophiles dont la taille est inférieure à 600 Da (Ménard et al., 2010). Elle est régulée par les jonctions serrées ainsi que par les jonctions adhérentes et desmosomes qui assurent l'adhérence et la communication entre les cellules. Les jonctions serrées, situées au pôle apical, sont composées de protéines transmembranaires (les claudines, les occludines, les *junctional adhesion molecules* et les tricellulines) assemblées à des protéines inter-cellulaires, les *zonula occludens*, qui relient les jonctions serrées au cytosquelette. En fonction de leur nature, les claudines peuvent être très peu étanches (Claudines 1, 3, 4, 5, 8, 11, 14 et 19) ou



**FIGURE 7. JONCTIONS ENTRE DEUX CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES VOISINES ET TRANSLOCATION DU LIPOPOLYSACCHARIDE**

**A.** Image de microscopie électronique et schéma associé représentant les jonctions serrées intercellulaires. Les jonctions serrées incluent les protéines transmembranaires occludines et claudines, reliées au cytosquelette par l'intermédiaire des zonula occludens (ZO) cytosoliques. Les niveaux de phosphorylation des chaînes légères de myosine par la myosin light chain kinase (MLCK) permettent la contraction ou le relâchement de la myosine et donc influent sur l'étanchéité des jonctions serrées. Les jonctions adhérentes sont composées des cadhérines reliées au cytosquelette par les  $\alpha$ - et  $\beta$ -caténines. Les desmosomes assurent également la jonction entre deux cellules voisines et sont connectés au cytosquelette. Tiré de (Turner, 2009)

**B.** Représentation de la translocation du lipopolysaccharide bactérien dans l'intestin grêle et dans le côlon par voies transcellulaire et paracellulaire. Au niveau de l'intestin grêle, le LPS peut être transloqué par voies transcellulaires via des endocytoses clathrines- ou cavéoles-dépendantes ou à travers les cellules caliciformes en réponse à l'acétylcholine. Ce LPS peut également être exporté par l'entérocyte en étant intégré par les chylomicrons contenant les acides gras du régime. Au niveau colique en revanche, l'absorption des chylomicrons n'a pas lieu tandis que les cellules caliciformes ne répondent pas à l'acétylcholine pour former les voies de passage des antigènes. Tiré de (Guerville and Boudry, 2016).

favoriser la formation de pores et donc être permissives (Claudines 2, 7, 10, 15 et 16) (Krause et al., 2009). La localisation et l'assemblage des jonctions serrées dépendent par ailleurs de phénomènes de phosphorylation énergivores, notamment par le biais de kinases. Ainsi, en fonction de l'état métabolique des cellules, la localisation des protéines de jonctions serrées peut-être altérée modulant ainsi la perméabilité de la barrière intestinale (Olivier et al., 2019). L'intégrité des jonctions serrées et les protéines qui les constituent dépendent de l'état de différenciation des CEI. Une augmentation de la prolifération des CEI, comme observée lors d'un stress, est associée à un défaut de perméabilité intestinale chez le rat (Boudry et al., 2007). De plus, des organoïdes d'intestin grêle maintenus en prolifération sont caractérisés par une forte augmentation de l'expression de *Cldn2*, par rapport aux organoïdes différenciés (Pearce et al., 2018). Par ailleurs, l'expression de la *Cldn2* semble limitée aux cellules de la crypte peu différenciées dans l'intestin de souris saines (Holmes et al., 2006). Les CEI sont également jointes par des jonctions communicantes, qui permettent la diffusion de petites molécules d'une cellule à une autre, des jonctions adhérentes, composées de cadhérines associées au cytosquelette d'actine par les caténines, de desmosomes et des jonctions d'ancrage à la matrice extracellulaire (hémidesmosomes). La perméabilité paracellulaire d'un tissu ou de cellules *in vitro* peut être évaluée par le passage de petites molécules, telle que le sel de sodium de fluorescéine (*fluorescein sodium salt* abrégé FSS ; 0,4 kDa), ou bien par mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER).

Le passage de molécule de taille plus grande (>600 Da), qui ne peuvent diffuser par la voie paracellulaire, se fait par la voie transcellulaire. Ce passage est réalisé par des phénomènes de diffusion passive ou facilitée qui ne nécessitent pas d'énergie ou bien par des phénomènes de transports actifs et de transcytose énergie-dépendants. Ainsi, le passage par la voie transcellulaire peut d'abord se faire par la formation de vésicules d'internalisation suite à une interaction molécule/clathrine dépendante, notamment réalisée par des virus et des immunoglobulines (Doherty et al., 2009). Des micro-organismes et antigènes peuvent également être internalisés de façon spécifique après fixation sur des récepteurs cellulaires, ou de manière aspécifique par micropinocytose de fluides extracellulaires, de débris cellulaires et de nutriments, après invagination de la membrane plasmique et formation d'une vésicule (Doherty et al., 2009). Il a également été montré que des antigènes luminaux peuvent être transloqués à travers les cellules caliciformes de l'intestin grêle via des *globlet cell-associated antigen passages* en réponse à l'acétylcholine (Knoop et al., 2015).

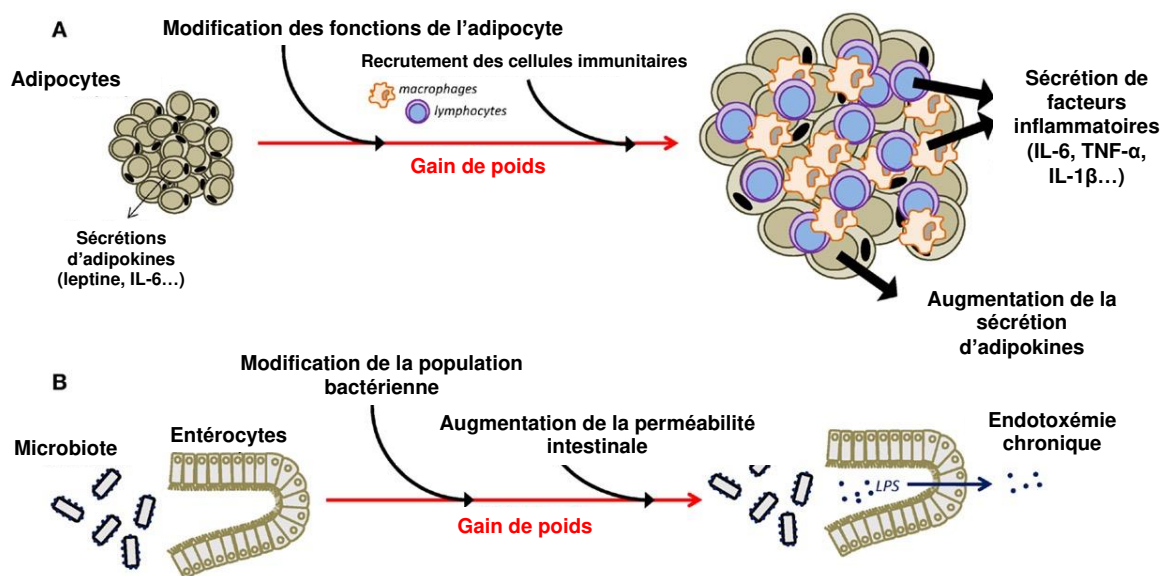
La dernière grande voie de passage transcellulaire dépend des *lipid-rafts*. Il s'agit de micro-domaines de la membrane plasmique riches en cholestérols et sphingolipides qui peuvent s'invaginer lorsqu'ils contiennent des cavéolines pour former des cavéoles par la suite endocytées (Simons et al., 2000). La perméabilité transcellulaire peut être évaluée par la mesure du flux de molécules dont la taille est supérieure à 600 Da telle que le FITC-Dextran

(FD4 ; 4 kDa) ou la Horseradish peroxidase (HRP ; 44 kDa). De plus, dans un contexte d'augmentation de perméabilité intestinale, le FD4 est considéré comme un marqueur de perméabilité paracellulaire.

### III. REGIME OBESOGENE ET EFFETS SUR L'ENDOTOXEMIE, L'HYPERPERMEABILITE INTESTINALE ET L'INFLAMMATION

#### III.1. Régime obésogène et endotoxémie

Dans le cadre de la consommation d'un régime obésogène, l'augmentation de la concentration plasmatique de lipopolysaccharide (LPS), qui composent la membrane externe des bactéries Gram-négatives, correspond à une endotoxémie dite métabolique, pouvant concourir à l'inflammation chronique de bas-grade dans de nombreux tissus tels que le foie, le muscle ou le cerveau (Lumeng et al., 2011; Reilly et al., 2017). Cette inflammation est initiée par l'interaction spécifique du LPS avec le *toll-like receptor (TLR) 4* des cellules immunitaires innées telles que les macrophages entraînant la libération de cytokines pro-inflammatoires (Akira and Takeda, 2004) (**Figure 8**).



**FIGURE 8. MECANISMES A L'ORIGINE DE L'INFLAMMATION CHRONIQUE DE BAS-GRADE CHEZ L'OBÈSE**

**A.** La prise de masse grasse est associée à la modification de l'activité des adipocytes qui, en réponse à une augmentation du stockage des lipides, sécrètent des adipokines qui à leur tour recrutent des macrophages et lymphocytes qui sécrèteront des cytokines pro-inflammatoires.

**B.** Dans l'intestin, la modification de l'environnement luminal induite par un régime obésogène est souvent associée à une augmentation de la perméabilité intestinale à l'origine du passage de composés bactériens à travers l'épithélium intestinal vers les circulations sanguine et lymphatique, déclenchant alors l'endotoxémie métabolique chez l'obèse. Tiré de (Castanon et al., 2014).

L'administration de 100 µg/kg/jour de LPS en sous-cutané pendant 4 semaines chez des souris provoque une augmentation de l'adiposité et des TG hépatiques, de la résistance à l'insuline ainsi qu'une élévation de l'expression de *Tnfa*, *Il1*, *Il6* dans le foie, les tissus adipeux

sous-cutané et viscéral et le muscle tout comme chez les souris nourries avec un HFD (72% kcal des lipides) sur la même durée (Cani et al., 2007). En outre, la mesure de la concentration plasmatique de la protéine de liaison au LPS (*LPS binding protein* – LBP), synthétisée par le foie, reflet de l'endotoxémie métabolique, s'avère être fortement corrélée aux troubles métaboliques, tels que le diabète de type 2 (Creely et al., 2007) et l'insulino-résistance (Cani et al., 2007; Sun et al., 2010), ainsi qu'à l'IMC (Shen et al., 2019). Il a alors été montré que l'endotoxémie survient suite à la consommation d'un HFD qui induit une augmentation transitoire de la concentration plasmatique de LBP chez l'Homme (Amar et al., 2008; Laugerette et al., 2011) comme chez l'animal (Hamilton et al., 2015; Laugerette et al., 2011), et revient à la normale 3 heures après la prise alimentaire (Ghanim et al., 2009).

Ces données soulignent donc l'induction d'une endotoxémie par la consommation d'un HFD et l'action majeure de cette dernière dans l'inflammation de bas-grade et des troubles métaboliques associés. Néanmoins, l'obésité peut tout de même se développer quand bien même l'apparition de l'endotoxémie est empêchée, comme montré par Dalby *et al.* chez un modèle de souris *knock out* (KO) pour le TLR4 et cluster de différenciation (CD) 14 qui développaient un phénotype d'obésité après avoir consommé un HFD (Dalby et al., 2018). De plus, alors que certaines études ont montré que la consommation chronique d'un HFD induisait une augmentation de l'endotoxémie chez l'Homme après 1 mois de HFD à 40% kcal en lipides (Pendyala et al., 2012) par rapport à des régimes pauvres en lipides, d'autres travaux n'ont pas retrouvé d'augmentation de la concentration plasmatique de LBP en réponse au HFD (4 semaines à 78% kcal en lipides) (Kless et al., 2015).

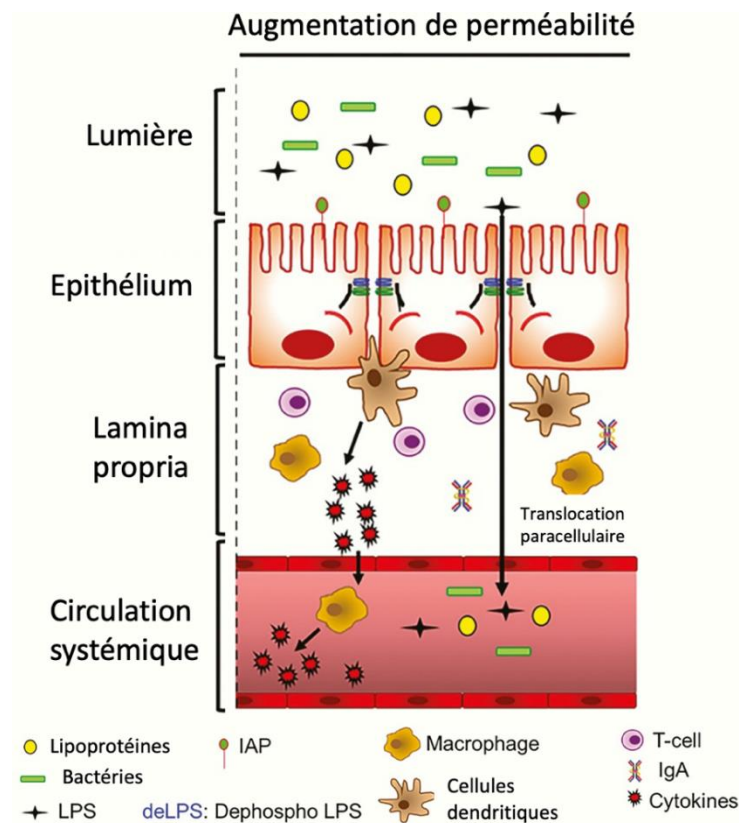
## III.2. Perméabilité intestinale et régime obésogène

### III.2.1. Perméabilité et passage du LPS

Quelle qu'en soit la cause, une augmentation de la perméabilité intestinale peut occasionner une augmentation de la concentration plasmatique de LPS. De façon physiologique dans l'intestin, le LPS est détoxifié par la phosphatase alcaline intestinale relarguée par les CEI dans la lumière, qui le déphosphoryle et fait du LPS déphosphorylé un antagoniste des TLR4, plutôt qu'un agoniste. Cette inactivation diminue l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, régulateur majeur de la réponse inflammatoire, et donc la production de cytokines pro-inflammatoires (Bentala et al., 2002; Lu et al., 2008). En revanche, dans un contexte d'hyperperméabilité intestinale, également appelé « *leaky gut syndrome* », le LPS ainsi que des acides nucléiques microbiens peuvent franchir l'épithélium intestinal par la voie transcellulaire, voire par la voie paracellulaire via l'altération des jonctions serrées induite par



la consommation d'un régime obésogène (Cani et al., 2008; Gulhane et al., 2016; Murakami et al., 2016). Cette translocation de composés bactériens initie alors une réponse inflammatoire intestinale, par les cellules immunitaires de la lamina propria, puis systémique (**Figure 9**). Une fois l'épithélium franchi, le LPS contribue à augmenter la perméabilité paracellulaire en interagissant avec les TLR4 du pôle basal de l'entérocyte (Nighot et al., 2017). Dans la circulation systémique, le LPS se retrouve ensuite lié à des LBP ou au CD14, synthétisé par les macrophages. Le dosage de l'une ou l'autre de ces molécules permet alors d'évaluer l'endotoxémie d'un individu.



**FIGURE 9. PASSAGE DU LPS PAR LA VOIE PARACELLULAIRE DANS LE CADRE D'UNE AUGMENTATION DE LA PERMEABILITE INTESTINALE, NOTAMMENT INDUITE PAR LA CONSOMMATION D'UN REGIME OBESOGENE**

*La consommation d'un régime obésogène porte atteinte à l'intégrité des jonctions serrées, par diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées et/ou en provoquant leur relocalisation. Cette désorganisation des jonctions serrées conduit à une augmentation de la perméabilité paracellulaire, facilitant le passage du LPS à travers l'épithélium intestinal vers la circulation systémique, activant les cellules du système immunitaire de la lamina propria, la production de cytokines pro-inflammatoires. De (Ghosh et al., 2020).*



### III.2.2. Perméabilité intestinale et régime obésogène

Bien que le lien ne soit pas forcément évident, l'endotoxémie métabolique qui peut être retrouvée chez l'obèse serait directement associée avec l'augmentation de perméabilité intestinale. Chez le rat, Hamilton *et al.* ont en effet montré que l'augmentation de perméabilité colique était corrélée avec l'élévation des concentrations plasmatiques de LPB, dès 3 semaines de HFD (45% kcal en lipides) (Hamilton *et al.*, 2015). De plus, un certain nombre d'études montrent une augmentation de la concentration plasmatique de FD4, après gavage chez des souris ayant reçu un régime HFD de 3 jours (Johnson *et al.*, 2015) jusqu'à 8 semaines (Murakami *et al.*, 2016) et ceci, pour des quantités variables de lipides dans le régime, allant de 40% à 60% en kcal. Cette augmentation de perméabilité ne semble ainsi pas dépendre de la durée du régime ni de sa teneur en lipides. En outre, lorsqu'elle survient, l'hyperperméabilité intestinale peut être occasionnée dans tous les segments intestinaux. Des données obtenues en chambre de Ussing chez la souris montrent en effet une élévation du passage de molécules par la voie paracellulaire à la suite de la consommation d'un HFD (60% kcal en lipides) dans le duodénum (Stenman *et al.*, 2012), le jéjunum (Johnson *et al.*, 2015; Stenman *et al.*, 2012), l'iléon (Johnson *et al.*, 2015) et dans le côlon (Stenman *et al.*, 2012).

Bien qu'un certain nombre d'études démontrent les effets délétères d'un HFD sur la perméabilité intestinale dans des modèles de rongeurs, peu d'études ont été réalisées chez l'Homme. En mesurant le lactulose et le mannitol excrétés dans les urines après administration à des personnes obèses, afin de respectivement évaluer la perméabilité paracellulaire et transcellulaire, il a été mis en évidence que l'augmentation de perméabilité était associée avec les altérations métaboliques associées à l'obésité (stéatose hépatique et résistance à l'insuline) (Damms-Machado *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2012). De plus, une étude menée sur 122 personnes sévèrement obèses à jeun a révélé que l'augmentation de la perméabilité jéjunale aux petites molécules (FSS, 0,4 kDa) en chambres de Ussing était directement corrélée à l'inflammation systémique de ces personnes (haut niveau d'haptoglobine et de protéine C réactive). De plus, l'ajout de micelles lipidiques suffisait à augmenter la perméabilité jéjunale aux macromolécules (passage de macromolécules de 4 kDa), de façon deux fois plus importante chez les personnes obèses par rapport aux sujets non-obèses, de façon toujours corrélée aux marqueurs d'inflammation systémique (Genser *et al.*, 2018).

Ainsi bien qu'il soit clair que l'hyperperméabilité intestinale joue un rôle majeur dans le l'apparition des complications liées à l'obésité, il reste encore à savoir s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de l'apparition des désordres métaboliques.

Des travaux montrent que l'augmentation de perméabilité intestinale semble précéder le développement du phénotype d'obésité. Nascimento *et al.* ont en effet montré que la consommation d'un HFD (40% kcal en lipides) provoquait dès 15 jours de régime une

diminution de l'expression des protéines des jonctions serrées des CEI de duodénum et du jéjunum (claudines-1, -3 et ZO-1), associée à l'augmentation de la perméabilité intestinale qui apparaît 45 jours plus tard. Néanmoins, l'endotoxémie, évaluée par la concentration plasmatique de LPS, ou des signes d'inflammation intestinale n'étaient toujours pas manifestes après ces 60 jours de régime (Nascimento et al., 2021).

Gulhane *et al.* ont montré que l'augmentation de perméabilité colique est associée à une augmentation de l'inflammation colique (Gulhane et al., 2016). Ainsi, 11 semaines de HFD (46% kcal en lipides) suffisaient à augmenter la perméabilité colique tandis que l'expression de *Kruppel-like factor 4 (Klf4)*, un facteur contrôlant la différenciation en cellule caliciforme, et de *Muc2* étaient toutes deux moins exprimées dans le côlon des souris HFD par rapport aux contrôles, de la même façon que l'expression de *Cldn1*. De plus l'expression du marqueur de stress oxydant *Nitric oxide synthase 2 (Nos2)* ainsi que la concentration sérique d'endotoxines étaient toutes deux plus importantes chez les souris HFD.

En outre, les acides gras semblent jouer un rôle majeur dans les altérations de perméabilité et l'inflammation intestinale. En complément de leur étude *in vivo*, Gulhane *et al.* ont montré qu'un traitement de 24h avec de l'acide palmitique (C16:0) à 500  $\mu$ M sur les cellules d'adénocarcinome colique LS174T provoquait une diminution de l'expression de *Klf4*, et de la sécrétion de *Muc2* associées à une expression plus importante de *Nos2* et une hyperperméabilité, montrée par une diminution de la TEER (Gulhane et al., 2016). Ces mêmes acides gras seraient également responsables, par des phénomènes associés au stress oxydant, de la relocalisation des protéines de jonctions serrées des colonocytes (Gulhane et al., 2016). De plus, le relargage des acides gras par l'entérocyte dans la circulation systémique se fait notamment par les chylomicrons (voir **VII.2.5**). Or, puisque les chylomicrons sont capables de lier le LPS, une augmentation de l'absorption des acides gras et de leur relargage dans la circulation systémique peut accroître l'endotoxémie (Laugerette et al., 2011; Vors et al., 2015). Les auteurs ont ainsi suggéré que l'augmentation de perméabilité colique associée à l'inflammation était provoquée par une altération de la barrière de mucus dû au stress oxydant dans les cellules caliciformes induit par les acides gras non-estérifiés du HFD.

Enfin, des études menées chez la souris (Kless et al., 2015) ou chez l'Homme (Brignardello et al., 2010), ont montré des altérations métaboliques associées à l'obésité sans pour autant révéler d'hyperperméabilité intestinale, y compris après avoir augmenté la durée du régime ou sa quantité de lipides (Kless et al., 2015). Kless *et al.* vont même jusqu'à montrer que pour des HFD allant de 48% à 78% de lipides en kcal pour 4 ou 12 semaines de régime, les souris ne présentaient pas d'altération de perméabilité intestinale (Kless et al., 2015).

Quoiqu'il en soit, les mécanismes exacts conduisant à l'altération de la fonction de barrière sous HFD sont encore débattus mais seraient associés à la perturbation des jonctions

serrées (localisation ou expression des protéines), à l'inflammation, aux altérations de la couche de mucus, à la dysbiose et/ou au stress oxydant induit par les acides gras et aux acides biliaires (Rohr et al., 2020) (**Figure 10**).

### III.3. Inflammation intestinale de bas-grade et régime obésogène

Outre l'augmentation de perméabilité intestinale qui concourt aux désordres métaboliques chez l'obèse, des études montrent des signes d'inflammation de bas-grade intestinale avant même le développement de l'obésité et des complications associées. Cette inflammation se manifeste notamment par l'infiltration de macrophages dans la muqueuse intestinale associée à l'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (**Tableau 2**) et jouerait un rôle important dans les désordres métaboliques associés à l'obésité (Riedel et al., 2022). Ainsi, Kawano *et al.* ont montré que la consommation d'un HFD à 60% kcal en lipides pendant 4 semaines, augmentait l'expression génique de marqueurs pro inflammatoires (dont *Ccl2* codant pour une chimiokine) dans le côlon, de façon associée à une infiltration de macrophages, de la diminution de la taille du côlon, de la profondeur des cryptes et du nombre de cellules caliciformes (Kawano et al., 2016). Les auteurs ont également montré l'induction d'un stress oxydant au niveau colique, par détection du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à l'Amplex rouge, et de l'activité de la peroxydase, qui survenait dès 4 semaines tandis que l'augmentation significative de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le tissu adipeux épididymaire n'était perceptible qu'à 12 semaines de HFD. De façon intéressante, à l'exception de *Il1b* et de *Foxp3*, l'expression génique des marqueurs de cellules immunitaires n'était pas modifiée par 4 semaines de HFD dans l'intestin grêle. Les auteurs ont finalement montré, par des modèles KO du récepteur de CCL2 des monocytes et des cellules épithéliales coliques (CEC), que la consommation d'un HFD induisait une augmentation de l'expression de *Ccl2* par les CEC et provoquait le recrutement des macrophages au phénotype pro-inflammatoire M1 dans le côlon. L'infiltration des macrophages dans l'épithélium colique conduisait ensuite à l'augmentation de la perméabilité colique, avant même l'apparition de l'insulino-résistance et de l'inflammation hépatique et adipeuse (Kawano et al., 2016). Chez la souris, l'initiation de l'inflammation colique induite par un HFD (45% kcal en lipides pendant 12 semaines) serait de plus facilitée par la diminution de l'expression de *peroxisome proliferator-activated receptor (Ppar) γ* (Liu et al., 2015). La diminution de l'expression de *Pparγ* dans les CEC est par ailleurs connue comme un marqueur d'inflammation, notamment dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Dubuquoy et al., 2006). De plus, Ding *et al.* ont montré que la consommation d'un HFD (45% kcal en lipides) pendant 6 semaines induisait une réponse pro-inflammatoire dans l'intestin grêle, manifestée par une expression génique de *Tnfa* 3 fois plus importante chez les souris HFD par rapport aux souris contrôles, tandis que l'insulinorésistance n'était quant à elle

perceptible qu'après 16 semaines de régime. De plus, l'expression génique de *Tnfa* iléale était fortement corrélée à l'insulino-résistance (Ding et al., 2010).

Ces résultats suggèrent donc que la consommation d'un régime riche en lipides initie d'abord une réponse pro-inflammatoire de bas-grade au niveau intestinal qui précéderait l'obésité et l'apparition des complications associées.

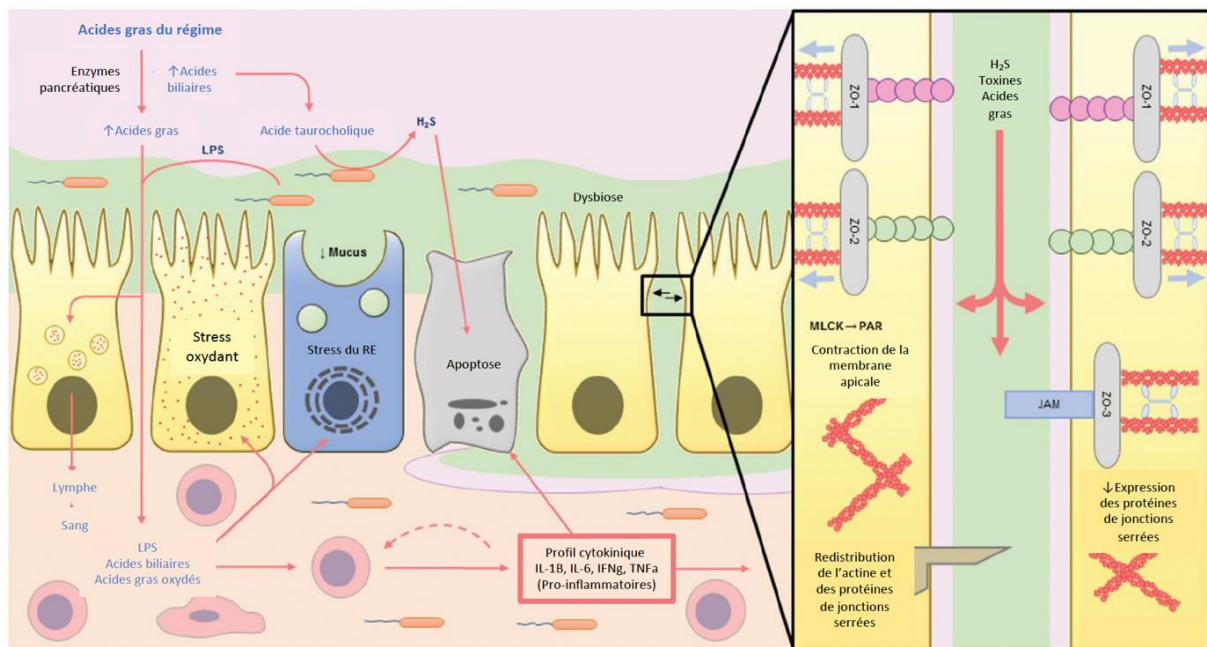
**TABLEAU 2. SYNTHÈSE DES ÉTUDES DÉCRIVANT L'EFFET D'UN RÉGIME RICHE EN LIPIDES SUR LA PRODUCTION DE CYTOKINES AU NIVEAU INTESTINAL**

Cytokine	Effet du HFD	Type de HFD (% kcal des lipides)	Durée	Sujet d'étude	Tissu	Référence
IL1B	↑	69%	8, 12 semaines	Souris C57Bl6/J	Côlon	(Kawano et al., 2016)
IL4/IL13	↑	61%	8 semaines	Souris C57Bl/6	Côlon	(Teixeira et al., 2011)
IL6	↑	61%	8 semaines	Souris C57Bl/6	Côlon	(Teixeira et al., 2011)
	↑			Personnes obèses	Plasma	(Peluso et al., 2012)
IL10	↑	61%	8 semaines	Souris C57Bl/6	Côlon	(Teixeira et al., 2011)
	↓	45%	1 semaine	Rat Wistar	Intestin grêle	(Hamilton et al., 2015)
IL12	↑			Personnes obèses	Sérum	(Suárez-Álvarez et al., 2013)
IL17	↑			Personnes obèses	Plasma	(Peluso et al., 2012)
IL18	↑	69%	4,8 semaines	Souris C57Bl6/J	Côlon	(Kawano et al., 2016)
IL22	↑	60%	28 jours	Souris C57Bl/6	Côlon	(Zou et al., 2018)
IFN $\gamma$	↑	61%	8 semaines	Souris C57Bl/6	Côlon	(Teixeira et al., 2011)
	↑	60%	12 à 16 semaines	Souris C57Bl/6	Intestin grêle Côlon	(Luck et al., 2015)
TNF $\alpha$	↑	69%	8, 12, 24 semaines	Souris C57Bl6/J	Côlon	(Kawano et al., 2016)
		61%	8 semaines	Souris C57Bl/6	Côlon	(Teixeira et al., 2011)
				Personnes obèses	Sérum	(Suárez-Álvarez et al., 2013)
		Beurre	8 h	Souris BALB/c	Intestin grêle	(Fujiyama et al., 2007)
		60%	12 semaines	Souris C57Bl/6NHsd	Intestin grêle	(Robles E. et al., 2017)
Perforine	↑	45%	6 semaines	Souris C57Bl6	Intestin grêle	(Ding et al., 2010)
		60%	13 semaines	Souris C57Bl/6NHsd	Intestin grêle	(Robles E. et al., 2017)
Granzyme B	↑	60%	14 semaines	Souris C57Bl/6NHsd	Intestin grêle	(Robles E. et al., 2017)

Néanmoins, cette inflammation de bas-grade intestinale induite par un HFD n'est pas systématique. Johnson *et al.* ont montré que la consommation d'un HFD pendant 7 jours (60% kcal en lipides) suffisait à augmenter la perméabilité au FD4 en chambre de Ussing, dans le jéjunum et l'iléon, et était associée à une déplétion en éosinophiles, sans pour autant manifester de signes d'inflammation dans l'intestin grêle (Johnson et al., 2015). Outre la durée du régime, il a été suggéré que l'initiation de l'inflammation au niveau intestinal induite par la consommation d'un HFD serait imputable au microbiote. Des souris axéniques, ne montrent en effet ni signe d'inflammation ni d'obésité (Ding et al., 2010). En revanche, le recours à la transplantation de fèces provenant des souris conventionnelles nourries avec un régime HFD à des souris axéniques suffisait à suractiver NF- $\kappa$ B, soulignant le rôle du microbiote dans

l'induction de la réponse inflammatoire, mais éventuellement des lipides qui pourraient se trouver en quantité importante dans les fèces (Ding et al., 2010).

En outre, les acides gras du régime, en fonction de leur nature, sont d'importants inducteurs de l'inflammation. De la même façon que le LPS, les acides gras saturés peuvent activer le TLR4 ainsi que le TLR2, provoquant l'hétérodimérisation de TLR1 avec TLR2 et déclenchant l'inflammasome et la production de cytokines pro-inflammatoires (Snodgrass et al., 2013). A l'inverse, les acides gras polyinsaturés, ligands préférentiels de PPAR $\gamma$ , montrent des propriétés anti-inflammatoires notamment en inhibant l'hétérodimérisation induite par les acides gras saturés (Snodgrass et al., 2013) et en diminuant l'activation de NF- $\kappa$ B (Volpe et al., 2013) et la production de cytokines pro-inflammatoires (IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IL6), chez l'Homme comme chez la souris (Calder, 1997).



**FIGURE 10. SYNTHÈSE DES EFFETS POTENTIELS DE LA CONSOMMATION CHRONIQUE D'UN RÉGIME RICHE EN LIPIDES SUR LA BARRIÈRE INTESTINALE**

*La consommation d'un régime riche en lipides peut provoquer une augmentation de la perméabilité intestinale en diminuant l'expression des protéines de jonctions serrées ainsi qu'en les redistribuant. De plus, l'afflux important d'acide gras est associé à une augmentation des concentrations luminales d'acides biliaires, tel que l'acide taurocholique, dont la déconjugaison par les *Desulfovibrio spp*, dont la croissance est favorisée par les régimes riches en lipides, produit du sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ). Le  $H_2S$  pourrait alors augmenter la perméabilité intestinale en induisant l'apoptose des cellules épithéliales intestinales. Les acides gras absorbés par les cellules épithéliales intestinales sont susceptibles d'induire un stress oxydant et du réticulum endoplasmique pouvant provoquer l'apoptose des cellules épithéliales intestinales. Enfin, le passage de LPS, d'acides biliaires et d'acides gras de la lumière intestinale vers la lamina propria déclenche une réponse inflammatoire qui contribue à induire l'apoptose des cellules épithéliales intestinales. Abréviations : RE, réticulum endoplasmique ; MLCK, myosin-light chain kinase ; PAR ; anneau d'actinomyosine périfonctionnel. Adapté de (Rohr et al., 2020).*

## IV. LA MITOCHONDRIE, SOURCE DE L'ÉNERGIE CELLULAIRE

---

### IV.1. Structure des mitochondries

Les mitochondries sont des organites de 0,5 à 3  $\mu\text{m}$  de long par 0,5-1  $\mu\text{m}$  de large et délimités par deux bicouches phospholipidiques : une membrane mitochondriale interne (MMI) et une membrane mitochondriale externe (MME), séparées par un espace intermembranaire (EIM).

La MME sépare le contenu mitochondrial du cytosol. Elle permet la communication de cet organite avec son environnement par l'intermédiaire de plusieurs signaux de transduction et de membranes associées aux mitochondries qui permettent une communication fonctionnelle et physique entre les mitochondries et divers organites intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique (RE), les autophagosomes et les lysosomes. La MME constitue également une interface d'échange entre les mitochondries et le cytosol. Les protéines et les ions de moins de 5 kDa diffusent à travers la MME via les porines, rendant les concentrations de petites molécules (ions, sucres, etc.) entre l'EIM et le cytosol similaires. En revanche, les molécules plus grosses, telles que les pré-protéines qui possèdent un signal d'adressage mitochondrial, transloquent à travers la MME en se liant aux translocases de la membrane externe mitochondriale (*translocase of outer mitochondrial membrane*, TOMM) (Ahting et al., 2001). Les protéines internalisées dans les mitochondries comprennent des *heat shock proteins* (HSP) et/ou des protéines impliquées dans le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA), la  $\beta$ -oxydation et/ou la phosphorylation oxydative (OXPHOS).

La MMI est quant à elle une membrane perméable aux gaz impliqués dans les phénomènes de respiration ( $\text{O}_2$  et  $\text{CO}_2$ ), mais est en revanche imperméable aux protons, permettant l'établissement d'un gradient de protons entre l'EIM et la matrice mitochondriale. Cette MMI héberge les complexes de la chaîne de transport d'électrons (CTE), impliqués dans la production d'ATP (**Tableau 3**). Des replis de la MMI vers la matrice, appelés crêtes mitochondriales, prolongent la MMI, augmentant ainsi la surface disponible pour la production d'ATP et facilitant les échanges de protéines et de métabolites par le biais des translocases (Abrahams et al., 1994).

La fonction mitochondriale est par ailleurs fortement liée à sa morphologie puisque des changements dans cette dernière ont un impact sur leur état bioénergétique et inversement. En effet, plus la demande énergétique de la cellule est importante et plus les mitochondries adoptent une forme tubulaire avec de nombreuses crêtes (Nunnari et al., 2012).



Les mitochondries sont également des organites mobiles qui se déplacent le long des microtubules par l'intermédiaire d'une Rho-GTPase mitochondriale (Miro). Miro ancre alors la kinésine, une protéine motrice, à la surface de la mitochondrie, permettant la mobilité de la mitochondrie et formant ainsi un réseau dynamique (Fransson et al., 2003).

**TABLEAU 3. DESCRIPTION DES COMPLEXES DE LA CHAÎNE DE RESPIRATION MITOCHONDRIALE**

Complexe	Nombre de sous-unités (codées par ADNmt)	Fonction	Inhibition pharmacologique
<b>Complexe I</b> NADH déshydrogénase	45 (7)	Catalyse l'oxydation du NADH en NAD <sup>+</sup> et transfère les électrons au Coenzyme Q (CoQ)	Roténone Piéricidine A
<b>Complexe II</b> Succinate ubiquinone oxydoréductase	4 (0)	Constitue à la fois une composante de la CTE, en recevant les électrons provenant de l'oxydation du FADH <sub>2</sub> et en les transférant au CoQ, et à la fois du TCA en catalysant la déshydrogénation du succinate en fumarate	Malonate
<b>Complexe III</b> Ubiquinol cytochrome c oxydoréductase	11 (1)	Catalyse le transfert d'électrons de la CoQ au cytochrome c	Antimycine A
<b>Complexe IV</b> Cytochrome c oxydoréductase	14 (3)	Transfère les électrons du cytochrome c à l'oxygène moléculaire, accepteur final des électrons de la CTE	Azide / Cyanure
<b>Complexe V</b> ATP synthase	17 (2)	Phosphorylation de l'ADP en ATP par couplage osmo-chimique	Oligomycine

## IV.2. Le génome mitochondrial

Les mitochondries possèdent leur propre génome, un ADN mitochondrial (ADNmt) circulaire à double brin (~16,6 kb chez l'Homme) dans la matrice mitochondriale. Le génome mitochondrial est constitué de centaines à des milliers de copies d'ADNmt par cellule en fonction du tissu (O'Hara et al., 2019). Il est d'origine maternelle bien que la découverte récente de mitochondries d'origine paternelle remet en question ce fait (Vissing, 2019). L'ADNmt est caractérisé par de courtes séquences intergéniques (introns) et est dépourvu d'histones, le rendant plus sensible aux dommages provoqués notamment par les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces dommages peuvent être des lésions de l'ADNmt entraînant des cassures simples ou doubles de l'ADNmt ou affecter les bases de l'ADN (par exemple, des pontages de thymine et formation de thymine glycol) (Gureev et al., 2017). Cet ADNmt a par ailleurs pu être retracé à partir d'une protéobactérie ancestrale. Ainsi, l'eucaryote *Reclinomonas americana* aurait phagocyté une bactérie (possiblement *Rickettsia prowazekii*) et serait à l'origine de l'intégration des mitochondries dans les cellules eucaryotes (Gray et al., 2001). Cette théorie est plus largement connue sous l'appellation « théorie endosymbiotique » et suggérerait un dialogue moléculaire entre les mitochondries et les bactéries.

Les mitochondries sont également considérées comme étant des organites semi-autonomes car elles disposent de toute la machinerie nécessaire pour synthétiser des protéines à partir de leur propre ADN. En revanche, le contrôle de la réplication de l'ADNmt, de la transcription ainsi que de la traduction reste régulé par les protéines synthétisées à partir de l'ADN nucléaire (Capps et al., 2003). Parmi les 37 gènes constituant le génome mitochondrial, 2 codent des ARN ribosomiques, 22 des ARN de transfert et 13 des ARN messagers polypeptidiques (Falkenberg, 2018). Les 13 protéines codées par l'ADNmt représentent 10% des protéines de la chaîne de la CTE (Haynes et al., 2013). Ces protéines forment les sous-unités essentielles de la chaîne respiratoire : 7 sous-unités pour le complexe I de la CTE (NADH déshydrogénase), 1 pour le complexe III (cytochrome c - oxydoréductase), 3 sous-unités pour le complexe IV (cytochrome c oxydase), et enfin 2 sous-unités pour le complexe V (ATP synthase) de la CTE (Jackson et al., 2019). Des travaux suggèrent que le nombre de mitochondries et de copies d'ADNmt est fonction des besoins énergétiques cellulaires, car les demandes énergétiques élevées tendent à nécessiter un nombre accru de mitochondries et de copies d'ADNmt par rapport aux demandes énergétiques faibles (Capps et al., 2003).

Bien que la plupart des protéines mitochondriales soient codées par le génome nucléaire et transloquent du cytosol vers la matrice via les translocases des MME et MMI (Chacinska et al., 2009), les mitochondries possèdent leur propre machinerie pour assurer le repliement des protéines et l'assemblage des complexes. Ainsi, l'importation et le repliement des protéines sont contrôlés par des protéines chaperonnes localisées dans la matrice, tandis que les protéases de la MMI et de la matrice dégradent les protéines qui ne se sont pas pliées ou assemblées correctement (Tatsuta et al., 2008).

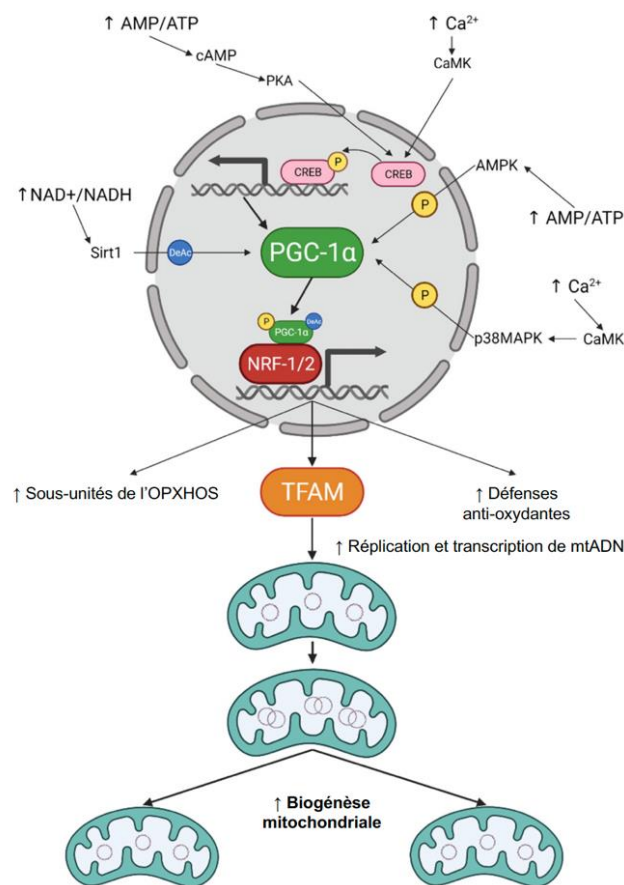
### **IV.3. Dynamique mitochondriale : biogenèse, fusion, fission, et mitopagie**

#### **IV.3.1. Biogenèse**

La biogenèse mitochondriale est le processus par lequel des mitochondries préexistantes se développent et se divisent. Elle contribue à maintenir l'homéostasie métabolique cellulaire en fournissant un pool de mitochondries saines et en éliminant les mitochondries endommagées. La biogenèse mitochondriale nécessite des protéines codées par les génomes mitochondrial et nucléaire. Elle implique le *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ) *coactivator1  $\alpha$*  (PGC1 $\alpha$ ), un cofacteur de transcription qui dirige la



biogénèse en activant les *nuclear respiratory factors* (NRF) 1 et 2. NRF1 et NRF2 sont deux facteurs de transcription qui activent ensuite le *mitochondrial transcription factor A* (TFAM), qui à son tour contrôle la transcription et la réplication de l'ADNmt. NRF1 et NRF2 contrôlent également l'expression des gènes nucléaires codant les sous-unités de la CTE et les protéines nécessaires aux fonctions mitochondriales (Finck et al., 2006) (**Figure 11**). La biogénèse mitochondriale, ainsi que sa morphologie, peuvent être influencées par des facteurs cellulaires, parmi lesquels le stress oxydant et l'état de prolifération ou de différenciation des cellules (Jornayvaz et al., 2010).



**FIGURE 11. BIOGENESE MITOCHONDRIALE ET CASCADE DE SIGNALISATION**

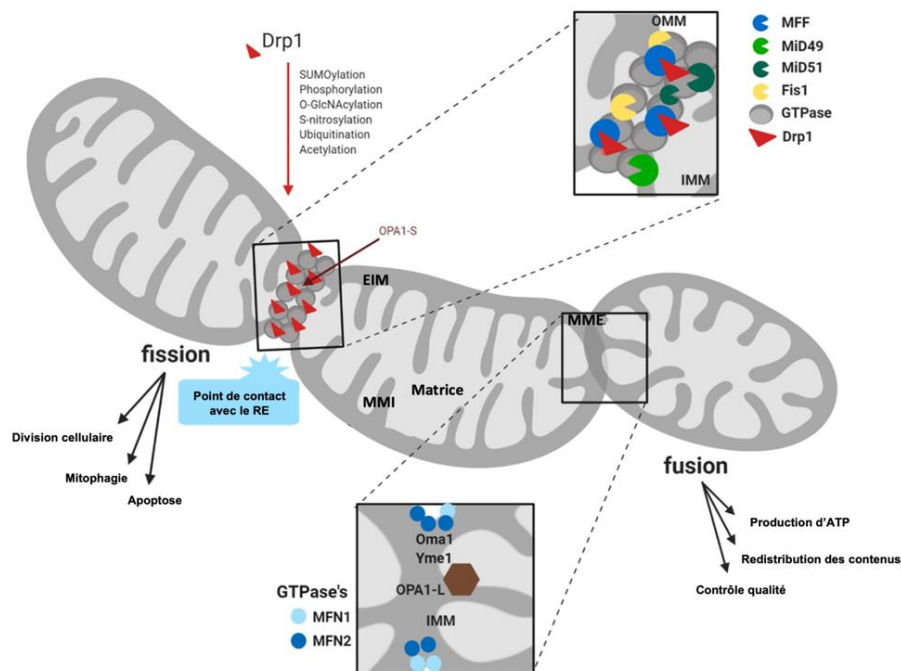
Adapté de (Cardanho-Ramos et al., 2021)

#### IV.3.2. Fusion et fission

Les mitochondries sont soumises à des processus de fusion et de fission toutes deux régulées par des guanosine triphosphatases (GTPases) de la famille des dynamines dont l'action entraîne la division et la fusion des deux bicouches mitochondriales (Osellame et al., 2012; Youle et al., 2012) (**Figure 12**).

La fission est le phénomène par lequel une mitochondrie se divise en mitochondries filles plus petites. Elle implique d'abord le RE qui entre en contact avec la mitochondrie, l'entoure et crée le microdomaine d'appareil de fission (Archer, 2013). Cet appareil est constitué de protéines de la MME telles que les protéines de dynamique mitochondriale 49 et 51 kDa (Mid49 et 51) et les facteurs de fission mitochondriale qui recrutent la *GTPase dynamin-related protein 1* (DRP1) sur les sites où le RE et les mitochondries s'attachent (Friedman et al., 2011; Youle et al., 2012). Ensuite, DRP1 transloque à travers la MME où elle se multimérisse, formant une structure en anneau autour de l'organite qui provoque la rupture des deux membranes. Une fois la fission mitochondriale terminée, la mitochondrie saine est réintégrée au réseau tubulaire tandis que la régulation négative des médiateurs de la fusion isole les mitochondries endommagées et facilite la mitophagie (Archer, 2013). Lors de la division cellulaire, la fission génère ainsi le nombre nécessaire d'organites qui seront redistribués dans les cellules filles. La fission peut également se produire pour faciliter l'autophagie des mitochondries dépolarisées, caractérisées par un faible potentiel de membrane mitochondrial et une production d'ATP réduite (El-Hattab et al., 2018). Une fission excessive peut cependant conduire à l'apoptose cellulaire par la libération de facteurs induisant l'apoptose (Bano et al., 2018) tel que le cytochrome c, par perméabilisation de la MME ou lors de l'ouverture des jonctions qui relient les crêtes au reste de la MMI (Martinou et al., 2006).

La fusion est quant à elle médiée dans la MME par les isoformes mitofusine (MFN) 1 et MFN2, qui forment des homo- ou hétérodimères, et par l'*optic atrophy 1* (OPA1) dans la MMI, qui facilite la fusion des membranes internes (Youle et al., 2012). MFN2 est d'ailleurs co-activé par PGC1 $\alpha$ , soulignant le lien entre biogenèse et fusion dans le contrôle du nombre de mitochondries. La fusion permet à la cellule d'augmenter d'une part sa capacité oxydative et de favoriser la production d'ATP nécessaire aux cellules en croissance et d'autre part, c'est un processus par lequel chaque mitochondrie compense les défauts de l'autre (Archer, 2013). La machinerie de fusion permet en effet des échanges d'ADNmt, de protéines et de composants membranaires entre les mitochondries et assure donc la longévité et le maintien de la fonction mitochondriale (Naghdi et al., 2018).



**FIGURE 12. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES IMPLIQUES DANS LA FUSION ET LA FISSION MITOCHONDRIALE**

*Abréviations : Drp1, dynamin-related peptide 1 ; RE, réticulum endoplasmique ; Fis1, protéine de fission mitochondriale 1 ; MMI, membrane mitochondriale interne ; EIM, espace intermembranaire ; MMO, membrane mitochondriale externe ; MFF, facteur de fission mitochondriale ; MFN, mitofusine ; MiD, protéine de dynamique mitochondriale ; Oma1, Zinc Metallopeptidase ; OPA1 (-L, -S), Optic Atrophy 1 (formes longue et courte, respectivement) ; SUMO, petit modificateur de type ubiquitine ; Yme1, protéine 1 d'échappement mitochondrial de levure. Tiré de (McKay et al., 2020).*

Alors qu'un équilibre entre la fission et la fusion maintient un nombre stable de mitochondries dans une cellule en régulant la morphologie mitochondriale et sa bioénergétique, des changements dans l'équilibre de cette dynamique peuvent se produire en réponse à un stress cellulaire. Un déséquilibre entre la fusion et la fission vers la fusion donne alors lieu à des mitochondries allongées et tubulaires, constituant un réseau tubulaire mitochondrial, tandis qu'un déséquilibre vers la fission génère des mitochondries fragmentées (Chan, 2006), souvent associées à une diminution de la production d'ATP et considérées comme pathologiques (Dagda et al., 2009; Lutz et al., 2009). Alors que les altérations de la morphologie mitochondriale sont associées à une altération de la production d'énergie mitochondriale (Lewis et al., 2009; Nazli et al., 2004; Somasundaram et al., 1997; Yeganeh et al., 2018), le métabolisme mitochondrial contrôle réciproquement la morphologie mitochondriale. En cas de stress métabolique, les mitochondries ont tendance à fusionner afin

d'augmenter leur capacité d'oxydation, maximisant ainsi l'OXPPOS et la production d'énergie (Youle et al., 2012).

### **IV.3.3. Mitophagie**

L'autophagie est une voie catabolique, conservée au cours de l'évolution, qui élimine les composants cytoplasmiques, y compris les organites endommagés, par dégradation lysosomale. Appliqué aux mitochondries, ce processus est appelé mitophagie et entraîne l'élimination des mitochondries endommagées afin d'empêcher la production excessive des mtERO et la toxicité cellulaire (Hamacher-Brady et al., 2016). La mitophagie est médiée par la *phosphatase and tensin homolog-induced kinase 1* (PINK1) et par la protéine *RBR E3 ubiquitin protein ligase* cytosolique (Parkin) (Pellegrino et al., 2015). Dans les mitochondries saines, PINK1 est localisée à l'intérieur des mitochondries. Cependant, dans les mitochondries endommagées, résultant d'une MMI dépolarisée ou d'un excès de protéines mal conformées au-delà de la limite de réparation (voir IV.3.4), PINK1 ne peut pas être importée dans les mitochondries et s'accumule sur la MME (Pellegrino et al., 2015). Les mitochondries endommagées sont donc reconnues par la Parkin, ce qui provoque son recrutement du cytosol vers la MME. Ensuite, PINK1 phosphoryle et active Parkin, déclenchant ainsi l'ubiquitination de protéines de la MME principalement au niveau des lysines 48, telles que MFN1/2 et TOMM20 (Sulkshane et al., 2021), et le recrutement de la machinerie du mitophagosome (Kondapalli et al., 2012). Le phagosome fusionne avec un lysosome et procède à la dégradation des mitochondries par l'intermédiaire de protéases et de lipases lysosomales (Pellegrino et al., 2015).

La mitophagie semble également être liée à la mobilité des mitochondries. Wang *et al* ont suggéré que, pendant la mitophagie, la combinaison des activités de PINK1 et de Parkin contribue à isoler les mitochondries endommagées du réseau de kinésine par la dégradation protéasomique de Miro (Wang et al., 2011) ainsi que par la régulation négative des médiateurs de la fusion, diminuant la probabilité de fusion des mitochondries trop endommagées avec les saines (Twig et al., 2010).

### **IV.3.4. Contrôle qualité de la mitochondrie par la « mitochondrial unfolded protein response »**

En plus de la dynamique mitochondriale et de ses régulations, le contrôle qualité de la mitochondrie est médié par la *mitochondrial unfolded protein response* (mtUPR). Cette voie est déclenchée par l'accumulation de protéines mal repliées dans les mitochondries causée, notamment, par une production excessive d'ERO (Papa et al., 2014). La mtUPR est ainsi

capable de réduire le stress protéotoxique mitochondrial et de rétablir l'homéostasie protéique en augmentant les chaperonnes mitochondriales et le pool de protéases. En cas de stress induit par des protéines mal conformées, un dialogue entre la mitochondrie et le noyau est déclenché et active le facteur de transcription *C/EBP homologous protein* (CHOP). CHOP active ensuite la transcription de chaperonnes et de protéases mitochondriales (Papa et al., 2014).

La mtUPR induit également l'expression de NRF1, impliqué dans la biogénèse mitochondriale (Papa et al., 2014). Elle présente un axe de régulation qui repose sur l'interaction entre la sirtuine (SIRT) 7 et NRF1, dans lequel le stress causé par l'accumulation de protéines mal repliées, en réponse à la privation de nutriments, induit l'expression de SIRT7 qui à son tour réprime NRF1 et conduit à une diminution de l'activité mitochondriale et de sa biogénèse pour éviter la mort cellulaire (Mohrin et al., 2015). Ce mécanisme favorise donc la quiescence cellulaire et la résistance au stress nutritionnel (Mohrin et al., 2015).

La mtUPR présente également un mécanisme de résistance au stress mitochondrial qui implique la désacétylase mitochondriale SIRT3, sans faire intervenir CHOP (He et al., 2016). Il a en effet été démontré que l'axe SIRT3 de la mtUPR limite les dommages oxydatifs dans les mitochondries en situation de stress en induisant l'expression de l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase (SOD) 2, via l'activation du facteur de transcription nucléaire FOXO3, et favorise l'élimination des mitochondries irréparables en activant les cibles de la mitophagie (He et al., 2016).

La mtUPR régule ainsi l'activation des gènes impliqués dans les voies métaboliques, les mécanismes de piégeage des ERO et la dynamique mitochondriale, soutenant ainsi le rétablissement de l'homéostasie protéique ainsi que le métabolisme afin de résister au stress mitochondrial et de maintenir l'intégrité du réseau mitochondrial (Haynes et al., 2013).

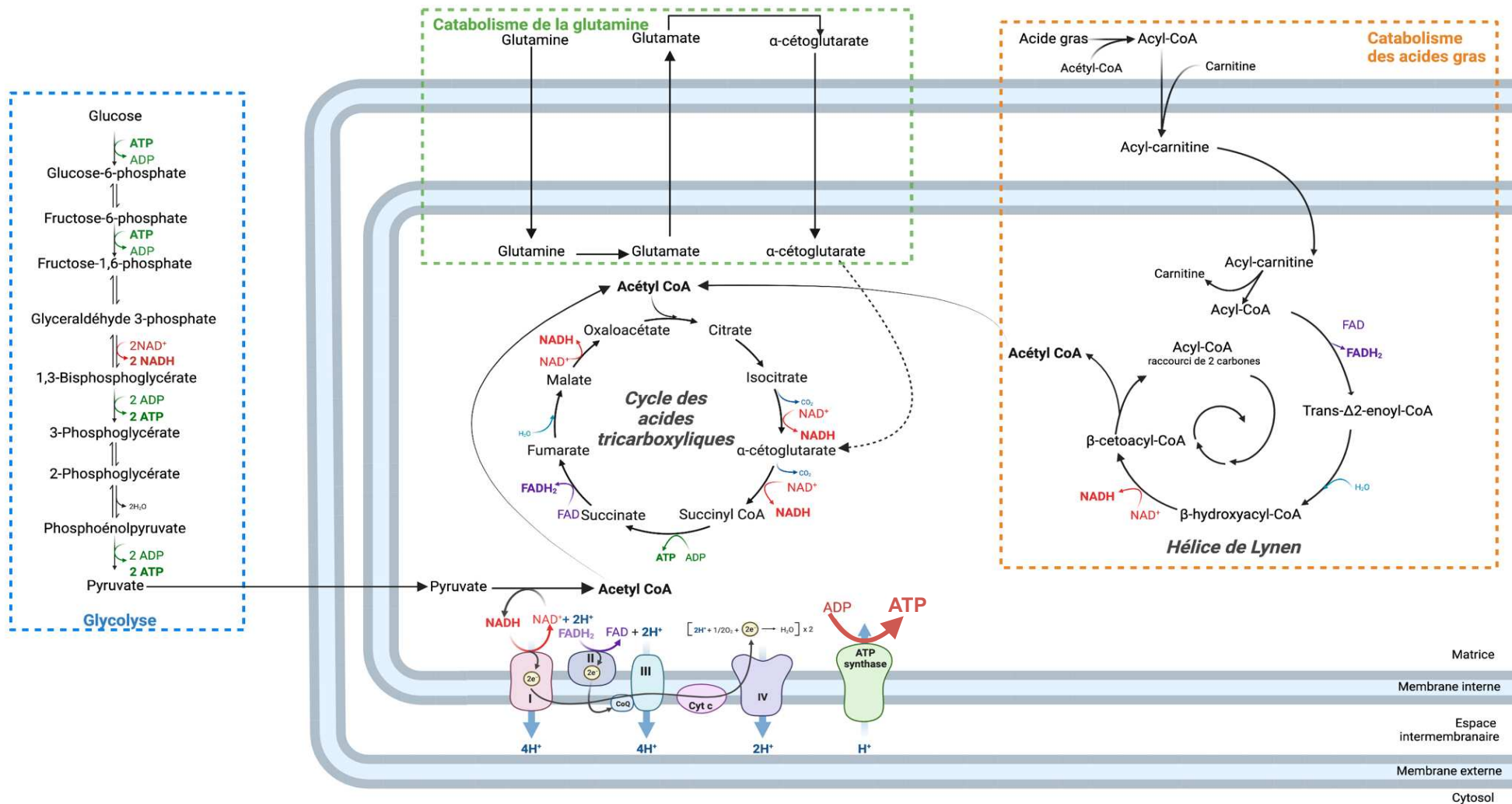
#### **IV.4. La bioénergétique mitochondriale**

La mitochondrie est considérée comme la centrale énergétique de la cellule, produisant des molécules d'ATP, dont la rupture d'une liaison au groupement phosphate (générant de l'adénosine diphosphate – ADP), libère de l'énergie. Produite par l'OXPHOS, cette énergie consiste en l'oxydation des cofacteurs d'oxydo-réduction nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et flavine adénine dinucléotide (FADH<sub>2</sub>) couplée à la phosphorylation de l'ADP en

ATP. Le NADH et le  $\text{FADH}_2$  sont obtenus par des voies cataboliques telles que la  $\beta$ -oxydation des acides gras via l'hélice de Lynen, le catabolisme des glucides, qui inclut la glycolyse, ou par le catabolisme des acides aminés. Ces voies produisent de l'acétyl-CoA qui entre dans le TCA, également appelé cycle de Krebs, dans lequel chaque décarboxylation oxydative génère du NADH (**Figure 13**).

Étant donné que l'Acétyl-CoA qui alimente le TCA peut être obtenu par diverses voies cataboliques, cette coenzyme est considérée comme un carrefour métabolique. D'autre part, les intermédiaires métaboliques du TCA participent à des réactions d'anabolisme qui forment des glucides, des acides gras ou des acides aminés. Le TCA étant impliqué à la fois dans l'anabolisme et le catabolisme, il est considéré comme amphibolique.

Au cours de leur oxydation, le NADH et le  $\text{FADH}_2$  transfèrent leurs électrons, ce qui initie le flux d'électrons à travers la CTE, également appelé chaîne respiratoire. La variation d'enthalpie libre générée par l'oxydation du NADH et du  $\text{FADH}_2$ , très exergonique au niveau des complexes I et III, permet la translocation de protons à travers ces deux complexes, de la matrice mitochondriale vers l'EIM, générant un gradient de protons. Ce gradient entraîne à son tour le transport de protons de l'EIM vers la matrice à travers l'ATP synthase et constitue une force proton-motrice qui entraîne la rotation des sous-unités de l'ATP synthase. Cette énergie mécanique permet enfin la synthèse d'ATP par couplage osmo-chimique à partir de la condensation du phosphate inorganique et de l'ADP. Ainsi, le passage de trois protons dans l'ATP synthase permet une rotation complète de ses sous-unités et la production d'une molécule d'ATP. En bilan de la chaîne d'OXPHOS, l'oxydation d'une molécule de NADH produit trois molécules d'ATP (puisqu'elle s'accompagne d'un transfert de quatre protons par le complexe I) tandis qu'une molécule de  $\text{FADH}_2$  produit deux molécules d'ATP (car il n'y a pas de transfert de proton par le complexe II).



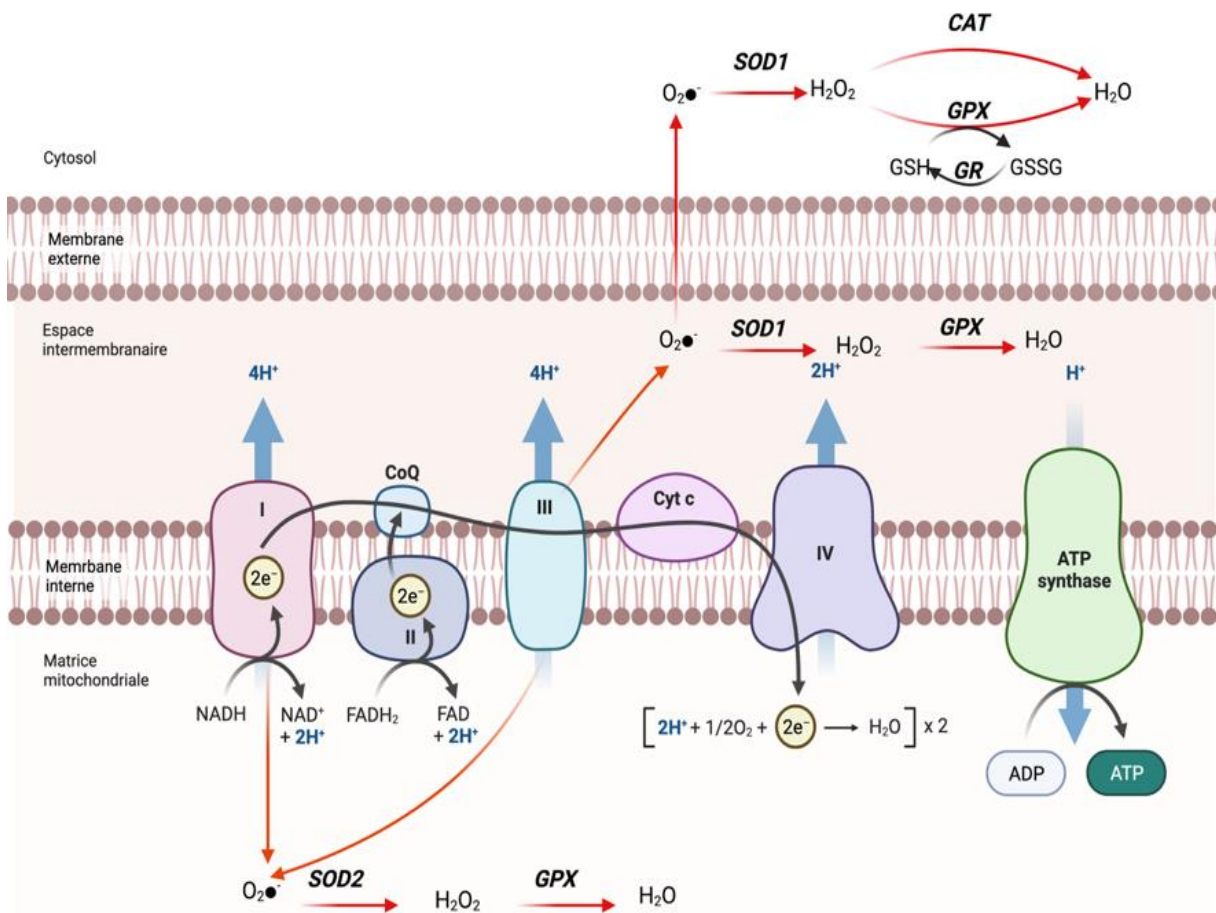
**FIGURE 13. BIOENERGETIQUE MITOCHONDRIALE DES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES**

Le catabolisme de la glutamine, des acides gras ainsi que la glycolyse fournissent les intermédiaires, sous forme d'Acétyl-CoA ou d'α-cétoglutarate, qui alimentent le cycle des acides tricarboxyliques. Les décarboxylations oxydatives successives de ce cycle fournissent les coenzymes d'oxydo-réduction NADH et FADH<sub>2</sub> qui sont par la suite respectivement oxydés par les complexes I et II de la chaîne de respiration mitochondriale. Leur oxydation fournit les électrons qui sont transférés d'un complexe mitochondrial à un autre, s'accompagnant d'un transfert de proton de la matrice vers l'espace intermembranaire, générant un gradient de protons nécessaire à la synthèse d'ATP au niveau du complexe V par force proton-motrice. Adapté de (Guerbette et al., 2022)



## IV.5. Génération des espèces réactives de l'oxygène

Les mitochondries constituent la source la plus abondante des ERO dans la cellule. Les ERO comprennent les radicaux superoxydes ( $O_2^{\bullet-}$ ) et leurs intermédiaires de détoxification, tel que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), par des enzymes antioxydantes (hydroxyles et peroxydes). La principale source de mtERO est la CTE. En effet, l'OXPHOS n'est pas totalement efficace car 0,2 à 2 % des électrons peuvent fuir des complexes I et III, et interagir avec l' $O_2$  pour produire des ERO, notamment  $O_2^{\bullet-}$  (Zhao et al., 2019) (**Figure 14**).

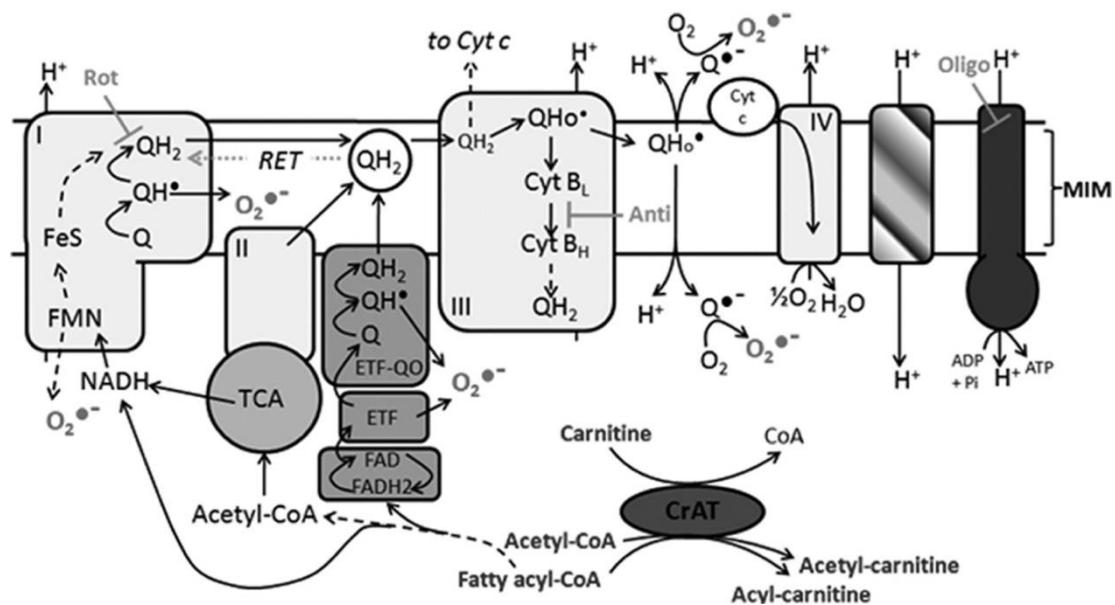


**FIGURE 14. PRODUCTION D'ESPÈCES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE MITOCHONDRIALES (MTERO) ET PRINCIPALES VOIES DE DÉTOXIFICATION**

*L'oxydation des coenzymes redox NADH et  $FADH_2$  peut occasionner des fuites d'électrons des complexes I, vers la matrice mitochondriale, et III, à la fois vers la matrice et l'espace intermembranaire, de la chaîne de respiration mitochondriale. Les électrons peuvent interagir avec du dioxygène et former des radicaux libres de l' $O_2$ , générant ainsi des ERO sous la forme d'anions superoxydes  $O_2^{\bullet-}$ . Les  $O_2^{\bullet-}$  sont ensuite détoxifiés par les superoxydes dismutases (SOD) 1/2 pour générer des peroxydes d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) puis le dégrader en  $H_2O$  par les glutathions peroxydases (GPX) ou la catalase (CAT). Adapté de (Guerbette et al., 2022).*



Certaines enzymes mitochondriales constituent également, dans une moindre mesure, une source de mtERO. Tout d'abord, les flavoprotéines pyruvate et  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénases situées dans la matrice constituent une source de  $O_2^{\bullet-}$  et  $H_2O_2$  par le transfert d'électrons via leur sous-unité flavine (Starkov et al., 2004). Ensuite, la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras est également une source de ERO. Elle peut d'abord favoriser les fuites d'électrons de la CTE des complexes I et III ainsi que des flavoprotéines et des oxydoréductases qui transfèrent des électrons issus de l'oxydation des acides gras. La déshydrogénation des acétyl-CoA par l' $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase dans le cycle de Krebs est également une source d'ERO (Seifert et al., 2010; Zhang et al., 2019) (**Figure 15**).



**FIGURE 15. MECANISMES POSSIBLES DE FORMATION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (ERO) PENDANT LA  $\beta$ -OXYDATION**

*La  $\beta$ -oxydation des acides gras est susceptible de générer des ERO par le biais de fuites provenant des échanges d'électrons, catalysés par l'électron transfer flavoprotein (ETF)-oxidoreductase, entre les ETF et la quinone (Q), au cours de la déshydrogénation des acyl-coA en 2-enoyl-coA. L'oxydation des co-enzymes d'oxydo-réduction émanant de la  $\beta$ -oxydation ou du cycle des acides tricarboxyliques (TCA) peut également produire des ERO par l'intermédiaire du complexe I, au niveau de la flavine (flavin mononucléotide – FMN) ou de la quinone. Des électrons peuvent également fuir des quinones du complexe III pour générer des ERO. Tiré de (Seifert et al., 2010)*

Dans une moindre mesure, les ERO sont également produites dans d'autres compartiments cellulaires notamment par des oxydases cytosoliques, comme la xanthine oxydase (Battelli et al., 2016), ou au sein des peroxysomes via leurs oxydases (Schrader et al., 2004) et par les cytochromes P450 du RE (Bezirtzoglou, 2012). Par ailleurs, les NADPH oxydases membranaires, telles que la NADPH oxydase 1 (Nox1) principalement exprimée

dans le côlon (Bánfi et al., 2000) et Dual oxidase 2 (Duox2), localisées tout au long du tube digestif et plus particulièrement dans les extrémités des villosités de l'intestin grêle et les sommets des cryptes coliques (Sommer, 2015), génèrent également des ERO dans la lumière intestinale sous l'influence du microbiote.

Pour équilibrer la concentration en ERO, les cellules possèdent une machinerie enzymatique antioxydante endogène. La SOD1, pour les ERO de l'EIM et cytosoliques, ou la SOD2, pour les ERO de la matrice mitochondriale, catalysent la conversion de  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ . Ensuite,  $H_2O_2$  est réduit en  $H_2O$  et en disulfure de glutathion via la glutathion peroxydase (GPX), cytosolique ou mitochondriale, ou en  $H_2O$  via la catalase (CAT) cytosolique. Le glutathion peut ensuite être recyclé à partir du disulfure de glutathion par la glutathion réductase (Simonson et al., 1993). En outre, il a été montré que certains métabolites de la quinone inhibent l'activité du complexe I, provoquant ainsi la génération d'ERO (Fato et al., 2008). Cependant, en catalysant la réduction de la quinone via un électron provenant du NADH, la flavoprotéine NAD(P)H Quinone Déshydrogénase 1 (NQO1) exerce des propriétés antioxydantes, équilibrant ainsi le rapport  $NAD^+/NADH$  ainsi que la génération d'ERO. Les antioxydants exogènes, tels que les vitamines et minéraux alimentaires, jouent également un rôle dans l'équilibre des ERO, notamment en cédant un électron aux radicaux libres pour les stabiliser (Hengstermann et al., 2008).

Malgré l'activation de la machinerie antioxydante, un excès de génération d'ERO nuit à la viabilité cellulaire, par la peroxydation lipidique ou par des dommages aux protéines et à l'ADN, et déclenche finalement l'apoptose (Zhao et al., 2017). De plus, la surexpression de PGC1 $\alpha$  dans certaines cellules augmente l'activité mitochondriale et l'accumulation des ERO, (D'Errico et al., 2011). Par ailleurs, il a été montré que l'accumulation de radicaux libres intracellulaires diminue l'activité des enzymes antioxydantes mitochondriales (SOD, GPX et CAT) dans le modèle *in vitro* d'entérocytes de porc IPEC-J2 (Cai et al., 2013). Puisque l'ADNmt et les enzymes du TCA semblent être extrêmement vulnérables aux lésions dues aux ERO, les mitochondries sont considérées comme la cible principale des dommages cellulaires induits par les ERO (Chinopoulos et al., 1999; LeDoux et al., 2007).

Cependant, les ERO jouent également des rôles bénéfiques dans l'homéostasie des tissus. En tant que seconds messagers, les ERO sont impliquées dans les voies de transduction intracellulaires et contrôlent l'action de multiples voies de signalisation notamment en activant la voie des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), impliquée notamment dans l'apoptose, la prolifération et la différenciation ainsi que dans l'inflammation par le biais de l'activation transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B (Matsuzawa et al., 2008; Zhao et al.,

2017). Elles sont également impliquées dans la voie de l'apoptose mitochondriale *via* la *Bcl-2-associated X protein* (BAX). Ces protéines favorisent en effet la perméabilisation de l'OMM, ce qui entraîne la libération de facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c, de l'IMM vers le cytosol (D'Errico et al. 2011). Outre son rôle apoptotique, il a également été révélé que BAX joue un rôle dans la bioénergétique mitochondriale puisque des CEC *in vitro* déficientes en BAX présentent une diminution de l'OXPPOS et de la production d'ATP (Boohaker et al. 2011).

## V. HOMEOSTASIE INTESTINALE ET FONCTION MITOCHONDRIALE DES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES

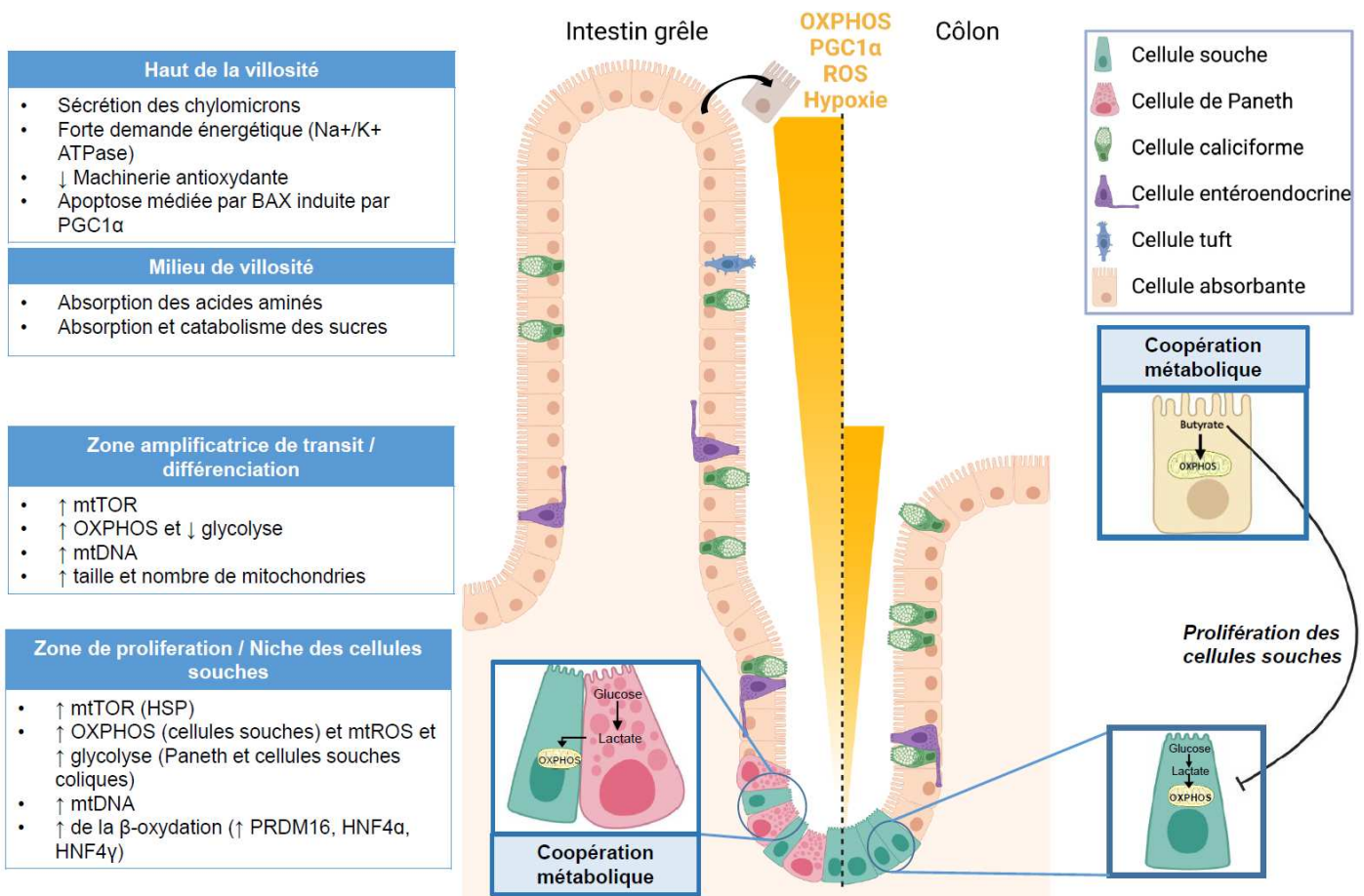
---

### V.1. Zonation de l'épithélium intestinal et activités métaboliques le long de l'axe crypte-villosité

#### V.1.1. Activités métaboliques le long de l'axe crypte-villosité

Au cours de leur ascension vers le haut de l'axe crypte-villosité ou de la crypte colique, les CEI passent par différents états de différenciation associés à diverses fonctions, dépendantes de l'environnement extracellulaire et de l'expression des gènes, supportées par différentes activités métaboliques. En traçant les cellules progénitrices issues des CSI, Moor *et al.* ont observé que presque aucun gène n'est exprimé de façon continue le long de l'axe crypte-villosité, ce qui suggère que la différenciation des entérocytes n'est pas définitive lorsqu'ils se situent dans les villosités, mais plutôt qu'ils se transdifférencient en permanence (Moor *et al.*, 2018). Les mécanismes d'absorption des nutriments sont également différents le long de l'axe crypte-villosités, comme révélé par des profils de zonation des gènes impliqués dans l'absorption des nutriments dans le jéjunum de souris. Le profil d'expression des gènes dans les entérocytes en milieu de villosités suggère que ceux-ci sont impliqués dans l'absorption des acides aminés ainsi que dans l'absorption et le métabolisme des glucides. Les CEI dans le haut des villosités sont quant à elles plutôt impliquées dans l'absorption des lipides et la sécrétion des chylomicrons (Moor *et al.*, 2018) (**Figure 16**).

De façon associée à la zonation fonctionnelle et leur état de différenciation, les CEI présentent une zonation métabolique le long de l'axe crypte-villosité. Les cellules de Paneth possèdent un phénotype glycolytique élevé, tandis que les CSI présentent à la fois des activités glycolytiques et d'OXPPOS relativement élevées (Rodríguez-Colman *et al.*, 2017). Les entérocytes différenciés au sommet des villosités (Stringari *et al.*, 2012), ou les colonocytes matures (Litvak *et al.*, 2018), ont majoritairement recours à l'OXPPOS pour répondre à leurs besoins énergétiques importants (**Figure 16**). En tant que modulateur de la biogénèse mitochondriale, PGC1 $\alpha$  peut agir comme un régulateur métabolique du devenir des CEI. En étant exprimé de façon graduelle du bas des cryptes au sommet des villosités, là où son expression est la plus importante, de manière concomitante à son co-activateur de gènes cibles PPAR $\gamma$  (Lefebvre *et al.*, 1999), PGC1 $\alpha$  semble contribuer à ce gradient métabolique. En plus de moduler la biogénèse mitochondriale, l'OXPPOS et la  $\beta$ -oxydation des acides gras, PGC1 $\alpha$  peut stimuler la capacité respiratoire (démontrée par une plus grande activité de la cytochrome c oxydase) des cellules (D'Errico *et al.*, 2011)



**FIGURE 16. FONCTION MITOCHONDRIALE DES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES ET ZONATION METABOLIQUE LE LONG DE L'AXE CRYPTE-VILLOSITE**

Les cellules souches intestinales ont recours à la glycolyse pour rapidement produire l'énergie nécessaire à leur prolifération, ainsi qu'à la phosphorylation oxydative (OXPHOS), soutenue par le lactate fourni par les cellules de Paneth dans l'intestin grêle. Les cellules épithéliales différenciées ont quant à elle recours à l'OXPHOS à partir de glutamine ou de glucose dans l'intestin grêle et du butyrate dans le côlon, pour répondre à leur importante demande énergétique. Ce shift métabolique est réalisé dans la zone amplificatrice de transit où les cellules progénitrices, issues de la division asymétrique des cellules souches, montrent une dépendance accrue de l'OXPHOS, soutenue par la β-oxydation des acides gras dans l'intestin grêle, associée à une augmentation du nombre de mitochondrie régulé par Pgc1α, de leurs activités et d'une l'hypoxie physiologique. L'importante OXPHOS en haut des villosités et des cryptes coliques concomitante à la diminution de la machinerie anti-oxydante contribue à déclencher la mort cellulaire par anoikis. Adapté de (Guerbette et al., 2022; Ho and Theiss, 2022; Rath et al., 2018).

La transition des cellules TA en cellules différenciées est généralement, comme cela a été montré dans les fibroblastes, accompagnée d'un remodelage mitochondrial d'une forme sphérique avec peu de crêtes mitochondriales vers une forme allongée avec des crêtes bien développées, suggérant une augmentation de la fusion mitochondriale associée à une plus grande capacité de production d'ATP (Folmes et al., 2011). La biogénèse mitochondriale est en effet régulée le long de l'axe crypte-villosité. Des observations par microscopie électronique d'intestin grêle de rat révèlent que les CEI des villosités contiennent près de deux fois plus de mitochondries que les CEI des cryptes. Ces mitochondries semblent également plus grandes dans les villosités que dans les cryptes (Jeynes et al., 1975). De plus, dans des organoïdes de jéjunum de souris, la différenciation des CEI est associée à une augmentation du nombre de mitochondries (Rodríguez-Colman et al., 2017) comme montré dans d'autres tissus, tel que dans le cœur (Chung et al., 2007) ou dans les fibroblastes (Folmes et al., 2011).

Le long de l'axe crypte-villosité, la *mammalian target of rapamycin* (mTOR) augmente les quantités d'ADNmt et l'expression des gènes impliqués dans l'OXPPOS dans la CEI, sous l'influence des nutriments, comme les acides aminés et le glucose, et des facteurs de croissance, comme l'*insulin-like growth factor* (Fingar et al., 2004; Yang et al., 2016). De même, le répresseur de transcription Yin Yang 1 (YY1) et mTOR jouent des rôles essentiels dans la division asymétrique des CSI et l'activité des cellules progénitrices puisque leur délétion chez la souris perturbe la réparation de l'épithélium intestinal (Perekatt et al., 2014; Sampson et al., 2016). Dans les cellules souches musculaires, il a été démontré que mTOR régule la formation d'un complexe entre PGC1 $\alpha$  et YY1, ce qui entraîne une augmentation de la biogénèse mitochondriale et de l'expression des gènes de l'OXPPOS (Cunningham et al., 2007). Cependant, un tel mécanisme n'a pas encore été décrit dans l'intestin.

### **V.1.2. Implications des médiateurs mitochondriaux dans l'induction de la différenciation des cellules progénitrices**

Les médiateurs mitochondriaux ATP et ERO peuvent réguler le changement phénotypique des cellules le long de l'axe crypte-villosité. Pendant la différenciation cellulaire, de grandes quantités d'ATP sont nécessaires pour assurer l'absorption des nutriments et la fonction de barrière dans l'intestin.

Tout d'abord, il a été montré que la substitution du glucose par du galactose dans le milieu d'organoïdes d'intestin grêle de souris favorisait le développement de cryptes matures dans ces organoïdes (Rodríguez-Colman et al., 2017). Étant donné que le galactose favorise l'OXPPOS et augmente les taux de consommation d'oxygène, les auteurs ont suggéré qu'une augmentation de l'activité mitochondriale par le biais de l'OXPPOS entraînerait la différenciation des CEI pendant la formation des cryptes d'organoïdes. De plus, l'inhibition de l'activité du complexe I dans ces organoïdes, par l'ajout de roténone, et/ou du complexe IV, par le biais de l'azide, empêche la formation des cryptes. Ces résultats indiquent donc que l'activité OXPPOS des CSI, soutenue par la glycolyse des cellules de Paneth, est nécessaire à la prolifération des CSI tandis que l'OXPPOS des cellules TA participe à l'induction de la différenciation (Rodríguez-Colman et al., 2017). Par ailleurs, l'activité OXPPOS des cellules TA est associée à la génération d'ERO, nécessaires à la différenciation en CEI. Il a effectivement été décrit dans des organoïdes d'intestin grêle de souris que p38, une MAP kinase sensible au statut d'oxydo-réduction des cellules et impliquée dans la différenciation des CEI en activant la protéine *homeobox* Cdx2 (Houde et al., 2001), est activée par les ERO pendant la formation et la différenciation des cryptes (Rodríguez-Colman et al., 2017). L'analyse par immunohistochimie de l'intestin grêle de souris révèle en outre que p38 est activée à la base des cryptes intestinales tandis qu'elle l'est beaucoup moins à l'extrémité des villosités.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'ATP produit par OXPPOS et les ERO sont des médiateurs qui contrôlent la formation des cryptes et la différenciation des CEI p38-dépendante.

## **V.2. La fonction mitochondriale dans le contrôle de l'homéostasie des cellules souches intestinales**

De nombreuses études suggèrent que l'activité métabolique des cellules pourrait déterminer le phénotype cellulaire et même contrôler la destinée des CSI (Folmes et al., 2011). De façon générale, les cellules en prolifération active nécessitent une forme d'énergie rapidement mobilisable. Cette énergie est fournie par une activité glycolytique élevée au détriment de l'OXPPOS (Fan et al., 2015). Cette caractéristique métabolique est assimilable

à l'effet Warburg, une altération métabolique des cellules cancéreuses décrite par Otto Warburg et caractérisée par une glycolyse importante, suivie d'une fermentation lactique (Warburg, 1956). Les cellules LGR5+ étant hautement prolifératives, elles présentent une activité glycolytique élevée. Cependant, en plus d'une importante glycolyse, l'activité d'OXPHOS des CSI d'intestin grêle est relativement élevée. Ceci est dû à l'oxydation importante du lactate fourni par les cellules de Paneth, comme observé dans des organoïdes d'intestin grêle de souris (Rodríguez-Colman et al., 2017). De plus, l'analyse de la fluorescence du ratio NADH/NAD<sup>+</sup> dans l'intestin grêle de souris par microscopie confirme un gradient métabolique le long de l'axe crypte-villosité, avec une activité glycolytique élevée dans les cellules de Paneth, qui soutient l'OXPHOS des CSI au fond des cryptes via l'apport en lactate, et une OXPHOS importante dans les entérocytes différenciés au sommet des villosités (Stringari et al., 2012). Ainsi, dans l'intestin grêle, les cellules présentent des activités métaboliques différentes mais coopératives (**Figure 16**).

Très récemment, il a été montré que la  $\beta$ -oxydation des acides gras joue par ailleurs un rôle majeur dans le maintien du caractère souche des CSI et dans le renouvellement de l'intestin grêle (Mana et al., 2021; Mihaylova et al., 2018) par l'intermédiaire des facteurs de transcription *Hepatocyte Nuclear Factor* (HNF) 4 $\alpha$  et HNF4 $\gamma$  (Chen et al., 2020), deux régulateurs de l'oxydation des acides gras. Des souris double KO pour ces 2 facteurs sont caractérisées par une perte du caractère souche des CSI et un renouvellement épithélial réduit (Chen et al., 2020). En outre, la délétion de la carnitine palmitoyltransférase 1a (Cpt1a) chez la souris provoque une diminution du nombre de CSI ainsi que de leur aptitude à se renouveler (Mihaylova et al., 2018). Enfin, PRDM16, un facteur de transcription qui favorise l'oxydation des acides gras par l'activation des PPAR, s'avère être nécessaire à la survie des cellules progénitrices dérivées des CSI issues de duodénum et de jéjunum (Stine et al., 2019). Cette potentialisation de la survie des cellules progénitrices se fait par ailleurs selon un gradient intestinal : du duodénum, où la  $\beta$ -oxydation et l'expression de PRDM16 sont les plus importantes, et décline vers l'iléon (Stine et al., 2019).

Dans le côlon, les cellules de Paneth ne sont pas présentes. Les cellules souches coliques effectuent alors elles-mêmes la conversion du glucose en lactate par glycolyse anaérobie, même en présence d'oxygène, ce qui leur confère un métabolisme assimilable à l'effet Warburg (Fan et al., 2015). En outre, une barrière métabolique est établie dans les cryptes coliques, également appelée "paradoxe du butyrate", qui protège les CSI de l'effet anti-prolifératif du butyrate. Cet acide gras à chaîne courte (AGCC) produit par le microbiote intestinal peut, à des concentrations physiologiques, inhiber la prolifération des CSI. Le butyrate bloque en effet l'activité de l'histone désacétylase (HDAC), augmentant ainsi la liaison



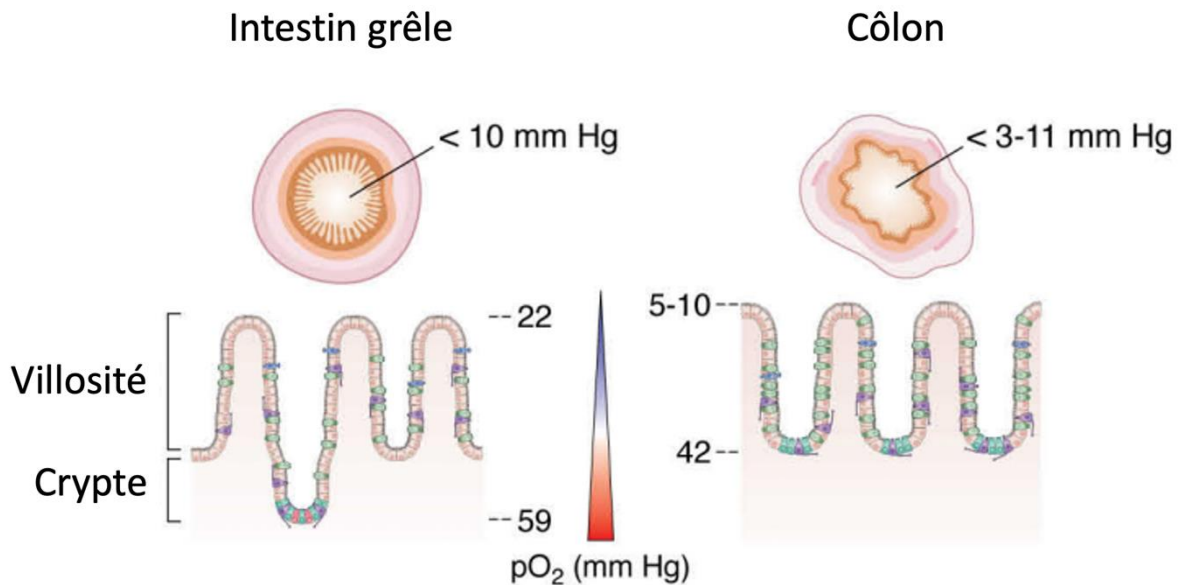
de FOXO3 sur les régulateurs inhibant l'expression des gènes du cycle cellulaire et la prolifération des CSI (Kaiko et al., 2016). Si les CSI étaient exposées à du butyrate, elles ne l'oxyderaient probablement pas puisqu'elles possèdent un métabolisme plus glycolytique qu'aérobie (Fan et al., 2015), provoquant son accumulation dans le cytoplasme et inhibant leur prolifération (Kaiko et al., 2016). Il a en effet été montré que 10 mM de butyrate provoquent l'apoptose des CSI par arrêt préalable du cycle cellulaire via l'inhibition de HDAC (Kaiko et al., 2016). Cependant, les colonocytes situés au sommet de la crypte oxydent préférentiellement le butyrate, limitant ainsi sa concentration à proximité des CSI dans le bas des cryptes, et favorisant leur prolifération (Kaiko et al., 2016) (**Figure 16**). Ceci témoigne d'une autre coopération métabolique entre les différents types de CEI.

Enfin, les mitochondries sont capables de moduler le caractère souche et la prolifération des CSI via la mtUPR et notamment via la HSP mitochondriale 60 (Hsp60) (Berger et al., 2016). Des souris KO pour Hsp60, une chaperonne nécessaire au repliement et à l'assemblage des protéines importées dans les mitochondries (Cheng et al., 1990), montrent une activation de la mtUPR associée à une altération de la fonction mitochondriale, caractérisée par une diminution de l'expression des gènes qui codent des sous-unités des complexes de l'OXPHOS ainsi qu'une diminution de la capacité respiratoire et de la production d'ATP (Berger et al., 2016). De plus, les cryptes jéjunales provenant de souris mutées Hsp60 présentent une diminution de la prolifération cellulaire et du caractère souche, suggérant un rôle majeur de la fonction mitochondriale dans le maintien du caractère souche et de la prolifération cellulaire (Berger et al., 2016).

### V.3. Bioénergétique mitochondriale et hypoxie physiologique dans l'intestin

Étant donné que l'OXPHOS nécessite une grande quantité d'oxygène, elle participe à l'hypoxie physiologique intestinale et donc au maintien de l'homéostasie (**Figure 17**). De cette façon, PGC1 $\alpha$  favorise le maintien de l'hypoxie épithéliale, en soutenant le métabolisme aérobie des CEI et CEC, et la croissance de bactéries anaérobies strictes (Furuta et al., 2001). Quant à PPAR $\gamma$ , il agit en tant que récepteur nucléaire, principalement exprimé dans les colonocytes différenciés et activé par le butyrate, pour déclencher la  $\beta$ -oxydation et contribuer à la forte activité OXPHOS et à l'hypoxie au sommet des cryptes (Donohoe et al., 2011; Litvak et al., 2018). Le maintien de cette hypoxie physiologique est de plus primordial pour préserver l'homéostasie intestinale. En situation d'hypoxie, les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  du facteur inductible de l'hypoxie (HIF) interagissent entre elles et déclenchent notamment l'expression de gènes

impliqués dans la production de peptides antimicrobiens, tels que la  $\beta$ -défensine-1 humaine (Kelly et al., 2013), ou de facteurs impliqués dans le maintien de la barrière intestinale tels que la mucine-3 (Furuta et al., 2001) ou les *trefoil factors* (Louis et al., 2006).



**FIGURE 17. MAINTIEN DE L'HYPOXIE DANS L'INTESTIN ET FONCTION MITOCHONDRIALE DES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES**

*Un gradient d'hypoxie se crée le long de l'axe crypte-villosité de l'intestin grêle, ou de l'axe de la crypte dans le côlon, soutenu par un apport en  $O_2$  via la circulation sanguine aux CEI. Les cellules souches intestinales et de Paneth en bas des cryptes présentent un phénotype glycolytique, tandis qu'au fur et à mesure de leur progression vers le sommet de la crypte/villosité, les cellules épithéliales connaissent des transitions phénotypiques associées à une importante activité mitochondriale aérobie qui consomme une forte quantité d' $O_2$ , ce qui permet d'instaurer une hypoxie physiologique. Adapté de (Singhal et al., 2020).*

#### V.4. Fonction mitochondriale et apoptose induite par les espèces réactives de l'oxygène mitochondriales

La surexpression de PGC1 $\alpha$  et l'augmentation de l'OXPPOS dans les CEI différenciées s'accompagnent également d'une augmentation de la production de mtERO. Cependant, dans l'intestin, contrairement à d'autres tissus où elle induit l'expression d'enzymes anti-oxydantes (St-Pierre et al., 2006), la surexpression de PGC1 $\alpha$  ne provoque pas d'effet sur la détoxification des ERO (D'Errico et al., 2011). De plus, les enzymes de la machinerie antioxydante, telles que SOD2 et CAT, étant faiblement exprimées dans les extrémités des villosités (Turan et al.,

2009) ou au sommet des cryptes coliques, cette accumulation d'ERO contribue à déclencher la mort cellulaire par anoikis (D'Errico et al., 2011). Ainsi, dans un intestin sain, la prolifération des CSI au fond des cryptes est contrebalancée par l'apoptose des CEI à l'extrémité des villosités ou des cryptes coliques.

PGC1 $\beta$ , un homologue de PGC1 $\alpha$ , exprimé tout au long de l'axe crypte-villosité dans l'intestin grêle et des cryptes dans le côlon, active également l'OXPPOS mais protège l'épithélium intestinal contre les dommages induits par les ERO en stimulant la production d'enzymes antioxydantes, telles que SOD2 et GPX4 (Bellafante et al., 2014). En effet, la surexpression de Pgc1 $\beta$  chez la souris active la machinerie antioxydante et entraîne une augmentation de la durée de vie des entérocytes et une sensibilité accrue aux tumeurs, tandis que les souris KO pour Pgc1 $\beta$  sont protégées contre la carcinogenèse intestinale (Bellafante et al., 2014). Par conséquent, PGC1 $\beta$  orchestre l'équilibre entre l'activité mitochondriale accrue et la protection contre la surproduction d'ERO tout au long de l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon.

## V.5. Fonction mitochondriale et barrière intestinale

Il apparaît que, du fait de la grande quantité d'énergie nécessaire au renouvellement épithélial, aux transporteurs ATPase-dépendants, au maintien des jonctions serrées par les phénomènes de phosphorylation ainsi qu'à la synthèse des glycoprotéines du mucus et des peptides antimicrobiens, l'épithélium intestinal requiert une grande quantité d'énergie. Ainsi, bien que le tractus gastro-intestinal ne représente que 5% du poids total du corps, il consomme 20% de l'oxygène total de l'organisme (Blachier et al., 2009). Cette production d'énergie est réalisée par la mitochondrie qui jouerait donc un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie intestinale et dans l'intégrité de la barrière épithéliale. Des études, principalement menées sur des modèles *in vitro* de CEI, montrent que l'induction pharmacologique d'une dysfonction mitochondriale provoque une augmentation de perméabilité intestinale. D'abord, Nazli *et al.* ont montré que le traitement des colonocytes *in vitro* (T84 et HT-29) avec du dinitrophénol (DNP), un découplant de l'OXPPOS, provoquait une augmentation de l'internalisation d'*Escherichia coli* (*E. coli*) non-pathogène et une augmentation de la synthèse d'IL-8 (Nazli et al., 2004). Cette dysfonction mitochondriale s'accompagne par ailleurs d'une altération de la morphologie mitochondriale caractérisée par des crêtes gonflées. Par conséquent, les auteurs ont suggéré que la dysfonction mitochondriale des CEI a induit un stress métabolique et a augmenté l'internalisation de bactéries pouvant exacerber l'inflammation intestinale. Puis, Wang *et al.* ont montré que l'altération de la fonction mitochondriale des cellules intestinales

T84 par le DNP entraîne un stress oxydant associé à une translocation accrue d' *E. coli* (Wang et al., 2014). En revanche, le traitement de ces CEI *in vitro* avec des antioxydants (MitoTEMPO ; mitoquinone) ciblant spécifiquement les mtERO a prévenu l'augmentation de la perméabilité épithéliale induite par la dysfonction mitochondriale pharmacologique (Lopes et al., 2018; Wang et al., 2014). Il a alors été conclu que la dysfonction mitochondriale de ces cellules engendre un stress oxydant qui serait responsable de l'hyperperméabilité épithéliale. Ce stress oxydant pourrait en effet augmenter la perméabilité intestinale par des phénomènes associés à la redistribution des occludines et de ZO-1 vers le compartiment intra-cellulaire, au réarrangement de l'actine, diminuant l'interaction entre cytosquelette et protéines des jonctions serrées (Rao, 2008), ou encore en phosphorylant l'occludine, par activation des *c-Jun N-terminal kinases*, provoquant sa dissociation de ZO-1 comme montré sur la lignée de CEI Caco-2 (Gangwar et al., 2017).

Outre la production délétère des mtERO, une déplétion en ATP, causée par une dysfonction mitochondriale, provoque une augmentation de la perméabilité épithéliale des Caco-2. Tout d'abord, puisque les Caco-2 ont un métabolisme principalement glycolytique, les auteurs ont substitué le milieu de culture riche en glucose par un milieu riche en galactose afin de garantir un métabolisme basal aérobie. Puis, ils ont montré que l'inhibition pharmacologique de la production d'ATP des Caco-2, en bloquant l'activité du complexe I mitochondrial (par la roténone ou la piéricidine A) ou en découplant la chaîne de respiration mitochondriale (par le carbonyl cyanide m-chlorophényl – CCCP), induisait une diminution de la TEER de façon concentration dépendante, entre 12h (en réponse au CCCP) et 24h (pour la piéricidine A). Cette augmentation de perméabilité s'accompagnait d'une redistribution de la CLDN7 du compartiment extra-cellulaire vers le cytosol (JanssenDuijghuijsen et al., 2017). Cette étude souligne ainsi l'importance de la fonction mitochondriale dans le maintien de la perméabilité intestinale.

## **VI. SUBSTRATS ENERGETIQUES NON LIPIDIQUES, METABOLITES LUMINAUX ET CONSEQUENCES METABOLIQUES SUR LES CEI**

---

### **VI.1. Substrats énergétiques des cellules épithéliales intestinales**

Les CEI sont des cellules polarisées qui font face à la lumière intestinale d'un côté et au milieu intérieur de l'autre. Alors que la composition du milieu intérieur est relativement stable chez les individus sains grâce à de puissants mécanismes de régulation de l'homéostasie, la composition de l'environnement luminal peut changer radicalement en fonction du régime alimentaire, de l'heure de la journée et de la composition et de l'activité du microbiote intestinal. En effet, la composition des repas ingérés ainsi que les habitudes alimentaires modifient directement la composition luminale de l'intestin grêle. Par ailleurs, et bien que la croissance des micro-organismes soit globalement inhibée par les acides biliaires et les sécrétions pancréatiques dans l'intestin grêle (Aron-Wisnewsky et al., 2012), le rôle des bactéries jéjunales sur l'absorption des nutriments, et notamment des lipides, est de plus en plus reconnu (Martinez-Guryn et al., 2018; Tazi et al., 2018). Quant au côlon, il constitue un lieu important de fermentation bactérienne. Ainsi, dans le côlon, les glucides alimentaires non digérés ou partiellement digérés (polysaccharides structurels des parois cellulaires végétales, oligosaccharides, amidon résistant), protéines et lipides alimentaires ou provenant de sources endogènes (sécrétions digestives, cellules exfoliées et mucines) sont métabolisés par les bactéries intestinales, ce qui entraîne une composition luminale variable, en fonction des facteurs alimentaires et/ou de la composition du microbiote (Kolodziejczyk et al., 2019).

Cette particularité de l'environnement des CEI conduit à une grande diversité de substrats énergétiques pour ces cellules. De façon générale, les entérocytes utilisent principalement le D-glucose, la L-glutamine et le L-glutamate en tant que substrats de l'O<sub>2</sub>PHOS (Alpers, 2000; Stoll et al., 1999), et les colonocytes produisent de l'énergie à partir de substrats provenant soit de la lumière, principalement le butyrate, soit dans une moindre mesure de la circulation systémique, comme le D-glucose, l'acétoacétate et la L-glutamine (Roediger, 1982). Cependant, de nombreux substrats et métabolites, provenant directement de l'alimentation ou de la transformation microbienne intestinale, sont également utilisés comme substrats énergétiques et peuvent moduler la fonction mitochondriale des CEI.

## VI.2. Effets des métabolites bactériens et des dérivés de nutriments ou de composés alimentaires sur la fonction mitochondriale des CEI

L'environnement luminal et les métabolites qui le composent, issus de la digestion ou du métabolisme bactérien, à partir de substrats exogènes ou endogènes, jouent un rôle fondamental dans la fonction mitochondriale des CEI et donc dans le maintien de l'homéostasie intestinale. En fonction de leur nature et de leur concentration, ces métabolites peuvent être utilisés comme substrat énergétique par le biais de l'OXPHOS ou bien au contraire perturber l'activité métabolique des cellules épithéliales. Outre les acides gras saturés du régime, la grande majorité des perturbateurs métaboliques décrits dans un contexte d'obésité sont dérivés des acides aminés (**Tableau 4**). De plus, les effets délétères de ces métabolites sur la mitochondrie des cellules épithéliales a souvent été démontrée au niveau colique.

**TABLEAU 4. ÉTUDES DECRIVANT LES METABOLITES BACTERIENS RETROUVES DANS LES FLUIDES DE SUJETS OBESES**

Participants	Fluide biologique	Métabolites plus concentrés chez les sujets obèses		Reference
15 d'obésité morbide et 10 témoins	Urine	2-hydroxyisobutyrate		(Calvani et al., 2010)
		Acides gras à chaîne ramifiée	Acide 2- méthylbutyrique	
20 sujets obèses et 20 de poids normal	Fèces	Acides phénoliques	Acide valérique et isovalérique	(Tiihonen et al., 2010)
		Acide lactique	Acide 3- OH-benzènepranoïque	
		Isobutyrate et butyrate		
15 enfants obèses et 15 de poids normal	Fèces	Propionate		(Payne et al., 2011)
		Formate		
		Diméthylglycine	3-méthylhistidine	
50 participants avec un IMC normal et 50 participants obèses	Plasma, sérum et urine	4-hydroxyphénylpyruvate	N-acétylglycoprotéine	(Ahmad et al., 2017)
		3-aminoisobutyrate	Acides biliaires	
		Lysine	Carnitine	
		Phénylalanine	Isoleucine	
118 sujets obèses et 139 sujets avec IMC normal	Sérum	Tyrosine	Valine	(Liu et al., 2017)
		Leucine	Glutamate	
			Leucine	
		Phénylalanine	Alanine	
Cohorte METSIM de 531 sujets dont 132 avec un IMC > 30 kg/m <sup>2</sup>	Plasma et sérum	TMAO	Glycérol	(Org et al., 2017)
		Isoleucine	Pyruvate	
		Isoleucine		
52 femmes en surpoids et 47 obèses	Sérum	Leucine	Phénylalanine	(Houttu et al., 2017)
		Valine		
		Leucine		
67 enfants d'IMC normal et 71 enfants obèses (agés de 6–12 ans)	Sérum	Valine	Tyrosine	(López-Contreras et al., 2017)
		Phénylalanine		

## VI.2.1. Des métabolites substrats de la chaîne de respiration mitochondriale

### VI.2.1.a. Glucose

Il a été estimé que la concentration de glucose dans des chymes humains peut atteindre 300 mM (Ferraris et al., 1990). Dans l'intestin, le glucose alimentaire est rapidement absorbé dans le duodénum et le jéjunum par le biais d'un transport actif secondaire via le cotransporteur Na<sup>+</sup>-glucose (SGLT1), tout comme pour le galactose, et *via* le transporteur de glucose 2 (GLUT2) tandis que le fructose est absorbé par l'intermédiaire de GLUT5 (Kellett, 2001). Bien que le transport de glucose par SGLT1 ne nécessite pas directement de l'énergie fournie par l'adénosine triphosphate (ATP), de l'énergie est en revanche nécessaire pour transférer le Na<sup>+</sup> contre son gradient (*i.e.* vers la lumière intestinale) et ainsi maintenir le potentiel électro-chimique du Na<sup>+</sup>, nécessaire à son absorption. Après dégradation des oligopeptides par les peptidases de la bordure en brosse des entérocytes, les acides aminés libres sont absorbés par une série de transporteurs, de façon couplée à un passage d'ions (Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, H<sup>+</sup>) ou bien, pour les di- et tripeptides, par un symport *via* le Peptide transporter 1 (PepT1) couplé à une entrée de H<sup>+</sup> dans la cellule (Hirst, 1993).

En présence d'oxygène, le métabolisme du glucose commence dans le cytosol par sa glycosylation en pyruvate. Le pyruvate entre ensuite dans les mitochondries, par des porines à travers la MME et des symports H<sup>+</sup>/pyruvate dans la MMI, où il initie l'OXPPOS et la production d'ATP (**Figure 13**). À partir d'une molécule de glucose, environ 30 à 36 molécules d'ATP sont produites par la glycolyse suivie de l'OXPPOS (**Tableau 5**). D'autre part, lorsque des quantités limitées d'oxygène sont disponibles, la glycolyse se fait par voie anaérobie et génère 2 ATP ainsi que du lactate à partir d'une molécule de glucose.

**TABLEAU 5. BILAN DE PRODUCTION D'ATP PAR GLYCOLYSE ET OXPPOS**

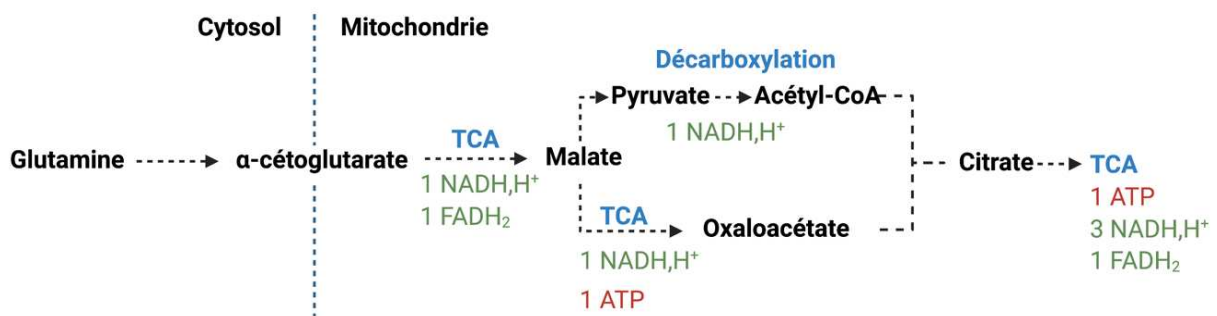
Voie métabolique	ATP formés au cours de la réaction	Coenzymes formées	ATP formés par l'oxydation des coenzymes
Glycolyse	2 ATP	2 NADH,H <sup>+</sup>	6 ATP
Décarboxylation oxydative des 2 pyruvates issus de la glycolyse		2 NADH,H <sup>+</sup>	6 ATP
2 tours de TCA	2 ATP	2 x 3 NADH,H <sup>+</sup> 2 X1 FADH <sub>2</sub>	18 ATP 4 ATP
<b>BILAN partiel</b>	<b>4 ATP</b>		<b>34</b>
<b>BILAN TOTAL</b>	<b>38 ATP formés à partir d'une molécule de glucose oxydée (dont 2 consommés pendant la glycolyse)</b>		



### VI.2.1.b. Glutamine et glutamate

Dans le contenu jéjunal de quatre volontaires humains sains, il a été mesuré des concentrations de L-glutamate variant de 0,1 mM avant le repas à 2,6 mM, 3h après avoir reçu un repas test contenant notamment 50 g d'albumine sérique bovine purifiée (Adibi et al., 1973). Comme le glucose, l'apport de glutamine ou de glutamate à des entérocytes humains isolés provoque une augmentation majeure de la consommation d'oxygène par rapport à d'autres substrats fournis par la circulation sanguine, comme les corps cétoniques, et fait d'elle le substrat préférentiel des CEI (Ashy et al., 1988). Par ailleurs, la glutamine joue un rôle majeur dans le maintien de la barrière intestinale (Belmonte et al., 2007) et régule le métabolisme des acides aminés des CEI, notamment en stimulant la synthèse de protéines mitochondriales (Bertrand et al., 2015).

Le L-glutamate pénètre dans les entérocytes et est ensuite transaminé avec de l'oxaloacétate qui donne de l' $\alpha$ -cétoglutarate et du L-aspartate. L' $\alpha$ -cétoglutarate peut également être obtenu par transamination du L-glutamate en présence de butyrate. L' $\alpha$ -cétoglutarate entre alors dans la mitochondrie et subit plusieurs étapes d'oxydation par le TCA pour produire de l'ATP (Blachier et al., 2009) (**Figure 18**). En outre, le L-aspartate peut également être oxydé dans le TCA et alimenter l'OXPHOS (Windmueller et al., 1976).



**FIGURE 18. OXYDATION DE LA GLUTAMINE PAR LES CEI**

*Une molécule de glutamine/glutamate est convertie en  $\alpha$ -cétoglutarate et suit le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) pour fournir du malate. Le flux d'oxydation de la glutamine est ensuite doublé à cette étape puisqu'une molécule de malate poursuit le TCA pour fournir de l'oxaloacétate tandis qu'une autre molécule de malate fournit du pyruvate, ensuite décarboxylé en acétyl-CoA. La condensation de l'oxaloacétate avec l'acétyl-CoA produit ensuite du citrate qui entre dans le TCA. A partir d'une molécule de glutamine, 24 ATP sont finalement formés par l'oxydation des coenzymes NADH,H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub> ainsi que par la formation directe d'ATP par le TCA. Figure réalisée à partir des informations données dans (Mazat and Ransac, 2019).*

Alors que le L-glutamate peut être directement utilisé comme fuel énergétique par sa conversion en  $\alpha$ -cétoglutarate, la L-glutamine doit d'abord entrer dans la mitochondrie où elle est convertie en L-glutamate et en ammoniac par la glutaminase phosphate-dépendante (Pinkus et al., 1977). Le L-glutamate est ensuite exporté dans le cytosol de l'entérocyte où il est transaminé et métabolisé de la même manière que décrit précédemment. On estime que 24 molécules d'ATP peuvent être générées à partir d'une molécule de glutamine (Mazat et al., 2018) (**Tableau 6**).

L'addition de ces deux voies fait que la L-glutamine et le L-glutamate sont considérés comme des carburants énergétiques équivalents dans les entérocytes (Blachier et al., 2009). Cependant, comme cela a été montré dans les entérocytes de porc, la conversion de la L-glutamine en L-glutamate est inhibée par le L-glutamate lorsque les deux sont présents dans les entérocytes à la même concentration (Blachier et al., 1999).

**TABLEAU 6. BILAN DE L'OXYDATION DE LA GLUTAMINE/GLUTAMATE**

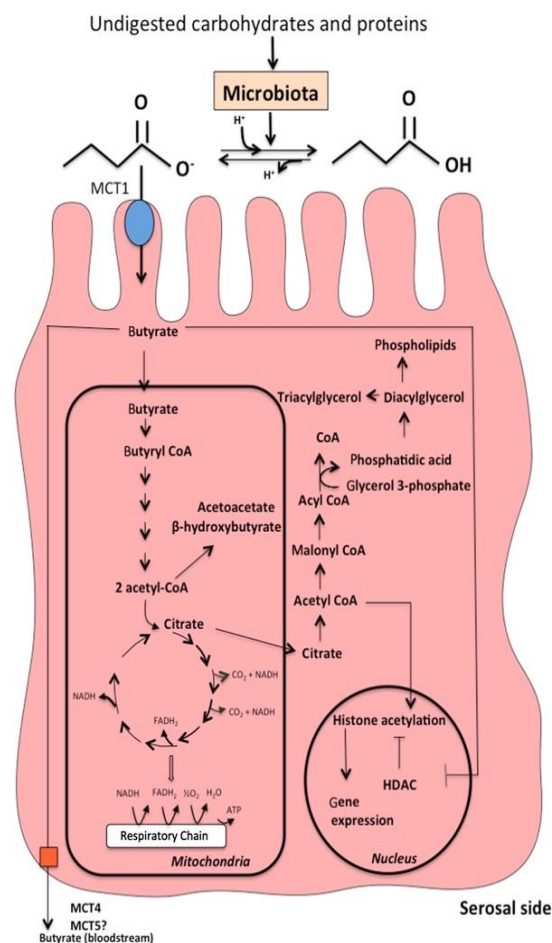
Voie métabolique	ATP formés au cours de la réaction	Coenzymes formées	ATP formés par l'oxydation des
			coenzymes
TCA à partir de l' $\alpha$ -cétoglutarate jusqu'au malate	1 ATP	1 FADH <sub>2</sub> 1 NADH,H <sup>+</sup>	2 ATP 3 ATP
TCA du malate à l'oxaloacétate		1 NADH,H <sup>+</sup>	3 ATP
Pyruvate → Acetyl-CoA		NADH,H <sup>+</sup>	3 ATP
TCA du citrate	1 ATP	3 NADH,H <sup>+</sup> 1 FADH <sub>2</sub>	3 x 3 ATP 2 ATP
<b>Bilan partiel</b>	<b>2 ATP</b>		<b>22 ATP</b>
<b>BILAN TOTAL</b>	<b>24 ATP pour 1 molécule de Glutamine / Glutamate</b>		

### VI.2.1.c. Butyrate

Les acides gras à chaîne courte (AGCC) sont le résultat de la fermentation bactérienne anaérobie de glucides non digérés obtenus à partir de fibres alimentaires mais aussi de plusieurs acides aminés, dérivés de protéines non digérées ou de sources endogènes. Les AGCC comprennent principalement l'acétate, le propionate et le butyrate dans des rapports molaires chez l'Homme d'environ 60 : 20 : 20. Chez l'Homme, la concentration d'AGCC diminue du côlon ascendant (environ 130 mmol/kg de contenu luminal) au côlon descendant (86 mmol/kg de contenu luminal), en fonction du régime alimentaire, de la composition du microbiote et de l'état de santé (Cummings et al., 1987; Tazoe et al., 2008). La concentration de butyrate varie de 11 mM à 25 mM dans les fèces humaines (Hamer et al., 2008). L'obésité

est par ailleurs souvent associée à des concentrations d'AGCC, dont le butyrate, plus importantes chez les sujets obèses par rapport à ceux présentant un IMC < 25 kg/m<sup>2</sup> (Kim et al., 2019).

D'un point de vue métabolique, le butyrate est principalement utilisé par les colonocytes comme source d'énergie et est considéré comme le substrat préférentiel des colonocytes, contribuant à 70% de leurs besoins énergétiques (Roediger, 1980) tandis que le propionate, majoritairement exporté vers le foie, est un substrat pour la néoglucogenèse intestinale et hépatique et induit l'expression des enzymes impliquées dans cette voie (De Vadder et al., 2014). Le butyrate entre dans la mitochondrie où il est d'abord oxydé par  $\beta$ -oxydation en acétyl-CoA, qui subit ensuite une OXPHOS via le cycle TCA pour produire de l'énergie (Andriamihaja et al., 2009) (**Figure 19**). En plus d'être le principal substrat pour la production d'énergie dans les colonocytes, le butyrate inhibe l'oxydation d'autres substrats, tels que l'acétoacétate, la L-glutamine et le D-glucose (Roediger, 1982). Les AGCC sont également capables de réguler le métabolisme des CEI notamment par l'induction de PPAR $\gamma$  dans les colonocytes (Alex et al., 2013).



**FIGURE 19. OXYDATION DU BUTYRATE DANS LES MITOCHONDRIES DES COLONOCYTES**

*Le butyrate, dérivé de polysaccharides ou de protéines non digérées, entre dans le colonocyte par le transporteur de monocarboxylate isoforme 1 (MCT1) après avoir diffusé à travers les couches de mucus. Le butyrate entre ensuite dans la mitochondrie où il est utilisé comme substrat énergétique par la  $\beta$ -oxydation. Une partie de ce butyrate peut être utilisée dans la lipogenèse tandis que le butyrate non-oxydé inhibe l'activité des histone désacétylases (HDAC) et inhibe l'expression de gènes impliqués dans la prolifération. Tiré de (Blachier et al., 2017).*

### VI.2.1.d. Polyamines

Les polyamines sont des métabolites polycationiques, présents dans toutes les cellules eucaryotes à différents niveaux. Elles comprennent la putrescine, la spermidine et la spermine. Alors que les polyamines d'origine alimentaire sont rapidement absorbées dans l'intestin grêle (Uda et al., 2003), la putrescine et la spermidine coliques sont produites par le microbiote intestinal à des concentrations de l'ordre du millimolaire (Tofalo et al. 2019). Le précurseur de ces polyamines est la L-ornithine qui, via l'activité de l'ornithine décarboxylase (ODC1), est décarboxylée pour former la putrescine, précurseur de la spermidine et de la spermine (Bardocz et al., 1998). La putrescine est notamment apportée par une alimentation riche en fruits et en fromage tandis que la spermidine est apportée par les légumes et la spermine par la viande (Ali et al., 2011). Des dosages de polyamines à partir d'échantillons sanguins de sujets obèses (Codoñer-Franch et al., 2011) ou de rats obèses (Jamdar et al., 1996) montrent que l'obésité est associée à une élévation de leur concentration.

Outre leurs rôles dans la prolifération cellulaire, la synthèse des acides nucléiques et des protéines, il a été montré que les polyamines étaient impliquées dans les voies métaboliques. Des travaux montrent en effet que les polyamines peuvent être utilisées comme substrats énergétiques par les CEI (Madsen et al., 1996). La putrescine peut en effet être convertie en succinate par les CEI de l'intestin grêle, qui peut alors subir l'OXPPOS et constitue une source directe d'énergie pour la CEI lorsque cela est nécessaire (Bardocz et al., 1998). Il a également été montré que les polyamines jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale en interagissant avec le pore de transition de perméabilité de la MMI (Elustondo et al., 2015).

En outre, dans l'axe crypte-villosité, les CEI des villosités sont caractérisées par une activité ODC1 élevée par rapport aux CEI des cryptes. Ces niveaux élevés d'ODC1 peuvent contribuer à répondre à la demande énergétique élevée des entérocytes différenciés par la conversion des polyamines en succinate suivie de l'OXPPOS (Madsen et al., 1996). Par conséquent, Madsen *et al.* ont constaté que le traitement de rats pendant 24h avec de l' $\alpha$ -difluorométhylornithine, un inhibiteur de l'ODC, entraîne une diminution de la respiration mitochondriale des CEI, associée au gonflement des mitochondries dans les entérocytes différenciés. Le traitement de ces rats avec 2 mM de spermine a restauré la fonction et la forme des mitochondries (Madsen et al., 1996).

Par ailleurs, dans d'autres tissus, il a été démontré que les polyamines induisent la mitophagie dans le cœur (Eisenberg et al., 2016), la traduction des protéines mitochondriales par l'hyposination du facteur d'initiation eucaryote 5A dans le rein (Melis et al., 2017) et qu'elles stimulent le complexe pyruvate déshydrogénase (PDH), augmentant ainsi l'OXPPOS le foie de rat (Pezzato et al., 2008).

### VI.2.1.e. Sulfure d'hydrogène

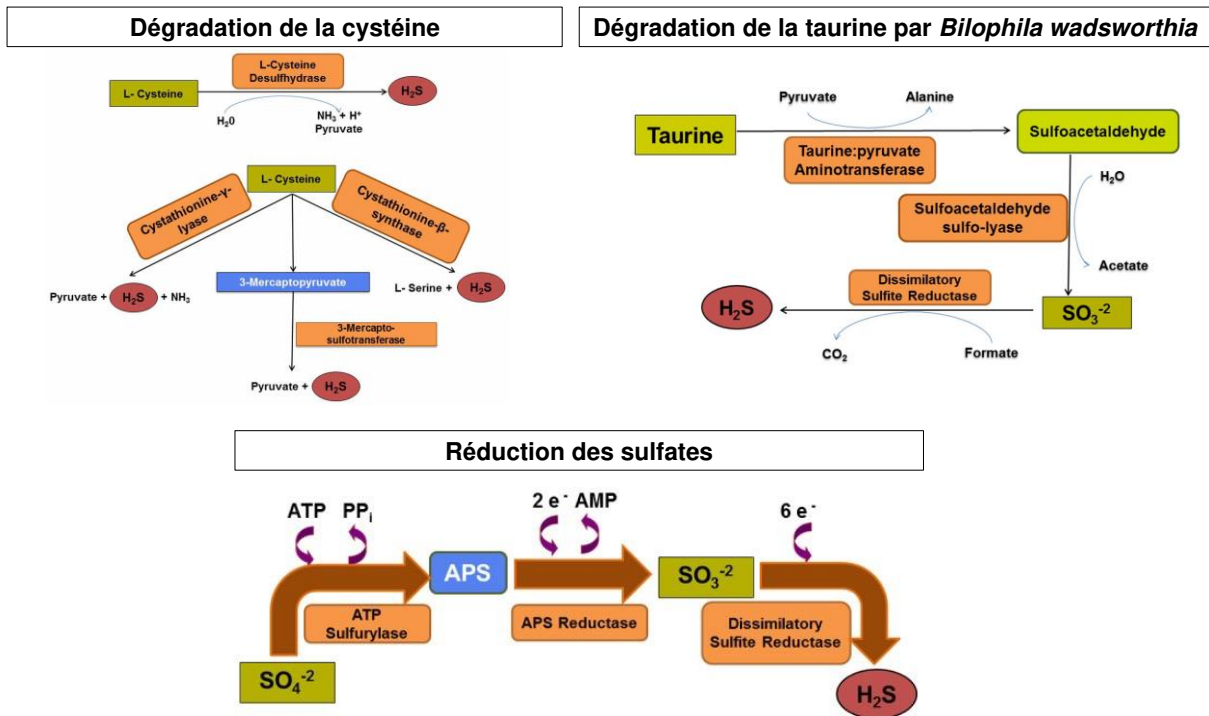
Dans la lumière du gros intestin, le sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) est présent à des concentrations allant de 0,2 à 2,0 mM (Macfarlane et al., 1992) tandis que les concentrations de sulfures dans les fécès humain peuvent atteindre 3,4 mM suite à la consommation d'un régime riche en viande (Magee et al., 2000). Dans la lumière intestinale, le soufre peut ainsi être retrouvé sous forme de sulfure d'hydrogène et peut être retrouvé dans la composition d'acides aminés soufrés (cystéine et méthionine), sous les formes ionisées sulfates (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) et sulfites (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), associés aux acides biliaires, qu'ils soient sulfatés ou conjugués à la taurine, et intégré dans la composition du mucus sous la forme de sulfomucines.

Étant donné la diversité de substrats dans lesquels le soufre est retrouvé, le H<sub>2</sub>S peut être produit selon 3 voies différentes par les bactéries de l'intestin (**Figure 20**).

La principale voie de formation est issue du catabolisme de la cystéine et de la méthionine par les bactéries intestinales qui expriment l'enzyme cystéine désulfhydrase, qui catalyse la conversion de la cystéine en H<sub>2</sub>S, ammoniac et pyruvate. Ces bactéries comprennent *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Desulfovibrio* et *Enterobacter* (Barton et al., 2017).

Le H<sub>2</sub>S peut également être produit par sulfato-réduction réalisée par des bactéries dites sulfato-réductrices et notamment par les protéobactéries *Desulfovibrio*, *Desulfobacter* et *Desulfobulbus* (Gibson et al., 1988).

La troisième voie consiste en la dégradation de la taurine par *Bilophila wadsworthia* (Laue et al., 1997). La taurine est notamment apportée par l'acide taurocholique, un acide biliaire dont la concentration augmente en réponse à une alimentation riche en lipides chez les humains (Ou et al., 2012) tout comme chez la souris obèse (Murakami et al., 2016). La prolifération de *Bilophila wadsworthia* est d'ailleurs favorisée par la consommation d'un régime hyperlipidique (Devkota et al., 2012).



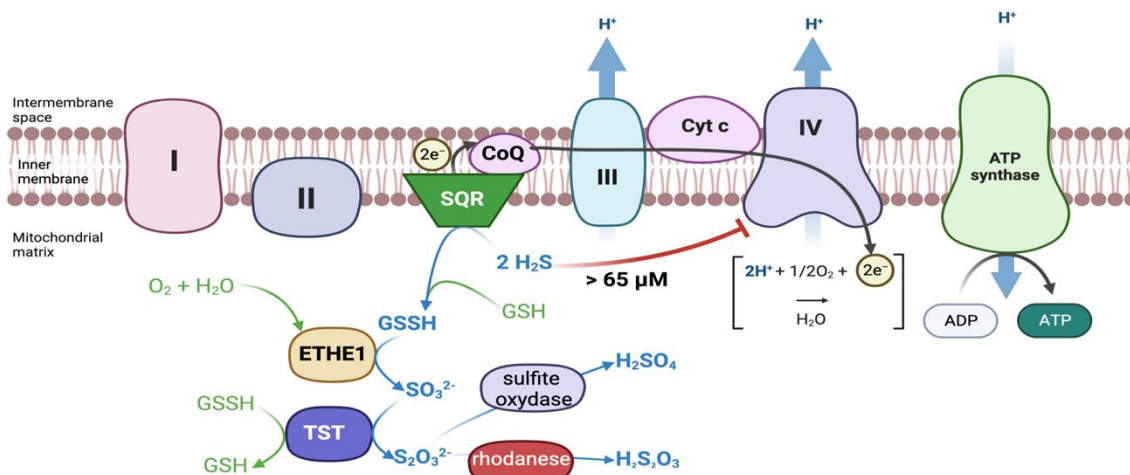
**FIGURE 20. VOIES DE FORMATION DU H<sub>2</sub>S**

Le H<sub>2</sub>S d'origine bactérienne est formé par la dégradation de la cystéine par les bactéries sulfato-réductrices, par dégradation de la taurine réalisée par *Bilophila wadsworthia* ou par réduction des sulfates. De (Carbonero et al., 2012)

Par ailleurs, les colonocytes sont capables de produire du H<sub>2</sub>S intracellulaire via la dégradation de la cystéine catalysée par la cystathionine β-synthase (Guo et al., 2016).

Dans les colonocytes, le H<sub>2</sub>S est d'abord oxydé dans la mitochondrie, pour permettre sa détoxification en acide thiosulfurique (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ou en sulfate, par l'unité d'oxydation du soufre. Cette unité est composée de la sulfure quinone oxydoréductase (SQOR), intégrée à la MMI, qui oxyde le H<sub>2</sub>S en persulfide, puis la sulfure dioxygénase, aussi appelée *ethylmalonic encephalopathy 1* (ETHE1), catalyse la formation de sulfite (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) et enfin la thiosulfate sulfure transférase (TST) permet la formation de thiosulfate (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>) (Mimoun et al., 2012). La conversion finale des thiosulfates en acide thiosulfurique ou en sulfate est respectivement réalisée par la sulfite oxydase ou par la rhodanese (Müller et al., 2004). Ces étapes de détoxification font notamment intervenir du glutathion pour transférer les groupements persulfides (Tiranti et al., 2009) (**Figure 21**). En dessous de 20 μM, le H<sub>2</sub>S est alors un substrat énergétique minéral qui permet la production d'un ATP pour 2 molécules de H<sub>2</sub>S (Mimoun et al., 2012).





**FIGURE 21. DETOXIFICATION MITOCHONDRIALE DU H<sub>2</sub>S ET PRODUCTION D'ÉNERGIE**

Le H<sub>2</sub>S est d'abord oxydé par la sulfure quinone réductase (SQR) en glutathion persulfide (GSSH) libérant des électrons qui sont redirigés vers le coenzyme Q et qui alimentent la chaîne de transport des électrons pour produire de l'ATP. Puis, en présence d'eau et d'O<sub>2</sub>, la sulfure dioxygénase (ETHE1) catalyse la formation de sulfite (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) et enfin, par ajout d'un second persulfide, la thiosulfate sulfure transférase (TST) permet la formation de thiosulfate (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>). Le thiosulfate peut ensuite être converti en sulfate (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) par la sulfite oxydase ou en acide thiosulfurique (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) par la rhodanese. A des concentrations de H<sub>2</sub>S supérieures à 65 μM, le H<sub>2</sub>S inhibe l'activité du complexe IV.

## VI.2.2. Des métabolites perturbateurs de la chaîne de respiration mitochondriale

### VI.2.2.a. Sulfure d'hydrogène

Outre sa capacité à être oxydé ou détoxifié à de faibles concentrations, le H<sub>2</sub>S à des concentrations plus élevées, exerce des effets de perturbateur métabolique. En effet, à des concentrations supérieures à 65 μM, le H<sub>2</sub>S présente des effets délétères sur la fonction mitochondriale en diminuant significativement la consommation d'oxygène des cellules HT-29 via une diminution de l'activité du complexe IV, altérant la production d'ATP, de façon réversible dans le temps. Ces effets délétères se traduisent également par un renouvellement limité des coenzymes d'oxydo-réduction, essentielles à l'activité de la CTE, montré par la diminution du rapport NAD<sup>+</sup>/NADH dans les lignées cellulaires issues de cancer colorectal humain HCEC et HT-29 traitées avec 0,1 mM de Na<sub>2</sub>S (Libiad et al., 2019). Ensuite, après un pré-traitement à des concentrations millimolaires durant 24h sur des HT-29 Glc<sup>+/-</sup>, le H<sub>2</sub>S empêche l'oxydation de la L-glutamine et du butyrate dans la mitochondrie en parallèle de son action inhibitrice du complexe IV, en se fixant de façon réversible sur son hème (Hill et al., 1984), et augmente la fuite de protons à travers la MMI par la *uncoupling protein 2* - UCP2 (Leschelle et al., 2005). De façon intéressante, le H<sub>2</sub>S peut être détoxifié par le complexe II, à

des concentrations qui inhibent l'activité du complexe IV mitochondrial (i.e. 100  $\mu$ M). Le complexe II priorise alors la détoxification du H<sub>2</sub>S en présentant une activité inverse qui consiste à utiliser le fumarate comme accepteur d'électrons, formant ainsi du succinate, soutenant donc le recyclage de la SQOR (Kumar et al., 2022).

#### VI.2.2.b. Indole

L'indole, produit par le microbiote intestinal à partir du tryptophane et détecté jusqu'à 1 mM dans les fèces humaines (Kumar et al., 2019), est également capable d'altérer la génération d'ATP des CEI par OXPHOS, comme cela a été démontré dans la lignée immortalisée GLUTag de cellules entéroendocrines coliques de souris (Chimerel et al., 2014). L'ajout de 1 mM d'indole bloque l'activité du complexe I mitochondrial de ces cellules entéroendocrines, altérant ainsi l'OXPHOS. En outre, il a été montré que l'indole peut diminuer la production d'ATP dans le foie en découplant l'OXPHOS (Chimerel et al., 2013). En tant que protonophore, l'indole à 0,8 mM permet aux protons de passer directement de la MMI à la matrice sans nécessairement passer par l'ATP synthase, comme montré dans des mitochondries isolées à partir de foie de rat. Pour rétablir ce gradient nécessaire à la génération d'ATP, les mitochondries augmentent l'activité de la CTE provoquant des taux plus élevés de consommation d'oxygène (Chimerel et al., 2013). Cependant, ce mécanisme n'a pas encore été décrit dans l'intestin.

#### VI.2.2.c. Dérivés de la L-tyrosine : p-crésol et acide 4-hydroxyphénylacétique

Le p-crésol est produit à partir de la L-tyrosine et se trouve à environ 0,4 mM dans les fèces humaines (Gostner et al., 2006). Une consommation élevée de protéines est corrélée à une augmentation de l'excrétion urinaire de p-crésol (Windey et al., 2012) alors que la consommation d'un régime riche en amidons résistants réduit son excrétion fécale (Birkett et al., 1996). Le prétraitement au p-crésol à des concentrations supérieures à 0,8 mM altère la fonction mitochondriale des cellules HT-29 Glc<sup>-/+</sup> en augmentant la fuite de protons à travers la MMI, ce qui entraîne une altération de la production d'ATP et la production concomitante d'anions superoxydes (Andriamihaja et al., 2015).

L'acide 4-hydroxyphénylacétique (HO-PAA) peut également être produit à partir de la L-tyrosine par le microbiote intestinal à des concentrations micromolaires (Gill et al., 2010). Le traitement de colonocytes humains HT-29 Glc<sup>-/+</sup> pendant 24h avec 1 mM de HO-PAA diminue l'activité du complexe I mitochondrial et la respiration mitochondriale des colonocytes. La



détection des peroxydes par H<sub>2</sub>-DCFDA a également révélé l'induction d'un stress oxydant après le traitement par HO-PAA (Armand et al., 2019).

#### VI.2.2.d. Ammoniac

L'ammoniac et l'ammonium, respectivement NH<sub>3</sub><sup>+</sup> et NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, proviennent principalement de la désamination des acides aminés et de l'hydrolyse de l'urée par les bactéries. Ils peuvent atteindre jusqu'à 30 mM dans les fèces humaines. Un régime riche en protéines augmente la concentration d'ammoniac dans le côlon humain (Cummings et al., 1979). Il a été rapporté que l'ammoniac, à des concentrations de l'ordre du millimolaire, est capable de diminuer la consommation d'oxygène basale des colonocytes (Andriamihaja et al., 2010) et d'inhiber l'oxydation des AGCC, probablement en bloquant l'enzyme malate déshydrogénase impliquée dans le TCA (Cremin et al. 2003). De plus, des cellules Caco-2 traitées pendant 24 heures avec 60 mM d'ammoniac présentent une diminution de l'expression des gènes codant les sous-unités mitochondriales de la CTE, une réduction du niveau d'ATP cellulaire et du potentiel de la membrane mitochondriale, ainsi qu'une diminution du contenu en intermédiaires du TCA. Ces altérations de fonction mitochondriale ont été associées à l'induction d'un stress oxydant et à une perturbation de la barrière épithéliale (Yokoo et al. 2021).

#### VI.2.2.e. Acides biliaires

Les régimes riches en lipides et pauvres en fibres favorisent la sécrétion d'acides biliaires et sont associés à une augmentation de la production d'acides biliaires secondaires par le microbiote intestinal (Reddy, 1981). C'est dans le duodénum que les plus fortes concentrations d'acides biliaires sont retrouvées, allant de 0,3 à 9,6 mM à jeun jusqu'à 8,3-11,9 mM en postprandial (Clarysse et al., 2009). Les acides biliaires constituent le principal composant de la bile et sont synthétisés dans les hépatocytes à partir du cholestérol, puis conjugués avec la taurine ou la glycine dans la membrane canaliculaire des hépatocytes. Chez l'Homme, 2 acides biliaires primaires sont synthétisés dans le foie : l'acide cholique (CA) et l'acide chénodésoxycholique (CDCA). Une fois sécrétés dans le duodénum, ils facilitent l'absorption des nutriments liposolubles alimentaires par les entérocytes. Si la plupart des acides biliaires sont réabsorbés dans l'iléon, environ 5% transitent vers le côlon où ils subissent une transformation bactérienne en acides biliaires secondaires. Ainsi, la 7 $\alpha$ -dihydroxylation des acides biliaires primaires CA et CDCA induit la production des acides biliaires secondaires acide désoxycholique (DCA) et acide lithocholique (LCA), respectivement (Ridlon et al. 2016; Ridlon et al. 2006).

Outre leur rôle dans l'absorption des lipides (voir **VII.2.2**), les acides biliaires exercent des effets délétères sur l'homéostasie intestinale et potentiellement la fonction mitochondriale des CEC. Il a en effet été montré que des concentrations élevées d'acides biliaires, telles que trouvées dans les eaux fécales des consommateurs de HFD favorisent le cancer du côlon (Ou et al., 2013) et génèrent un stress oxydant sur le modèle HT-29 (Washo-Stultz et al., 2002). Ce mécanisme de production des ERO est susceptible de survenir suite à une inhibition du complexe III de la CTE mitochondriale, comme cela a été montré dans les mitochondries isolées du foie de rat (Krähenbühl et al., 1994). Outre la production de mtERO, les acides biliaires produits à partir du DCA induisent également la génération des ERO à partir de protéines associées à la membrane telles que la NADPH oxydase dans la lignée cellulaire Caco-2 (Májer et al., 2014). Cette concentration excessive d'ERO peut potentialiser des dommages mitochondriaux. En effet, associé à l'induction d'un stress oxydant par le DCA sur HT-29, un traitement avec du sodium deoxycholate (500  $\mu$ M pendant 4h) diminue le potentiel de membrane mitochondrial et conduit au gonflement des mitochondries. Il a de plus été montré que le DCA induit la voie d'apoptose mitochondriale par libération du cytochrome c (Washo-Stultz et al., 2002).

#### VI.2.2.f. Delta-valerobetaine

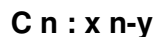
Le delta-valerobetaine est un métabolite bactérien, produit par *E. coli* (K12) et *Salmonella typhimurium*, retrouvé dans le caecum des souris conventionnelles à des concentrations allant de 320 à 560  $\mu$ mol/kg et de 120 à 440  $\mu$ mol/kg dans le côlon. Ce métabolite, qui est un précurseur de la triméthylamine, est retrouvée à des concentrations plasmatiques plus importantes chez des sujets obèses que chez des sujets avec un IMC < 30 kg/m<sup>2</sup>. Sa concentration plasmatique est corrélée avec la masse de tissu adipeux viscéral (Liu et al., 2021). Bien que ses effets sur la mitochondrie des CEI n'aient pas encore été démontrés, un traitement à la delta-valerobetaine sur la lignée d'hépatocytes HepG2 diminue la  $\beta$ -oxydation de l'acide palmitique de façon concentration dépendante, de 10 à 50  $\mu$ M. Il a de plus été montré que la diminution du catabolisme des acides gras par la delta-valerobetaine est causée par une déplétion de la concentration de carnitine dans la cellule (Liu et al., 2021), nécessaire au transport des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie (discuté dans la partie **VII.3.1**).

## VII. ABSORPTION DES LIPIDES ET METABOLISME DANS L'ENTEROCYTE

### VII.1. Structure et nomenclature des acides gras

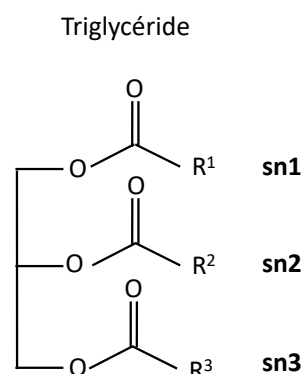
Les acides gras sont des acides carboxyliques possédant une plus ou moins longue chaîne aliphatique allant de 4 à 36 carbones. Ils sont d'abord classés en fonction de la longueur de leur chaîne carbonée. De 4 à 8 carbones, il s'agit d'un acide gras à chaîne courte, de 8 à 14 carbones à chaîne moyenne et au-delà de 14 carbones à longue chaîne voire très longue chaîne si le nombre de carbones est supérieur à 24. Outre leur longueur de chaîne, les acides gras se distinguent par leur nombre de doubles liaisons. Un acide gras ne présentant pas de double liaison sur sa chaîne aliphatique est dit saturé tandis qu'un acide gras avec au moins une double liaison est dit insaturé. La position de la double liaison la plus proche du méthyl terminal définit la famille de l'acide gras (par exemple, les n-3, n-6 ou n-9).

Les acides gras sont alors désignés par la nomenclature suivante :



Où **n** est le nombre d'atomes de carbones (**C**), **x** est le nombre de doubles liaisons et **y** correspond à la position de la double liaison la plus proche du groupement méthyl terminal.

Les lipides alimentaires sont composés à 90% par des TG, dont la structure correspond à 3 acides gras estérifiés sur une molécule de glycérol en position sn1, sn2 ou sn3 (**Figure 22**). Les autres lipides alimentaires sont les phospholipides (PL), le cholestérol (estérifié ou non) et les vitamines liposolubles.



**FIGURE 22. STRUCTURE D'UN TRIGLYCERIDE**

R1, R2 et R3 désignent la chaîne aliphatique des acides gras.

## VII.2. Digestion, absorption et export des lipides au niveau intestinal

### VII.2.1. Une prédigestion dans l'estomac

La digestion des lipides du régime implique des dégradations mécaniques puis chimiques de l'estomac jusqu'à l'intestin grêle. La digestion des lipides débute au niveau buccal (mastication et formation de « gros » globules gras). La présence d'une lipase linguale reste en revanche controversée chez l'homme. Ensuite, dans l'estomac, une pré-digestion mécanique et le pH acide permettent la formation de petites gouttelettes lipidiques de TG à partir des TG alimentaires. Puis une hydrolyse partielle, d'environ 10 à 30% des lipides alimentaires, est réalisée par une lipase gastrique, stable et active à un pH 4,5-5,5, permettant la formation d'acides gras libres et de diglycérides (DG) (Hamosh et al., 1973). La lipase gastrique hydrolyse préférentiellement la liaison ester en position sn3, et les DG formés sont principalement des sn1,2-DG (Hamosh et al., 1973). Une absorption mineure est décrite dès le niveau gastrique pour les acides gras à chaîne courte ou moyenne (en position sn-3 par exemple dans le lait). Le bolus alimentaire stomacal est ensuite déversé au niveau du duodénum.

### VII.2.2. La formation de micelles dans le duodénum

L'arrivée des produits (émulsion huile dans eau) issus de la dégradation des TG déclenche la sécrétion de lipases pancréatiques et le relargage de cholécystokinine, une hormone notamment impliquée dans la stimulation de la sécrétion des lipases pancréatiques. Les acides biliaires émulsifient ensuite les lipides, dont les acides gras déjà libérés, les DG produits et les TG restants, conduisant à la formation de micelles dont la structure favorise la lipolyse par ancrage de la lipase pancréatique associée à sa co-lipase. Les lipases pancréatiques et leurs colipases hydrolysent ensuite les liaisons esters des DG et TG restants, principalement en position sn-1 et sn-3, conduisant à la formation d'acides gras libres et de 2-monoacyl-glycérol (MG) (Mattson et al., 1956). Les esters de cholestérol sont quant à eux hydrolysés par des cholestérol estérases en acides gras libres et cholestérol puis intégrés sous forme de micelles tandis que les PL sont digérés par la phospholipase pancréatique A2 en lysophospholipides et acides gras libres.

Avant d'être absorbés par l'entérocyte, les acides gras à longue chaîne (hydrophobes) doivent d'abord traverser, sous forme de micelles, une couche aqueuse non agitée, composée de mucus et de glycocalyx, qui piège les molécules d'eau. Cette couche est notamment caractérisée par un faible pH, maintenu par l'activité des pompes  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  des entérocytes. Dans des conditions physiologiques en solution aqueuse, les acides gras sont sous forme ionisée. En revanche, lorsque le pH environnant est inférieur à leur constante d'acidité, ils se

protonent spontanément, induisant leur libération des micelles à proximité de la membrane de bordure en brosse (Niot et al., 2009).

### **VII.2.3. Absorption au niveau de l'entérocyte**

Bien que l'ensemble de l'intestin grêle soit capable d'absorber les produits de digestion des lipides, le jéjunum réalise la majorité de leur absorption. Une grande partie de l'absorption des acides gras peut se faire par diffusion passive à travers la membrane, par des phénomènes de *flip-flop*, lorsque leur concentration luminale est supérieure à la concentration dans l'entérocyte. En revanche, des études ont précédemment montré la nature saturable de l'absorption des acides gras par l'entérocyte, supposant une absorption facilitée par des protéines (Murota et al., 2005; Stremmel, 1988). Plusieurs protéines candidates ont alors été proposées pour expliquer la translocation des acides gras dans les CEI parmi lesquelles CD36, FATP4 et la Caveoline 1 (Niot et al., 2009).

Tout d'abord, CD36 (*Cluster of differentiation 36*), aussi appelé *fatty acid translocase*, est une protéine ubiquitaire très exprimée aux niveaux duodénal et jéjunal et décrit comme était longtemps décrit comme étant la meilleure candidate dans la captation des acides gras. CD36 permet le transport facilité des acides gras dans la cellule et joue un rôle majeur dans leur absorption intestinale (Cifarelli et al., 2018) puisque sa délétion chez des souris réduit de 50% l'absorption d'acides gras et de 60% celle du cholestérol (Nassir et al., 2007). Il a de plus été montré à partir d'entérocytes isolés de souris que la translocation des acides gras par CD36 augmente lorsque cette protéine est déphosphorylée par la phosphatase alcaline intestinale (PAL) (Lynes et al., 2011). La même étude montre que des souris nourries avec un régime obésogène présentent une augmentation de l'expression protéique de CD36 et de la PAL dans le jéjunum. Néanmoins, la délétion de CD36 dans l'intestin de rat n'a pas d'effet sur l'entrée des acides gras dans les entérocytes, ni sur leur réestérification (Tran et al., 2011). De plus, la concentration des acides gras issus des micelles au pôle apical de l'entérocyte est de l'ordre du  $\mu\text{M}$  tandis que l'affinité de CD36 pour ces derniers est de l'ordre du nM (Cifarelli et al., 2018). Il apparaît donc que la contribution relative du transport facilité des acides gras libres par CD36 dans l'entérocyte est donc moindre par rapport à la diffusion passive, notamment assurée par la couche d'eau non-agitée à pH acide qui permet la protonation des acides gras, suffisamment efficace pour assurer leur entrée dans l'entérocyte (Cifarelli et al., 2018). En outre, il a été montré que des souris KO pour CD36 présentent un défaut de compaction des acides gras en TG et chylomicrons ainsi que de leur sécrétion vers la lymphe (Drover et al., 2005; Nauli et al., 2006). Ces données indiquent que CD36 est impliqué dans l'export des acides gras sous forme de chylomicrons plutôt que dans leur transport facilité. Il a alors été décrit que dans les premières heures suivant la consommation de lipides, la liaison

des acides gras avec CD36 induit l'expression de la *microsomal triglyceride transfert protein* (MTP) et d'ApoB48, toutes deux nécessaires à la formation des pré-chylomicrons, par le biais de l'activation des kinases ERK ½ de façon associée à l'ubiquitination de CD36 (Lebrun et al., 2022; Tran et al., 2011). Ces données montrent qu'en tant que senseur de lipides, CD36 joue un rôle majeur dans la formation des chylomicrons et l'export des acides gras plutôt que dans le transport facilité des acides gras dans les entérocytes.

La *Fatty acid transport protein 4* (FATP4 aussi appelé SLC27A4), fortement exprimée dans les microvillosités des entérocytes, jouerait également un rôle dans l'absorption des acides gras puisque le knockdown de FATP4 dans des entérocytes murins isolés entraîne une nette diminution de l'incorporation d'acides gras à longue chaîne. Cependant, la délétion monoallélique de FATP4 chez la souris n'induit pas de défaut d'absorption des lipides au niveau intestinal. Il a été montré que l'incorporation des lipides serait surtout due à l'activité acyl-CoA synthétase de la FATP4 au niveau du RE, réalisée à partir d'acides gras et d'acétyl-CoA, qui favoriserait indirectement l'entrée des acides gras dans l'entérocyte, plutôt que par une activité de transporteur qui faciliterait la translocation (Milger et al., 2006).

La cavéoline 1 est également un acteur permettant l'entrée des acides gras dans l'entérocyte. Comme vu dans la partie II.5, elle est située au niveau des radeaux lipidiques membranaires et forme des vésicules d'endocytose qui participent à l'absorption d'acides gras à longue chaîne. Ainsi, un apport d'acide oléique augmente la quantité de vésicules contenant des cavéolines-1 dans le cytosol d'entérocytes murins. En revanche, l'immuno-déplétion de la cavéoline-1 dans le cytosol réduit de 91% la quantité d'acide oléique absorbé, suggérant une quasi-exclusive endocytose de l'acide oléique dans des vésicules contenant la cavéoline-1 (Siddiqi et al., 2013). Par ailleurs ces travaux montrent une colocalisation de CD36 avec la Cavéoline-1 dans les cavéoles (Siddiqi et al., 2013).

#### **VII.2.4. Devenir des acides gras dans l'entérocyte**

Une fois transloqués dans l'entérocyte, les acides gras sont liés aux *fatty acid binding protein* (FABP) 1 ou 2 selon une spécificité de ligands. FABP1, aussi appelée *Liver FABP* (LFABP), exprimée à la fois dans le foie et l'intestin (Gordon et al., 1985), se lie plus spécifiquement aux acides gras à longue chaîne (1 mole d'acide gras pour 1 mole de FABP1). Quant à FABP2, aussi appelée *Intestinal FABP* (IFABP) et exclusivement exprimée dans l'intestin (Gordon et al., 1985), elle peut se lier aux acides gras à longue chaîne (2 moles d'acides gras pour 1 mole de FABP2), aux *sn-2* MG (Lagakos et al., 2013), et aux acides biliaires (Thumser et al., 1996). Bien que leur rôle précis ne soit pas encore tout à fait clair dans l'intestin, les FABP1 et 2 sont impliquées dans l'adressage et le devenir des acides gras

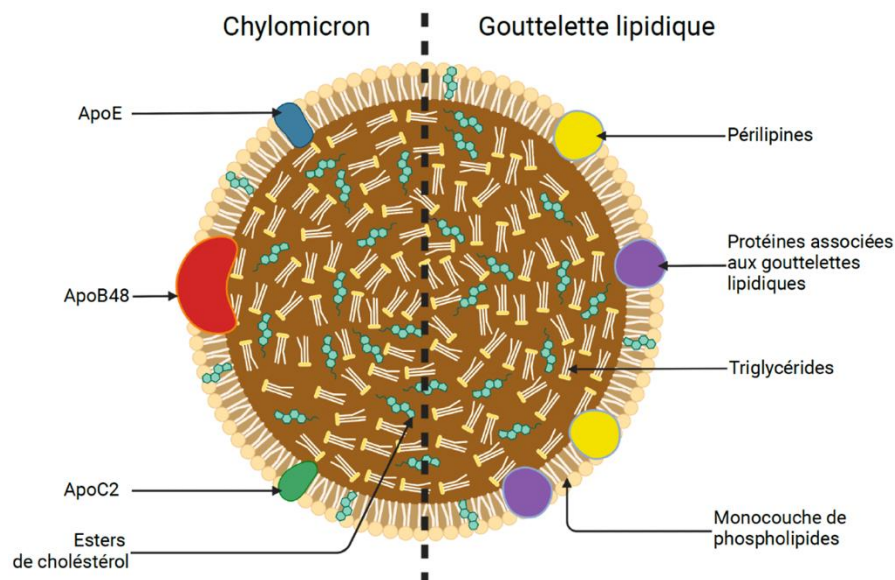
dans l'entérocyte. Il a été montré chez des souris KO pour FABP1 que l'oxydation du [<sup>14</sup>C]oleate, injecté par voie intraduodénale ou sanguine, était diminuée chez les souris FABP1<sup>-/-</sup> par rapport aux souris non mutées (Lagakos et al., 2011). De plus, l'injection intraduodénale de [<sup>3</sup>H]monoolein, un MG, provoque une élévation de la quantité de PL, de MG et de DG dans la muqueuse des souris mutées, tandis que la quantité de TG est plus faible chez ces souris par rapport aux non-mutées. Ainsi FABP1 dirigerait plutôt les acides gras vers le catabolisme oxydatif, quel que soit leur site d'entrée dans l'entérocyte, et serait impliquée dans la resynthèse des MG en TG. D'autre part, puisque les souris déficientes en FABP2 présentent une diminution du ratio TG/PL après l'injection intraduodénale de [<sup>14</sup>C]oleate, il a été suggéré que FABP2 dirigerait plutôt les acides gras vers leur resynthèse en TG (Lagakos et al., 2011). Ces travaux montrent par ailleurs que l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides n'est pas modifiée par les mutations, suggérant ainsi que les FABP modulent le trafic des lipides plutôt que l'expression des gènes associés à leur devenir.

Concernant leur export, les acides gras à chaîne moyenne (6 à 12 carbones) peuvent directement être redirigés vers le foie par la circulation lymphatique, pour y être oxydés ou compactés en lipoprotéines de très faible densité (VLDL), par un passage direct dans le système porte. En revanche, les MG et acides gras à longue chaîne sont resynthétisés en TG au niveau du RE en étant estérifiés avec un acyl-CoA pour former un DG, dont la réaction est catalysée par la monoacylglycerol acyltransferase, puis en TG par une réestérification du DG avec un acyl-CoA, catalysée par la diacylglycerol acyltransférase (DGAT) (Cheng et al., 2003; Yen et al., 2003). Une fois resynthétisés, les TG peuvent être exportés, principalement sous forme de chylomicrons ainsi que de VLDL, ou bien être stockés dans l'entérocyte sous forme de gouttelettes lipidiques cytosoliques (ou *cytosolic lipid droplets* – CLD) pour une utilisation/export ultérieur. Ces structures possèdent d'ailleurs des caractéristiques communes puisqu'elles sont constituées d'un cœur de TG et d'esters de cholestérol entourés d'une enveloppe composée de diverses protéines, de PL et de cholestérol (Demignot et al., 2014) (**Figure 23 et Tableau 7**).



**TABLEAU 7. COMPARAISON ENTRE GOUTTELETTE LIPIDIQUE DE L'ENTEROCYTE ET CHYLOMICRON**  
*De (Demignot et al., 2014)*

	<b>Gouttelette lipidique</b>	<b>Chylomicron</b>
<b>Taille</b>	Jusqu'à 6 µm	75-1200 nm
<b>Localisation</b>	Cytosol	Intérieur du RE et de l'appareil de Golgi ainsi qu'extracellulaire.
<b>Enveloppe protéique spécifique</b>		
<b>Apolipoprotéine B</b>	Non	Oui
<b>Pérlipines</b>	Oui	Non
<b>Fonction</b>	Stockage intracellulaire des lipides	Redistribution des lipides dans l'organisme



**FIGURE 23. COMPARAISON STRUCTURELLE DES CHYLOMICRONS ET DES GOUTTELETES LIPIDIQUES CYTOSOLIQUES**

### **VII.2.5. Les chylomicrons : structure d'export des lipides**

Les chylomicrons sont issus de la maturation de pré-chylomicrons. Ces derniers sont formés au niveau du RE par lipidation de l'apolipoprotéine (Apo) B-48. L'initiation de la formation des chylomicrons est permise par la MTP qui facilite le repliement de l'ApoB-48, favorisant son association avec les lipides et empêchant sa dégradation (Hussain et al., 1998). L'étape de formation des pré-chylomicrons par MTP constitue une première étape limitante d'absorption des acides gras. Ces pré-chylomicrons rencontrent ensuite une phase



d'expansion dans le RE durant laquelle des TG vont fusionner avec eux (Cartwright et al., 2001).

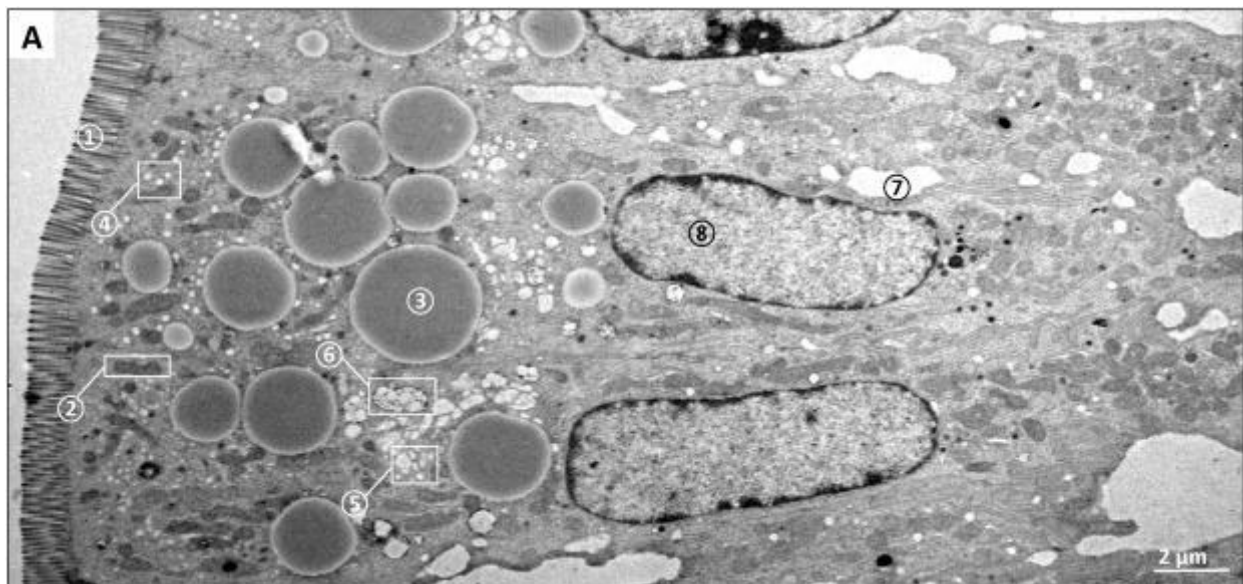
Les pré-chylomicrons sont ensuite transportés sous forme de *prechylomicron transfert vesicles* (PCTV) jusqu'au Golgi. La formation de ces PCTV nécessite un complexe multiprotéique, composé de FABP1, CD36, ApoB48 ainsi que de la *vesicle-associated membrane protein 7* (Siddiqi et al., 2010), qui contribuerait au bourgeonnement de la membrane du RE pour former ces vésicules (Neeli et al., 2007; Siddiqi et al., 2010). La déficience en une de ces protéines, en ayant recours à des souris KO ou à des anticorps, suffit en effet à bloquer la formation de PCTV dans le Golgi (Siddiqi et al., 2010).

Les PCTV sont ensuite redirigés au Golgi où ils mûrissent *via* l'ajout de l'ApoA-I, en plus de l'ApoA-IV déjà présente dans le pré-chylomicron (Siddiqi et al., 2003), et de la glycosylation de l'ApoB48 par les endoglycosidases (Berriot-Varoqueaux et al., 2001). Le transport des chylomicrons vers le Golgi et leur maturation constitue une seconde étape limitante dans l'absorption des acides gras. Les chylomicrons matures sont ensuite exocytés hors de l'entérocyte au niveau de leur membrane basale.

#### **VII.2.6. Les gouttelettes lipidiques : un stockage de lipides en perpétuelle dynamique**

Ces dernières années, l'intérêt pour les CLD n'a cessé de grandir. Elles sont comparables à des organites dynamiques, mobiles et capables de fusion, fission et d'interaction avec d'autres organites, et dont le protéome peut être modifié sous l'influence du régime (D'Aquila et al., 2019a; Walther et al., 2009; Zembroski et al., 2021). Leur métabolisme est également étroitement lié à celui des chylomicrons puisqu'elles sont notamment formées lorsque la capacité de compaction des lipides en chylomicron est saturée, permettant ainsi de détoxifier les acides gras dans l'entérocyte en les stockant transitoirement (Demignot et al., 2014). Ainsi, les TG qui n'ont pas été exportés sont stockés dans les CLD au sein des entérocytes (**Figure 24**).

La taille et le nombre de CLD varient en fonction du temps écoulé après la consommation du dernier repas. On retrouve des CLD dans l'intestin jusqu'à 18h après un repas chez l'Homme (Chavez-Jauregui et al., 2010; Xiao et al., 2019) et 12h après chez la souris (Zhu et al., 2009). Tandis que tous les segments de l'intestin grêle possèdent la capacité de stocker des acides gras sous forme de CLD, leur nombre ainsi que leur taille décroît du jéjunum, qui présente la majorité des CLD, jusqu'à l'iléon (Zhu et al., 2009). Les lipides stockés dans les CLD peuvent être remobilisés ultérieurement, notamment après ingestion de glucose (Robertson et al., 2003; Xiao et al., 2016).

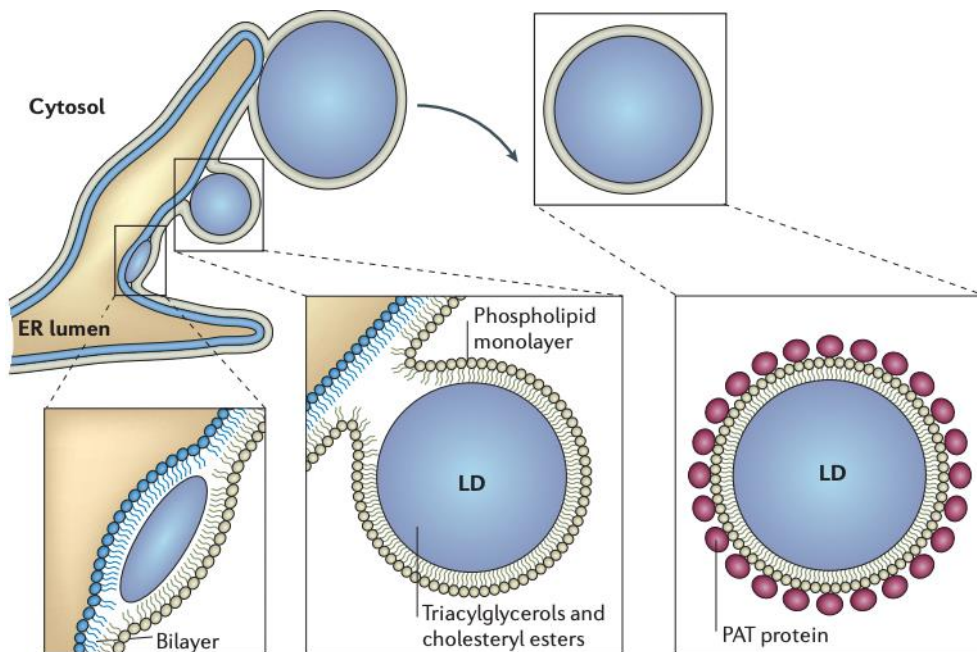


**FIGURE 24. IMAGE DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE D'UN ENTEROCYTE DE SOURIS C57BL/6 2 HEURES APRES ADMINISTRATION ORALE D'HUILE D'OLIVE**

① Microvillosités ② Mitochondrie ③ Gouttelette lipidique cytosolique ④ Triglycérides (TG) dans lumière du réticulum endoplasmique ⑤ TG dans l'appareil de Golgi ⑥ TG dans des vésicules sécrétoires ⑦ TG dans l'espace intercellulaire ⑧ Noyau. Tiré de (D'Aquila et al., 2016).

Les CLD sont formées à partir d'un bourgeonnement de la membrane du RE autour des TG, formant une monocouche phospholipidique entourant les lipides. Les CLD sont composées essentiellement de TG, d'esters de cholestérol et entouré d'une monocouche de PL, cholestérol et de protéines de revêtement, parmi lesquelles des périlipines (PLIN) (Fujimoto et al., 2008; Martin et al., 2006; Thiele et al., 2008) (**Figure 25**).

Le devenir de ce bourgeonnement, vers la formation de chylomicrons ou de CLD, est régit par les DGAT1 et DGAT2 : DGAT1 catalyse la dernière étape de formation des TG préférentiellement destinés à expandre les pré-chylomicrons, ce faisant limitant la taille des CLD, tandis que DGAT2 forme préférentiellement des TG qui seront intégrés à des CLD (Hung et al., 2017). Parmi les 180 protéines identifiées dans les CLD intestinales, les PLIN sont fortement exprimées et participent à leur formation ainsi qu'à leur fonction (Itabe et al., 2017). Parmi ces protéines, PLIN2 et PLIN3 sont les seules de la famille des PLIN qui ont été retrouvées dans l'intestin (D'Aquila et al., 2017). Un modèle de souris KO pour PLIN2 montre d'ailleurs que cette protéine est essentielle pour l'absorption intestinale des lipides et nécessaire à la formation des CLD (Frank et al., 2015).



**FIGURE 25. MODELE ACTUEL DE FORMATION DES GOUTTELETES LIPIDIQUES CYTOSOLIQUES**

*Le modèle actuellement établi décrit un bourgeonnement de la membrane du réticulum endoplasmique (ER) autour des triglycérides et des esters de cholestérol pour former une gouttelette lipidique cytosolique (CLD) mature dont la membrane est constituée de phospholipides et de protéines associées (PAT proteins désignent les protéines associées aux CLD incluant les périlipines). Tiré de (Martin and Parton, 2006)*

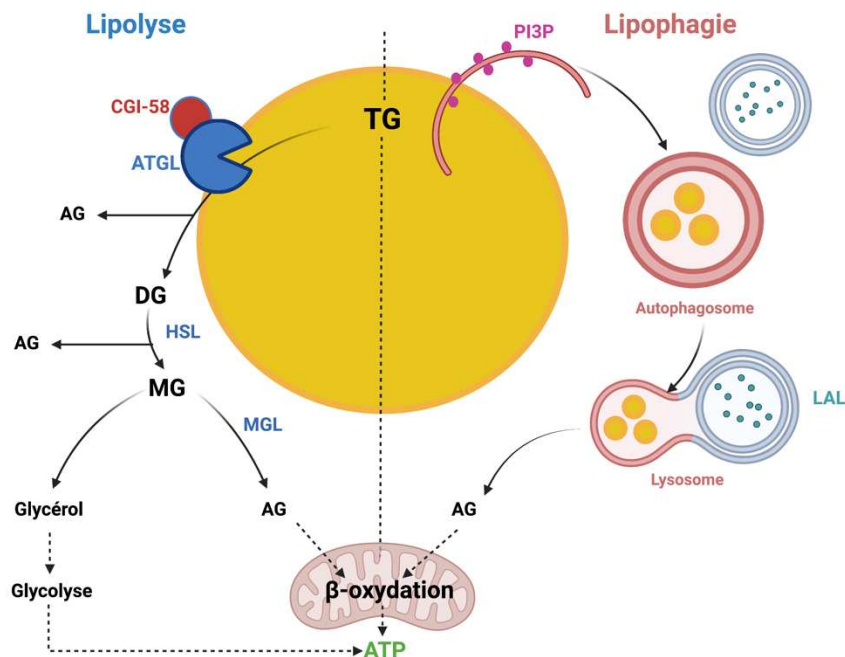
### **VII.2.7. Les voies de remobilisation des acides gras des gouttelettes lipidiques**

Les TG contenus dans les CLD peuvent être remobilisés par hydrolyse dans l'entérocyte (**Figure 26**). Alors qu'il avait été admis que la lipase hormono-sensible (HSL) était la seule enzyme capable de catalyser l'hydrolyse des TG des CLD, des travaux ont montré que la délétion de HSL chez la souris n'empêche pas la lipolyse des lipides neutres, aussi bien dans le tissu adipeux que dans les tissus non adipeux (Osuga et al., 2000). Il a alors été proposé que HSL catalyse l'hydrolyse des DG en MG tandis que l'adipose triglycéride lipase (ATGL), activée par le *co-activator comparative gene identification-58* catalyse l'hydrolyse des TG en DG et en acides gras libres (Obrowsky et al., 2013). Le rôle essentiel de cette enzyme dans l'activité TG hydrolase a été révélé par délétion du gène codant pour les ATGL dans l'intestin. Les souris mutées présentaient en effet une diminution de l'hydrolyse des TG associée à une augmentation du stockage intracellulaire de ces derniers. De plus, la délétion de ATGL provoque une diminution de l'expression des gènes cibles de PPAR $\alpha$ , impliqués dans la  $\beta$ -oxydation, le stress oxydant et l'absorption des lipides, suggérant que la libération des acides gras des CLD par ATGL module le métabolisme lipidique de l'entérocyte par

l'intermédiaire de PPAR $\alpha$  (Obrowsky et al., 2013). Les DG ainsi obtenus sont finalement hydrolysés en MG et en glycérol par la monoacylglycérol lipase (De Jong et al., 1978; Duncan et al., 2008) (**Figure 26**).

Il a également été proposé que le catabolisme des CLD au niveau intestinal puisse être réalisé par lipophagie, qui consiste en une lipolyse lysosomale. L'apport en lipides déclenche en effet une réponse autophagique de l'entérocyte qui se manifeste par la capture des CLD par un autophagosome au niveau du RE, colocalisé avec le phosphatidylinositol-3-phosphate, et un adressage aux lysosomes qui dégradent les TG en acides gras sous l'action des lipases acides des lysosomes (Khaldoun et al., 2014) (**Figure 26**).

Les lipides libérés des TG peuvent ensuite être re-estérifiés pour être exportés sous forme de chylomicrons ou restockés en CLD, être intégrés aux membranes sous forme de PL ou encore être  $\beta$ -oxydés par la mitochondrie. Par ailleurs, le glycérol provenant de l'hydrolyse des TG peut reformer du glucose par néoglucogénèse qui peut à son tour rejoindre la glycolyse.



**FIGURE 26. LIPOLYSE DES GOUTTELETTES LIPIDIQUES CYTOSOLIQUES**

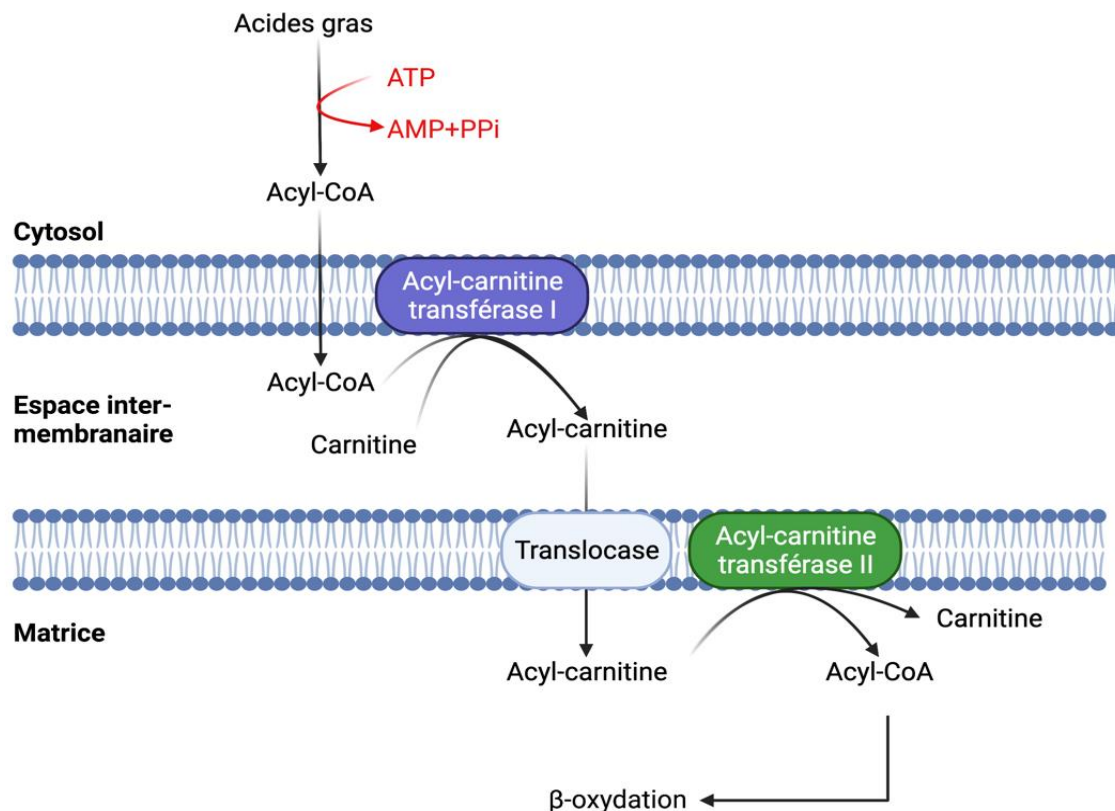
Les triglycérides (TG) des CLD sont d'abord hydrolysés par l'adipose triglycéride lipase (ATGL), co-activée par le co-activateur comparative gene identification-58 (CGI-58), en diacylglycérol (DG). L'hormone sensitive lipase (HLS) catalyse ensuite l'hydrolyse des DG en mono-acylglycérol (MG) qui est finalement hydrolysé en acides gras (AG) et en glycérol par la MG lipase (MGL). Quant à la lipophagie, les gouttelettes lipidiques sont ciblées et séquestrées dans un autophagosome, possédant des phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P), et redirigées vers un lysosome pour y subir l'hydrolyse par les lipases acides de lysosome (LAL). Les acides gras libérés par ces deux processus peuvent ensuite être  $\beta$ -oxydés dans la mitochondrie ou encore être re-estérifiés en TG, phospholipides ou esters de cholestérol. Schéma réalisé à partir de (D'Aquila et al., 2016) et de (Singh and Cuervo, 2012).



## VII.3. La $\beta$ -oxydation des acides gras saturés

### VII.3.1. L'activation des acides gras carnitine-dépendante

Avant d'entrer dans la mitochondrie, les acides gras subissent une activation préalable en étant estérifié en acyl-coA par une acyl-CoA synthétase à activité ATPase. Les acides gras à chaîne courte ou chaîne moyenne peuvent diffuser librement à travers les deux membranes mitochondriales une fois activés. En revanche, les acides gras à plus longue chaîne (supérieure à 12 carbones) nécessitent un transport carnitine-dépendant (**Figure 27**).



**FIGURE 27. ENTREE DES ACIDES GRAS A LONGUE CHAINE DANS LA MITOCHONDRIE**

Les acides gras subissent d'abord une première étape d'activation dans le cytosol en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase. Ils entrent ensuite dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie pour être liés à une carnitine, dont la réaction est catalysée par l'acyl-carnitine transférase I. L'acyl-carnitine est ensuite transloqué à travers la membrane mitochondriale interne par une translocase et est libéré de sa carnitine via l'activité enzymatique de l'acyl-carnitine transférase II, avant d'être  $\beta$ -oxydé.

Ainsi, les acyl-CoA à longue chaîne activés traversent la MME pour se retrouver dans l'EIM dans lequel l'acyl-carnitine transférase I, localisée au niveau de la MMI, catalyse la formation d'acyl-carnitine à partir d'un acyl-CoA et de la carnitine. L'acyl-carnitine ainsi formé est transloqué à travers la MMI par une translocase. Enfin, une fois arrivé dans la matrice

mitochondriale, l'acyl-CoA est libéré de la carnitine par l'acyl-carnitine transférase II et peut être  $\beta$ -oxydé.

### VII.3.2. La $\beta$ -oxydation dans la matrice mitochondriale

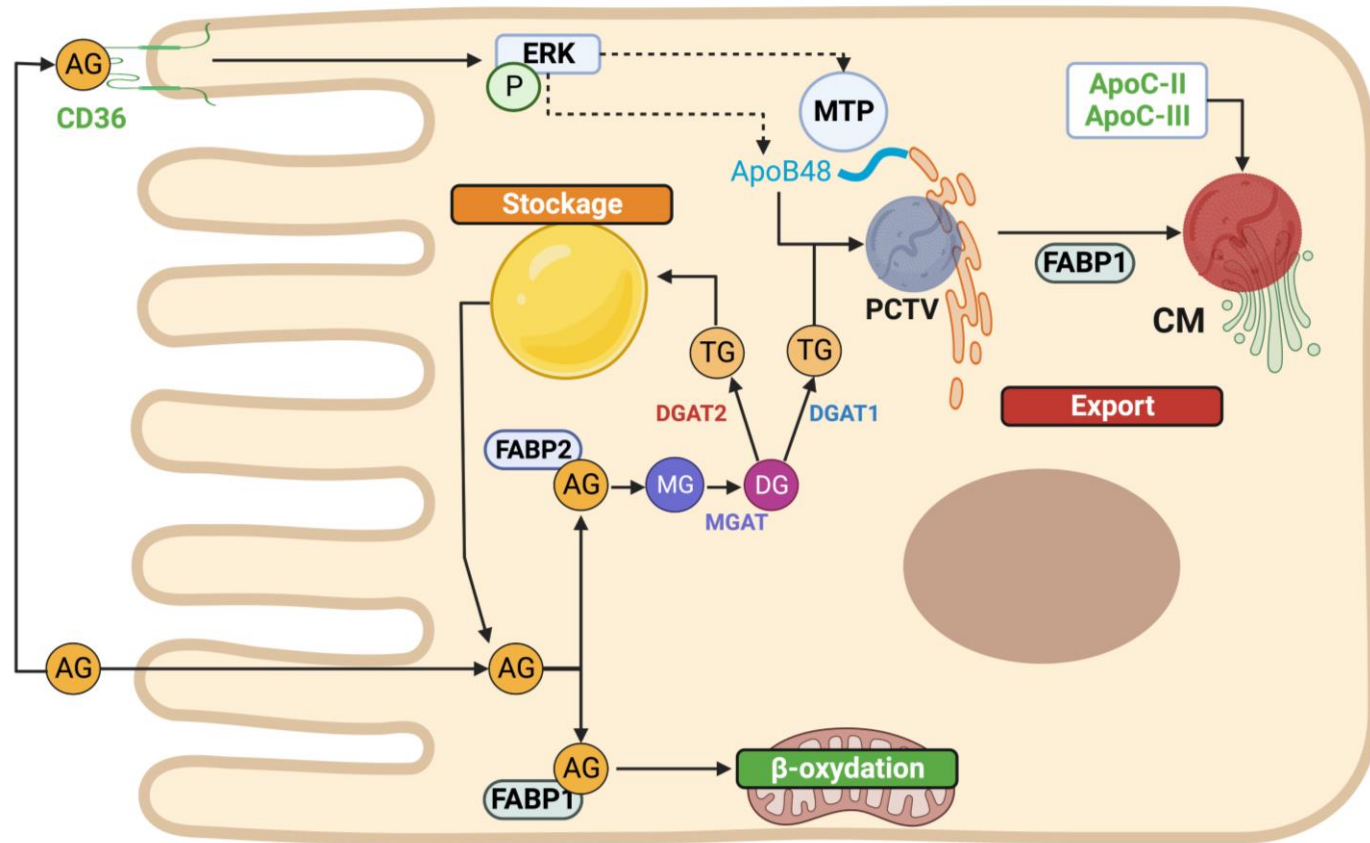
Les lipides alimentaires constituent la source énergétique la plus importante du régime puisque leur oxydation produit 9 kcal/g, soit plus du double de ce qui est apporté par l'oxydation des glucides ou des protéines (environ 4 kcal/g). La  $\beta$ -oxydation des acides gras est la principale voie de dégradation des acides gras. Quatre enzymes (acyl-CoA déshydrogénase – énoyl-CoA hydratase – hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase -  $\beta$ -cétotliase) constituent l'hélice de Lynen (**Figure 13**) et catalysent les réactions de déshydrogénation, hydratation, déshydrogénation et de coupure thiolitique dans la matrice mitochondriale. Chaque tour d'hélice clive deux carbones du squelette carboné de l'acide gras par oxydations successives sur les carbones en position  $\beta$ . Dans l'intestin, la  $\beta$ -oxydation des acides gras ne constitue pas la seule voie de catabolisme des lipides. Il existe en effet une  $\alpha$ -oxydation des acides gras à très longue chaîne (supérieure à 20 carbones) qui se déroule au sein du peroxyosome. Elle consiste à raccourcir d'un atome de carbone à la fois ces acides gras à très longue chaîne par oxydation partielle. Ils subiront ensuite une  $\beta$ -oxydation totale dans la mitochondrie.

Chaque tour d'hélice de Lynen produit, à partir d'un acyl-CoA à 2N carbones, un acyl-CoA raccourci de deux carbones et un acétyl-CoA. De plus, chaque tour produit une molécule de FADH<sub>2</sub> et une molécule de NADH par suite des étapes de déshydrogénation (**Tableau 8**). Ainsi, la  $\beta$ -oxydation des acides gras à 2N carbones se résume au bilan suivant :

**TABLEAU 8. BILAN DE PRODUCTION D'ATP PAR LA  $\beta$ -OXYDATION D'UN ACIDE GRAS A 2N CARBONES**

Voie métabolique	ATP formés au cours de la réaction	Coenzymes formées	ATP formés par l'oxydation des coenzymes
Hélice de Lynen (N-1 tour)		(N-1) NADH,H <sup>+</sup>	3 x (N-1) ATP
		(N-1) FADH <sub>2</sub>	2 x (N-1) ATP
TCA à partir des N Acétyl-CoA	N ATP	N x 3 NADH,H <sup>+</sup>	N x 3 x 3 ATP
		N x 1 FADH <sub>2</sub>	N x 2 x 1 ATP
<b>Bilan partiel</b>	N ATP		16N-2 ATP
<b>Bilan TOTAL</b>	17N-5 ATP produits à partir d'un acide gras à 2N carbones		
<b>BILAN TOTAL NET</b>	17N-6 ATP produits à partir d'un acide gras à 2N carbones en comptant 1 ATP pour l'activation de l'acide gras en acyl-CoA		

La synthèse des données sur le métabolisme intestinal des lipides peut être résumé selon le schéma suivant :



**FIGURE 28. BILAN DU DEVENIR DES ACIDES GRAS DANS L'ENTEROCYTE**

Les acides gras apportés par le régime sont hydrolysés par les lipases pancréatiques et leurs colipases en monoacylglycérol (MG) et en acides gras libres (AG). Les MG et AG entrent ensuite dans l'entérocyte majoritairement par diffusion passive. Dans le cytosol, les AG se lient de façon covalente à FABP1 ou 2 qui les redirigent respectivement vers la  $\beta$ -oxydation ou la voie de synthèse des triglycérides (TG). En fonction de l'isoforme de la diacylglycerol acyltransferase (DGAT) qui catalyse la formation des TG, les TG sont préférentiellement stockés sous forme de gouttelettes lipidiques (CLD) pour DGAT2 ou bien participent à l'expansion des pré-chylomicrons pour DGAT1. Les acides gras stockés dans les CLD peuvent être remobilisés ultérieurement par lipophagie ou lipolyse et redonner des AG libres qui seront  $\beta$ -oxydés ou exportés hors de l'entérocyte. Les pré-chylomicrons se forment dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) où le bourgeonnement de la membrane du RE par l'intermédiaire de la microsomal triglyceride transport protein (MTP), de CD36, d'ApoB48 et de FABP1, permet la formation des prechylomicrons transferts vesicles (PCTV). La formation de ces PCTV est coordonnée par CD36 qui, en tant que senseur de lipides, induit l'expression de MTP et d'ApoB48, étape limitante à l'absorption des AG. Ces PCTV sont ensuite redirigés vers le Golgi pour former des chylomicrons matures, dont le transport et la maturation dans le Golgi constitue une seconde étape limitante à l'absorption des AG. Les chylomicrons sont finalement exocytés hors de l'entérocyte.

## VIII. FONCTION MITOCHONDRIALE DES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES ET REGIME RICHE EN LIPIDES

---

### VIII.1. Fonction mitochondriale des entérocytes lors de la consommation d'un HFD

#### VIII.1.1. Un shift métabolique vers le catabolisme des lipides

En fonction de la composition du régime, l'intestin grêle est dit "métaboliquement flexible" (McCarthy et al., 1980). En réponse à une consommation excessive de lipides, il augmente leur absorption, leur estérification en TG, avec un pic 2h après la prise d'un repas chez l'Homme (Tiihonen et al., 2015), et leur export dans les chylomicrons (Singh et al., 1972), même après une consommation à court terme (Tremblay et al., 2013). L'analyse fonctionnelle et l'annotation de réseau réalisée par analyse de l'expression génique sur des fractions de CLD provenant d'entérocytes de souris obèses (60 % de kcal dérivés des lipides pendant 12 semaines) et contrôles (10 % de kcal provenant des lipides) soumises à un gavage d'huile, a révélé que le deuxième processus biologique de gene ontology (GO\_BP) le plus enrichi était le catabolisme lipidique et qu'il était plus présent dans le premier tiers de l'intestin grêle, que ce soit chez des souris obèses ou contrôles ayant été gavées avec de l'huile (Zembroski et al., 2021). Le GO\_BP du catabolisme des lipides comprenait des protéines impliquées dans la  $\beta$ -oxydation mitochondriale (*Acyl-CoA Dehydrogenase Very Long Chain*, *Acetyl-CoA Acyltransférase 2*, *Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Trifunctional Multienzyme Complex Subunit Alpha* et *Electron Transfer Flavoprotein Subunit Beta*) (D'Aquila et al., 2019a; Zembroski et al., 2021).

En réponse à l'augmentation de l'absorption des lipides alimentaires, l'intestin grêle est marqué par des adaptations métaboliques orientées vers le catabolisme des acides gras (Clara et al., 2017; Kondo et al., 2006; Ramachandran et al., 2018a). Ainsi, 3 jours de consommation de HFD (60 % de kcal provenant des lipides) suffisent à diminuer de 50% l'expression génique du transporteur de glucose *Slc5a1* et de l'hexokinase 1 (*Hk1*) dans les entérocytes jéjunaux isolés de souris (Clara et al., 2017), ce qui suggère une diminution du catabolisme glucidique. D'autre part, l'expression protéique de HMGCS2, une enzyme mitochondriale impliquée dans la cétogenèse, est plus fortement exprimée dans le jéjunum des souris nourries avec un HFD par rapport aux souris contrôles. Or, la cétogenèse est réalisée à partir de l'acétyl-CoA généré par l'oxydation des acides gras afin de produire de l'énergie à partir des lipides, dans un contexte de privation d'intermédiaires du TCA. Cela suggérerait donc une reprogrammation métabolique des entérocytes jéjunaux de la glycolyse



vers le catabolisme des lipides suite à la consommation d'un HFD (60% kcal dérivés des lipides), dès 3 jours (Clara et al., 2017) et retrouvé jusqu'à 20 semaines (Ramachandran et al., 2018). Pour prédire les variations des flux métaboliques en réponse à une augmentation des apports en lipides alimentaires, une modélisation *in silico* du métabolisme mitochondrial d'entérocytes murins a été développée (Sinha et al., 2018). Les simulations et l'analyse du protéome ont prédit une augmentation de l'oxydation des acides gras en réponse à l'augmentation du rapport lipides/glucides dans l'alimentation. Kondo *et al.* ont également montré que 2 semaines de consommation de HFD (30% de lipides en masse) chez des souris C57BL/6J augmentaient l'activité de la CPT1, ainsi que la  $\beta$ -oxydation de l'acide palmitique [ $U$ - $^{14}C$ ] dans des fractions mitochondriales issues de cellules épithéliales jéjunales de souris HFD par rapport aux souris nourries avec un régime contrôle (Kondo et al., 2006).

### **VIII.1.2. Rôle du métabolisme lipidique des CEI dans l'apparition de l'obésité**

La capacité à cataboliser les acides gras alimentaires dans les entérocytes semble directement associée à la protection contre le développement de l'obésité. En effet, dans plusieurs modèles de souris résistantes à l'obésité, le stockage des lipides dans les CEI sous forme de CLD s'avère être moindre après la consommation d'un HFD, que chez les souris développant une obésité, de façon associée à une augmentation de l'expression des gènes du métabolisme des acides gras, du transport des acides gras dans la mitochondrie et de leur  $\beta$ -oxydation.

Ainsi, les souris A/J nourries avec un HFD (30% de lipides) sont résistantes à l'obésité et sont caractérisées par une expression génique dans les CEI et une activité CPT1 dans les mitochondries isolées des CEI plus importantes par rapport à des souris C57BL/6J, prônes à l'obésité (Kondo et al., 2006) suggérant une augmentation de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. La surexpression de CPT1 dans les CEI de souris nourries avec un HFD est par ailleurs associée à une diminution de la masse de tissu adipeux viscéral ainsi qu'à un meilleur contrôle glycémique par rapport aux souris HFD non-mutées (Ramachandran et al., 2018).

De plus, la délétion intestinale de HDAC3, qui régule le métabolisme lipidique en modulant l'expression des PPAR, protège de l'obésité des souris nourries avec un HFD (60% de lipides en masse) (Dávalos-Salas et al., 2019) en augmentant la  $\beta$ -oxydation des CEI de duodénum par rapport à celles des souris non-mutées, de façon associée à une diminution de l'accumulation des CLD dans les CEI et un poids corporel identique à celui des souris nourries avec un régime standard (Dávalos-Salas et al., 2019).

La surexpression de SIRT3, dans les entérocytes jéjunaux (souris iSIRT3) suffit à augmenter leur activité métabolique. SIRT3 est en effet une histone désacétylase mitochondriale qui catalyse la désacétylation de l'acetyl-CoA synthétase 2, impliquée dans

l'activation des acides gras en acyl-CoA avant leur entrée dans la mitochondrie (Hallows et al., 2006). Après un gavage oral avec de l'acide oléique, les souris iSIRT3 recevant un HFD (60% kcal dérivées de lipides) présentent des concentrations bien plus faibles de palmitoyl-CoA, indiquant une augmentation de la  $\beta$ -oxydation, comparé aux souris HFD qui ne surexpriment pas SIRT3 (Ramachandran et al., 2017). Cette augmentation de la  $\beta$ -oxydation des acides gras s'accompagnait d'une amélioration de l'homéostasie du glucose chez la souris et d'une protection contre la résistance à l'insuline en cas de consommation d'un HFD (Ramachandran et al., 2017).

La capacité à cataboliser les acides gras alimentaires dans les entérocytes semble donc être directement associée à une protection contre le développement de l'obésité et des perturbations métaboliques associées.

### ***VIII.1.3. Catabolisme lipidique et risques de stress oxydant***

En dépit des effets bénéfiques d'une augmentation de la  $\beta$ -oxydation des acides gras sur l'homéostasie du glucose et la réduction de l'adiposité, une telle hausse du catabolisme des lipides est susceptible d'induire un stress oxydant (Gil-Cardoso et al., 2017; Qiao et al., 2013). La  $\beta$ -oxydation des acides gras constitue en effet une source de mtERO, comme décrit dans la **Figure 15**. De plus, la consommation de HFD a été liée à des concentrations réduites de glutathion et d'enzymes antioxydantes (SOD et CAT) dans les homogénats duodénaux de rats nourris avec un HFD (45% de lipides en kcal) pendant 4 semaines. Une détection accrue des ERO a également été observée dans les homogénats duodénaux de souris nourries avec un régime riche en lipides (21% de lipides en masse) pendant 8 semaines (Qiao et al., 2013) et dans l'iléon de rats nourris avec un régime riche en lipides et en saccharose (23% de lipides en masse) pendant 17 semaines (Gil-Cardoso et al., 2017). Il est intéressant de noter que les rats génétiquement obèses ne présentent aucune différence dans la détection des ERO dans l'intestin par rapport aux témoins, ce qui suggère que le stress oxydant de la muqueuse intestinale est plutôt lié à une consommation élevée de lipides et de saccharose plutôt qu'à l'obésité elle-même (Gil-Cardoso et al., 2017).

### ***VIII.1.4. Évaluation de la fonction mitochondriale des CEI de l'intestin grêle dans un HFD***

Bien que plusieurs études aient mis en évidence des changements métaboliques vers le métabolisme des lipides qui se produisent dans les CEI de l'intestin grêle sous HFD, aucune description précise de la fonction mitochondriale dans ces entérocytes n'est disponible jusqu'à présent dans la littérature. Dans les fractions des CLD de souris obèses (60% de kcal provenant des lipides pendant 12 semaines) et contrôle (10% de kcal provenant des lipides)

soumises à un gavage à l'huile, les termes GO\_BP les plus enrichis incluent la synthèse mitochondriale d'ATP (Zembroski et al., 2021). En accord avec le fait que les protéines impliquées dans la  $\beta$ -oxydation mitochondriale étaient principalement retrouvées dans les fractions CLD des entérocytes de souris obèses, les auteurs ont suggéré que les entérocytes pourraient s'adapter à une absorption excessive d'acides gras en associant leurs mitochondries à leurs CLD, favorisant ainsi le catabolisme des acides gras pour compenser leur stockage (Zembroski et al., 2021). En ce qui concerne la dynamique mitochondriale, le modèle *in silico* d'entérocytes de souris exposées à une augmentation du rapport lipides/glucides dans l'alimentation a suggéré que la fusion et la fission mitochondriales n'étaient pas altérées dans les entérocytes après la consommation d'un HFD (Sinha et al., 2018), bien qu'aucune analyse *in vivo* ou *in vitro* de la dynamique mitochondriale n'ait encore été réalisée pour corroborer ces prédictions. Enfin, 20 semaines de consommation de HFD (60% kcal dérivés des lipides) ont diminué de moitié l'expression du gène *Pgc1a* dans les entérocytes jéjunaux de souris (Ramachandran et al., 2018b, 2017). Cependant, les mécanismes précis qui pourraient expliquer la chute d'expression de *Pgc1a* n'ont pas été élucidés jusqu'à présent. De plus, puisque PGC1 $\alpha$  est le régulateur principal de la biogénèse mitochondriale, la diminution de son expression pourrait affecter le nombre de mitochondries et/ou la bioénergétique des entérocytes. Cependant, l'altération de la biogénèse mitochondriale des CEI dans l'intestin grêle en réponse à un HFD n'a pas été démontrée jusqu'à présent dans la littérature. En outre, les acides gras ont la propriété d'être des agents découplants de l'OXPPOS en transférant des protons à travers la MMI via leur groupement carboxyle et de façon catalysée par les *Uncoupling proteins* notamment (Ricquier et al., 2000; Skulachev, 1999). Il est donc possible que le catabolisme des acides gras dans les CEI provoque également une fuite de protons à travers la MMI.

## **IX. Fonction mitochondriale des cellules épithéliales coliques, homéostasie intestinale et HFD**

### **IX.1.1. Effets des régimes HFD sur la fonction mitochondriale des CEC *in vivo***

Ces dernières années, un certain nombre de travaux ont montré que la consommation d'un régime riche en acides gras saturés, pouvait modifier la fonction mitochondriale des CEC sans pour autant la caractériser. En effet, la consommation d'un régime HFD (60% kcal dérivées des lipides) pendant 16 semaines entraîne une atteinte morphologique des mitochondries (structure gonflée) et une diminution de l'activité des complexes II et III dans

des mitochondries isolées de CEC par rapport aux souris sous régime contrôle (Sun et al., 2018). La durée du régime ou la proportion énergétique des lipides n'aurait cependant pas d'incidence sur cette dysfonction puisque la consommation d'un régime à 45% kcal de lipides par des souris pendant 4 semaines suffit à réduire de moitié la quantité d'ATP épithéliale et à diminuer l'expression de gènes qui codent pour des sous-unités du complexe I (Lee et al., 2020). De plus, 13 semaines de HFD (60% kcal de lipides) provoque une diminution des concentrations d'ATP dans les CEC de souris et une diminution de l'expression des gènes codant pour les sous-unités V1 et S1 du complexe I de la chaîne de respiration mitochondriale (Yoo et al., 2021). En outre, l'augmentation de la concentration de lactate intracellulaire dans les colonocytes isolés (Lee et al., 2020) associée à la diminution de l'activité de la PDH (Yoo et al., 2021), qui catalyse la conversion du pyruvate en acétyl-CoA, suggère un shift métabolique des CEC de l'OXPPOS vers la glycolyse.

D'autre part, des auteurs ont montré que la consommation d'un HFD provoque un stress oxydant dans la muqueuse colique (Li and Li, 2020), qui suggère une dysfonction mitochondriale sans pour autant qu'elle n'ait été évaluée dans cette étude.

**TABLEAU 9. SYNTHÈSE DES ÉTUDES *IN VIVO* SUR LES EFFETS DE LA CONSOMMATION D'UN HFD SUR LES PARAMÈTRES MÉTABOLIQUES DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES**

Modèle	Lipides du régime HFD	Lipides du régime CTRL	Durée du régime	Cellules	Effets métaboliques	Références
Souris C57BL/6	60% kcal	10% kcal	12 semaines	CEI	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Enrichissement des GO_BP du catabolisme mitochondrial des acides gras dans les fractions de gouttelettes lipidiques</li> </ul>	(D'Aquila et al., 2019; Zembroski et al., 2021)
Souris C57BL/6N	60% kcal	10% kcal	3 à 14 jours	CEI (duodenum et jejunum)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ↓ <i>a priori</i> de la glycolyse (↓ de l'expression de <i>Slc5a1</i> et de <i>Hk1</i>)</li> <li>○ ↑ de l'expression de <i>Hmgcs2</i></li> </ul>	(Clara et al., 2017)
Souris C57BL/6J	30% masse	5% kcal		CEI (jejunum)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ↑ de l'activité de la CPT1</li> <li>○ ↑ de la β-oxydation de l'acide palmitique</li> </ul>	(Kondo et al., 2006)
Souris Kunming	21% en masse	5% kcal	8 semaines	Homogénats de duodenum	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Stress oxydant (↑ de la détection des ERO)</li> </ul>	(Qiao et al., 2013)
Rat Wistar	23% en masse	3% kcal	17 semaines	Homogénats d'iléon	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Stress oxydant (↑ de la détection des ERO)</li> </ul>	(Gil-Cardoso et al., 2017)
Souris C57BL/6N	60% kcal	10% kcal	20 semaines	CEI de jéjunum	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ↓ de l'expression de <i>Pgc1α</i></li> </ul>	(Ramachandran et al., 2018, 2017)
Souris C57BL/6J	45% kcal	10% kcal	4 semaines	CEC	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ↓ de 50 % de la concentration d'ATP épithéliale</li> <li>○ ↓ de l'expression des gènes codant pour les sous-unités du complexe I mitochondriaux</li> <li>○ Shift métabolique vers la glycolyse (↑ des niveaux de lactate intracellulaire et ↓ de l'activité de la PDH)</li> </ul>	(Lee et al., 2020)
Souris C57BL/6J	60% kcal	10% kcal	13 semaines	CEC	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ↓ de l'expression des gènes codant sous-unités V1 et S1 du complexe I mitochondrial</li> <li>○ ↓ de la concentration d'ATP</li> <li>○ ↓ de l'activité de la PDH</li> <li>○ Perte de l'hypoxie</li> </ul>	(Yoo et al., 2021)
Souris C57BL/6J	60% kcal	13% kcal	16 semaines	CEC	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Gonflement des mitochondries</li> <li>○ ↓ des activités des complexes II et III</li> </ul>	(Sun et al., 2018)
Souris C57BL/6	60% kcal	10% kcal	12 semaines	CEC	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Stress oxydant (↑ des peroxydes)</li> </ul>	(Li et al. 2020)

### **IX.1.2. Effets des acides gras saturés sur la fonction mitochondriale de CEC *in vitro***

A l'instar de l'intestin grêle, il a été suggéré que les altérations de fonction mitochondriale et d'induction de stress oxydant soient la conséquence du catabolisme des acides gras alimentaires. Différents auteurs ont ainsi utilisé des modèles *in vitro* de colonocytes traités à l'acide palmitique (C16:0) pendant 24h pour modéliser la consommation d'HFD. L'analyse métabolique par Seahorse a révélé qu'un traitement avec du palmitate, à des concentrations allant de 1 mM à 2,5 mM dans des cellules Caco-2, diminue les taux de production d'ATP par OXPHOS (Yoo et al., 2021). Le traitement au palmitate 2,5 mM diminue également l'expression des gènes codant les sous-unités V1 et S1 du complexe I de la chaîne d'OXPHOS (Yoo et al., 2021). Des cellules endocrines intestinales NCIH-716 incubées avec 500 µM de C16:0 présentent une diminution de la respiration maximale et de la capacité respiratoire de réserve (Sun et al., 2018). Enfin, le traitement de cellules HCT-116 pendant 24h avec 100 µM d'acide palmitique a entraîné une augmentation de la production des ERO, une diminution du potentiel de membrane mitochondriale et une altération du réseau mitochondrial. Ces défauts sont corrigés lorsque les cellules sont cultivées avec un antioxydant, la N-acétyl-L-cystéine (Li et al. 2020).

Hormis ces travaux réalisés avec de l'acide palmitique, les effets directs des acides gras sur CEI ont peu été étudiés. De plus, il n'est pas décrit si c'est la nature de l'acide gras ou bien son accumulation qui provoque les altérations de fonction mitochondriale.

### **IX.1.3. Influence de métabolites non-lipidiques dérivés du HFD**

Il a été montré qu'un régime HFD induisait des altérations de bioénergétique mitochondriale dans les CEC (**Tableau 9**), éventuellement induites par le catabolisme des acides gras comme le suggèrent les résultats obtenus *in vitro*. Cependant, l'absorption des acides gras a été décrite comme se faisant dans les CEI de l'intestin grêle proximal tandis qu'aucune étude ne montre d'absorption des acides gras du régime par les colonocytes *in vivo*. D'autres facteurs luminaux sont donc à prendre en compte pour expliquer les altérations mitochondriales des CEC décrites dans le **Tableau 9**, et notamment les acides biliaires. La consommation de HFD est en effet corrélée à des concentrations élevées d'acides biliaires dans les fécès, qui peuvent atteindre une concentration fécale de 0,35 mM chez des personnes nourries avec un HFD (Ou et al., 2012). Washo-Stultz *et al.* ont démontré que, dans la lignée des CEC HT-29, le DCA génère des ERO et un stress oxydant, probablement en inhibant le complexe III des mitochondries, comme cela a été décrit dans les mitochondries isolées du foie de rat (Krähenbühl et al., 1994; Washo-Stultz et al., 2002). Outre la production de mtERO, les acides biliaires induisent également la production d'ERO à partir de protéines

associées à la membrane telles que la NADPH oxydase dans la lignée cellulaire Caco-2 (Májer et al., 2014). Cette concentration excessive d'ERO pourrait alors endommager les mitochondries.

En outre, la consommation d'un HFD est associée à l'émergence de Desulfovibrionaceae chez les souris (Devkota et al., 2012; Zhang et al., 2010) et chez des personnes obèses (Palmas et al., 2021). Parmi les Desulfovibrionaceae, la croissance de *Bilophila wadsworthia* est favorisée par l'utilisation par cette bactérie d'acides biliaires conjugués à la taurine en tant qu'intermédiaire métabolique (Devkota et al., 2012) et est retrouvée dans des modèles murins d'obésité induite par le HFD (37% kcal dérivées des lipides) (Natividad et al., 2018). La taurine est en effet utilisée par *Bilophila wadsworthia* comme accepteur final d'électrons des complexes de la chaîne de respiration anaérobie et permet la formation de sulfure (Laue et al., 1997) puis, via la *dissimilatory sulfite reductase*, de H<sub>2</sub>S (Laue et al., 2001) (**Figure 20**). Les personnes obèses sont également caractérisées par une augmentation de l'abondance de *Desulfovibrio spp*, qui peuvent réduire les sulfates, issus notamment d'acides biliaires sulfatés, d'acides aminés soufrés ou encore des glycanes de la muqueuse intestinale de l'hôte, pour produire du H<sub>2</sub>S (Palmas et al., 2021). Compte tenu des effets délétères causés par de fortes concentrations de H<sub>2</sub>S sur la fonction mitochondriale des CEI, le HFD pourrait engendrer une dysfonction mitochondriale en favorisant la croissance des bactéries sulfato-réductrices et la formation de H<sub>2</sub>S.

## IX.2. Dysfonction mitochondriale des CEI et des CEC induite par un HFD et conséquences sur l'homéostasie intestinale

Les altérations de la fonction mitochondriale dans les CEI et les CEC, notamment dans le cadre d'un HFD, pourraient avoir des conséquences majeures sur l'homéostasie de l'épithélium. Ces conséquences seraient en lien avec une modification du renouvellement épithélial, en induisant l'apoptose ou en favorisant la prolifération des CSI, une augmentation de la perméabilité intestinale causée par l'altération des jonctions serrées, notamment en lien avec un stress oxydant des CEI, ou encore une perte de l'hypoxie physiologique.

L'altération de la fonction mitochondriale des CEI et des CEC est susceptible d'induire l'apoptose comme le montre une étude sur des souris nourries au HFD pendant 12 semaines qui présentent une augmentation de 50 % de l'expression du modulateur de l'apoptose régulé par p53 (PUMA) en parallèle d'un stress oxydant et des altérations mitochondriales observées

dans les CEC (Li et al., 2020). De façon similaire, les cellules HCT-116 traitées pendant 24h avec 100  $\mu$ M d'acide palmitique montrent une augmentation de l'expression protéique de la Caspase-3 clivée et de PUMA, suggérant une élévation de l'apoptose.

Très récemment, la consommation d'un HFD a été associée à une augmentation de l'activité proliférative des CSI dans l'intestin grêle. Les cryptes extraites du jéjunum de souris nourries avec un régime riche en lipides (60% kcal) pendant 6 mois ont en effet généré plus d'organoïdes que celles extraites du jéjunum de souris nourries avec un régime contrôle (lipides 10% kcal) (Mana et al., 2021). L'augmentation des expressions de PPAR $\delta$  et PPAR $\alpha$  dans les organoïdes provenant du jéjunum de souris HFD était également associée à une expression plus élevée des protéines de la  $\beta$ -oxydation. Ce shift métabolique vers l'augmentation de la  $\beta$ -oxydation médié par PPAR $\alpha$  a été montré comme responsable de l'augmentation de l'activité des CSI, tandis que l'altération de la  $\beta$ -oxydation des acides gras, par délétion ou inhibition de CPT1, supprimait ces effets (Mana et al., 2021). En outre, chez la drosophile ou dans des organoïdes cultivés à partir d'intestin grêle proximal de souris, la délétion du symport pyruvate/H<sup>+</sup> mitochondrial, bloquant le passage du pyruvate dans la mitochondrie et son entrée dans le TCA, conduit à une diminution de l'activité du TCA au profit de la  $\beta$ -oxydation. Cette augmentation du catabolisme lipidique provoque alors une augmentation de la prolifération des CSI tandis que la surexpression de ce transporteur supprime cet effet (Schell et al., 2017). Comme abordé dans la partie **II.5**, une augmentation de la prolifération dans l'intestin est associée à un défaut de perméabilité (Boudry et al., 2007) et à une augmentation de l'expression de claudines permissives. Il a par ailleurs été montré que l'intestin de souris obèses est caractérisé par augmentation de l'expression de *Cldn2* et de sa localisation au niveau de la membrane apicale des CEI (Ahmad et al., 2017). Ainsi, une augmentation de la prolifération induite par un HFD serait susceptible d'augmenter la perméabilité intestinale par le biais de l'augmentation de l'expression de claudines permissives.

Comme abordé dans le chapitre **III.2.2**, une dysfonction mitochondriale des CEI associée à un stress oxydant et une déplétion en ATP sont susceptibles de provoquer une augmentation de perméabilité intestinale. Or, dans leur modèle d'obésité induite par un HFD, Li *et al.* ont observé un stress oxydant (**Tableau 2**) associé à une augmentation de la concentration plasmatique de FD4 après gavage, témoignant d'une augmentation de perméabilité intestinale *in vivo* (Li et al., 2020). La consommation d'un HFD a de plus provoqué une diminution de l'expression protéique de l'occludine chez ces souris tandis que les cellules HCT-116 traitées avec de l'acide palmitique présentent également une diminution de l'expression de cette protéine de jonction serrée (Li et al., 2020). De plus, en faisant



l'hypothèse que les mtERO, issus du catabolisme des acides gras du HFD, sont à l'origine de l'augmentation de perméabilité intestinale, Watson *et al.* ont ajouté des S3QELs, un suppresseur de superoxyde dérivé du complexe III, dans le régime de leurs souris. Après 16 semaines, les souris nourries avec l'aliment enrichi en S3QELs ont été protégées de l'augmentation de perméabilité intestinale *in vivo* tandis que l'expression de gènes codant des protéines de jonctions serrées (*Tjp1, Ocln, Cldn5*) et des mucines (*Muc 2, 4, 13*) est similaire à celle des souris nourries avec un régime contrôle (Watson *et al.*, 2021).

Une autre caractéristique de l'altération de la fonction de barrière intestinale induite par un HFD est la réduction de plusieurs facteurs sécrétés impliqués dans les mécanismes de défense, comme l'expression de peptides antimicrobiens (Everard *et al.*, 2014; Garidou *et al.*, 2015). L'expression de ces facteurs est notamment permise par le maintien d'une hypoxie physiologique au niveau colique. Or, Yoo *et al.* ont montré que l'altération de la fonction mitochondriale induite par 13 semaines de HFD à 60% kcal de lipides était associée à une perte d'hypoxie de l'épithélium colique (Yoo *et al.*, 2021). Ainsi, l'altération de la fonction mitochondriale induite par le HFD et les éventuels changements du niveau d'hypoxie pourraient participer à l'altération des mécanismes de défense observés sous l'HFD, éventuellement par le biais d'une modification de la signalisation HIF (voir **V.3**).

### **IX.3. Dysfonction mitochondriale des CEI et dysbiose**

La composition du régime modifie la composition de l'environnement luminal et par conséquent la nature et la concentration des métabolites bactériens (Duncan *et al.*, 2007). La dysbiose dans l'obésité induite par le régime alimentaire a maintes fois été décrite et jouerait un rôle dans les altérations métaboliques chez l'obèse (Cani *et al.*, 2009). Néanmoins, étant donné la complexité étiologique de l'obésité associée à celle des régimes, il n'existe pas de microbiote caractéristique de l'obésité. Ainsi, bien que l'association entre obésité et augmentation du ratio Firmicutes/Bacteroidetes soit fréquemment retrouvée chez des personnes obèses ou dans des modèles animaux (Aron-Wisniewsky *et al.*, 2013; Kelly *et al.*, 2012; Tremaroli *et al.*, 2012), elle n'est en revanche pas systématique (Arumugam *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2013).

De plus, ces changements de composition du microbiote, induits par la composition en macronutriments du régime et la modification des caractéristiques physicochimiques, est susceptible d'altérer l'environnement luminal et en particulier les métabolites bactériens qui en dérivent. Ces métabolites, dont certains sont délétères en fonction de leur concentration, sont

susceptibles de provoquer une dysfonction mitochondriale des CEI/CEC qui pourrait notamment se manifester par une perte d'hypoxie de l'environnement luminal. La relation entre le niveau d'oxygène et la composition du microbiote a été décrite en utilisant des antibiotiques à large spectre chez la souris. La perte d'hypoxie et la déstabilisation de l'expression de HIF provoquent l'expansion des bactéries anaérobies facultatives, comme les Enterobacteriaceae telles que *E. coli*, associée à une inhibition de la croissance des anaérobies strictes, comprenant les producteurs de butyrate (Byndloss et al., 2017; Litvak et al., 2018). Récemment, Yoo *et al.* ont montré que ces modifications de microbiote étaient retrouvées suite à la consommation d'un HFD. En effet, la consommation d'un HFD conduit à une biodisponibilité accrue de l'oxygène dans la lumière colique, favorisant l'expansion des bactéries anaérobies facultatives telles que les Enterobacteriaceae et la dégradation aérobie de la choline en triméthylamine. Ces données suggèrent donc une atteinte de la bioénergétique mitochondriale des CEC qui contribue à modifier l'environnement luminal suite à son oxygénation. La perte d'hypoxie qui s'ensuit est susceptible d'altérer l'homéostasie intestinale consécutive à la déstabilisation des HIF (voir **V.3**) et aggraver la dysfonction mitochondriale par le biais de métabolites bactériens délétères et la diminution de la production de butyrate. En revanche, le traitement au 5-ASA, un agoniste de PPAR $\gamma$  visant à augmenter l'activité mitochondriale, améliore l'hypoxie épithéliale et réduit la croissance d'*E. coli* des souris HFD (Yoo et al., 2021). Le 5-ASA apparaît donc ici comme une cible thérapeutique permettant de restaurer l'homéostasie intestinale en améliorant la fonction mitochondriale des CEI.



## **OBJECTIFS DE LA THESE**

---

## OBJECTIFS DE LA THESE

---

La compréhension du lien entre excès de masse grasse et co-morbidités de l'obésité est un enjeu scientifique, sanitaire et économique majeur. Les troubles métaboliques associés à l'obésité sont susceptibles de survenir suite à une inflammation systémique de bas grade (Calder et al., 2011; Minihane et al., 2015). L'accumulation excessive de graisse dans le tissu adipeux des sujets obèses conduit à une inflammation de nombreux tissus tels que le foie, le muscle ou le cerveau (Lumeng et al., 2011; Reilly et al., 2017). De plus, des altérations de l'homéostasie intestinale, et notamment une augmentation de sa perméabilité, montrée chez le sujet obèse (Genser et al., 2018) comme dans des modèles animaux (Cani et al., 2009; Hamilton et al., 2015; Serino et al., 2012), participent à l'apparition et la perpétuation de cette inflammation. Les travaux pionniers de Cani et collaborateurs ont montré que la réduction de cette hyperperméabilité chez la souris obèse permettait de réduire l'inflammation de bas grade et les perturbations métaboliques associées (Cani et al., 2009). Restaurer la fonction de barrière intestinale chez le sujet obèse constitue donc une piste thérapeutique qui permettrait de réduire le risque de co-morbidités associées à l'obésité.

Le maintien de la barrière intestinale est fortement dépendant de la fonction mitochondriale des CEI, source de l'énergie cellulaire. Ainsi, des altérations de la fonction mitochondriale des CEI ou des CEC, notamment dans le cadre de la consommation d'un régime obésogène, peuvent entraîner des conséquences majeures sur l'homéostasie de l'épithélium intestinal. Ces conséquences ont trait à la modification du renouvellement épithélial, en induisant l'apoptose (Li and Li, 2020) ou en favorisant la prolifération des CSI (Mana et al., 2021), à l'augmentation de perméabilité intestinale causée par l'altération des jonctions serrées (Ahmad et al., 2017), notamment en lien avec un stress oxydant des CEI (Gil-Cardoso et al., 2017b; Li and Li, 2020), ou encore par une perte de l'hypoxie physiologique (Yoo et al., 2021).

Par ailleurs, la consommation d'un régime obésogène modifie le métabolisme lipidique des entérocytes ainsi que l'environnement luminal (Cani et al., 2009; Hamilton et al., 2015), pouvant provoquer une dysfonction mitochondriale des CEI/CEC. Ainsi nous faisons l'hypothèse que des changements du métabolisme lipidique et de l'environnement luminal (i.e. composition du microbiote et des métabolites produits), induits par la consommation d'un régime obésogène, modifient la fonction mitochondriale des CEI et des CEC, induisant une hyperperméabilité intestinale.

**Les objectifs de ce projet de thèse sont donc de déterminer si la consommation d'un régime obésogène modifie la fonction mitochondriale des cellules épithéliales**

## **d'intestin grêle et/ou de côlon, et si oui, quelles sont les conséquences de cette dysfonction sur l'homéostasie intestinale ?**

Pour répondre à cette problématique, l'étude a été divisée en 3 grands axes :

**Partie I** : Revue bibliographique portant sur le rôle de la fonction mitochondriale dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal dans un contexte sain et d'obésité induite par un régime.

**Partie II** : Impact d'une surcharge en lipides sur la fonction mitochondriale des CEI *in vivo* et *in vitro* et conséquences sur l'homéostasie jéjunale.

**Partie III** : Modifications de l'environnement luminal colique induit par la consommation d'un régime obésogène et fonction mitochondriale des cellules épithéliales coliques.

Les résultats présentés dans chaque partie sont rédigés sous la forme d'articles scientifiques ayant fait, ou allant faire, l'objet d'une soumission pour publication dans des journaux internationaux à comité de lecture.

La **partie I** a consisté à d'abord faire l'état des connaissances bibliographiques sur le rôle joué par la fonction mitochondriale des CEI et des CEC dans le maintien de l'homéostasie intestinale puis à discuter des altérations connues de cette fonction mitochondriale et des conséquences sur l'homéostasie intestinale dans un contexte d'obésité induite par un régime. Cette revue, dont les éléments ont été repris dans l'introduction de ce manuscrit, a fait l'objet d'une **publication dans le journal *Molecular Metabolism*** (Guerbette et al., 2022).

La **partie II** présente d'abord les résultats obtenus sur les effets induits par 22 semaines de consommation d'un régime obésogène sur la fonction mitochondriale des CEI et sur l'homéostasie intestinale dans un modèle de souris obèse (**Partie II.1** – Article en préparation). En complément de cet article, les données obtenues après 3 jours de consommation de régime obésogène sont présentées (**Partie II.2**) ainsi que les résultats obtenus sur un modèle d'organoïdes murins de jéjunum traités avec des acides gras (**Partie II.3**). Ensuite, une caractérisation de la composition en acides gras des régimes utilisés *in vivo* et de ceux stockés sous forme de TG dans les CEI a été réalisée (**Partie II.4**) afin d'évaluer par la suite les effets de ces acides gras, seuls ou en mélange, sur la fonction mitochondriale et la perméabilité intestinale d'un modèle *in vitro* d'entérocytes porcins, les IPEC-J2 (**Partie II.5** - Article à rédiger). Dans le but de développer une stratégie thérapeutique innovante ciblant la mitochondrie des CEI, les effets de la fucoxanthine, un caroténoïde extrait d'algues brunes, sur la bioénergétique des IPEC-J2 ont également été évalués (**Partie II.6** - Article à rédiger).

La **partie III** (**Article soumis le 28/11/2022 dans ELife**) décrit la dysbiose colique induite par la consommation d'un régime obésogène et ses effets sur la fonction mitochondriale des CEC ainsi que sur la perméabilité intestinale chez la souris obèse.





**PARTIE I : ROLE DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE DANS  
L'HOMÉOSTASIE DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL DANS UN  
CONTEXTE SAIN ET D'OBESITÉ INDUITE PAR UN RÉGIME.**

---



# Mitochondrial function in intestinal epithelium homeostasis and modulation in diet-induced obesity



Thomas Guerbette<sup>1</sup>, Gaëlle Boudry<sup>1,\*</sup>, Annaïg Lan<sup>1,2,3</sup>

## ABSTRACT

**Background:** Systemic low-grade inflammation observed in diet-induced obesity has been associated with dysbiosis and disturbance of intestinal homeostasis. This latter relies on an efficient epithelial barrier and coordinated intestinal epithelial cell (IEC) renewal that are supported by their mitochondrial function. However, IEC mitochondrial function might be impaired by high fat diet (HFD) consumption, notably through gut-derived metabolite production and fatty acids, that may act as metabolic perturbators of IEC.

**Scope of review:** This review presents the current general knowledge on mitochondria, before focusing on IEC mitochondrial function and its role in the control of intestinal homeostasis, and featuring the known effects of nutrients and metabolites, originating from the diet or gut bacterial metabolism, on IEC mitochondrial function. It then summarizes the impact of HFD on mitochondrial function in IEC of both small intestine and colon and discusses the possible link between mitochondrial dysfunction and altered intestinal homeostasis in diet-induced obesity.

**Major conclusions:** HFD consumption provokes a metabolic shift toward fatty acid  $\beta$ -oxidation in the small intestine epithelial cells and impairs colonocyte mitochondrial function, possibly through downstream consequences of excessive fatty acid  $\beta$ -oxidation and/or the presence of deleterious metabolites produced by the gut microbiota. Decreased levels of ATP and concomitant  $O_2$  leaks into the intestinal lumen could explain the alterations of intestinal epithelium dynamics, barrier disruption and dysbiosis that contribute to the loss of epithelial homeostasis in diet-induced obesity. However, the effect of HFD on IEC mitochondrial function in the small intestine remains unknown and the precise mechanisms by which HFD induces mitochondrial dysfunction in the colon have not been elucidated so far.

© 2022 The Authors. Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords** Obesity; Intestine; Mitochondria; Energy metabolism; High fat diet

## 1. INTRODUCTION

Overweight and obesity are defined as abnormal or excessive fat accumulation that presents a risk to health owing to an energy imbalance between calories consumed and calories expended. According to recent reports from the World Health Organization (WHO), 1.9 billion adults were overweight and 650 million obese in 2016. Four million overweight or obese people die each year from associated complications, such as cardiovascular diseases or cancer [1]. Those obesity-associated metabolic disorders are likely to occur as a result of systemic low-grade inflammation [2,3]. Indeed, because of the major endocrine function of adipose tissue notably in adipokine production, excessive fat accumulation in obese subjects leads to metabolic inflammation of numerous tissues such as liver, muscle or brain [4,5]. However, disturbances of intestinal homeostasis, in particular an increased permeability of the intestinal barrier, concomitant with intestinal microbiota alterations of its composition and/or metabolic activities, as described in animal model [6–8] as well as in humans [9], also participate in the onset and/or

perpetuation of systemic low-grade inflammation [10]. Intestinal homeostasis relies on complex interactions between the microbiota, the intestinal epithelium, and the host immune system, that allow the intestinal barrier function maintenance. This barrier is notably made of a monolayer of intestinal epithelial cells (IEC), associated with each other by tight junctions, and a mucus layer that protects the IEC surface. In physiological situations, the intestinal barrier acts as a filter that absorbs nutrients in the small intestine and water and electrolytes in the colon. Those absorption processes involve transporters that require high amounts of energy. In addition, the intestinal epithelium constantly renews itself every 4–5 days. This renewal is ensured by intestinal stem cells (ISC), nested at the bottom of intestinal crypts, which undergo continuous asymmetric division generating progenitor cells that differentiate as they migrate up the crypt-villus axis in the small intestine, or up the crypt in the colon, and finally die by anoikis. A balance between proliferation/apoptosis contributes to intestinal homeostasis whereas disruption of this equilibrium and increased apoptosis is associated with defects of the intestinal barrier [11].

<sup>1</sup>Institut Numecan, INSERM, INRAE, Univ Rennes, Rennes, France <sup>2</sup>Université Paris-Saclay, AgroParisTech, INRAE, UMR PNCA, Paris, France

<sup>3</sup> Gaëlle Boudry and Annaïg Lan Contributed equally.

\*Corresponding author. Institut Numecan, 16 Le Clos, 35590 Saint-Gilles, France. E-mail: [Gaelle.Boudry@inrae.fr](mailto:Gaelle.Boudry@inrae.fr) (G. Boudry).

Received April 6, 2022 • Revision received June 27, 2022 • Accepted July 6, 2022 • Available online 8 July 2022

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101546>

Abbreviations			
CAT	Catalase	ISC	Intestinal stem cells
CLD	Cytosolic lipid droplet	LGR5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
CPT1	Carnitine palmitoyltransferase 1	MFN	Mitofusin
DRP1	Dynamin-related protein 1	Miro	Mitochondria Rho-GTPase
ER	Endoplasmic reticulum	mt	Mitochondria
ETC	Electron transport chain	mTOR	Mitochondrial target of rapamycin
FADH	Flavin adenine dinucleotide	NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
GO_BP	Gene ontology biological process	NRF	Nuclear respiratory factor
GPX	Glutathione peroxidase	OMM	Outer mitochondrial membrane
GTP	Guanosine triphosphate	OXPHOS	Oxidative phosphorylation
HDAC	Histone deacetylase	Parkin	RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase
HFD	High fat diet	PGC1	Peroxisome proliferator activated receptor $\gamma$ coactivator-1
HK1	Hexokinase 1	PINK1	Phosphatase and tensin homolog-induced kinase 1
HIF1 $\alpha$	Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$	PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
HMGCS2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2	PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
HSP	Heat shock protein	ROS	Reactive oxygen species
IEC	Intestinal epithelial cells	SCFA	Shortchain fatty acids
IMM	Inner mitochondrial membrane	SIRT	Sirtuin
IMS	Intermembrane space	SOD	Superoxide dismutase
		TCA	Tricarboxylic acid cycle

Because of the energy needed for rapid epithelial turnover, ATPase-dependent transporters, and junctional cell permeability regulations as well as mucus glycoproteins and antimicrobial peptides synthesis, the intestinal epithelium requires great amounts of energy. Henceforth, the gastrointestinal tract represents only 5% of the total body weight, but consumes 20% of the whole-body oxygen [12]. Energy is produced by mitochondria, in the form of ATP via oxidative phosphorylation (OXPHOS). Mitochondrial function plays therefore a pivotal role in intestinal homeostasis. However, IEC mitochondrial function is likely to be impaired by high fat diet (HFD) consumption notably through nutrients, such as fatty acids, or metabolites produced by the gut microbiota, that may act as metabolic perturbators of IEC. Mitochondrial dysfunction is thus defined as any mechanism that reduces efficiency of OXPHOS and leads to decreased levels of cellular ATP. The objectives of this review are first to resume the current knowledge on mitochondria, then focus on mitochondrial function in IEC and in the control of intestinal homeostasis and highlight the known effects of metabolites, originating from the diet or gut bacterial metabolism, on IEC mitochondrial function. The final objective is to summarize the current literature on the impact of HFD on mitochondrial function in IEC and discusses the possible link between mitochondrial dysfunction and altered intestinal homeostasis in diet-induced obesity.

## 2. GENERAL DESCRIPTION OF MITOCHONDRIA

### 2.1. Structure

Mitochondria are 0.5–1  $\mu\text{m}$  long by 0.5–1  $\mu\text{m}$  large organelles that are delimited by two phospholipid bilayers: an inner mitochondrial membrane (IMM) and an outer mitochondrial membrane (OMM), separated by an intermembrane space (IMS) (Figure 1). The OMM separates the mitochondrial content from the cytosolic space and allows the communication of mitochondria with its environment, notably through mitochondria-associated membranes (MAM) which permit functional and physical communication between mitochondria and the endoplasmic reticulum (ER). The OMM also constitutes an exchange interface between the mitochondria and the cytosol. While proteins and ions smaller than 5 kDa diffuse through the OMM via porins, bigger molecules, such as pre-proteins which possess a mitochondrial

targeting signal, translocate across the OMM via binding to translocases of OMM complex [13]. Proteins internalized into the mitochondria include heat shock proteins (HSP) or proteins involved in the tricarboxylic acid cycle (TCA),  $\beta$ -oxidation and/or OXPHOS. On the other hand, the IMM is an impermeable membrane that allows lipid trafficking. It houses the electron transport chain (ETC) complexes, involved in ATP production via OXPHOS. Inward folds, called cristae, extend IMM thus increasing surface for ATP generation and facilitating protein and metabolite exchanges through IMM translocases [16]. Mitochondria are also mobile organelles able to move along microtubules via a mitochondrial Rho-GTPase (Miro), which anchors kinesin motor to the mitochondrial surface, forming a dynamic network [17].

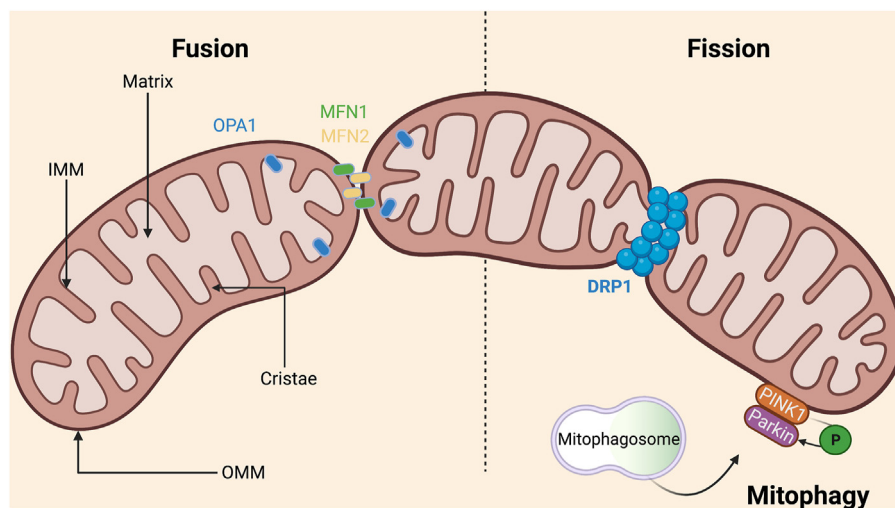
### 2.2. Mitochondrial genome

Mitochondria possess their own genome, a circular double-stranded mtDNA (~16.6 kb in humans) housed inside the matrix. Mitochondrial genome is made of hundreds to thousands of mtDNA copies per cell depending on the tissue [18], only transmitted maternally, although this has been recently challenged [19]. Strong evidences suggest that the number of mitochondria and mtDNA copies is function of the cellular energy requirements since high energy demands tend to require an enhanced number of mitochondria and more copies of mtDNA than low energy demand [20].

### 2.3. Mitochondrial dynamics: biogenesis, fission, fusion, and control quality

#### 2.3.1. Biogenesis

Mitochondrial biogenesis is the process through which pre-existing mitochondria grow and divide. It contributes to maintain cellular metabolic homeostasis by providing a pool of healthy mitochondria and eliminating damaged mitochondria. Mitochondrial biogenesis requires proteins encoded by both mitochondrial and nuclear genomes. It involves peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) coactivator1  $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ), a co-transcriptional factor which drives biogenesis especially by activating nuclear respiratory factor (NRF) 1 and 2. NRF1 and NRF2 are both transcriptional factors which activate the mitochondrial transcription factor A (TFAM), which in turn drives



**Figure 1: Mitochondrial structure and dynamics.** This schematic representation of mitochondrial architecture shows inner mitochondrial membrane (IMM) folded in cristae, which houses the mitochondrial electron transport chain, and surrounds the mitochondrial matrix. Outer mitochondrial membrane (OMM) separates the intermembrane space from the cytosol. Mitochondrial dynamics involves fusion and fission. Fusion of two mitochondria into a bigger one is notably mediated in the OMM by mitofusin (MFN) 1 and MFN2 isoforms, which form homo or heterodimers, and by optic atrophy 1 (OPA1) in IMM which facilitates inner membrane merging. At the opposite, mitochondrial fission provides smaller mitochondria from a bigger one and occurs where endoplasmic reticulum (ER) makes contacts with mitochondria, creating the fission apparatus composed of OMM protein, such as mitochondrial dynamics proteins of 49 and 51 kDa, and GTPase Dynamin-related protein 1 (DRP1) on sites where ER attach. DRP1 then translocates to the OMM, multimerizes, forming a ring structure around the organelle which finally splits both membranes. Once mitochondrial fission is completed, the healthy mitochondrion is reintegrated to the tubular network whereas the downregulation of fusion mediators isolates damaged mitochondria. Damaged mitochondria, are characterized by the phosphatase and tensin homolog-induced kinase 1 (PINK1) accumulation on the OMM and are recognized by the cytosolic RBR E3 ubiquitin protein ligase (Parkin) that phosphorylates PINK1, triggering OMM protein ubiquitination and recruiting mitophagosomes machinery. The phagosome fuses with a lysosome and proceeds to mitochondrial degradation via lysosomal proteases and lipases to finally eliminate damaged mitochondria by mitophagy. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

transcription and replication of mtDNA. NRF1 and NRF2 also control the expression of nuclear genes encoding ETC subunits and proteins required for mitochondrial functions [21]. Mitochondrial biogenesis can be influenced by cellular factors, among which oxidative stress and proliferation or differentiation state [22].

### 2.3.2. Fusion and fission

Mitochondria are submitted to processes of fusion and fission. The fission is the phenomenon by which a mitochondrion divides into smaller daughter mitochondria. During cell division, it thereby generates the necessary number of organelles for redistribution into daughter cells. Fission can also occur to facilitate the autophagy of depolarized mitochondria, characterized by a low mitochondrial membrane potential and impaired ATP production [23]. Fusion allows the cell to generate the correct number of mitochondria for growing cells on one hand while on the other hand, it is a process by which each mitochondrion compensates defects of each other [24]. Fusion machinery indeed allows mtDNA, protein and membrane component exchanges between mitochondria which thus provide essential support to ensure mitochondrial function [25]. While a balance between fission and fusion maintains a stable mitochondria number within a cell by regulating mitochondrial morphology and bioenergetic functionality, changes in mitochondrial fusion or fission balance can occur as a cellular response to stress. An imbalance of fusion over fission results in elongated and tubular mitochondria, constituting a mitochondrial tubular network, whereas an imbalance towards fission generates fragmented mitochondria [26], often associated with decreased ATP production and considered as pathological [27,28]. While alterations in mitochondrial morphology is associated with impairment of mitochondrial energy production [29–32], mitochondrial metabolism in

turn controls mitochondrial morphology. In case of metabolic stress, mitochondria tend to fuse in order to increase their oxidative capacity thus maximizing OXPHOS and energy production [33]. Mitochondrial function is thus strongly connected to mitochondria morphology as changes in mitochondria morphology (e.g. shape, cristae integrity) impact mitochondria bioenergetic state and *vice versa* [34].

### 2.3.3. Mitochondrial quality control

**2.3.3.1. Mitochondrial unfolded protein response.** One mechanism of mitochondrial quality control is the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR). This pathway is triggered by the accumulation of misfolded proteins in mitochondria caused, for example, by excessive reactive oxygen species (ROS) production [35]. mtUPR is thus able to reduce mitochondrial proteotoxic stress and reestablish protein homeostasis by increasing the mitochondrial chaperone and protease pool through their transcription by the nuclear activation of the transcription factor C/EBP homologous protein (CHOP) [35]. Mitochondrial proteotoxic stress also induces the expression of NRF1, involved in mitochondrial biogenesis [35]. mtUPR also displays regulatory axis, based on the sirtuin (SIRT) 7 and NRF1 interplay, in which mitochondrial protein folding stress, in response to nutrient deprivation, induces SIRT7 expression which in turn repressed NRF1 and leads to diminished mitochondrial activity and biogenesis to avoid cell death [36]. This mechanism thus promotes cell quiescence and nutritional stress resistance [36].

mtUPR also displays a mitochondrial stress resistance machinery that involves the mitochondrial deacetylase SIRT3 in a CHOP-independent manner [37]. SIRT3 axis of mtUPR has indeed been shown to limit oxidative damages in stressed mitochondria by inducing the expression of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) 2, through

the activation of the nuclear transcription factor FOXO3, and potentiates the elimination of irreparable mitochondria by activating mitophagy targets [35].

mtUPR thus regulates the activation of genes involved in metabolic pathways, ROS scavenging machinery and mitochondrial dynamics, that sustains the reestablishment of protein homeostasis as well as metabolism to withstand mitochondrial stress and maintain mitochondrial network integrity [38].

**2.3.3.2. Mitophagy.** Autophagy is a catabolic pathway which removes cytoplasmic components, including damaged organelles, by lysosomal degradation. Applied to mitochondria, this process is called mitophagy (Figure 1) and results in the elimination of damaged mitochondria, marked by depolarized IMM or excess of unfolded proteins beyond the mtUPR repair limit, to prevent excessive mitochondrial ROS (mtROS) generation and cell toxicity [39]. Mitophagy seems to be also connected to mitochondrial motility. Wang et al. suggested that, during mitophagy, combination of PINK1 and Parkin activities contributes to isolate the damaged mitochondria from the kinesin network by the proteasomal degradation of Miro [40] as well as down-regulation of fusion mediators, decreasing probability of mitochondria to fuse with others [41].

#### 2.4. Mitochondrial bioenergetics

Mitochondria is considered as the powerhouse of the cell which provides energy in the form of ATP. This energy is produced through OXPHOS which consists in oxidation of the redox cofactors nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and flavin adenine dinucleotide (FADH<sub>2</sub>) coupled with the phosphorylation of ADP into ATP.

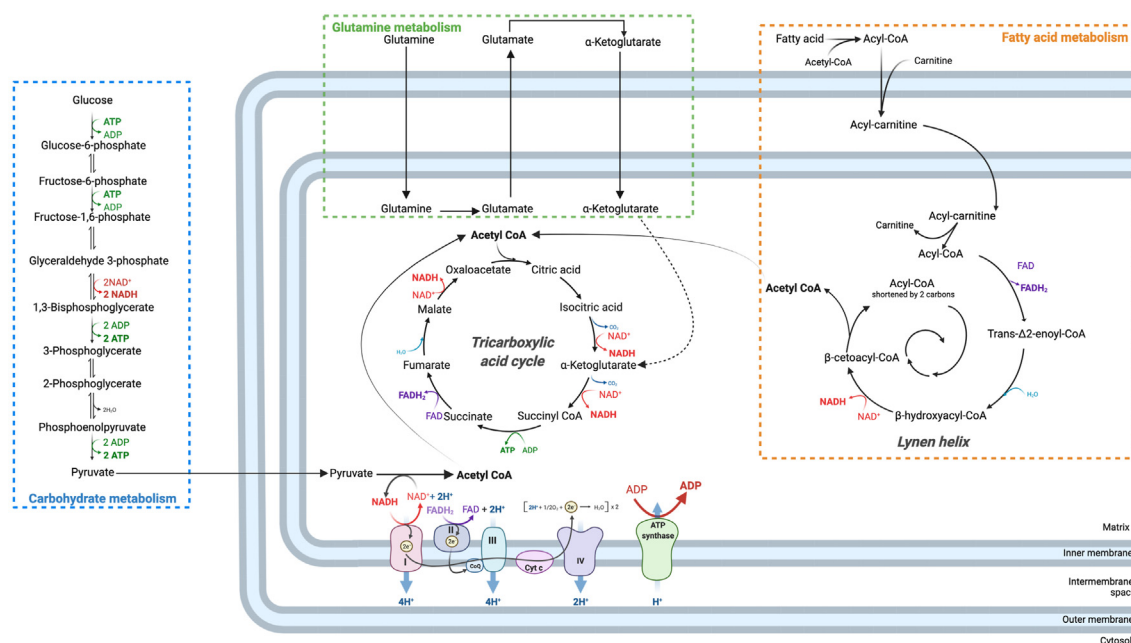
NADH and FADH<sub>2</sub> is obtained through catabolic pathways such as fatty acid  $\beta$ -oxidation via the Lypen helix or carbohydrate catabolism, which includes glycolysis, or through amino acid catabolism (Figure 2). Those

pathways give rise to acetyl-CoA that enters in the TCA, also known as Krebs cycle, in which each oxidative decarboxylation generates NADH. Acetyl-CoA is thus considered as a metabolic crossroad.

During their oxidation, NADH and FADH<sub>2</sub> transfer their electrons, initiating the electron flux through the ETC, also known as respiratory chain (Figure 3). This chain is made of 5 enzymatic complexes: NADH dehydrogenase (Complex I), succinate dehydrogenase (Complex II), ubiquinol cytochrome c oxidoreductase (Complex III), cytochrome c oxidase (Complex IV) and ATP synthase (Complex V) [42]. Electron transfer through ETC complexes is accompanied with proton pumping, from mitochondrial matrix toward IMS that generates electrical and chemical gradients. Those gradients in turn drive the transport of protons from IMS to the matrix through ATP synthase and constitute a proton driving force that drives the rotation of ATP synthase subunits. This mechanical energy finally allows chemical synthesis of ATP from condensation of inorganic phosphate and ADP.

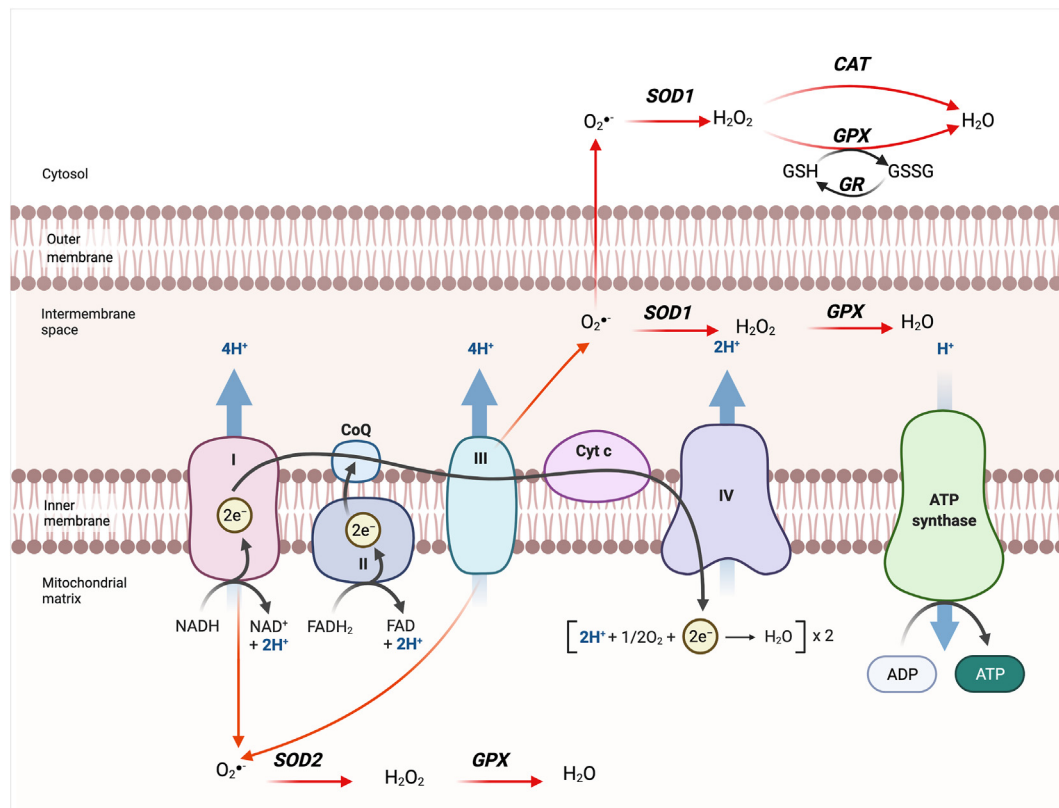
#### 2.5. Mitochondrial ROS generation

Mitochondria are the most abundant source of ROS. ROS include superoxide radicals (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) and downstream products such as hydroxyl and peroxide compounds, like hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). OXPHOS is indeed not totally efficient as 0.2–2% of the electrons leak out, notably from complexes I and III, and interact with O<sub>2</sub> to produce ROS, especially O<sub>2</sub><sup>•-</sup> [43] (Figure 3). Some mitochondrial enzymes also constitute, to a lesser extent, a source of mtROS. First, the matrix-located pyruvate and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenases are reduced flavoproteins that constitute a source of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through electron transfer by their flavin subunit [44]. Then, mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation is also a source of ROS whether by favoring electron leaks from the ETC via complexes I and III and electron transfer flavoprotein and oxidoreductase [45] or from enzymes involved in the mitochondrial



**Figure 2: Schematic view of mitochondrial bioenergetics in intestinal epithelial cells.** Electron transport chain (ETC) is fueled through catabolism of Acetyl-CoA in the tricarboxylic acid cycle (TCA) that generates NADH and FADH<sub>2</sub>, whose oxidation in complexes I and II of the ETC initiates electron transfer between complexes. Acetyl-CoA is a metabolic crossroad since it can be obtained through carbohydrate catabolism as well as fatty acid  $\beta$ -oxidation in the Lypen helix, including butyrate and fatty acids from diet, that also generates NADH and FADH<sub>2</sub> in each round. Amino acid catabolism also fuels TCA notably through conversion of glutamine into glutamate and then dehydrogenation into  $\alpha$ -ketoglutarate.





**Figure 3: Electron transport chain (ETC) and Reactive Oxygen Species (ROS) generation.** ETC is made of 5 enzymatic complexes: **NADH dehydrogenase** (Complex I), **succinate dehydrogenase** (Complex II), **ubiquinol cytochrome c oxidoreductase** (Complex III), **cytochrome c oxidase** (Complex IV) and **ATP synthase** (Complex V). By respectively binding to complex I and II, NADH and FAD<sub>2</sub> provides each two electrons to the ETC during their oxidation. These electrons are transferred, via several iron sulfur clusters, to lipid soluble redox coenzymes Q (CoQ). Then, coenzyme Q reduction transfers electrons to Complex III which are in turn transferred to cytochrome c (Cyt c) molecules. Cytochromes c next provide electrons to Complex IV that catalyzes the reduction of 2 O<sub>2</sub> molecules into H<sub>2</sub>O. In each complex, except Complex II, energy of passing electrons is accompanied by proton pumping from matrix to the intermembrane space (IMS). Accumulation of protons in the IMS generates a potential difference (electrical and chemical gradients) across the inner membrane. Those gradients in turn drive the transport of protons from IMS to the matrix through complex V, also known as ATP synthase, and constitutes a proton-driving force that drives the rotation of Complex V subunits. This mechanical energy finally allows chemical synthesis of ATP from condensation of inorganic phosphate and ADP. Electron leaks from complexes I, toward mitochondrial matrix, and III, into the matrix and into the IMS, interact with O<sub>2</sub> and generate superoxide anions. The latter may then be converted into H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O by antioxidant enzymes (SOD1/2: superoxide dismutase 1/2; GPX: glutathione peroxidase; GR: glutathione reductase; GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidised glutathione; CAT: catalase) in the cytosol or within IMM or mitochondrial matrix.

β-oxidation such as the flavoprotein long-chain acyl-CoA dehydrogenase [46]. To a lesser extent, ROS are also produced in other cell compartments notably through cytosolic oxidases, such as xanthine oxidase [47], within the peroxisomes via their oxidases [48], through ER cytochrome P450 [49] and also from membrane enzymes, such as the family of NADPH oxidases Nox and Duox [50].

To balance ROS concentration, cells possess an endogenous antioxidant enzymatic machinery (Figure 3). Exogenous antioxidants, such as dietary vitamins and minerals, also exert a role in ROS balance [51]. However, an excess of ROS generation leads to cellular damages, via lipid peroxidation and protein oxidation as well as DNA and mtDNA damages, that ultimately triggers programmed cell death [52]. mtDNA, because of its structure, is more susceptible to ROS damages, resulting in single or double mtDNA breaks or DNA base alterations such as bypasses of the thymine and formation of thymine glycol [53]. Moreover, TCA enzymes are also vulnerable to ROS injuries [54,55] making mitochondria the primary target of ROS-induced cellular damages. It is noteworthy that ROS also display beneficial roles in tissue homeostasis. As second messengers, they are involved in multiple intracellular transduction pathways and control the action of mitogen-activated protein kinases [56].

### 3. MITOCHONDRIAL FUNCTIONS IN INTESTINAL EPITHELIAL CELLS

#### 3.1. Epithelial renewal dynamics in small intestine and colon

The small intestine epithelium is characterized by elongated domains towards lumen, called villi, composed of differentiated IEC and inward-invaginated domains called crypts, which contain ISC. Colonic epithelium only displays crypts and a flat epithelial surface.

The intestinal epithelium is in constant turn-over and self-renews every 4–5 days. Crypt-based columnar ISC are located at the bottom of the crypts, intercalated between Paneth cells in the small intestine, and harbor leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 (Lgr5) gene as a specific marker [57]. Here, they continuously undergo asymmetric division generating transit-amplifying cells. Through continuous and rapid cycles of proliferation, these progenitor cells gradually move upward the crypt and finally differentiate into absorptive IEC (enterocytes or colonocytes) or secretory cells (such as goblet or enteroendocrine cells). Paneth cells remain within the small intestinal crypts where they pursue their role of antimicrobial defense and stem cell maintenance since they participate to the niche environment of Lgr5+ cells. An equivalent to Paneth cells in the colon is



Reg4+ cells which also play a role in epithelial niche for ISC [58]. Finally, at the top of the villus in the small intestine, or at the colonic epithelial surface, senescent cells lose their attachment to the basement membrane and neighboring cells, and fall into the lumen via anoikis [59].

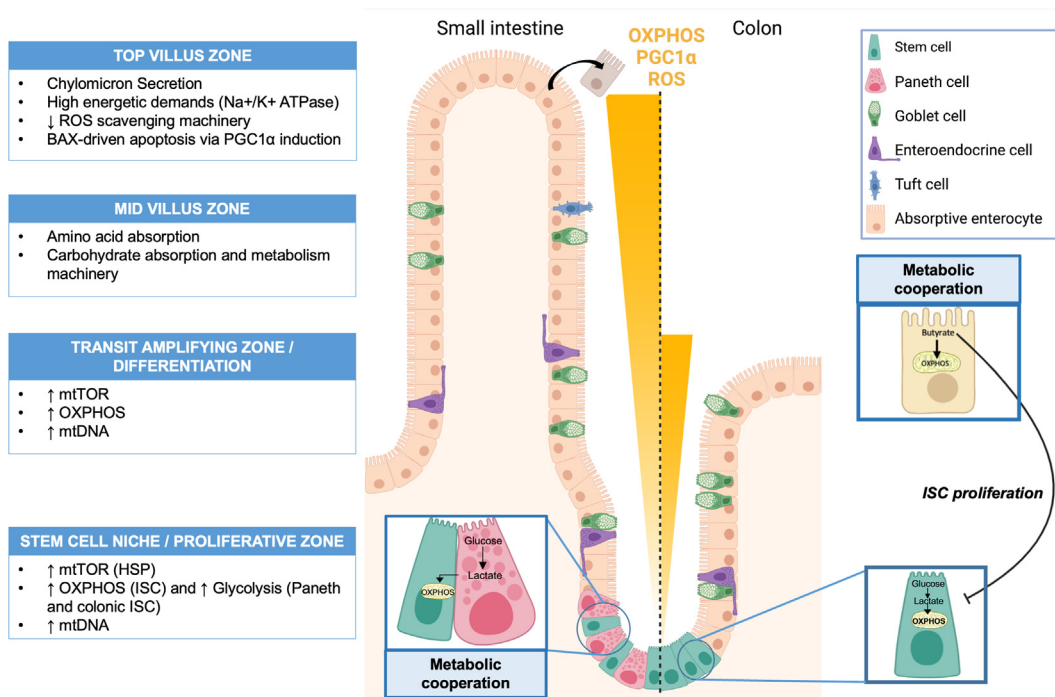
Because intestinal epithelium is exposed to pathogens and luminal components derived from diet or microbiota, which may trigger cell damages and apoptosis, epithelial renewal is essential to ensure intestinal homeostasis through intestinal barrier integrity [60]. Yet, this process requires high amount of energy directly provided by mitochondria.

### 3.2. Intestinal epithelium zonation associated with different metabolic activity along the crypt/villus axis

As they migrate upward the crypt-villus axis, enterocytes encounter zoned cell states associated with different functions, depending on the extra-cellular environment and gene expression, and thus different metabolic activities. By tracing Lgr5+ ISC progenies, it appears that most genes are not continuously expressed along the crypt-villus axis, suggesting that enterocytes are not terminally differentiated during their migration along the villi, but rather continuously transdifferentiate [61]. Heatmaps and zonation profiles of genes involved in the absorption of distinct nutrient classes highlight a zonation of nutrient absorption machineries along the crypt-villus axis in mouse jejunum. Mid-villus enterocytes display amino acid and carbohydrate absorption and metabolism machinery, whereas villus tip cells have increased expressions of genes involved in lipid absorption and chylomicron secretion [61] (Figure 4).

In connection with the intestinal epithelium zonation, IEC display a metabolic gradient associated with their proliferation and phenotypic transitions during their migration along the crypt-villus axis. Paneth cells tend to have a high glycolytic phenotype whereas Lgr5+ ISC display both high glycolytic and OXPHOS activities as shown by NADH/NAD+ fluorescence analyzes in mouse small intestine through three-dimensional phasor fluorescence lifetime microscopy [62]. On the contrary, differentiated enterocytes at the top of the villi [63] or colonocytes at the top of the crypts [64] use OXPHOS to fulfill their energetic needs (Figure 4). In line with this metabolic gradient, mitochondrial biogenesis and activity are also regulated along the crypt-villus axis. In rat small intestine IEC from villi contain at least twice more mitochondria than IEC from crypts. Those mitochondria also seem larger in villi than in crypts [65]. Moreover, in intestinal organoids, IEC differentiation has been linked to an increase in mitochondrial number [62].

Finally, ROS can regulate cell phenotypic shift along the crypt-villus axis. Immunohistochemistry analysis of mouse small intestine reveals that p38, a MAP kinase sensitive to redox status and involved in IEC differentiation, is activated at the bottom of intestinal crypts whereas it is less active in differentiated villi. In mouse small intestine organoids, p38 is activated during crypt formation and differentiation in responses to ROS signaling [66]. Furthermore, impairing OXPHOS in mouse small intestine organoids, by blocking ETC complexes or treating them with antioxidants, altered crypt formation [61]. Taken together those results suggest that mitochondrial function, through ROS signaling and p38 activity, drives crypt formation and IEC differentiation.



**Figure 4: Intestinal epithelium zonation and metabolic activities along the crypt/villus axis.** As intestinal epithelial cells (IEC) migrate up along the crypt/villus axis, they display a metabolic gradient associated with different mitochondrial activities that play a major role in intestinal homeostasis. Intestinal crypts house intestinal stem cells (ISC) that rely on glycolysis to rapidly provide energy needed for proliferation, in association with oxidative phosphorylation (OXPHOS) in the small intestine, supported by Paneth cell-derived lactate. Then, IEC migration upward the crypt/villus axis is accompanied with higher mitochondrial content and PGC1 $\alpha$  expression, notably induced by the mammalian target of rapamycin (mTOR), and higher OXPHOS activities to support essential functions such as nutrient absorption. Enterocytes from small intestine mainly rely on D-glucose, L-glutamine and L-glutamate to fuel OXPHOS while differentiated colonocytes mostly  $\beta$ -oxidize microbiota-derived butyrate thus protecting ISC against its anti-proliferative effect. At villi tips or at the top of colonic crypts, enhanced metabolic activities finally generate reactive oxygen species (ROS) accumulation in mature IEC which contributes to trigger apoptosis by anoikis.

### 3.3. Mitochondrial function in the control of ISC homeostasis

Strong evidences suggest that cell metabolism is a key regulator of pluripotency and differentiation: metabolism could control stem cell fate and even determine cellular phenotype [67]. Generally, cells in active proliferation state perform high glycolytic activity and show low OXPPOS level [68], assimilable to the “Warburg effect”, a metabolic alteration of cancer cells characterized by important glycolysis, followed by lactic acid fermentation [69]. As highly proliferative cells, Lgr5+ cells exhibit high glycolytic activity. However, they also display relatively high mitochondrial activity and use lactate to produce ATP via sustained OXPPOS as observed in mouse small intestine organoids [62]. Indeed, besides supporting ISC stemness by providing essential growth factor, Paneth cells also support Lgr5+ cell metabolic state by providing glycolysis-derived lactate. Thus, in the small intestine, cells show different but cooperative metabolic activities (Figure 4). Yet, recent works demonstrated that fatty acid  $\beta$ -oxidation play a major role in ISC maintenance and stemness [70,71] mediated by the transcription factors HNF4A and HNF4G [72], both regulators of intestinal fatty acid oxidation. Furthermore, PRDM16, a transcription factor that promotes fatty acid  $\beta$ -oxidation through PPAR activation, is necessary for the survival of the stem-cell-derived progenitor cells in upper parts of the small intestine [73].

Paneth cells being absent in the colon, colonic ISC perform themselves the conversion of glucose into lactate through anaerobic glycolysis, even in presence of O<sub>2</sub>, thus harboring a Warburg-like metabolism [68]. Moreover, a metabolic barrier is established in mammalian colonic crypts, also called “butyrate paradox”, that protect ISC from the anti-proliferative effect of butyrate. This short-chain fatty acid (SCFA) produced by the gut microbiota, can indeed inhibit ISC proliferation at physiological concentrations through the inhibition of histone deacetylase (HDAC), and increasing FOXO3 binding on negative regulators of cell cycle genes and inhibiting proliferation of ISC [74]. Theoretically, since colonic ISC display higher rates of glycolytic activity than OXPPOS [68], butyrate would not be efficiently oxidized and would accumulate in the cytoplasm and inhibit consequently proliferation [74]. However, colonocytes at the top of the crypt preferentially oxidize butyrate thus limiting its amount at crypts basis, where ISC are located, and favoring ISC proliferation [74] (Figure 4).

Furthermore, mitochondria are able to modulate ISC stemness and proliferation via mtUPR and notably through mitochondrial HSP [75]. To assess its role in intestinal homeostasis, the mitochondrial chaperone HSP60, required for the folding and assembly of proteins imported into mitochondria [76], was deleted in mouse intestinal epithelium. This resulted in mtUPR activation and mitochondrial function impairment in association with a loss of stemness and cell proliferation in Hsp60-deficient jejunal crypts [75], suggesting a critical role for mitochondrial function and mtUPR in maintaining stemness and proliferation.

### 3.4. Influence of intracellular signaling on mitochondrial bioenergetics zonation

As mitochondrial biogenesis modulator, PGC1 $\alpha$  can act as a metabolic regulator of IEC fate by increasing OXPPOS and fatty acid  $\beta$ -oxidation [77]. PGC1 $\alpha$  is predominantly expressed at the top of the villi (and far less in proliferative crypts) along with PPAR- $\gamma$  [78], with which it interacts to trigger gene expression. As an epithelial nuclear receptor primarily synthesized in differentiated colonocytes and activated by butyrate, PPAR $\gamma$  triggers mitochondrial  $\beta$ -oxidation of fatty acids and oxygen consumption through OXPPOS, further contributing to the high OXPPOS activity at the top of crypts [64,79]. PPAR $\gamma$  and PGC1 $\alpha$  thus seem to contribute to the intestinal metabolic gradient along the crypt-villus and crypt axes.

Moreover, along the crypt-villus axis, the mammalian target of rapamycin (mTOR) increases levels of mtDNA and the expression of genes involved in OXPPOS in IEC, through nutrient signaling, such as amino acids and glucose, and growth factors, such as insulin growth factor [80,81]. Also, the transcriptional repressor protein Yin Yang 1 (YY1) and mTOR play critical roles in intestinal epithelium repair and ISC renewal since their deletion in mice impairs stem cell renewal [82,83]. In muscle stem cells, mTOR has been shown to mediate the complex formation between PGC1 $\alpha$  and YY1 resulting in increased mitochondrial biogenesis and OXPPOS gene expression [84]. Whether this also applies in IEC need further investigations.

### 3.5. Mitochondrial function and apoptosis through PGC1 $\alpha$ -driven ROS accumulation

The overexpression of PGC1 $\alpha$  and enhanced OXPPOS in differentiated IEC is also accompanied by increased mtROS production. However, in the intestine, contrarily to other tissues where it induces the expression of antioxidant enzymes [85], PGC1 $\alpha$  overexpression enhances mitochondrial activity and ROS accumulation, without displaying any effect on ROS scavenging [86]. Furthermore, accumulation of intracellular free radicals decreases antioxidant mitochondrial enzyme activities (SOD, GPX and CAT) in an *in vitro* model of pig enterocytes [87]. This raises the question of mitochondrial injury consequences on intestinal homeostasis.

While PGC1 $\alpha$  does not display antioxidant properties in the small intestine, PGC1 $\beta$ , a PGC1 $\alpha$  homolog, localized all along the entire crypt-villus axis in the small intestine and crypts in the colon, triggers OXPPOS but also protects the intestinal epithelium against ROS-driven damages by stimulating antioxidant enzymes production, such as SOD2 and GPX4 [88]. Indeed, overexpressing *Pgc1 $\beta$*  in mouse resulted in higher enterocyte lifespan and increased tumor susceptibility while *Pgc1 $\beta$*  knockout mice were protected against intestinal carcinogenesis [88]. Hence, this transcriptional factor coactivator orchestrates the balance between enhanced mitochondrial activity and protection against ROS over-production along the entire epithelium in the small intestine and colon. Yet, enzymes of the antioxidant machinery, such as SOD2 and CAT, are poorly expressed in villi tips [89] compared to crypt base, while prooxidant enzymes, such as glutathione transferase/reductase, are highly expressed in it [89]. Thus ROS accumulation ultimately fosters cell apoptosis at the top of the crypt-villus axis [77].

### 3.6. Energetic substrates of IEC

IEC are polarized cells facing the intestinal lumen on one side and the *milieu interieur* on the other side. While the *milieu interieur* composition is relatively stable in healthy individuals thanks to strong homeostasis regulatory mechanisms, the composition of the luminal side can change drastically depending on the diet, time of the day and gut microbiota composition and activities. Indeed, the composition of ingested meals as well as diet patterns directly modify the luminal composition of the small intestine. Moreover, and although the growth of microorganisms is globally inhibited by bile acids and pancreatic secretions in the small intestine [90], the role of jejunal bacteria on nutrient absorption, and especially lipid absorption, is more and more recognized [91,92]. As for the colon, it constitutes an important place of bacterial fermentation. Hence, in the colon, undigested or partially digested dietary carbohydrates [structural polysaccharides of plant cell walls, oligosaccharides (galactooligosaccharides or fructooligosaccharides [93]), resistant starch [94]], dietary proteins and lipids or substrates from endogenous sources (digestive secretions, exfoliated cells, and mucins) are metabolized by gut bacteria, resulting in variable

luminal composition, depending on dietary factors and/or microbiota composition [95].

This particularity of the IEC environment leads to a large possibility of energetic substrates for those cells (Figure 2). In general, enterocytes mostly use D-glucose, L-glutamine and L-glutamate as substrates for oxidative metabolism [96,97], and colonocytes produce energy from substrates originating either from the lumen, such as SCFA, mainly butyrate, or to a lesser extent from blood origin, such as D-glucose, acetoacetate and L-glutamine [98]. However, many substrates and metabolites, directly originating from the diet or from gut microbial transformation, are also used as energetic fuels and modulate IEC mitochondrial function (Table 1).

#### 4. ROLE OF MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN DIET-INDUCED OBESITY INTESTINAL HOMEOSTASIS DISTURBANCES

##### 4.1. Impact of HFD on IEC mitochondrial function

###### 4.1.1. In the small intestine

**4.1.1.1. Metabolic switch towards lipid catabolism.** Depending on the diet composition, the small intestine is “metabolically flexible” [99]. In response to excessive fat consumption, it increases fat absorption, esterification into triacylglycerol and export into chylomicrons [100], even after a short-term exposure of 3 days in humans [101]. Triacylglycerol that have not been exported are stored in cytosolic lipid droplets (CLD) within the enterocytes, up to 18 h in humans [102,103] and 12 h in mice [104], and can be remobilized later, notably after glucose ingestion [105,106]. Functional analysis and network annotation performed on CLD fractions from obese (60% kcal from fat for 12 weeks) and lean (10% kcal from fat) mice subjected to oil gavage, revealed that lipid catabolism is the second most enriched gene ontology biological process (GO\_BP) and is more present in the proximal parts of the small intestine in both obese and lean mice after oral gavage [107]. Those enriched GO\_BP include proteins involved in mitochondrial  $\beta$ -oxidation (Acyl-CoA Dehydrogenase Very Long Chain, Acetyl-CoA Acyltransferase 2, Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Tri-functional Multienzyme Complex Subunit Alpha and Electron Transfer Flavoprotein Subunit Beta) and are overexpressed in CLD fractions of enterocytes from obese mice [107,108].

In response to increase dietary fat absorption, the small intestine is marked by metabolic adaptations towards fatty acid  $\beta$ -oxidation [109–111]. Interestingly, three days of HFD consumption (60% kcal from fat) is sufficient to decrease nearly by half the gene expression of the glucose transporter Slc5a1 and of hexokinase 1 (Hk1) in jejunal isolated enterocytes [111], suggesting a decrease in glucose metabolism in enterocytes of HFD mice. On the other hand, protein expression of HMGCS2, a mitochondrial enzyme involved in ketogenesis, is highly increased in the jejunum of HFD-fed mice. Ketogenesis is performed from acetyl-CoA generated via fatty acid  $\beta$ -oxidation to produce energy from lipids, in a context of TCA intermediate deprivation. This suggests a metabolic re-programming of jejunal enterocytes from glycolysis towards lipid metabolism, from 3 days after HFD consumption [111] to 20 weeks of HFD [110]. To predict metabolic flux variations in response to increased dietary lipid intakes, a constraint-based metabolic model of mitochondria from murine enterocyte was developed [112]. Simulations and protein transcript analysis predicted an increase in  $\beta$ -oxidation in response to increased ratio of lipid/carbohydrate in the diet. Kondo et al. besides showed that 2 weeks of HFD consumption in C57BL/6 J mice increased carnitine palmitoyl-transferase (CPT) activity, that allows fatty acid entrance within mitochondria, and the levels of [U- $^{14}$ C]palmitic acid  $\beta$ -oxidation in

mitochondrial fractions of jejunal epithelial cells from HFD-fed mice [109].

Despite the fact that fatty acids are sparsely used as energetic substrate by enterocytes in physiological states [97], increased  $\beta$ -oxidation can be seen as a mechanism to counteract excessive lipid storage as found in hepatocytes in a context of nonalcoholic fatty liver disease [113].

**4.1.1.2. Role of IEC lipid metabolism in the onset of obesity.** The ability to catabolize dietary fatty acids in enterocytes seems directly associated with protection against obesity development. By comparing levels of expression of fatty acid metabolism-related genes in response to a HFD between C57BL/6 J mice and an obesity-resistant strain (A/J), it appears that expressions were higher in HFD-fed A/J mice while CPT activity displayed increased expression in A/J mice compared to the HFD-fed C57BL/6 J mice [109]. Moreover, intestine-specific deletion of HDAC3 protects mice fed a HFD from obesity [114]. HDAC3 deletion increased fatty acid  $\beta$ -oxidation in IEC from duodenum compared to wild-type mice. After 17 weeks on HFD, mice lacking intestinal HDAC3 had less triglyceride storage in their enterocytes than control mice in HFD and similar bodyweight than mice fed a standard diet [114]. Likewise, hypothesizing that enterocyte lipid metabolism plays a major role in controlling obesity development and metabolic alterations, Ramachandran et al. developed a mutant mouse model which over-expresses the mitochondrial transporter CPT1a in their enterocytes (iCPT1mt). iCPT1mt mice fed a HFD exhibited increased levels of  $\beta$ -oxidation in IEC compared to floxed mice (Cpt1mt<sup>fl/fl</sup>). Although iCPT1mt HFD mice developed obesity, with similar body weight gain than control mice, their visceral fat mass was reduced, and they displayed improved glycemic control compared HFD Cpt1mt<sup>fl/fl</sup> [115]. Moreover, overexpression of SIRT3 in enterocytes increased metabolic activities in jejunal enterocytes after oral gavage with oleic acid in HFD mice, with notably lower concentrations of palmitoyl-CoA, indicating increased  $\beta$ -oxidation [116]. Furthermore, SIRT3 overexpression in IEC improves mouse glucose homeostasis and protects against insulin resistance under HFD [116]. Besides, SIRT3, in association with SIRT5, is also able to enhance fatty acid  $\beta$ -oxidation by promoting very long chain acyl-CoA dehydrogenase activity and its binding to cardiolipin of mitochondrial membranes [117].

Taken together, these data indicate that enhancing fatty acid  $\beta$ -oxidation in the jejunum of HFD mice improves body glucose homeostasis, prevents insulin resistance, and reduces fat mass gain.

**4.1.1.3. Lipid catabolism and risks of oxidative stress.** Despite the fact that enhanced fatty acid  $\beta$ -oxidation improves glucose homeostasis and reduces adiposity, it could however induce oxidative stress [118,119]. Fatty acid  $\beta$ -oxidation indeed constitutes a source of mtROS as described in 2.5. Furthermore, HFD consumption has been linked to reduced concentrations of glutathione and antioxidant enzymes (SOD and CAT) in duodenal homogenates from rats fed a HFD (45% kcal fat) for 4 weeks. Additionally, increased ROS detection has been observed in duodenal homogenates of mice fed a HFD (21% kcal fat) for 8 weeks [118] and in the ileum of rats fed a high-fat/high-sucrose diet (23% kcal from fat) for 17 weeks [119]. Interestingly, genetically obese rats do not show any difference in ROS detection in the intestine compared to control mice suggesting that oxidative stress is related to high fat/high sucrose consumption rather than obesity itself in the small intestine [119].

**4.1.1.4. Mitochondria function from IEC of small intestine in HFD.** Although several studies have pinpointed the metabolic switch toward fatty acid metabolism that occurs in IEC from the small intestine under

**Table 1** — Effects of dietary and gut microbial-derived metabolites on mitochondrial function of intestinal epithelial cells.

Metabolite	Luminal concentration	Diet	Origin	Target tissue	Fate <sup>a</sup> and effect
Glucose	300 mM in intestinal chyme [147]	Diet		Small intestine (from lumen)/Colon (from bloodstream)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aerobic metabolism: conversion into pyruvate [148]</li> <li>Anaerobic glycolysis in presence of lactate</li> </ul>
L-glutamine and L-glutamate	L-glutamate found at 0.1 mM before meal to 2.6 mM (3 h after meal containing 50 g of purified bovine serum albumin) [149]	Diet		Small intestine (from lumen)/Colon (from bloodstream)	<ul style="list-style-type: none"> <li>L-glutamine: first converted into L-glutamic acid, then into L-glutamate</li> <li>L-glutamate: hydrolysis via peptidase with oxalacetate to form <math>\alpha</math>-ketoglutarate and OXPHOS [12,150]</li> </ul>
Indole	Up to 1 mM in human feces [151]		Produced by gut microbiota from tryptophan [151]	Colon	<ul style="list-style-type: none"> <li>At 1 mM <i>in vitro</i> on GLUTag cells: bioactive endocrine cells thus impairing insulin secretion</li> <li>At 2.5 mM <i>in vitro</i> on HT-29 cells: inhibition of mitochondrial respiration and maximal respiratory consumption</li> </ul>
H <sub>2</sub> S	In the large intestinal lumen, H <sub>2</sub> S is present at concentrations ranging from 1.0 to 2.4 mM [154] and human fecal sulfide concentrations can reach 3.4 mM in association with high-meat diet [155]		Bacterial metabolite mainly produced through cysteine catabolism by gut bacteria [156]	Colon	<ul style="list-style-type: none"> <li>Deoxygenation through oxidation by HT-29 Glc<sup>-/-</sup> and in human colon</li> <li>Under 20 <math>\mu</math>M <i>in vitro</i> on HT-29 cells: inhibition of mitochondrial respiration and maximal respiratory consumption</li> <li>At concentrations ranging from 37.5 to 150 <math>\mu</math>M: decreases colonocytes oxygen consumption and promotes glycolysis</li> <li>At 0.1 mM <i>in vitro</i> on HT-29 cells: essential for ETC activity/ATP production [159]</li> <li>At millimolar concentrations <i>in vitro</i> butyrate mitochondrial oxidation as well as inhibition of the cytochrome c oxidase</li> </ul>
P-cresol	Around 0.4 mM in human feces [160]		Produced from L-tyrosine by gut microbiota [160]	Colon	<ul style="list-style-type: none"> <li>At concentrations above 0.8 mM <i>in vitro</i> on HT-29 cells: inhibition of ATP production and concomitant pro-inflammatory response</li> <li>At 1.6 mM on rat normal colonocytes: inhibition of mitochondrial respiration</li> </ul>
4-Hydroxyphenylacetic acid (HO-PAA)	Micromolar concentrations [162]		Produced from L-tyrosine by gut microbiota [162]	Colon	<ul style="list-style-type: none"> <li>At 1 mM <i>in vitro</i> on HT-29 Glc<sup>-/-</sup> cells: inhibition of mitochondrial respiration</li> </ul>
Ammonia (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> and NH <sub>3</sub> )	Up to 30 mM in human feces [164]		Deamination of amino acids and urea hydrolysis by bacteria [165]	Colon	<ul style="list-style-type: none"> <li>At millimolar concentrations in rat colon: inhibition of TCA enzyme malate dehydrogenase</li> <li>At 60 mM <i>in vitro</i> on Caco-2 cells: inhibition of mitochondrial ETC subunits, reduce membrane potential and TCA intermediate production and emergence of oxidative stress and eIF2<math>\alpha</math> phosphorylation</li> </ul>
Butyrate	From 1 mM to 25 mM per kg of intestinal content [169]		Anaerobic bacterial fermentation of undigested carbohydrates obtained from dietary fibers but also of several amino acids, derived from undigested proteins or endogenous sources [170]	Colon	<ul style="list-style-type: none"> <li>Preferred energetic fuel of colonocytes</li> <li>Required for mitochondrial respiration</li> <li>Inhibition of other substrates oxidation</li> <li>At 1 mM <i>in vitro</i> on HT-29 cells: inhibition of mitochondrial respiration</li> </ul>



Table 1 – (continued)

Polyamines: putrescine, spermidine, spermine	Colonic putrescine and spermidine found at millimolar concentrations [173]	Diet and gut microbiota Produced from decarboxylation of L-ornithine, via ornithine decarboxylase (ODC1) activity, to form putrescine, the precursor of spermidine and spermine [174]	Small intestine for dietary polyamines [175], colon for gut-derived polyamines [173]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Regulation of IEC metabolism notably through PPAR-<math>\gamma</math> and Angiopoietin-like protein 4 induction <i>in vitro</i> on T84 and HT-29 cell lines and in mouse colonocytes [172]</li> <li>In IEC from small intestine, OXPPOS substrate through conversion into succinate as shown in rat [174]</li> <li>In mouse colonocyte, increased levels of ETC proteins in mouse colonocytes [176]</li> </ul>
Abbreviation: ETC: electron transport chain, IEC: intestinal epithelial cells, IMM: inner mitochondrial membrane, OXPPOS: oxidative phosphorylation ROS: reactive oxygen species, SCFA: ShortChain Fatty Acids, TCA: tricarboxylic acid cycle. <sup>a</sup> Except for the entero-endocrine cell line GLUTag, all cited cell lines are absorptive IEC.				

HFD, no precise description of mitochondrial function within those enterocytes is available so far. In CLD fractions from obese (60% kcal from fat for 12 weeks) and lean (10% kcal from fat) mice subjected to oil gavage, the most enriched GO\_BP terms include proteins involved in mitochondrial ATP synthesis [107]. Consistent with the fact that proteins involved in mitochondrial  $\beta$ -oxidation were mostly found in CLD fractions from enterocytes of obese mice, the authors suggested that enterocytes may adapt against excessive fatty acid absorption by associating CLD and mitochondria, thus favoring fatty acid catabolism to compensate their storage [107]. As for mitochondrial dynamics, the *in silico* model of mouse enterocyte exposed to increased ratio of lipid/carbohydrate in the diet suggested that mitochondrial fusion and fission were unaltered in enterocytes in a context of HFD consumption [112] although no *in vivo* nor *in vitro* analysis of mitochondrial dynamics has been yet performed to corroborate those predictions. Finally, 20 weeks of HFD consumption decreased by half the *Pgc1 $\alpha$*  gene expression of jejunal enterocytes [115,116]. However, precise mechanisms that could explain the drop of *Pgc1 $\alpha$*  have not been elucidated so far but could possibly be linked to HFD-induced oxidative stress, notably through enhanced lipid catabolism. Moreover, since *Pgc1 $\alpha$*  is the master regulator of mitochondrial biogenesis, its decreased expression could affect mitochondrial number and/or enterocyte bioenergetics. However, altered mitochondrial biogenesis in response to HFD in intestine has not yet been demonstrated.

#### 4.1.2. In the colon

While the impact of HFD on IEC mitochondrial function in the jejunum is poorly described, several recent works show that HFD consumption is associated with alterations of mitochondrial function in colonocytes. The first indication was the observation of swollen mitochondria and decreased complexes II and III activities of freshly isolated mitochondria from colonic IEC of mice fed a HFD (60% kcal fat) for 16 weeks [120]. The time of HFD consumption or fat content of the diet does not seem to be crucial in this effect since shorter HFD consumption periods and lower fat content diets also resulted in signs of colonic dysfunction. Indeed, four weeks of a 45% kcal fat HFD induced a 50% decrease in epithelial ATP levels and lower expression of genes encoding for ETC subunits and *Sirt3* compared to colonocytes from control mice [121]. Likewise, HFD (60% kcal fat) consumption for 13 weeks resulted in decreased ATP levels in mouse colonic IEC and diminished expression of mRNA mitochondrial markers encoding for subunits V1 and S1 of mitochondrial complex I in these cells [122]. Furthermore, elevation of intracellular lactate levels in isolated colonocytes [121] and decreased pyruvate dehydrogenase activity, which catalyzes the conversion of pyruvate to Acetyl-CoA [121,122], suggest a switch of colonocyte metabolism from OXPPOS toward glycolysis. To explain colonocyte mitochondrial dysfunction, the authors proposed mechanisms linked to dietary fatty acid metabolism. Although fatty acid  $\beta$ -oxidation, especially long chain and saturated fatty acids, elicits ROS production and mitochondrial bioenergetic impairments at the hepatic level [123,124], these alterations remain unclear in the intestine. *In vitro* models of IEC treated with palmitic acid to mimic HFD consumption all concluded on a negative effect of palmitic acid on mitochondrial function and an increase in ROS level (Table 2). However, fatty acid absorption primarily or even exclusively happens at the small intestinal level and not at the colonic level [125]. Thus, other mechanisms than increased dietary fatty acid metabolism have to be investigated to explain colonic mitochondrial dysfunction in HFD-fed mice. Among possible mechanisms, deleterious microbial metabolites have been proposed (see Table 1) as well as bile acids. Indeed, HFD consumption is correlated with elevated concentrations of bile

**Table 2** — *In vitro* studies evaluating the effects of palmitate on mitochondrial function in different intestinal cell lines.

Concentration	Duration	Cell line	Results	Reference
100 $\mu$ M	24 h	HCT-116	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increased ROS production</li> <li>• Decreased mitochondrial membrane potential</li> <li>• Altered mitochondrial network</li> <li>• Treatment with n-acetyl-L-cysteine, a known ROS inhibitor, improved those defects</li> </ul>	[134]
500 $\mu$ M	24 h	NCI-H716	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Decreased maximal respiration and spare respiratory capacity</li> <li>• Alterations of mitochondrial membrane potential</li> </ul>	[120]
From 1 mM to 2.5 mM	24 h	Caco-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Decreased ATP production rate from OXPHOS</li> <li>• Diminished expression of genes encoding subunits V1 and S1 of mitochondrial complex I (2.5 mM)</li> </ul>	[122]

Abbreviation: OXPHOS: oxidative phosphorylation, ROS: reactive oxygen species.

acids in stools, which can reach a fecal concentration of 0.35 mM in humans fed a HFD [126]. In HT-29 colon cancer cells, deoxycholic acid increases mtROS generation, possibly by inhibiting complex III from mitochondria as reported in isolated rat liver mitochondria [127,128]. This excessive concentration of ROS generated by bile acid may potentiate mitochondrial damages. Furthermore, HFD consumption is associated with the emergence of sulphate reducing Desulfovibrionaceae in mice [129,130] and in obese humans [131]. Among Desulfovibrionaceae, *Bilophila wadsworthia* growth is mediated by the taurine-conjugated bile acid [129]. Taurine is indeed used by *B. wadsworthia* as a final electron acceptor of the ETC for anaerobic respiration which forms sulfide [132] and then, via dissimilatory sulfite reductase, hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) [133]. Obese humans are also characterized by the growth of *Desulfovibrio piger* that degrades glycans from the host intestinal mucosa into  $H_2S$  through sulfate reduction [131]. Considering the deleterious effects caused by high concentrations of  $H_2S$  on mitochondrial function of IEC (Table 1), HFD may potentiate mitochondrial dysfunction by favoring the growth of sulfur-reducing bacteria and  $H_2S$  formation.

In conclusion, several lines of evidence point to mitochondrial dysfunction in colonocytes while in-depth analysis of mitochondrial function in enterocytes has not been reported so far.

## 4.2. Possible link between HFD-induced mitochondrial dysfunction and alterations of epithelial homeostasis

### 4.2.1. Intestinal epithelial cell mitochondrial dysfunction and alteration of IEC renewal and apoptosis

As described earlier, alterations of mitochondrial function in IEC can have major consequences on intestinal epithelium homeostasis through enhanced apoptosis or impairment of ISC metabolism and proliferation. This applies also to HFD-induced mitochondrial dysfunction. Indeed, parallel to the oxidative stress and mitochondrial alterations observed in colonocytes of mice fed a HFD for 12 weeks, an increase by 50% of p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) expression was observed, although no other apoptotic markers have been studied [134]. Likewise, HCT-116 cells treated for 24 h with 100  $\mu$ M palmitic acid exhibited hallmarks of apoptosis, characterized by increased protein expression of cleaved Caspase-3 and PUMA (Table 2).

High fat diet consumption has also been shown to impact ISC activity through a mechanism potentially involving the mitochondria. Crypts extracted from the jejunum of mice fed a HFD (60% kcal fat) for 6 months generated more organoids than those extracted from the jejunum of low fat diet-fed mice (10% kcal fat) [71]. Organoids from HFD-fed mice jejunum also exhibited higher expression of proteins involved in fatty acid  $\beta$ -oxidation, notably through increases in PPAR $\delta$

and PPAR $\alpha$  expressions. This enhanced PPAR-fatty acid  $\beta$ -oxidation program was responsible of stemness enhancement whereas fatty acid  $\beta$ -oxidation impairment, through deletion or inhibition of CPT1, suppressed those effects [71]. Furthermore, in mouse proximal small intestine organoids and *Drosophila*, deletion of the mitochondrial pyruvate carrier, impairing TCA cycle to the benefit of fatty acid  $\beta$ -oxidation, is sufficient to increase ISC proliferation whereas its over-expression suppress it [135]. Even though mitochondrial function has not been precisely evaluated in these models, the involvement of mitochondria is possible since fatty acid  $\beta$ -oxidation is strongly linked to mitochondrial function and ROS generation.

### 4.2.2. Intestinal epithelial cell mitochondrial dysfunction and disruption of intestinal barrier function

Chronic HFD consumption induces intestinal barrier disruption notably through tight junction restructuring [136]. The exact mechanisms leading to altered barrier function under HFD is still debated and could be explained by tight junction disruption, inflammation, alterations of mucus layer, dysbiosis and oxidative stress linked to fatty acid and bile acids [137]. A role of mitochondrial dysfunction is also conceivable. Indeed, impairment of mitochondrial function in T84 cells by dinitrophenol results in increased superoxide detection and concomitant translocation and internalization of *Escherichia coli* that is corrected when using MitoTEMPO, an antioxidant specifically targeting mtROS [138]. Moreover, in their HFD-induced obesity model marked by increased peroxide detection in mouse colonocytes, suggesting the emergence of oxidative stress, Li et al. observed an increased *in vivo* intestinal permeability [134]. Moreover, expression of the tight junction protein occludin was decreased in HFD-fed mouse colonocytes and HCT-116 after palmitic acid treatment [134]. Likewise, hypothesizing that HFD-derived mtROS production participates to intestinal barrier disruption, Watson et al. supplemented their HFD with S3QELs, a suppressor of complex III-derived superoxide. After 16 weeks, mice fed the S3QELs-supplemented HFD were protected against increased *in vivo* intestinal permeability and decreased expression of genes encoding tight junction proteins in colonocytes compared to non-supplemented mice [139]. Another feature of HFD-induced alteration of intestinal barrier function is the reduction of several secreted factors involved in defense mechanisms, such as expression of antimicrobial peptides [140,141]. The  $\alpha$ -subunit of hypoxia-inducible factor (HIF) interacts with the  $\beta$ -subunit of HIF and both act as  $O_2$ -sensors. Those transcriptional factors target, among others, genes involved in production of antimicrobial peptides, such as human  $\beta$  defensin-1 [142], intestinal trefoil factor peptides [143] and mucin-3 [144], as well as in creatine metabolism, which appears to be essential in epithelial barrier function [145]. Since OXPHOS requires high amount of oxygen, it participates to

the physiological hypoxia observed in healthy colon and small intestine along the crypt-villus axis, from the highest O<sub>2</sub> pressure in the crypts to the lowest at the top of the villi. Thus, HFD-induced alteration of mitochondrial function and subsequent possible changes in hypoxia level could participate to the altered defense mechanisms observed under HFD through altered HIF signaling.

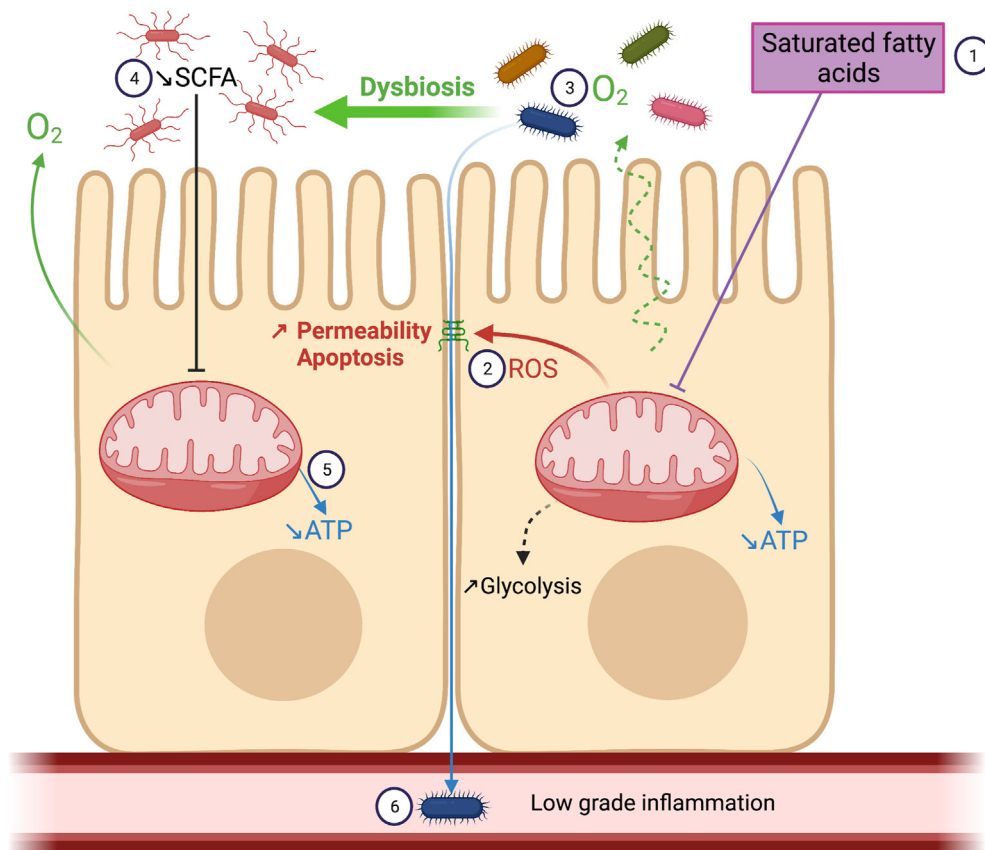
#### 4.2.3. Intestinal epithelial cell mitochondrial dysfunction and dysbiosis

Dysbiosis in diet-induced obesity has been thoroughly described and incriminated in metabolic alterations in obesity [7]. The relationship between O<sub>2</sub> level and microbiota composition has already been described using broad-spectrum antibiotics in mice. The loss of epithelial hypoxia and destabilization of HIF expression promote the expansion of facultative anaerobic bacteria, like Enterobacteriaceae such as *E. coli*, concomitantly with the inhibition of obligate anaerobe growth, including butyrate-producers [64,146]. Recently, Yoo et al. showed that this also applies to chronic HFD consumption. Indeed, HFD-induced mitochondrial bioenergetics defects lead to increased oxygen bioavailability in the colonic lumen favoring the expansion of facultative anaerobic bacteria such as Enterobacteriaceae. Treatment with 5-ASA to increase mitochondrial bioenergetics ameliorated epithelial hypoxia and reduced the fitness advantage of *E. coli* in HFD-

fed mice [122]. Moreover, by stimulating the increase in mitochondria number and respiratory capacity (shown by greater cytochrome c oxidase activity), PGC1 $\alpha$  improves the aerobic energy production thus favoring epithelial hypoxia and development of obligate anaerobic bacteria [143].

## 5. CONCLUSION

Because of the high amount of energy required to ensure rapid epithelial turnover, nutrient transport and maintenance of epithelial barrier, intestinal epithelium homeostasis largely depends on mitochondrial activity, notably via OXPHOS. Moreover, as IEC migrate upward the crypt-villus axis, they encounter different metabolic states associated with different mitochondrial activities due to metabolic cooperation which ensures epithelial homeostasis. To fuel energy production, metabolites provided from the diet or bacterial fermentation are used by IEC as substrates. Yet, dietary changes, and more particularly HFD consumption, seem to modulate mitochondrial function, as recently described in colonocytes. However, the mechanisms involved in these defects have not been described yet, although several authors hypothesized a role of dietary fatty acid  $\beta$ -oxidation (Figure 5). In addition, mitochondrial function in IEC in response to lipid challenge is not clear in the small intestine. Data indicate that enhanced fatty acid



**Figure 5: Proposed mechanisms of mitochondrial dysfunction of colonocytes induced by saturated fatty acids from diet.** ① High fat diet consumption induces mitochondrial dysfunction in colonocytes, possibly mediated by fatty acid metabolism, although this can be debated, and characterized by perturbations of mitochondrial dynamics and shape (swollen mitochondria), and decreased ATP production as a consequence of altered OXPHOS activities. ② Mitochondrial dysfunction is associated with the emergence of oxidative stress which may generate epithelial barrier alterations through tight junction restructuring and IEC apoptosis, which could increase intestinal permeability. ③ Decreased OXPHOS levels is linked to O<sub>2</sub> leaks into the intestinal lumen, inducing ④ loss of epithelial hypoxia, colonic dysbiosis and decreased short-chain fatty acid (SCFA) concentrations, including butyrate, the preferred energy fuel for colonocytes, leading to decreased levels of ATP. ⑤ Taken together, those alterations could promote bacterial translocation and systemic low-grade inflammation.



catabolism could be a mechanism that compensates lipid storage in enterocyte and ameliorates glucose homeostasis and reduces fat gain. Yet, although fatty acid  $\beta$ -oxidation is increased few days after HFD consumption, it is still unclear how this catabolic pathway evolves with longer periods of HFD consumption and how it affects mitochondrial function of small intestine epithelial cells. Nevertheless, excessive fatty acid oxidation may aggravate HFD-induced oxidative stress which may in turn alter epithelial barrier, favoring low grade inflammation and may promote tumorigenicity. Getting a better understanding of mitochondrial function in IEC under HFD would help to identify mitochondrial target/regulators in order to prevent intestinal alterations and the emergence of metabolic disorders.

## ACKNOWLEDGEMENT

TG was partly funded by a Region Bretagne grant #300000592.

## CONFLICT OF INTEREST

None declared.

## REFERENCES

- [1] WHO Obesity. <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/obesity>. [accessed February 16, 2022].
- [2] Minihane, A.M., Vinoy, S., Russell, W.R., Baka, A., Roche, H.M., Tuohy, K.M., et al., 2015. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *British Journal of Nutrition* 114(7): 999–1012. <https://doi.org/10.1017/S0007114515002093>.
- [3] Calder, P.C., Ahluwalia, N., Brouns, F., Buettler, T., Clement, K., Cunningham, K., et al., 2011. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *British Journal of Nutrition* 106(S3):S1–S78. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005460>.
- [4] Lumeng, C.N., Saltiel, A.R., 2011. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation* 121(6):2111–2117. <https://doi.org/10.1172/JCI57132>.
- [5] Reilly, S.M., Saltiel, A.R., 2017. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nature Reviews Endocrinology* 13(11):633–643. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.90>.
- [6] Hamilton, M.K., Boudry, G., Lemay, D.G., Raybould, H.E., 2015. Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 308(10):G840–G851. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00029.2015>.
- [7] Cani, P.D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., et al., 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58(8):1091–1103. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.165886>.
- [8] Serino, M., Luche, E., Gres, S., Baylac, A., Bergé, M., Cenac, C., et al., 2012. Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut* 61(4):543–553. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301012>.
- [9] Genser, L., Aguanno, D., Soula, H.A., Dong, L., Trystram, L., Assmann, K., et al., 2018. Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes. *The Journal of Pathology* 246(2):217–230. <https://doi.org/10.1002/path.5134>.
- [10] Cani, P.D., Jordan, B.F., 2018. Gut microbiota-mediated inflammation in obesity: a link with gastrointestinal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 15(11):671–682. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0025-6>.
- [11] Bojarski, C., Gitter, A.H., Bendfeldt, K., Mankertz, J., Schmitz, H., Wagner, S., et al., 2001. Permeability of human HT-29/B6 colonic epithelium as a function of apoptosis. *The Journal of Physiology* 535(Pt 2):541–552. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00541.x>.
- [12] Blachier, F., Boutry, C., Bos, C., Tomé, D., 2009. Metabolism and functions of l-glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines. *The American Journal of Clinical Nutrition* 90(3):814S–821S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27462S>.
- [13] Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W., Nussberger, S., 2001. Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting tom channel in the outer membrane of mitochondria. *Journal of Cell Biology* 153(6):1151–1160. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.6.1151>.
- [16] Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R., Walker, J.E., 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370(6491):621–628. <https://doi.org/10.1038/370621a0>.
- [17] Fransson, Å., Ruusala, A., Aspenström, P., 2003. Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis\*. *Journal of Biological Chemistry* 278(8):6495–6502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208609200>.
- [18] O'Hara, R., Tedone, E., Ludlow, A., Huang, E., Arosio, B., Mari, D., et al., 2019. Quantitative mitochondrial DNA copy number determination using droplet digital PCR with single-cell resolution. *Genome Research* 29(11): 1878–1888. <https://doi.org/10.1101/gr.250480.119>.
- [19] Vissing, J., 2019. Paternal comeback in mitochondrial DNA inheritance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(5):1475–1476. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821192116>.
- [20] Capps, G.J., Samuels, D.C., Chinnery, P.F., 2003. A model of the nuclear control of mitochondrial DNA replication. *Journal of Theoretical Biology* 221(4):565–583. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2003.3207>.
- [21] Finck, B.N., Kelly, D.P., 2006. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *Journal of Clinical Investigation* 116(3):615–622. <https://doi.org/10.1172/JCI27794>.
- [22] Jornayvaz, F.R., Shulman, G.I., 2010. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in Biochemistry* 47. <https://doi.org/10.1042/bse0470069>.
- [23] El-Hattab, A.W., Suleiman, J., Almannai, M., Scaglia, F., 2018. Mitochondrial dynamics: biological roles, molecular machinery, and related diseases. *Molecular Genetics and Metabolism* 125(4):315–321. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.10.003>.
- [24] Archer, S.L., 2013. Mitochondrial dynamics — mitochondrial fission and fusion in human diseases. *New England Journal of Medicine* 369(23):2236–2251. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1215233>.
- [25] Naghdi, S., Slovinsky, W.S., Madesh, M., Rubin, E., Hajnóczy, G., 2018. Mitochondrial fusion and Bid-mediated mitochondrial apoptosis are perturbed by alcohol with distinct dependence on its metabolism. *Cell Death & Disease* 9(10):1–16. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1070-3>.
- [26] Chan, D.C., 2006. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22(1):79–99. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104638>.
- [27] Dagda, R.K., Cherra, S.J., Kulich, S.M., Tandon, A., Park, D., Chu, C.T., 2009. Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *Journal of Biological Chemistry* 284(20): 13843–13855. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808515200>.
- [28] Lutz, A.K., Exner, N., Fett, M.E., Schlehe, J.S., Kloos, K., Lämmermann, K., et al., 2009. Loss of Parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *Journal of Biological Chemistry* 284(34): 22938–22951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.035774>.
- [29] Lewis, K., Lutgendorff, F., Phan, V., Söderholm, J.D., Sherman, P.M., McKay, D.M., 2009. Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate. *Inflammatory Bowel Diseases* 16(7):1138–1148. <https://doi.org/10.1002/ibd.21177>.
- [30] Nazli, A., Yang, P.-C., Jury, J., Howe, K., Watson, J.L., Söderholm, J.D., et al., 2004. Epithelia under metabolic stress perceive commensal bacteria as a

- threat. *American Journal Of Pathology* 164(3):947–957. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63182-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63182-3).
- [31] Somasundaram, S., Rafi, S., Hayllar, J., Sigthorsson, G., Jacob, M., Price, A.B., et al., 1997. Mitochondrial damage: a possible mechanism of the “topical” phase of NSAID induced injury to the rat intestine. *Gut* 41(3):344–353. <https://doi.org/10.1136/gut.41.3.344>.
- [32] Yeganeh, P.R., Leahy, J., Spahis, S., Patey, N., Desjardins, Y., Roy, D., et al., 2018. Apple peel polyphenols reduce mitochondrial dysfunction in mice with DSS-induced ulcerative colitis. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 57: 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.03.008>.
- [33] Youle, R., van der Bliek, A., 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337(6098):1062–1065. <https://doi.org/10.1126/science.1219855>.
- [34] Nunnari, J., Suomalainen, A., 2012. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148(6):1145–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>.
- [35] Papa, L., Germain, D., 2014. SirT3 regulates the mitochondrial unfolded protein response. *Molecular and Cellular Biology* 34(4):699–710. <https://doi.org/10.1128/MCB.01337-13>.
- [36] Mohrin, M., Shin, J., Liu, Y., Brown, K., Luo, H., Xi, Y., et al., 2015. STEM CELL AGING. A mitochondrial UPR-mediated metabolic checkpoint regulates hematopoietic stem cell aging. *Science (New York, N.Y.)* 347(6228):1374–1377. <https://doi.org/10.1126/science.aaa2361>.
- [37] He, C., Hart, P.C., Germain, D., Bonini, M.G., 2016. SOD2 and the mitochondrial UPR: partners regulating cellular phenotypic transitions. *Trends in Biochemical Sciences* 41(7):568–577. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.04.004>.
- [38] Haynes, C.M., Fiorese, C.J., Lin, Y.-F., 2013. Evaluating and responding to mitochondrial dysfunction: the UPRmt and beyond. *Trends in Cell Biology* 23(7):311–318. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.02.002>.
- [39] Hamacher-Brady, A., Brady, N.R., 2016. Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(4):775–795. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2087-8>.
- [40] Wang, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y.L., Selkoe, D., et al., 2011. PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell* 147(4):893–906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.018>.
- [41] Twig, G., Liu, X., Liesa, M., Wikstrom, J.D., Molina, A.J.A., Las, G., et al., 2010. Biophysical properties of mitochondrial fusion events in pancreatic  $\beta$ -cells and cardiac cells unravel potential control mechanisms of its selectivity. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 299(2):C477–C487. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00427.2009>.
- [42] Nadege, B., 2009. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience*(14):4015. <https://doi.org/10.2741/3509>.
- [43] Zhao, R.-Z., Jiang, S., Zhang, L., Yu, Z.-B., 2019. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 44(1):3–15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>.
- [44] Starkov, A.A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B.J., Browne, S.E., Patel, M.S., et al., 2004. Mitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *Journal of Neuroscience* 24(36): 7779–7788. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1899-04.2004>.
- [45] Seifert, E.L., Estey, C., Xuan, J.Y., Harper, M.-E., 2010. Electron transport chain-dependent and -independent mechanisms of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission during long-chain fatty acid oxidation. *Journal of Biological Chemistry* 285(8):5748–5758. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.026203>.
- [46] Zhang, Y., Bharathi, S.S., Beck, M.E., Goetzman, E.S., 2019. The fatty acid oxidation enzyme long-chain acyl-CoA dehydrogenase can be a source of mitochondrial hydrogen peroxide. *Redox Biology* 26:101253. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101253>.
- [47] Battelli, M.G., Polito, L., Bortolotti, M., Bolognesi, A., 2016. Xanthine oxidoreductase-derived reactive species: physiological and pathological effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2016/3527579>.
- [48] Schrader, M., Fahimi, H.D., 2004. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochemistry and Cell Biology* 122(4):383–393. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0673-1>.
- [49] Bezirtzoglou, E.E.V., 2012. Intestinal cytochromes P450 regulating the intestinal microbiota and its probiotic profile. *Microbial Ecology in Health and Disease* 23. <https://doi.org/10.3402/mehd.v23i0.18370>.
- [50] Rada, B., Leto, T.L., 2008. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH Oxidases. *Contributions to Microbiology* 15:164–187. <https://doi.org/10.1159/000136357>.
- [51] Hengstermann, S., Valentini, L., Schaper, L., Buning, C., Koernicke, T., Maritschnegg, M., et al., 2008. Altered status of antioxidant vitamins and fatty acids in patients with inactive inflammatory bowel disease. *Clinical Nutrition* 27(4):571–578. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2008.01.007>.
- [52] Zhao, M., Tang, S., Xin, J., Wei, Y., Liu, D., 2017. Reactive oxygen species induce injury of the intestinal epithelium during hyperoxia. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3247>.
- [53] Gureev, A.P., Shaforostova, E.A., Starkov, A.A., Popov, V.N., 2017. Simplified qPCR method for detecting excessive mtDNA damage induced by exogenous factors. *Toxicology* 382:67–74. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.03.010>.
- [54] Chinopoulos, C., Tretter, L., Adam-Vizi, V., 1999. Depolarization of in situ mitochondria due to hydrogen peroxide-induced oxidative stress in nerve terminals. *Journal of Neurochemistry* 73(1):220–228. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0730220.x>.
- [55] LeDoux, S.P., Druzhyina, N.M., Hollensworth, S.B., Harrison, J.F., Wilson, G.L., 2007. Mitochondrial DNA repair: a critical player in the response of cells of the CNS to genotoxic insults. *Neuroscience* 145(4):1249–1259. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.10.002>.
- [56] Matsuzawa, A., Ichijo, H., 2008. Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780(11):1325–1336. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.12.011>.
- [57] Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., et al., 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449(7165):1003–1007. <https://doi.org/10.1038/nature06196>.
- [58] Sasaki, N., Sachs, N., Wiebrands, K., Ellenbroek, S.I.J., Fumagalli, A., Lyubimova, A., et al., 2016. Reg4+ deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5+ stem cells in colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(37):E5399–E5407. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607327113>.
- [59] Dufour, G., Demers, M.-J., Gagné, D., Dydensborg, A.B., Teller, I.C., Bouchard, V., et al., 2004. Human intestinal epithelial cell survival and anoikis differentiation STATE-DISTINCT regulation and roles of protein kinase B/akt isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 279(42):44113–44122. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405323200>.
- [60] Williams, J.M., Duckworth, C.A., Watson, A.J.M., Frey, M.R., Miguel, J.C., Burkitt, M.D., et al., 2013. A mouse model of pathological small intestinal epithelial cell apoptosis and shedding induced by systemic administration of lipopolysaccharide. *Disease Models & Mechanisms* 6(6):1388–1399. <https://doi.org/10.1242/dmm.013284>.
- [61] Moor, A.E., Harnik, Y., Ben-Moshe, S., Massasa, E.E., Rozenberg, M., Eilam, R., et al., 2018. Spatial reconstruction of single enterocytes uncovers broad zonation along the intestinal villus Axis. *Cell* 175(4):1156–1167. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.063> e15.
- [62] Rodríguez-Colman, M.J., Schewe, M., Meerlo, M., Stigter, E., Gerrits, J., Pras-Raves, M., et al., 2017. Interplay between metabolic identities in the

- intestinal crypt supports stem cell function. *Nature* 543(7645):424–427. <https://doi.org/10.1038/nature21673>.
- [63] Stringari, C., Edwards, R.A., Pate, K.T., Waterman, M.L., Donovan, P.J., Gratton, E., 2012. Metabolic trajectory of cellular differentiation in small intestine by Phasor Fluorescence Lifetime Microscopy of NADH. *Scientific Reports* 2(1):568. <https://doi.org/10.1038/srep00568>.
- [64] Litvak, Y., Byndloss, M.X., Bäumlér, A.J., 2018. Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota. *Science (New York, N.Y.)* 362(6418). <https://doi.org/10.1126/science.aat9076>.
- [65] Jaynes, B.J., Altmann, G.G., 1975. A region of mitochondrial division in the epithelium of the small intestine of the rat. *The Anatomical Record* 182(3): 289–296. <https://doi.org/10.1002/ar.1091820303>.
- [66] Houde, M., Laprise, P., Jean, D., Blais, M., Asselin, C., Rivard, N., 2001. Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2\*. *Journal of Biological Chemistry* 276(24):21885–21894. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100236200>.
- [67] Folmes, C.D.L., Nelson, T.J., Martínez-Fernández, A., Arrell, D.K., Lindor, J.Z., Dzeja, P.P., et al., 2011. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metabolism* 14(2):264–271. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.011>.
- [68] Fan, Y.-Y., Davidson, L.A., Callaway, E.S., Wright, G.A., Safe, S., Chapkin, R.S., 2015. A bioassay to measure energy metabolism in mouse colonic crypts, organoids, and sorted stem cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 309(1):G1–G9. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00052.2015>.
- [69] Warburg, O., 1956. On the origin of cancer cells. *Science* 123(3191):309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>.
- [70] Mihaylova, M.M., Cheng, C.-W., Cao, A.Q., Tripathi, S., Mana, M.D., Bauer-Rowe, K.E., et al., 2018. Fasting activates fatty acid oxidation to enhance intestinal stem cell function during homeostasis and aging. *Cell Stem Cell* 22(5):769–778. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.001> e4.
- [71] Mana, M.D., Hussey, A.M., Tzouanas, C.N., Imada, S., Barrera Millan, Y., Bahceci, D., et al., 2021. High-fat diet-activated fatty acid oxidation mediates intestinal stemness and tumorigenicity. *Cell Reports* 35(10):109212. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109212>.
- [72] Chen, L., Vasoya, R.P., Toke, N.H., Parthasarathy, A., Luo, S., Chiles, E., et al., 2020. HNF4 regulates fatty acid oxidation and is required for renewal of intestinal stem cells in mice. *Gastroenterology* 158(4):985–999. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.031> e9.
- [73] Stine, R.R., Sakers, A.P., TeSlaa, T., Kissig, M., Stine, Z.E., Kwon, C.W., et al., 2019. PRDM16 maintains homeostasis of the intestinal epithelium by controlling region-specific metabolism. *Cell Stem Cell* 25(6):830–845. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.08.017> e8.
- [74] Kaiko, G.E., Ryu, S.H., Koues, O.I., Collins, P.L., Solnica-Krezel, L., Pearce, E.J., et al., 2016. The colonic crypt protects stem cells from microbiota-derived metabolites. *Cell* 165(7):1708–1720. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.018>.
- [75] Berger, E., Rath, E., Yuan, D., Waldschmitt, N., Khaloian, S., Allgäuer, M., et al., 2016. Mitochondrial function controls intestinal epithelial stemness and proliferation. *Nature Communications* 7(1):1–17. <https://doi.org/10.1038/ncomms13171>.
- [76] Cheng, M.Y., Hartl, F.U., Horwich, A.L., 1990. The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly. *Nature* 348(6300):455–458. <https://doi.org/10.1038/348455a0>.
- [77] D'Errico, I., Salvatore, L., Murzilli, S., Lo Sasso, G., Latorre, D., Martelli, N., et al., 2011. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha (PGC1alpha) is a metabolic regulator of intestinal epithelial cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(16):6603–6608. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016354108>.
- [78] Lefebvre, M., Paulweber, B., Fajas, L., Woods, J., McCrary, C., Colombel, J.F., et al., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *Journal of Endocrinology* 162(3):331–340. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1620331>.
- [79] Donohoe, D.R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T.M., Bunger, M.K., et al., 2011. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metabolism* 13(5):517–526. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.018>.
- [80] Fingar, D.C., Blenis, J., 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23(18):3151–3171. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207542>.
- [81] Yang, H., Xiong, X., Wang, X., Yin, Y., 2016. Mammalian target of rapamycin signaling pathway changes with intestinal epithelial cells renewal along crypt-villus Axis. *Cellular Physiology and Biochemistry* 39(2):751–759. <https://doi.org/10.1159/000445665>.
- [82] Perekatt, A.O., Valdez, M.J., Davila, M., Hoffman, A., Bonder, E.M., Gao, N., et al., 2014. YY1 is indispensable for Lgr5+ intestinal stem cell renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(21):7695–7700. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400128111>.
- [83] Sampson, L.L., Davis, A.K., Grogg, M.W., Zheng, Y., 2016. mTOR disruption causes intestinal epithelial cell defects and intestinal atrophy postinjury in mice. *The FASEB Journal* 30(3):1263–1275. <https://doi.org/10.1096/fj.15-278606>.
- [84] Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., Puigserver, P., 2007. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1–PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 450(7170):736–740. <https://doi.org/10.1038/nature06322>.
- [85] St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jäger, S., et al., 2006. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127(2):397–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.024>.
- [86] D'Errico, I., Lo Sasso, G., Salvatore, L., Murzilli, S., Martelli, N., Cristofaro, M., et al., 2011. Bax is necessary for PGC1alpha pro-apoptotic effect in colorectal cancer cells. *Cell Cycle* 10(17):2937–2945. <https://doi.org/10.4161/cc.10.17.16791>.
- [87] Cai, X., Chen, X., Wang, X., Xu, C., Guo, Q., Zhu, L., et al., 2013. Pre-protective effect of lipoid acid on injury induced by H2O2 in IPEC-J2 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 378(1):73–81. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1595-9>.
- [88] Bellafante, E., Morgano, A., Salvatore, L., Murzilli, S., Tullio, G.D., D'Orazio, A., et al., 2014. PGC-1beta promotes enterocyte lifespan and tumorigenesis in the intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(42):E4523–E4531. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415279111>.
- [89] Turan, A., Gill, R., Dudeja, P.K., Mohan, H., Mahmood, A., 2009. Effect of fat feeding on pro-oxidant and anti-oxidant enzyme systems in rat intestine: possible role in the turnover of enterocytes. *Digestive Diseases and Sciences* 54(6):1229–1236. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0490-9>.
- [90] Aron-Wisniewsky, J., Doré, J., Clement, K., 2012. The importance of the gut microbiota after bariatric surgery. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9(10):590–598. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.161>.
- [91] Martínez-Guryñ, K., Hubert, N., Frazier, K., Urläss, S., Musch, M.W., Ojeda, P., et al., 2018. Small intestine microbiota regulate host digestive and absorptive adaptive responses to dietary lipids. *Cell Host & Microbe* 23(4): 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.03.011> e5.
- [92] Tazi, A., Araujo, J.R., Mulet, C., Arena, E.T., Nigro, G., Pédrón, T., et al., 2018. Disentangling host-microbiota regulation of lipid secretion by enterocytes: insights from commensals *Lactobacillus paracasei* and *Escherichia coli*. *mBio* 9(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01493-18> e01493-18, mBio/9/5/mBio.01493-18.atom.

- [93] Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H., Zhao, Z., 2009. Prebiotic oligosaccharides change the concentrations of short-chain fatty acids and the microbial population of mouse bowel. *Journal of Zhejiang University - Science B* 10(4): 258–263. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820261>.
- [94] Duncan, S.H., Belongue, A., Holtrop, G., Johnstone, A.M., Flint, H.J., Lobley, G.E., 2007. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Applied and Environmental Microbiology* 73(4):1073–1078. <https://doi.org/10.1128/AEM.02340-06>.
- [95] Kolodziejczyk, A.A., Zheng, D., Elinav, E., 2019. Diet–microbiota interactions and personalized nutrition. *Nature Reviews Microbiology* 17(12):742–753. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0256-8>.
- [96] Stoll, B., Burrin, D.G., Henry, J., Yu, H., Jahoor, F., Reeds, P.J., 1999. Substrate oxidation by the portal drained viscera of fed piglets. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 277(1):E168–E175. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.277.1.E168>.
- [97] Alpers, D.H., 2000. Is glutamine a unique fuel for small intestinal cells? *Current Opinion in Gastroenterology* 16(2):155 <https://doi.org/10.1097/00001574-200003000-00010>.
- [98] Roediger, W.E., 1982. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology* 83(2):424–429.
- [99] McCarthy, D.M., Nicholson, J.A., Kim, Y.S., 1980. Intestinal enzyme adaptation to normal diets of different composition. *American Journal of Physiology* 239(6):G445–G451. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1980.239.6.G445>.
- [100] Singh, A., Balint, J.A., Edmonds, R.H., Rodgers, J.B., 1972. Adaptive changes of the rat small intestine in response to a high fat diet. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 260(4):708–715. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(72\)90019-7](https://doi.org/10.1016/0005-2760(72)90019-7).
- [101] Tremblay, A.J., Lamarche, B., Guay, V., Charest, A., Lemelin, V., Couture, P., 2013. Short-term, high-fat diet increases the expression of key intestinal genes involved in lipoprotein metabolism in healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition* 98(1):32–41. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.060251>.
- [102] Xiao, C., Stahel, P., Carreiro, A.L., Hung, Y.-H., Dash, S., Bookman, I., et al., 2019. Oral glucose mobilizes triglyceride stores from the human intestine. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 7(2):313–337. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.10.002>.
- [103] Chavez–Jauregui, R.N., Mattes, R.D., Parks, E.J., 2010. Dynamics of fat absorption and effect of sham feeding on postprandial lipema. *Gastroenterology* 139(5):1538–1548. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.05.002>.
- [104] Zhu, J., Lee, B., Buhman, K.K., Cheng, J.-X., 2009. A dynamic, cytoplasmic triacylglycerol pool in enterocytes revealed by ex vivo and in vivo coherent anti-Stokes Raman scattering imaging[S]. *Journal of Lipid Research* 50(6): 1080–1089. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800555-JLR200>.
- [105] Robertson, M.D., Parkes, M., Warren, B.F., Ferguson, D.J.P., Jackson, K.G., Jewell, D.P., et al., 2003. Mobilisation of enterocyte fat stores by oral glucose in humans. *Gut* 52(6):834–839.
- [106] Xiao, C., Dash, S., Morgantini, C., Lewis, G.F., 2016. Intravenous glucose acutely stimulates intestinal lipoprotein secretion in healthy humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 36(7):1457–1463. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.307044>.
- [107] Zembroski, A.S., D'Aquila, T., Buhman, K.K., 2021. Characterization of cytoplasmic lipid droplets in each region of the small intestine of lean and diet-induced obese mice in response to dietary fat. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 321(1):G75–G86. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00084.2021>.
- [108] D'Aquila, T., Zembroski, A.S., Buhman, K.K., 2019. Diet induced obesity alters intestinal cytoplasmic lipid droplet morphology and proteome in the postprandial response to dietary fat. *Frontiers in Physiology* 10:180. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00180>.
- [109] Kondo, H., Minegishi, Y., Komine, Y., Mori, T., Matsumoto, I., Abe, K., et al., 2006. Differential regulation of intestinal lipid metabolism-related genes in obesity-resistant A/J vs. obesity-prone C57BL/6J mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 291(5):E1092–E1099. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00583.2005>.
- [110] Ramachandran, D., Clara, R., Fedele, S., Michel, L., Burkard, J., Kaufman, S., et al., 2018. Enhancing enterocyte fatty acid oxidation in mice affects glycemic control depending on dietary fat. *Scientific Reports* 8:10818, 10/gdzq3f.
- [111] Clara, R., Schumacher, M., Ramachandran, D., Fedele, S., Krieger, J.-P., Langhans, W., et al., 2017. Metabolic adaptation of the small intestine to short- and medium-term high-fat diet exposure: intestinal metabolic adaptation to HFD. *Journal of Cellular Physiology* 232(1):167–175. <https://doi.org/10.1002/jcp.25402>.
- [112] Sinha, N., Suarez-Diez, M., Hooiveld, G.J.E.J., Keijer, J., Martin dos Santos, V., van Schothorst, E.M., 2018. A constraint-based model analysis of enterocyte mitochondrial adaptation to dietary interventions of lipid type and lipid load. *Frontiers in Physiology* 9:749. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00749>.
- [113] Ipsen, D.H., Lykkesfeldt, J., Tveden-Nyborg, P., 2018. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75(18):3313–3327. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6>.
- [114] Dávalos-Salas, M., Montgomery, M.K., Reehorst, C.M., Nightingale, R., Ng, I., Anderton, H., et al., 2019. Deletion of intestinal Hdac3 remodels the lipidome of enterocytes and protects mice from diet-induced obesity. *Nature Communications* 10:5291. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13180-8>.
- [115] Ramachandran, D., Clara, R., Fedele, S., Michel, L., Burkard, J., Kaufman, S., et al., 2018. Enhancing enterocyte fatty acid oxidation in mice affects glycemic control depending on dietary fat. *Scientific Reports* 8(1):10818. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29139-6>.
- [116] Ramachandran, D., Clara, R., Fedele, S., Hu, J., Lackzo, E., Huang, J.-Y., et al., 2017. Intestinal SIRT3 overexpression in mice improves whole body glucose homeostasis independent of body weight. *Molecular Metabolism* 6(10):1264–1273. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.07.009>.
- [117] Zhang, Y., Bharathi, S.S., Rardin, M.J., Uppala, R., Verdin, E., Gibson, B.W., et al., 2015. SIRT3 and SIRT5 regulate the enzyme activity and cardiopilin binding of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *PLoS One* 10(3): e0122297. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122297>.
- [118] Qiao, Y., Sun, J., Ding, Y., Le, G., Shi, Y., 2013. Alterations of the gut microbiota in high-fat diet mice is strongly linked to oxidative stress. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(4):1689–1697. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4323-6>.
- [119] Gil-Cardoso, K., Ginés, I., Pinent, M., Ardévol, A., Terra, X., Blay, M., 2017. A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats. *British Journal of Nutrition* 117(2):218–229. <https://doi.org/10.1017/S0007114516004608>.
- [120] Sun, Y., Jin, C., Zhang, X., Jia, W., Le, J., Ye, J., 2018. Restoration of GLP-1 secretion by Berberine is associated with protection of colon enterocytes from mitochondrial overheating in diet-induced obese mice. *Nutrition & Diabetes* 8. <https://doi.org/10.1038/s41387-018-0061-x>.
- [121] Lee, J.-Y., Cevallos, S.A., Byndloss, M.X., Tiffany, C.R., Olsan, E.E., Butler, B.P., et al., 2020. High-fat diet and antibiotics cooperatively impair mitochondrial bioenergetics to trigger dysbiosis that exacerbates pre-inflammatory bowel disease. *Cell Host & Microbe* 28(2):273–284. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.001> e6.
- [122] Yoo, W., Zieba, J.K., Foegeding, N.J., Torres, T.P., Shelton, C.D., Shealy, N.G., et al., 2021. High-fat diet–induced colonocyte dysfunction escalates microbiota-derived trimethylamine N-oxide, vol. 7.
- [123] Egnatchik, R.A., Leamy, A.K., Noguchi, Y., Shiota, M., Young, J.D., 2014. Palmitate-induced activation of mitochondrial metabolism promotes oxidative



- stress and apoptosis in H4IIEC3 rat hepatocytes. *Metabolism Clinical and Experimental* 63(2):283–295. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.10.009>.
- [124] Kakimoto, P.A.H.B., Tamaki, F.K., Cardoso, A.R., Marana, S.R., Kowaltowski, A.J., 2015. H2O2 release from the very long chain acyl-CoA dehydrogenase. *Redox Biology* 4:375–380. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.02.003>.
- [125] Turner, D.A., 1958. The absorption, transport, and deposition of fat: application of a new method for the determination of 1131-lipid activity in dogs and man (part 2). *American Journal of Digestive Diseases* 3(9):682–708. <https://doi.org/10.1007/BF02231240>.
- [126] Ou, J., DeLany, J.P., Zhang, M., Sharma, S., O'Keefe, S.J.D., 2012. Association between low colonic short-chain fatty acids and high bile acids in high colon cancer risk populations. *Nutrition and Cancer* 64(1):34, 10/fjftt.
- [127] Krähenbühl, S., Talos, C., Fischer, S., Reichen, J., 1994. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology* 19(2):471–479. <https://doi.org/10.1002/hep.1840190228>.
- [128] Washo-Stultz, D., Crowley-Weber, C.L., Dvorakova, K., Bernstein, C., Bernstein, H., Kunke, K., et al., 2002. Role of mitochondrial complexes I and II, reactive oxygen species and arachidonic acid metabolism in deoxycholate-induced apoptosis. *Cancer Letters* 177(2):129–144. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00786-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00786-8).
- [129] Devkota, S., Wang, Y., Musch, M., Leone, V., Fehlner-Peach, H., Nadimpalli, A., et al., 2012. Dietary fat-induced taurocholic acid production promotes pathobiont and colitis in IL-10<sup>-/-</sup> mice. *Nature* 487(7405):104–108. <https://doi.org/10.1038/nature11225>.
- [130] Zhang, C., Zhang, M., Wang, S., Han, R., Cao, Y., Hua, W., et al., 2010. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *The ISME Journal* 4(2):232–241. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.112>.
- [131] Palmas, V., Pisanu, S., Madau, V., Casula, E., Deledda, A., Cusano, R., et al., 2021. Gut microbiota markers associated with obesity and overweight in Italian adults. *Scientific Reports* 11(1):5532. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84928-w>.
- [132] Laue, H., Denger, K., Cook, A.M., 1997. Taurine reduction in anaerobic respiration of *Bilophila wadsworthia* RZATAU. *Applied and Environmental Microbiology* 63(5):2016–2021.
- [133] Laue, H., Friedrich, M., Ruff, J., Cook, A.M., 2001. Dissimilatory sulfite reductase (desulfoviridin) of the taurine-degrading, non-sulfate-reducing bacterium *Bilophila wadsworthia* RZATAU contains a fused DsrB-DsrD subunit. *Journal of Bacteriology* 183(5):1727–1733. <https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1727-1733.2001>.
- [134] Li, X., Li, X., 2020. Obesity promotes experimental colitis by increasing oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the colon. *Inflammation*. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01261-6>.
- [135] Schell, J.C., Wisidagama, D.R., Bensard, C., Zhao, H., Wei, P., Tanner, J., et al., 2017. Control of intestinal stem cell function and proliferation by mitochondrial pyruvate metabolism. *Nature Cell Biology* 19(9):1027–1036. <https://doi.org/10.1038/ncb3593>.
- [136] Ahmad, R., Rah, B., Bastola, D., Dhawan, P., Singh, A.B., 2017. Obesity induces organ and tissue specific tight junction restructuring and barrier Deregulation by claudin switching. *Scientific Reports* 7(1):5125. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04989-8>.
- [137] Rohr, M.W., Narasimhulu, C.A., Rudeski-Rohr, T.A., Parthasarathy, S., 2020. Negative effects of a high-fat diet on intestinal permeability: a review. *Advances in Nutrition* 11(1):77–91. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz061>.
- [138] Wang, A., Keita, A.V., Phan, V., McKay, C.M., Schoutz, I., Lee, J., et al., 2014. Targeting mitochondria-derived reactive oxygen species to reduce epithelial barrier dysfunction and colitis. *American Journal Of Pathology* 184(9):2516–2527. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.05.019>.
- [139] Watson, M.A., Pattavina, B., Hilsabeck, T.A.U., Lopez-Dominguez, J., Kapahi, P., Brand, M.D., S3QELs protect against diet-induced intestinal barrier dysfunction. *Aging Cell* n/a: e13476, Doi: 10.1111/ace1.13476.
- [140] Everard, A., Lazarevic, V., Gaia, N., Johansson, M., Ståhlman, M., Backhed, F., et al., 2014. Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *The ISME Journal* 8(10): 2116–2130. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.45>.
- [141] Garidou, L., Pomié, C., Klopp, P., Waget, A., Charpentier, J., Aloulou, M., et al., 2015. The gut microbiota regulates intestinal CD4 T cells expressing ROR $\gamma$ t and controls metabolic disease. *Cell Metabolism* 22(1):100–112. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.001>.
- [142] Kelly, C.J., Glover, L.E., Campbell, E.L., Kominsky, D.J., Ehrentraut, S.F., Bowers, B.E., et al., 2013. Fundamental role for HIF-1 $\alpha$  in constitutive expression of human  $\beta$  defensin-1. *Mucosal Immunology* 6(6):1110–1118. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.6>.
- [143] Furuta, G.T., Turner, J.R., Taylor, C.T., Hershberg, R.M., Comerford, K., Narravula, S., et al., 2001. Hypoxia-inducible factor 1–dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *Journal of Experimental Medicine* 193(9):1027–1034. <https://doi.org/10.1084/jem.193.9.1027>.
- [144] Louis, N.A., Hamilton, K.E., Canny, G., Shekels, L.L., Ho, S.B., Colgan, S.P., 2006. Selective induction of mucin-3 by hypoxia in intestinal epithelia. *Journal of Cellular Biochemistry* 99(6):1616–1627. <https://doi.org/10.1002/jcb.20947>.
- [145] Glover, L.E., Bowers, B.E., Saeedi, B., Ehrentraut, S.F., Campbell, E.L., Bayless, A.J., et al., 2013. Control of creatine metabolism by HIF is an endogenous mechanism of barrier regulation in colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(49):19820–19825. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302840110>.
- [146] Byndloss, M.X., Olsan, E.E., Rivera-Chávez, F., Tiffany, C.R., Cevallos, S.A., Lokken, K.L., et al., 2017. Microbiota-activated PPAR- $\gamma$  signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science* 357(6351):570–575. <https://doi.org/10.1126/science.aam9949>.
- [147] Ferraris, R.P., Yasharpour, S., Lloyd, K.C., Mirzayan, R., Diamond, J.M., 1990. Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions. *American Journal of Physiology* 259(5 Pt 1):G822–G837. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1990.259.5.G822>.
- [148] Krebs, H.A., 1972. Some aspects of the regulation of fuel supply in omnivorous animals. *Advances in Enzyme Regulation* 10:397–420. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(72\)90025-8](https://doi.org/10.1016/0065-2571(72)90025-8).
- [149] Adibi, S.A., Mercer, D.W., 1973. Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals. *Journal of Clinical Investigation* 52(7):1586–1594. <https://doi.org/10.1172/JCI107335>.
- [150] Pinkus, L.M., Windmueller, H.G., 1977. Phosphate-dependent glutaminase of small intestine: localization and role in intestinal glutamine metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 182(2):506–517. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90531-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90531-8).
- [151] Kumar, A., Sperandio, V., 2019. Indole signaling at the host-microbiota-pathogen interface. *mBio* 10(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.01031-19> e01031-19, <https://doi.org/10.1128/mBio.01031-19>.atom.
- [152] Chimere, C., Emery, E., Summers, D.K., Keyser, U., Gribble, F.M., Reimann, F., 2014. Bacterial metabolite indole modulates incretin secretion from intestinal enteroendocrine L cells. *Cell Reports* 9(4):1202–1208. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.032>.
- [153] Armand, L., Fofana, M., Couturier-Becavin, K., Andriamihaja, M., Blachier, F., 2022. Dual effects of the tryptophan-derived bacterial metabolite indole on colonic epithelial cell metabolism and physiology: comparison with its co-metabolite indoxyl sulfate. *Amino Acids*. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03122-4>.
- [154] Macfarlane, G.T., Gibson, G.R., Cummings, J.H., 1992. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *Journal*

- of Applied Bacteriology 72(1):57–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb04882.x>.
- [155] Magee, E.A., Richardson, C.J., Hughes, R., Cummings, J.H., 2000. Contribution of dietary protein to sulfide production in the large intestine: an in vitro and a controlled feeding study in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 72(6):1488–1494. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.6.1488>.
- [156] Blachier, F., Andriamihaja, M., Larraufie, P., Ahn, E., Lan, A., Kim, E., 2021. Production of hydrogen sulfide by the intestinal microbiota and epithelial cells and consequences for the colonic and rectal mucosa. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 320(2):G125–G135. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00261.2020>.
- [157] Mimoun, S., Andriamihaja, M., Chaumontet, C., Atanasiu, C., Benamouzig, R., Blouin, J.M., et al., 2012. Detoxification of H<sub>2</sub>S by differentiated colonic epithelial cells: implication of the sulfide oxidizing unit and of the cell respiratory capacity. *Antioxidants and Redox Signaling* 17(1):1–10. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4186>.
- [158] Leschelle, X., Gubern, M., Andriamihaja, M., Blottière, H.M., Couplan, E., Gonzalez-Barroso, M.-M., et al., 2005. Adaptive metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1725(2):201–212. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.06.002>.
- [159] Libiad, M., Vitvitsky, V., Bostelaar, T., Bak, D.W., Lee, H.-J., Sakamoto, N., et al., 2019. Hydrogen sulfide perturbs mitochondrial bioenergetics and triggers metabolic reprogramming in colon cells. *Journal of Biological Chemistry* 294(32):12077–12090. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009442>.
- [160] Gostner, A., Blaut, M., Schäffer, V., Kozianowski, G., Theis, S., Klingenberg, M., et al., 2006. Effect of isomalt consumption on faecal microflora and colonic metabolism in healthy volunteers. *British Journal of Nutrition* 95(1):40–50. <https://doi.org/10.1079/bjn20051589>.
- [161] Andriamihaja, M., Lan, A., Beaumont, M., Audebert, M., Wong, X., Yamada, K., et al., 2015. The deleterious metabolic and genotoxic effects of the bacterial metabolite P-cresol on colonic epithelial cells. *Free Radical Biology and Medicine* 85(a0üt):219–227. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.004>.
- [162] Gill, C.I.R., McDougall, G.J., Glidewell, S., Stewart, D., Shen, Q., Tuohy, K., et al., 2010. Profiling of phenols in human fecal water after raspberry supplementation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(19):10389–10395. <https://doi.org/10.1021/jf1017143>.
- [163] Armand, L., Andriamihaja, M., Gellenoncourt, S., Bitane, V., Lan, A., Blachier, F., 2019. In vitro impact of amino acid-derived bacterial metabolites on colonocyte mitochondrial activity, oxidative stress response and DNA integrity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1863(8):1292–1301. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.04.018>.
- [164] Cummings, J.H., Hill, M.J., Bone, E.S., Branch, W.J., Jenkins, D.J.A., 1979. The effect of meat protein and dietary fiber on colonic function and metabolism II. Bacterial metabolites in feces and urine. *The American Journal of Clinical Nutrition* 32(10):2094–2101. <https://doi.org/10.1093/ajcn/32.10.2094>.
- [165] Aj, V., Sm, B., 1980. Ammonia production by intestinal bacteria: the effects of lactose, lactulose and glucose. *Journal of Medical Microbiology* 13(2). <https://doi.org/10.1099/00222615-13-2-177>.
- [166] Andriamihaja, M., Davila, A.-M., Eklou-Lawson, M., Petit, N., Delpal, S., Allek, F., et al., 2010. Colon luminal content and epithelial cell morphology are markedly modified in rats fed with a high-protein diet. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 299(5):G1030–G1037. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00149.2010>.
- [167] Cremin, J.D., Fitch, M.D., Fleming, S.E., 2003. Glucose alleviates ammonia-induced inhibition of short-chain fatty acid metabolism in rat colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 285(1):G105–G114. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00437.2002>.
- [168] Yokoo, K., Yamamoto, Y., Suzuki, T., 2021. Ammonia impairs tight junction barriers by inducing mitochondrial dysfunction in Caco-2 cells. *The FASEB Journal* 35(11):e21854. <https://doi.org/10.1096/fj.202100758R>.
- [169] Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P., Macfarlane, G.T., 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28(10):1221–1227. <https://doi.org/10.1136/gut.28.10.1221>.
- [170] Blachier, F., de Sá Resende, A., da Silva Fogaça Leite, G., Vasques da Costa, A., Lancha Junior, A.H., 2018. Colon epithelial cells luminal environment and physiopathological consequences: impact of nutrition and exercise. *Nutrire* 43(1):2. <https://doi.org/10.1186/s41110-018-0061-6>.
- [171] Roediger, W.E.W., 1980. The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *The Lancet* 316(8197):712–715. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)91934-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)91934-0).
- [172] Alex, S., Lange, K., Amolo, T., Grinstead, J.S., Haakonsson, A.K., Szalowska, E., et al., 2013. Short-chain fatty acids stimulate angiotensin-like 4 synthesis in human colon adenocarcinoma cells by activating peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *Molecular and Cellular Biology* 33(7):1303–1316. <https://doi.org/10.1128/MCB.00858-12>.
- [173] Tofalo, R., Cocchi, S., Suzzi, G., 2019. Polyamines and gut microbiota. *Frontiers in Nutrition* 6. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00016>.
- [174] Bardocz, S., Grant, G., Brown, D., Pusztai, A., 1998. Putrescine as a source of instant energy in the small intestine of the rat. *Gut* 42(1):24–28.
- [175] Uda, K., Tsujikawa, T., Fujiyama, Y., Bamba, T., 2003. Rapid absorption of luminal polyamines in a rat small intestine ex vivo model. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 18(5):554–559. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2003.03020.x>.
- [176] Nakamura, A., Kurihara, S., Takahashi, D., Ohashi, W., Nakamura, Y., Kimura, S., et al., 2021. Symbiotic polyamine metabolism regulates epithelial proliferation and macrophage differentiation in the colon. *Nature Communications* 12(1):2105. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22212-1>.

**PARTIE II : IMPACT D'UNE SURCHARGE EN LIPIDES  
SUR LA FONCTION MITOCHONDRIALE DES CEI *IN*  
*VIVO* ET *IN VITRO* ET CONSEQUENCES SUR  
L'HOMÉOSTASIE JEJUNALE**

---



## **PARTIE II : IMPACT D'UNE SURCHARGE EN LIPIDES SUR LA FONCTION MITOCHONDRIALE DES CEI *IN VIVO* ET *IN VITRO* ET CONSEQUENCES SUR L'HOMÉOSTASIE JEJUNALE**

---

### **Contexte**

L'obésité est une pathologie associée à une inflammation de bas-grade à l'origine des troubles métaboliques de l'obèse, tels que le diabète et la NAFLD. Des altérations de la barrière intestinale (Genser et al., 2018; Johnson et al., 2015; Stenman et al., 2012) et de l'environnement luminal (Cani et al., 2009) observées chez le sujet obèse ou en surpoids contribuent à cette inflammation de bas-grade. La fonction mitochondriale des CEI joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie intestinale (Guerbette et al., 2022). En outre, un fort apport alimentaire en lipides et en sucres est susceptible de modifier le métabolisme des CEI et leur fonction mitochondriale et participer à la perte d'homéostasie intestinale chez le sujet obèse. Rétablir l'homéostasie intestinale en ciblant la fonction mitochondriale des CEI apparaît alors comme un enjeu thérapeutique majeur pour prévenir l'apparition des désordres métaboliques du sujet obèse.

### **Hypothèse**

Nous faisons l'hypothèse qu'un régime obésogène modifie la fonction mitochondriale des CEI, tel que cela a été montré dans d'autres tissus, tels que le foie (García-Ruiz et al., 2014), le tissu adipeux (Heinonen et al., 2015) ou le muscle (Richardson et al., 2005), notamment par le biais d'une modification du métabolisme lipidique des CEI, pour lequel les effets d'un régime obésogène sont encore peu clairs dans la littérature. Une dysfonction mitochondriale des CEI pourrait alors contribuer à la perte de l'homéostasie intestinale, en altérant notamment le renouvellement cellulaire et la perméabilité intestinale.

### **Les principaux objectifs de cette partie étaient de :**

1. Déterminer les effets de la consommation d'un régime obésogène sur la fonction mitochondriale des CEI et l'homéostasie intestinale chez la souris.
2. Caractériser le métabolisme lipidique des CEI.
3. Évaluer les effets des acides gras du régime obésogène sur la fonction mitochondriale, le métabolisme lipidique et la perméabilité intestinale dans un modèle *in vitro* d'entérocytes.

### **Méthodes**

Des souris mâles C57BL/6J ont reçu pendant 22 semaines un régime contrôle (CTRL ; 10% kcal dérivés des lipides) ou un régime obésogène (DIO ; 58% kcal dérivés des lipides) avec ou sans supplémentation en sucres dans l'eau de boisson (42 g/L de sucres dont 55%

fructose et 45% sucrose). Le phénotype d'obésité a été caractérisé par la pesée des souris et des tissus adipeux viscéraux ainsi que par un test de tolérance orale au glucose, l'histologie du foie ainsi que par le dosage des TG hépatiques. Le jéjunum des souris a été prélevé à partir duquel l'histologie et la mesure de la perméabilité en chambre de Ussing ont été réalisées. Les CEI ont été isolées, sous la forme de cryptes et de villosités, puis la fonction mitochondriale a été évaluée par Seahorse (voir **l'annexe consacrée à l'analyse Seahorse**), expressions génique et protéique ainsi que par des observations en immunohistochimie et en microscopie électronique à transmission. Le métabolisme lipidique des CEI a également été caractérisé par quantification des acides gras des classes de lipides en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), mesure de l'expression de gènes ainsi que de la  $\beta$ -oxydation de l'acide palmitique radiomarqué. L'homéostasie redox des CEI a été déterminée par détection des peroxydes et des anions superoxydes cytosoliques ainsi que par mesure de l'expression de gènes codant des enzymes de la machinerie antioxydante.

Afin de modéliser les effets provoqués par la consommation d'un régime obésogène sur la fonction mitochondriale des CEI, un modèle murin d'organoïdes jéjunaux a été développé à partir de cryptes jéjunales issues de souris C57BL/6J nourries avec le régime CTRL et dans lequel les organoïdes étaient traités pendant 24h avec des acides gras (acides stéarique et oléique) avec ou sans induction préalable de la différenciation pendant 48h. Les organoïdes présentent l'avantage d'être un modèle représentatif de l'intestin, conservant les caractéristiques métaboliques et phénotypiques des CEI des souris desquelles ils sont issus.

Puis, dans le but de reproduire plus fidèlement les effets provoqués par la consommation du régime obésogène utilisé *in vivo* sur les paramètres d'intérêt, les effets des principaux acides gras quantifiés par GC-MS dans le régime et dans les CEI ont été évalués sur la fonction mitochondriale, le métabolisme lipidique et l'homéostasie intestinale de la lignée d'entérocytes porcins IPEC-J2 (*Intestinal Porcine Epithelial Cells – Jejunum 2*). Les IPEC-J2 présentent l'avantage d'être issues de jéjunum et ne sont ni cancéreuses, contrairement aux autres lignées intestinales souvent issues de cancer colorectal, ni transformées (Vergauwen, 2015). De plus, elles présentent un métabolisme oxydatif principalement dépendant de l'OXPPOS de la glutamine (Bernardini et al., 2021), tout comme l'entérocyte sain *in vivo*, et se différencient spontanément en quelques jours (environ 1 semaine) pour former un épithélium polarisé à forte TEER (Vergauwen, 2015). Ce modèle est considéré comme plus proche de la physiologie de l'intestin grêle humain que les autres lignées non-humaines (Vergauwen, 2015).

Enfin, afin de prévenir les altérations métaboliques induites par les acides gras sur les CEI, les propriétés de la fucoxanthine, un caroténoïde issu des algues brunes, ont été évaluées sur la fonction mitochondriale et le stress oxydant, avec ou sans traitement aux acides gras sur le modèle IPEC-J2.

## Résultats marquants de la partie II

---

### **Partie II.1 : L'accumulation des lipides induite par un régime obésogène diminue le nombre de mitochondries dans les entérocytes et augmente la prolifération ainsi que la perméabilité intestinale dans le jéjunum de souris obèses.**

- La consommation d'un régime obésogène diminue le nombre de mitochondries, la capacité oxydative et l'expression des gènes de la dynamique mitochondriale, dont *Pgc1a*, dans les CEI de souris obèses.
- Le métabolisme lipidique des CEI est modifié par la consommation d'un régime obésogène, marqué par une augmentation de l'accumulation des TG sous la forme de CLD et par une diminution de la capacité de  $\beta$ -oxydation.
- La machinerie antioxydante des CEI est induite par la consommation d'un régime obésogène.
- La consommation d'un régime obésogène augmente la perméabilité jéjunale, l'expression de *Cldn2* et la prolifération.
- La supplémentation en sucres dans l'eau de boisson ne modifie pas les effets provoqués par la consommation du régime obésogène seul sur les paramètres d'intérêt.
- Un traitement de 3 jours avec les principaux acides gras saturés du régime sur le modèle *in vitro* d'entérocytes IPEC-J2 induit d'abord une accumulation des TG avant de provoquer une augmentation de la perméabilité épithéliale et une diminution de la respiration basale.

### **Partie II.2 : La consommation d'un régime obésogène induit une stéatose entérocytaire, une diminution de l'expression de *Pgc1a* et une activation de la machinerie antioxydante dès 3 jours chez la souris.**

- La machinerie antioxydante des CEI est induite précocement par la consommation d'un régime obésogène *in vivo*.
- La consommation d'un régime obésogène provoque une accumulation de TG sous forme de CLD dans les CEI dès 3 jours de régime.
- L'expression de *Pgc1a* est diminuée de 60% dans les CEI des souris après 3 jours de consommation d'un régime obésogène.

**Partie II.3 : Un traitement avec des acides gras stéarique et oléique induit une accumulation lipidique et une dysfonction mitochondriale dans un modèle murin d'organoïdes de jéjunum en prolifération et différenciés.**

- Un mélange d'acides gras stéarique et oléique provoque une augmentation de l'accumulation lipidique dans des organoïdes en prolifération et différenciés après 24h de traitement, permettant d'obtenir un modèle de stéatose entérocytaire.
- Les acides gras C18:0 et C18:1 induisent une dysfonction mitochondriale des organoïdes jéjunaux en prolifération et différenciés, caractérisée par une diminution de la respiration liée à la production d'ATP.
- L'expression de certains gènes codant des sous-unités de la CTE dans les organoïdes différenciés est diminuée par un traitement aux acides gras C18:0 et C18:1.
- La viabilité des organoïdes différenciés ne permettant pas des traitements au-delà de 24h, ce modèle a été abandonné au profit d'un modèle cellulaire sur lignée immortalisée.

**Partie II.4 : Les acides gras du régime DIO et ceux stockés sous forme de triglycérides dans les cellules épithéliales intestinales des souris obèses sont essentiellement du C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0.**

- L'analyse des acides gras des régimes montrent que le régime DIO a été obtenu par enrichissement du régime CTRL avec de l'huile de coco.
- Le régime DIO est riche en acides gras saturés laurique (C12:0), myristique (C14:0), palmitique (C16:0) et stéarique (C18:0) et pauvre en acides gras polyinsaturés.
- Les acides gras stockés sous la forme de TG dans les CEI de souris obèses sont principalement du C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0.

**Partie II.5 : Caractérisation des effets seuls ou en mélange du C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0 sur la fonction mitochondriale, le métabolisme lipidique et la perméabilité intestinale du modèle *in vitro* d'entérocytes IPEC-J2.**

- Les acides gras C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0 sont tous stéatosants à 250  $\mu$ M et induisent l'expression de gènes codant des enzymes antioxydantes, ainsi qu'une augmentation de la fuite de protons des IPEC-J2 *in vitro*.
- Seuls le C16:0 et le C18:0 à 250  $\mu$ M induisent une dysfonction mitochondriale sévère, marquée par une diminution du taux de production d'ATP par OXPHOS associée à une augmentation de la perméabilité intestinale.
- Bien que le C16:0 à 250  $\mu$ M induit une dysfonction mitochondriale et une augmentation de la perméabilité, un mélange de C12:0, C14:0 et C18:0 reproduit la dysfonction

mitochondriale observée avec le mélange des 4 acides gras et indique qu'un mélange d'acides gras à forte concentration induit une dysfonction mitochondriale des CEI.

- Le C16:0, le C18:0 ainsi que le mélange des 4 acides gras augmentent le nombre de cellules après 3 jours de traitement.

**Partie II.6 : La fucoxanthine purifiée, un caroténoïde issu des algues brunes, stimule la fonction mitochondriale, présente des effets antioxydants et diminue l'accumulation lipidique dans le modèle IPEC-J2.**

- Un traitement de 24h avec 100  $\mu$ M de fucoxanthine stimule les paramètres de bioénergétique mitochondriale, dont les respirations basale, maximale et liée à la production d'ATP et augmente la fuite de protons.
- Les effets stimulateurs de la fucoxanthine sur la fonction mitochondriale sont associés à une augmentation de l'activité de la CTE mitochondriale.
- Un traitement préventif à la fucoxanthine réduit la production de peroxydes dans un modèle de stress oxydant induit par du peroxyde d'hydrogène.
- La fucoxanthine diminue l'accumulation des TG dans les IPEC-J2 en réponse au traitement de 3 jours avec le mélange de C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0. Un co-traitement des IPEC-J2 avec la fucoxanthine et le mélange d'acides gras améliore la réponse au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par rapport à la condition acides gras seuls.

## Partie II.I : L'accumulation de lipides dans les cellules épithéliales intestinales réduit la biogénèse mitochondriale, augmente la prolifération et la perméabilité intestinale chez la souris

---

### **Dietary lipid excess reduces small intestinal epithelial cell mitochondrial biogenesis associated with enhanced proliferation and increased intestinal permeability in mice.**

Thomas Guerbette<sup>1</sup>, Vincent Ciesielski<sup>2,5</sup>, Manon Brien<sup>1</sup>, Daniel Catheline<sup>2</sup>, Roselyne Viel<sup>3</sup>, Mégane Bostoen<sup>1</sup>, Jean-Baptiste Perrin<sup>1</sup>, Vincent Rioux<sup>1,2</sup>, Agnès Burel<sup>4</sup>, Régis Janvier<sup>1</sup>, Annaïg Lan<sup>1,3\*</sup>, Gaëlle Boudry<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institut Numecan, INRAE, INSERM, Univ Rennes, Rennes, France

<sup>2</sup>Institut Agro, Univ Rennes 1, INRAE, INSERM, NuMeCan, Rennes, France

<sup>3</sup>Plateforme H2P2, Université de Rennes, Rennes, France

<sup>4</sup>Plateforme MRic, BIOSIT, Rennes, France

<sup>5</sup>UMR PNCA, AgroParisTech, INRAE, Université Paris-Saclay, Paris, France

\* Equal contribution

### **Acknowledgements**

We are grateful to Dr Olivier Loreal, Patricia Leroyer for the design of the animal experiment, Patrice Dahirel for his help with the animal experiment, Kilian Petitjean for his technical support and Marine Buraud for her contribution to the *in vitro* experiments.

### **Abstract**

**Background & Aims:** Obesity and overweight are associated with low-grade inflammation linked to alterations of intestinal homeostasis. The latter relies notably on an effective epithelial barrier and coordinated renewal of intestinal epithelial cells (IEC), both supported by the mitochondrial function of IEC. Yet, excess dietary lipid intake may induce alterations of mitochondrial function of IEC and of lipid metabolism. The aim of this study was to assess whether obesogenic diet consumption alters mitochondrial function of IEC in mouse jejunum in relation with IEC renewal dynamics and epithelial permeability in a mouse model of diet-induced obesity (DIO).

**Methods:** Mice were fed for 22 weeks with a 58% kcal fat diet (DIO group) or a 10% kcal fat diet (CTRL group). IEC from jejunum were isolated in the form of crypts and villi to assess mitochondrial function and lipid metabolism while permeability assay and histology were performed on the jejunal mucosa. An *in vitro* model of enterocytes, the IPEC-J2, incubated

with a mix of fatty acids representative of the obesogenic diet was used to decipher the sequence of events.

**Results:** Obesogenic diet induce hepatic steatosis and loss of the whole-body glucose homeostasis. *In vivo* and *in vitro* data indicated that excessive dietary lipid intake increased lipid storage in IEC in the form of cytosolic lipid droplets, resulting in IEC metabolic adaptation marked by low mitochondrial number and altered mitochondrial dynamics, diminished  $\beta$ -oxidative capacity and induction of the antioxidant machinery. Adaptation of IEC bioenergetics was associated with increased proliferation / differentiation balance, promoting significant *Cldn2* expression in the jejunal epithelium of DIO mice and contributing to increased epithelial permeability. Besides, IPEC-J2 treatment with a mix of fatty acids revealed that mitochondrial alterations were caused by high concentration fatty acids (1 mM), associated with rapid and transient induction of peroxide production followed by increased epithelial permeability.

**Conclusion:** Our study provides new insights into metabolic adaptations of IEC in obesity by revealing that excess lipid intake diminishes mitochondrial number and fatty acid oxidation of IEC in association with enhanced proliferation that contributes to increased epithelial permeability.

## Introduction

Obesity and associated complications, such as diabetes and cardiovascular diseases, causes the death of 4 million people each year (WHO, 2022). These pathologies have been associated with the rise of high fat/high sucrose diet consumption, notably in Western countries. Adipose tissue expansion induces systemic low-grade inflammation that particularly affects the liver, the brain and muscles, responsible of obesity-associated complications (Lumeng et al., 2011; Reilly et al., 2017). This systemic low-grade inflammation is perpetuated by alterations of intestinal homeostasis (Cani and Jordan, 2018). Animal models of diet-induced obesity (DIO) (Johnson et al., 2015; Stenman et al., 2012) and obese Humans (Genser et al., 2018) display increased small intestine permeability that notably results from tight junction (TJ) remodeling, with, among other changes, higher expression and localization of the leaky claudin (Cldn) 2 protein at the intestinal epithelial cell (IEC) apical membrane (Ahmad et al., 2017). Moreover, high fat diet (HFD) feeding enhances stemness of small intestine progenitors (Beyaz et al., 2016; Mah et al., 2014; Mana et al., 2021), resulting in increased number of intestinal stem cells (ISC) and higher IEC proliferation.

Interestingly, the IEC proliferation / differentiation balance affects TJ protein expression and epithelial permeability. Indeed, stress-induced IEC proliferation is associated with a defect of intestinal permeability in rat (Boudry et al., 2007). In addition, small intestine organoids maintained in proliferation are marked by high expression of *Cldn2* and low expression of other Cldn compared to differentiated organoids (Pearce et al., 2018). Claudin 2 is a pore forming



TJ protein, whose expression seems restricted to poorly differentiated crypt cells in healthy mice intestine (Holmes et al., 2006). While alteration of Claudin 2 expression impacts ion permeability, some authors suggested that changes in Claudin-2 expression may also participate to enhanced macromolecular permeability through induction of TJ strand discontinuities (Luettig et al., 2015). Hence, Claudin 2 has been associated with several diseases such as inflammatory conditions like Crohn's disease, ulcerative colitis, celiac disease, or HIV enteropathy (Barmeyer et al., 2015) or in colorectal cancer (Venugopal et al., 2019). Taken together, these data suggest that HFD-induced increased number of ISC and proliferation might be associated with increased permeability mediated by tight junction restructuring, especially enhanced Claudin 2 expression.

Differentiation of progenitors into a mature IEC phenotype parallels metabolic reprogramming. Indeed, differentiated IEC mostly relies on the energy provided by mitochondria through oxidative phosphorylation (OXPHOS), to ensure nutrient absorption, TJ maintenance and epithelial renewal. They are characterized by high mitochondrial content, regulated by a high expression of the biogenesis regulator PGC1 $\alpha$  compared to proliferating cells at the bottom of intestinal crypts (D'Errico et al., 2011). Thus, this organelle participates to the phenotypic and metabolic transitions (Moor et al., 2018) that occurs during cellular differentiation marked by a shift from glycolytic and low OXPHOS activities in ISC towards enhanced oxidative metabolism and dependency as IEC migrate along the crypt-villus axis, creating a metabolic gradient (Stringari et al., 2012). Moreover, mitochondrial function has been shown to be essential to drive differentiation in small intestine organoids by generating reactive oxygen species (ROS) through the OXPHOS of the Paneth cell-derived lactate, which thereby activates the p38 mitogen-activated protein kinase (Rodríguez-Colman et al., 2017). Interestingly, mitochondrial function can be affected by dietary lipid excess in several tissues. Indeed, consumption of saturated fatty acid impairs mitochondrial function in liver (Koliaki et al., 2015; Wojtczak et al., 1993), through mechanisms that are thought to be linked to fatty acid catabolism and storage and associated oxidative stress (Heinonen et al., 2015; Noeman et al., 2011; Starkov et al., 2004; Zhao et al., 2019). In the small intestine, the expression of *Pgc1a* is decreased by half in IEC of DIO mice (Ramachandran et al., 2018) indicating probable alterations of mitochondrial biogenesis. Yet, strong evidences of IEC mitochondrial dysfunction in the small intestine are lacking so far. Only *in vitro* studies evaluated the impact of saturated fatty acid on mitochondrial function in colonocytes. Hence, palmitic acid impaired colonocyte mitochondrial respiration and ATP production *in vitro* (Sun et al., 2018b; Yoo et al., 2021) associated with altered mitochondrial network and oxidative stress (Li and Li, 2020) which is susceptible to alter mitochondria dynamics (Ježek et al., 2018). In parallel, several studies have shown that HFD promotes a metabolic shift toward lipid catabolism in IEC. A short-term exposure to 3 days of HFD enhanced IEC fatty acid absorption and export into chylomicrons

in rat (Singh et al., 1972) as well as in Human (Tremblay et al., 2013). Moreover, 14 days of HFD feeding increased IEC fatty acid  $\beta$ -oxidation (FAO) in the jejunum (Kondo et al., 2006). These mechanisms may indicate IEC metabolic adaptation to counteract excessive lipid storage as observed in hepatocytes during nonalcoholic fatty liver disease (Ipsen et al., 2018). However, the presence of cytosolic lipid droplets (CLD) in IEC has also been reported, in Humans (Chavez–Jauregui et al., 2010; Xiao et al., 2018) and in several animal models of DIO (Berendsen and Blanchette-Mackie, 1983; Zhu et al., 2009), likely to favor the storage of fatty acids that are not oxidized or exported from the IEC .

We hypothesized that excess dietary fatty acid leads to alterations of lipid metabolism in IECs and concomitant mitochondrial adaptation, generating perturbations of the small intestinal epithelium renewal and remodeling of TJ, enhancing small intestinal permeability. We thus thoroughly characterized mitochondrial function and lipid metabolism in IEC in relation with IEC proliferation / differentiation balance and epithelial permeability in a mouse model of DIO. To decipher the sequence of events, we also used an *in vitro* model of jejunal epithelial cells with a cell metabolism close to *in vivo* IEC.

## **Material and methods**

### **Model of diet-induced obesity in mice**

Animal procedures were performed in accordance with French law and approved by the *Comité Rennais d’Ethique en Expérimentation Animale* and by the *Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche* (APAFIS#22076-2019091911225127 v4). Thirty-two male C57BL/6J (Janvier, France) were acclimated for one week to housing conditions and fed standard rodent chow diet (16% protein; Envigo, United States) and tap water *ad libitum*. Mice were housed by group of three to five per cage in an environment maintained at 20°C with a 12:12h light-dark cycle. After acclimation, half of the animals received *ad libitum* either a control diet (CTRL, D12328, 10% kcal fat Research Diets, New Brunswick, NJ, n=17) and tap water or an obesogenic diet (D12331, 58% kcal fat, n=15) and drinking water enriched with a mix of carbohydrates (45% sucrose and 55% fructose) at a concentration of 42 g/L to induce obesity (DIO group). Animals were anesthetized with isoflurane and blood samples were collected by intra-cardiac puncture. After cervical dislocation, organs were removed, including jejunum, liver, and visceral fat pads (epididymal, mesenteric and retroperitoneal). Tissues were stored at -80°C or fixed in 4% buffered formaldehyde for histology or rinsed with 0.15 M sodium cacodylate buffer and fixed by adding 2.5% glutaraldehyde for 1 h for electron microscopy. Eight centimeters from proximal jejunum were removed 5 cm after the pylorus, flushed with cold Hanks’ Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco, 14170112) and maintained in cold HBSS until IEC isolation. One centimeter of distal jejunum was maintained in Krebs buffer for immediate permeability assay in Ussing chamber

while another centimeter was fixed in 4% buffered formaldehyde for histology. Blood samples were left on ice for two hours and then centrifugated at 240xg for 10 min. The serum was aliquoted and stored at -80°C. Serum alanine aminotransferase (ALAT) concentration measurement was performed at the Biochemistry Department of Rennes University Hospital

## **Histology**

Morphometric analysis of jejunal mucosa and hepatic observations were performed on microscopic hematoxylin-eosin-saffron (HES) stained sections performed at H2P2 platform (UMS Biosit, Rennes, France). Jejunal villus and crypt sizes were measured using the software NDP.view2 (Hamamatsu).

## **Hepatic triglyceride quantification**

Hepatic triglyceride (TG) quantification was performed as previously described using the DiaSys kit (Diagnostic System, Grabels, France) (Appriou et al., 2019).

## **Oral glucose tolerance test**

Oral glucose tolerance test was performed one week before euthanasia. After a 4 h-fast, mouse glycemia was evaluated by collecting blood from tail vein and measuring glycemia with a glucometer. Mice then received a glucose solution (1g/kg) by intra-gastric gavage. Glycemia was measured every 15 min for 1 h and then 90 min and 120 min after oral gavage.

## **Jejunal epithelial cell isolation**

Jejunal villus and crypt isolation protocol was adapted from (O'Rourke et al., 2016). Jejunum was opened longitudinally and washed with ice cold HBSS. Five square-millimeter pieces were cut and placed into 10 mL ice-cold 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-HBSS. After a dozen aspirations with a 10 mL pipette and once the pieces had settled by gravity, supernatant was removed and 25 mL 5 mM EDTA-HBSS was added. Samples were incubated for 30 min at 4°C in a benchtop roller. After the incubation, EDTA-HBSS was removed and samples were washed with ice cold HBSS. To isolate IECs, 30 mL of ice-cold HBSS were then added to the samples and the tubes were vigorously shaken for 30s. Cell suspensions were finally filtered through a 200 µm strainer (PluriSelect,43-50200-50,). Isolated villi and crypts were centrifugated at 200xg for 5 min and resuspended into 6 mL of Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12 (ADF, Gibco, 12634010) supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 1% 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Gibco, 15630106). Isolated IEC were immediately used for metabolic analyses (bioenergetic analysis, fatty acid  $\beta$ -oxidation), fatty acid quantification and ROS detection assays while the remaining cells were centrifugated at 200xg for 5 min and either resuspended in lysis buffer RA1

(Macherey-Nagel) for RNA extraction, or in RIPA for further protein extraction, and stored at -80°C.

### **Bioenergetic analysis of IEC**

Extracellular flux analysis of IEC was performed with the extracellular flux analyzer Seahorse XFe24 (Agilent Seahorse XF technology). Prior to the experiment, cartridge plate was hydrated with calibrate buffer and incubated overnight at 37°C. 150 µL from the 6 mL IEC suspension were centrifugated at 200 g for 5 min. The supernatant was then removed, and the pellet was resuspended in 200 µL of mix made of 1:4 (vol:vol) matrigel (Corning, 354230) diluted in Seahorse complete medium (Seahorse medium (Agilent, 102353-100), 1 mM pyruvate, 2 mM L-glutamine and 17.5 mM glucose). Ten micromolar of Y-27632 (Sigma, Y0503) was added to the cell suspension. 50 µL of IEC suspension were then seeded per well of the Seahorse 24 well culture plate (100777-004, Agilent) and incubated for 30 min at 37°C in a non-CO<sub>2</sub> incubator while the Seahorse analyzer was calibrated with the cartridge. Seahorse complete medium was then added to each well and the plate was incubated for another 15 min at 37°C in a non-CO<sub>2</sub> incubator. Following incubation, the plate was loaded into the analyzer and the mitochondrial function analysis was performed using the Cell Mito Stress Test kit (Agilent, 103015-100). After basal measures, oligomycin (2 µM), Carbonyl cyanide-4-phenylhydrazone (FCCP; 2 µM) and antimycin A and rotenone (0.5 µM) were sequentially injected. Measures consisted in cycles of 3 min mix, 2 min wait and 3 min measurement after each injection. Three measurement cycles of oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were performed after each injection. Once the assay performed, Seahorse medium was removed and IEC were fixed in 4% PAF for 30 min and then stained with Hoechst 33258 (ThermoFisher, H3569) for normalization by DNA content. Proton efflux rates (PER), OCR and ECAR at basal states and after the injection of rotenone and antimycin A were used to calculate the ATP rate from OXPHOS according to Agilent instructions in the Seahorse Real-Time ATP Rate Assay instructions.

### **IEC gene expression**

Total RNA from isolated IEC were extracted following the manufacturer protocol of the Nucleospin RNA Plus extraction kit (Macherey-Nagel, 740955.250) and assayed using a Spectrometer ND-1000 (Nanodrop). Reverse transcription step was performed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase (4368814, Thermo Fisher Scientific). Gene expression was performed by real time quantitative PCR using the PowerSYBR green PCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific, 4368813). The expression of the genes of interest was analyzed using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method with Hypoxanthine Phospho Ribosyl Transferase 1 (*Hprt1*) as housekeeping gene. Primer sequences are available on demand.

### **Fatty acid quantification from IEC**

IEC were sonicated in 1 mL of PBS and 100  $\mu$ L were kept for protein normalization. 200  $\mu$ g of C17:0 was added to each sample as an internal standard for quantification. Lipid extraction was performed by adding 4 mL of a mix of 3:2 (volume:volume) hexane/isopropanol, acidified with 600  $\mu$ M HCl, in each sample. After a 15 min agitation at room temperature, samples were centrifugated at 1000xg for 10 min and the upper phase, which contains lipids, was transferred to a new tube containing 150 mM NaCl in order to rinse the organic phase. The tubes were vigorously shaken and centrifugated at 1000xg for 3 min. Hexane was then totally evaporated with nitrogen flow at 55°C and 1 mL of acetic acid/chloroforme was added to each tube. Eight hundred  $\mu$ L of the solution was totally evaporated in a water bath at 40°C and 80  $\mu$ L chloroform was added to the tube. The resulting solution was deposited on a silica plate to allow lipid class chromatography. After migration and revelation with primulin under UV-light, TG were collected and saponified, with 2 mL NaOH for 15 min at 70°C, and methylated, with 1 mL BF<sub>3</sub> in methanol for 10 min at 70°C. Five milliliters of NaCl 0,9% and 300  $\mu$ L of hexane were added in each tube. After 15 min agitation at room temperature and centrifugation at 1000xg for 10 min, the upper phase was transferred into a new vial. 1  $\mu$ L of each sample was injected. Fatty acids from TG were analyzed using a Agilent 7890N gas chromatograph coupled to a 5975C mass spectrometry detector (Agilent) (Drouin et al., 2019). The quantified fatty acids were normalized by mg of proteins using the BCA protein assay kit (23225, ThermoFisher Scientific).

### **Detection of reactive oxygen species**

ROS were detected using the H<sub>2</sub>DCFDA (ThermoFisher scientific, D399), for peroxides, and dihydroethidium (ThermoFisher scientific, D11347) for cytosolic superoxide anions, dyes. For each animal, peroxide detection was performed at both basal and stressed states. Thus, each IEC suspension was divided in 2 and were centrifugated at 300 g for 5 min and resuspended in a 10  $\mu$ M MitoSOX solution or in 10  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCFDA  $\pm$  30 mM hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Sigma Aldrich, 216763) to induce oxidative stress. All reagents were resuspended in HBSS. IEC were incubated with fluorescent dyes for 30 min at 37°C and protected from light. Then IEC were centrifugated at 300 g for 5 min and resuspended in HBSS. Measures of DCFDA fluorescence intensity at ex485/em590 and MitoSOX at ex520/em590 using the POLARstar Omega microplate reader (BMG Labtech) allowed ROS detection. Results were normalized after Hoechst staining and measure of fluorescence intensity.

### **IEC FAO capacity assay**

IEC were centrifugated at 300 g for 5 min and resuspended in 1:4 (vol:vol) matrigel diluted in William's medium (Gibco, A12176-01). 40  $\mu$ L of the IEC suspension were seeded per well of a 96 well plate. The plate was incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 10 min to allow the matrigel to polymerize. 100  $\mu$ L of warm FAO medium, consisting in William's medium containing 1% BSA, 100  $\mu$ M palmitic acid (Sigma-Aldrich, P5585), 1 mM L-Carnitine (Sigma-Aldrich, C0283) and 0.05  $\mu$ Ci/mL [U-<sup>14</sup>C]-palmitic acid (Perkin Elmer, NEC534050UC), was then added to each well. The plate was incubated for 3 h in a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. After the incubation, 1 M perchloric acid was added to each well (100  $\mu$ L) and incubated at 37°C for 5 min to allow palmitic acid precipitation. The content of each well was homogenized by pipetting up-down several times, transferred into 500  $\mu$ L tubes and centrifugated at 2000 g for 10 min. The supernatants containing soluble FAO metabolites were collected and transferred in a tube containing 4 mL of scintillation fluid. A liquid scintillation analyzer (TRI-CARB 4910TR, PerkinElmer) recorded the disintegrations per minutes of each sample. Results were normalized by Hoechst normalization performed on a plate, seeded in the same conditions than the one with radioactive components.

### **Jejunal permeability**

Trans-epithelial resistance (TEER) of jejunal mucosa was recorder using a voltage-clamp as already described (Lessard et al., 2009).

### **Mitochondria observations**

After fixation of the jejunal mucosa in glutaraldehyde, the specimens were rinsed several times with 0.15 M sodium cacodylate and post-fixed with 1.5% osmium tetroxide for 1 h. After rinsing, the specimens were dehydrated in increasing concentrations of acetone (50, 70, 80, 90 and 100%, v/v). The specimens were gradually infiltrated with increasing concentrations of epoxy resin (35,70 % v/v in ethanol) for a minimum of 3h per step, then incubated in pure epoxy resin with added 2,4,6-Tris (dimethylaminomethyl)phenol (DMP30, Sigma-Aldrich) and finally polymerized for 24 h at 60°C. Ultra-thin sections of 80 nm were then cut from the blocks using a UCT ultramicrotome (Leica), placed on grids and post-stained with uranyl acetate for 30 min. Grids were examined at 120 kV with a Jeol 1400 transmission electron microscope equipped with a SC 1000 camera (Gatan Orius).

TOMM20 immunostaining was performed on jejunal sections for IHC of mitochondria. Paraffin-embedded tissue was cut at 4  $\mu$ m and mounted on positively charged slides before they were dried at 58°C for 1h. IHC staining was performed on the Discovery ULTRA Automated IHC stainer using the ROCHE detection kit. Following deparaffination with Discovery wash solution at 75 °C for 8 minutes, antigen retrieval was performed using Ventana

proprietary, Tris-based buffer solution pH 8, at 95°C to 100°C for 40 minutes. Endogen peroxidase was blocked with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12 minutes. After rinsing, slides were incubated at 37°C for 32 minutes with rabbit anti-TOMM20 antibody (ab186735 Abcam; dilution at 1/5000). Signal enhancement was performed using a Goat anti-Rabbit HRP at 37°C for 16 min and DISCOVERY Rhodamine Kit (542-568nm) for 8 min. Nuclei were stained with DAPI.

### **Western blot of proteins from IEC**

Isolated IEC were lysed in RIPA buffer (Sigma-Aldrich, R0278) and sonicated before protein quantification and denaturation in Laemmli buffer. Ten µg of total protein lysates were separated in 4-12% Bis-tris SDS-PAGE gel and transferred onto PVDF membrane. Membranes were saturated for 2h at room temperature (RT) in a solution of 5% bovine serum albumin (BSA) in tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBST). Proteins were then immunoblotted overnight (4°C) with a cocktail of mouse primary antibodies against OXPHOS complex protein subunits (Invitrogen, 45-8199) and Ponceau staining for normalization. After 3 washes, blots were incubated in the appropriate secondary antibodies linked to HRP for 2 h at RT in a 5% BSA/TBST solution and enhanced chemiluminescence (ThermoFisher Scientific, 34076) revealed protein bands. Mean grey value of each band was measured using ImageJ.

### **Culture of mouse small intestine organoids**

Crypts and villi were isolated from the jejunum of CTRL mice as described in the *Jejunal epithelial cell isolation* section. Once cells were suspended in HBSS, they were filtered through a 70 µm filter (VWR International, 2572267) to retain only the suspended crypts. The harvested crypts were centrifuged at 200xg for 5 min at 4°C and resuspended in 6 mL of ADF. After centrifugation of the suspension at 200xg for 5 min, 250 crypts were seeded in 30 µL Matrigel. The plate was inverted and placed in the incubator at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 10 min to allow the Matrigel to solidify as a dome. Five hundred microliters of proliferative medium per well was then added. The proliferative medium was composed of 50% ADF supplemented with penicillin/streptomycin (2%; P/S, ThermoFisher Scientific, 15140122), HEPES (1%), L-Glutamine (1%; ThermoFisher Scientific; A2916801), and fetal bovine serum (FBS) and 50% conditioned medium of L-WRN cells, grown in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) GlutaMAX (ThermoFisher Scientific, 31966-021) with FBS (10%) and 8 mM epidermal growth factor (EGF; Sigma, E9644). This medium was supplemented with 10 mM Y-27632 (Sigma, Y0503) for the first 24h. After 4 days, differentiation was induced for 48 h for half of the wells via a 1/10 dilution (vol/vol) of the proliferative medium in ADF medium supplemented with P/S, HEPES, L-Glutamine and SVF in the same proportions as mentioned above while the other half were kept in the proliferative medium. Total RNA were then extracted from organoids as described in *IEC gene expression*.



### **IPEC-J2 cell line**

IPEC-J2 were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS (HyClone, SH30066.03), P/S (100 U/mL / 100 µg/mL), in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37° C. Cells were passed once a week and seeded at a density of 100,000 cells/cm<sup>2</sup>. Cells were treated once they reached confluence with an equimolar mix of C12:0 (Sigma, L4250), C14:0 (Sigma, M3128), C16:0 (Sigma, P5585) and C18:0 (Sigma, S4751) at 250 µM each and diluted in DMSO to a final concentration of 0.6% in culture media for 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 6h, 24h or 3 days.

### **Nile red staining of IPEC-J2**

Nile red staining was performed after cells were fixed into a 4% paraformaldehyde solution for 30 min. The Nile red powder (N1142, Thermofisher) was first diluted to 1 mg/mL into dimethyl sulfoxide (DMSO). Cells were incubated for 30 min at room temperature in a 100 µg/mL Nile red solution, diluted in PBS. After incubation, cells were washed with PBS and fluorescence was read at ex-520/em-590 using a microplate reader. Results were normalized using Hoechst 33258.

### **Bioenergetic analysis of IPEC-J2**

Cells were seeded in a 24-well plate for Seahorse plate before treatment with the mix of fatty acids as indicated above for 6h, 24h or 3 days. One hour before starting the analysis, cells were washed with the complete Seahorse medium and incubated for 45 min at 37 °C in incubator without CO<sub>2</sub> while the analyzer was calibrating. Mitochondrial function analysis was performed using the Cell Mito Stress Test kit as described in *Bioenergetic analysis of IEC*.

### **IPEC-J2 FAO capacity assay**

Cells were seeded onto 96 well plate and treated with the mix of fatty acids for 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 6h and 3 days. The day of the assay, treatment was removed, and cells were washed in pre-warmed PBS. A volume of 100 µL of warm FAO medium was added to each well and [U-14C]Palmitate oxidation was measured as described in *IEC FAO capacity assay*.

### **ROS detection assay on IPEC-J2**

H<sub>2</sub>DCFDA was used to detect peroxides. IPEC-J2 were incubated for 30 min with 10 µM of H<sub>2</sub>DCFDA diluted in HBSS to detect basal peroxides. On another plate, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM) was added for 1 h to induce oxidative stress, before peroxide detection. The cells were then rinsed with HBSS before incubation with the fluorescent probe for 30 min. After washing in HBSS, fluorescence was measured with the microplate reader at excitation/emission wavelengths of 485 nm/520 nm. Data were normalized by Hoechst staining.

### **Transepithelial electrical resistance of IPEC-J2**

TEER was measured after seeding cells onto plastic inserts (353504, Falcon) with 0.4  $\mu\text{m}$  pores. Once the TEER was stabilized, nearly 24 h after seeding, cells were treated with the mix of fatty acids. TEER was monitored every 30 min for 3 days using the CellZscope+ (Nano Analytics) and the medium was renewed every 24 h.

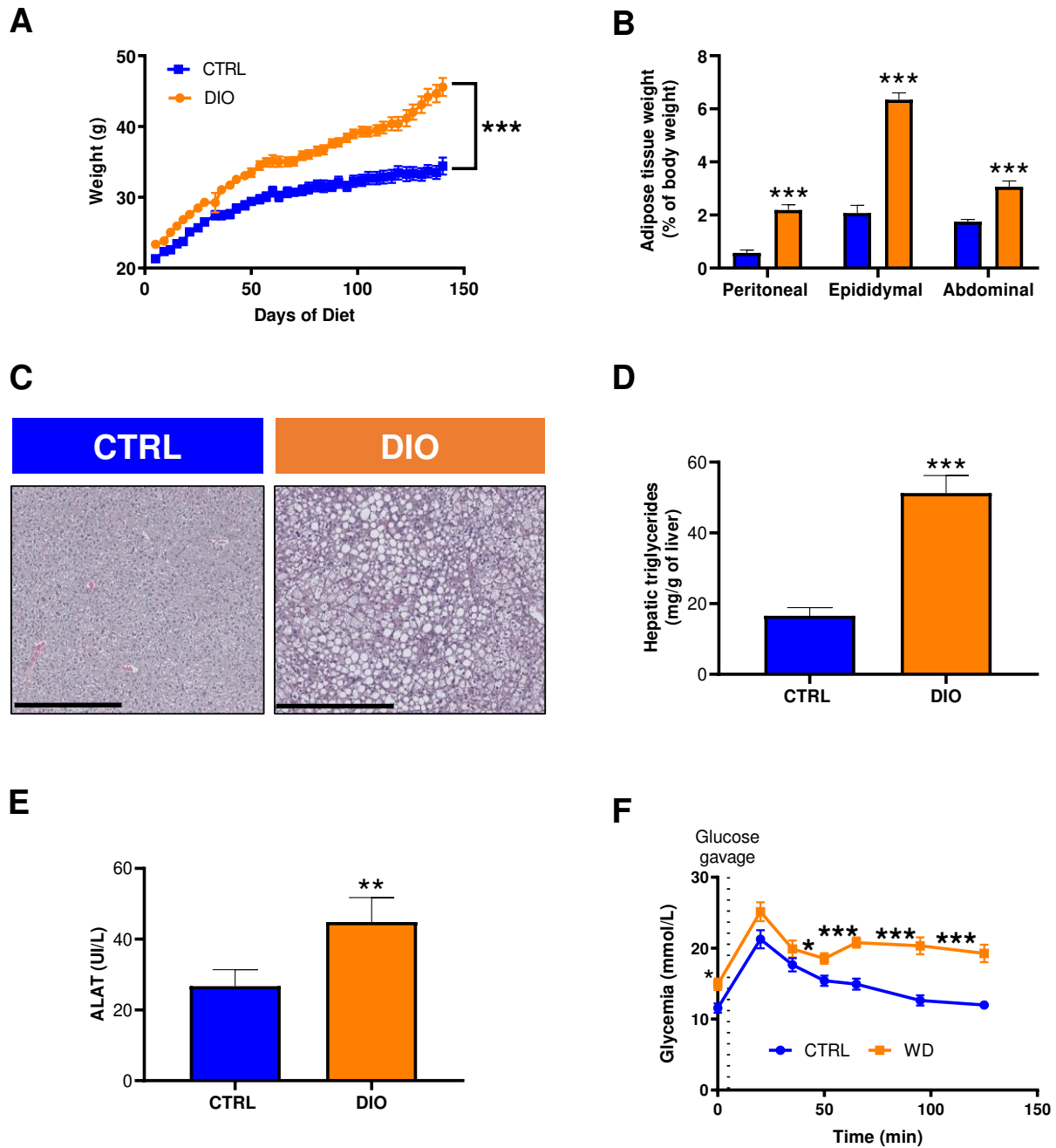
### **Statistical analysis**

Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Shapiro-wilk normality tests were performed on each data set, followed by a parametric test (Unpaired t-test) between CTRL and DIO mice, if both data sets followed a normal distribution, or a non-parametric test (Mann-Whitney test) otherwise. P-values  $<0.05$  were considered significant. Statistical analysis and graphs were performed on GraphPad Prism version 8.0.2.

## **Results**

### **DIO mice display increased adiposity, hepatic steatosis and altered glucose homeostasis.**

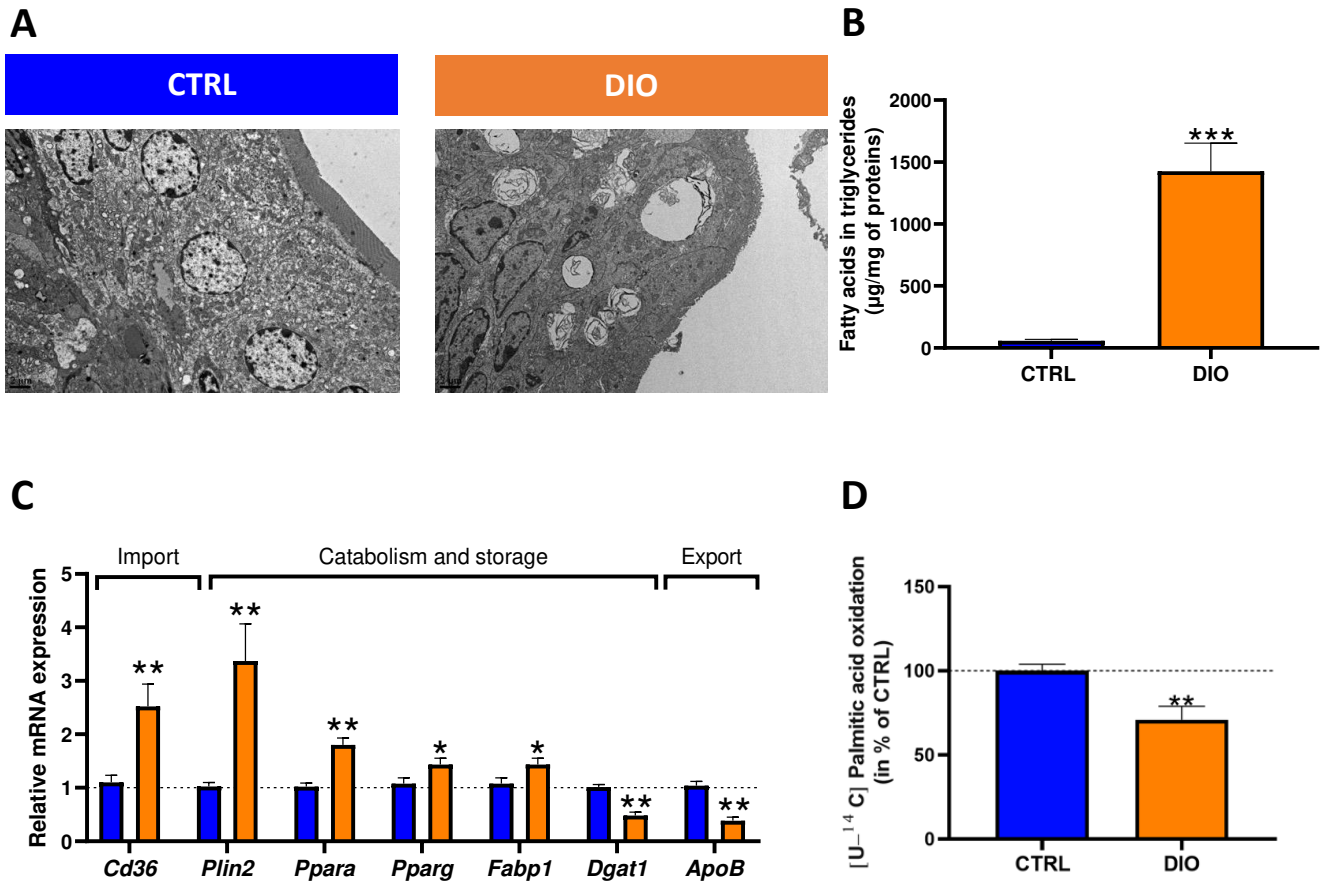
After 22 weeks of diet, DIO mice showed an increase in body weight compared to CTRL mice (**Figure 1.A**) and exhibited enhanced abdominal, peritoneal and epididymal fat pad weights relative to their body weight (**Figure 1.B**). DIO mice were characterized by hepatic steatosis, (**Figure 1.C**), increased liver TG concentration (**Figure 1.D**) as well as increased serum ALAT concentration (**Figure 1.E**) indicating hepatic cytolysis. DIO mice were also characterized by basal hyperglycemia (**Figure 1.F**) and a loss of glucose homeostasis compared to CTRL mice (**Figure 1.F**).



**Figure 1. Establishment of a diet-induced obesity model in mice. A. Mouse body weight evolution along the 22 weeks of control (CTRL) or obesogenic diet (DIO) consumption. B. Weight of peritoneal, epididymal and abdominal fat pads expressed in percentage of mouse body weight. C. Haematoxylin eosin saffron staining of liver from CTRL and DIO mice. D. Quantification of hepatic triglycerides. E. Serum alanine aminotransferase (ALAT). F. Blood glycemia before and after glucose gavage. Values are represented as means  $\pm$  SEM. Significant results are represented with \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$  after t-test ( $n = 9-15$  per group).**

## **DIO induces enterocyte steatosis and reduces FAO capacity of mouse jejunal epithelial cells.**

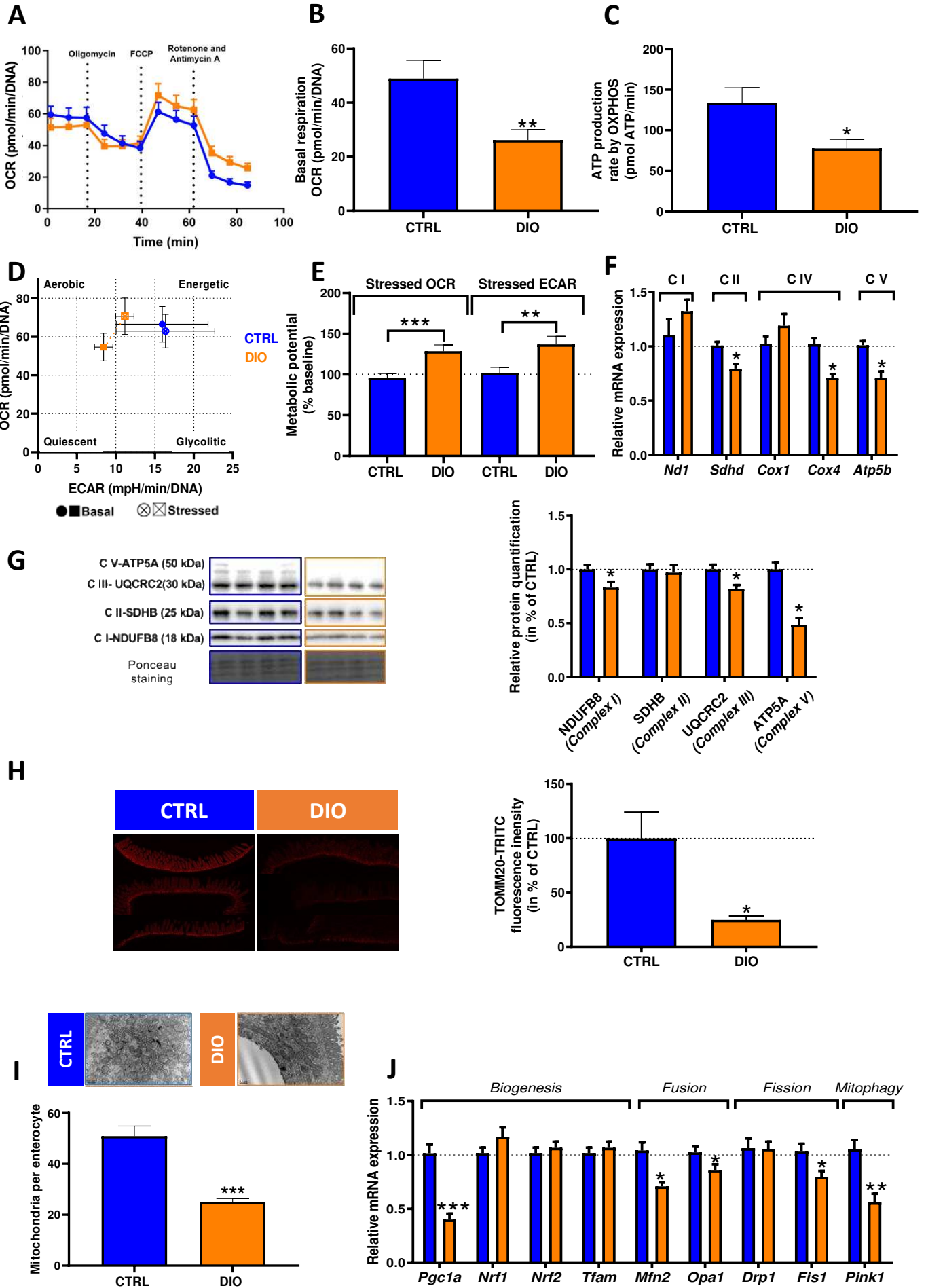
Cytosolic lipid droplets were apparent in IEC from the jejunal mucosa of DIO mice on transmission electron microscopy images (**Figure 2.A**). To characterize fatty acid accumulation in IEC, lipids were extracted from IEC and quantified. Quantification of fatty acids from TG revealed a 25-fold higher TG accumulation in IEC from DIO compared to CTRL mice (**Figure 2.B**), confirming enterocyte steatosis in response to DIO. In the same line, expression of *Cd36*, a transporter involved in IEC fatty acid absorption was 2.5-fold higher in IEC from DIO mice compared to CTRL ones (**Figure 2.C**) and *Plin2*, encoding a protein that surrounds CLD, was 3-fold more expressed in IEC from DIO mice (**Figure 2.C**). Moreover, both *Ppara* and *Pparg* were more expressed in IEC from DIO compared to CTRL mice (**Figure 2.C**) whereas expression of *Dgat1* and *ApoB*, both involved in chylomicron formation, were reduced by half in DIO compared to CTRL mice (**Figure 2.C**). Furthermore *Fabp1*, involved in resynthesis of monoacylglycerol into triacylglycerol as well as in directing fatty acids towards mitochondrial FAO, was 40% more expressed in IEC from DIO compared to CTRL mice (**Figure 2.C**). Yet, evaluation of mitochondrial FAO capacity, through measures of metabolites obtained from [U-<sup>14</sup>C]palmitic acid oxidation, revealed a lower capacity of palmitate oxidation in IEC of DIO mice compared to CTRL (**Figure 2.D**).



**Figure 2. DIO favours lipid storage and diminishes  $\beta$ -oxidative capacity in IEC. A.** Transmission electron images of tip villus from jejunal mucosa of CTRL and DIO mice. **B.** Quantification of fatty acids from triglycerides of intestinal epithelial cells from CTRL and DIO mice. **C.** mRNA relative expression of key genes involved in fatty acid entrance and fate in jejunal epithelial cells. Relative gene expressions are presented as fold change relative to CTRL calculated by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. **D.** Rates of [U-<sup>14</sup>C]palmitic acid oxidation of intestinal epithelial cells. Results were normalized by Hoechst intensity and expressed as percentage of CTRL. Values are represented as means  $\pm$  SEM. Significant results are represented with \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$  after t-test. \*\*\* $P < 0.001$  (n=9-15 per group).

### **DIO reduces IEC mitochondrial number and function.**

Mitochondrial function from isolated IEC was analyzed using the Seahorse analyzer (**Figure 3.A**). Calculations of metabolic parameters from the OCR profiles showed a 50% lower basal respiration of mitochondria from DIO mice IEC (**Figure 3.B**). Yet, spare respiratory capacity (CTRL:  $4.7 \pm 2.0$  vs DIO:  $21.6 \pm 4.4$ ,  $P < 0.01$ ) and coupling efficiency (CTRL:  $43.3 \pm 2.3$  vs DIO:  $66.5 \pm 5.8$ ,  $P < 0.001$ ) were higher in DIO mice IEC. The basal ATP production rate from OXPHOS, calculated from OCR, ECAR and PER data, was reduced by half in IEC from DIO mice compared to CTRL ones (**Figure 3.C**) while the energy map showed a less energetic phenotype of IEC mitochondria from DIO mice compared to CTRL ones (**Figure 3.D**). Interestingly, the addition of FCCP revealed a higher metabolic potential in mitochondria from DIO IEC compared to CTRL ones (**Figure 3.E**). Indeed, the OXPHOS and ECAR metabolic potential of IEC from DIO mice in a situation of high energetic demand were increased by 25% and 37%, respectively, compared to that of CTRL mice (**Figure 3.E**). Considering the lower basal respiration and OXPHOS-derived ATP production of mitochondria from IEC of DIO mice, expression of electron transport chain (ETC) subunits was measured. mRNA relative expressions of the ETC subunits *Sdhb*, *Cox4* and *Atp5b*, that respectively belong to complex II, IV and V, were 20% to 30% lower in IEC from DIO mice compared to CTRL ones (**Figure 3.F**). Relative abundance of cytochrome c mRNA was also reduced in IEC from DIO compared to that from CTRL mice (**Figure 3.F**). Furthermore, western blot analyzes confirmed that the protein expression of several subunits of the ETC (NDUFB8 (complex I), UQCRC2 (complex III) and ATP5A (complex V) was also diminished by 20 to 50% in IEC from DIO mice (**Figure 3.F and G**). In line with the decreased oxidative capacity of IEC from DIO mice, mitochondrial mass was evaluated. First, immunohistochemistry targeting the outer mitochondrial membrane transporter TOMM20 was performed. TOMM20 intensity was decreased by 75% in the jejunum from DIO mice compared to CTRL ones (**Figure 3.H**), suggesting a reduced number of mitochondria. To confirm this result, mitochondrial observations were performed on transmission electron microscopy images of jejunal enterocytes. The number of mitochondria in enterocytes from DIO mice was reduced by half compared to that from CTRL mice (**Figure 3.I**) but no apparent structural alteration of IEC mitochondria was noticed irrespective of the group. mRNA relative expression of *Pgc1a*, the master gene regulator of mitochondrial biogenesis, was 60% lower in IEC from DIO compared to CTRL mice (**Figure 3.J**). Yet, gene expression of *Nrf1*, *Nrf2* and *Tfam* were similar between groups (**Figure 3.J**). Moreover, gene expression of *Mfn2* and *Opa1*, both involved in mitochondrial fusion, and of *Fis1* and *Pink1*, involved in mitochondrial fission and mitophagy respectively, was lower in DIO mice compared to CTRL ones (**Figure 3.J**).

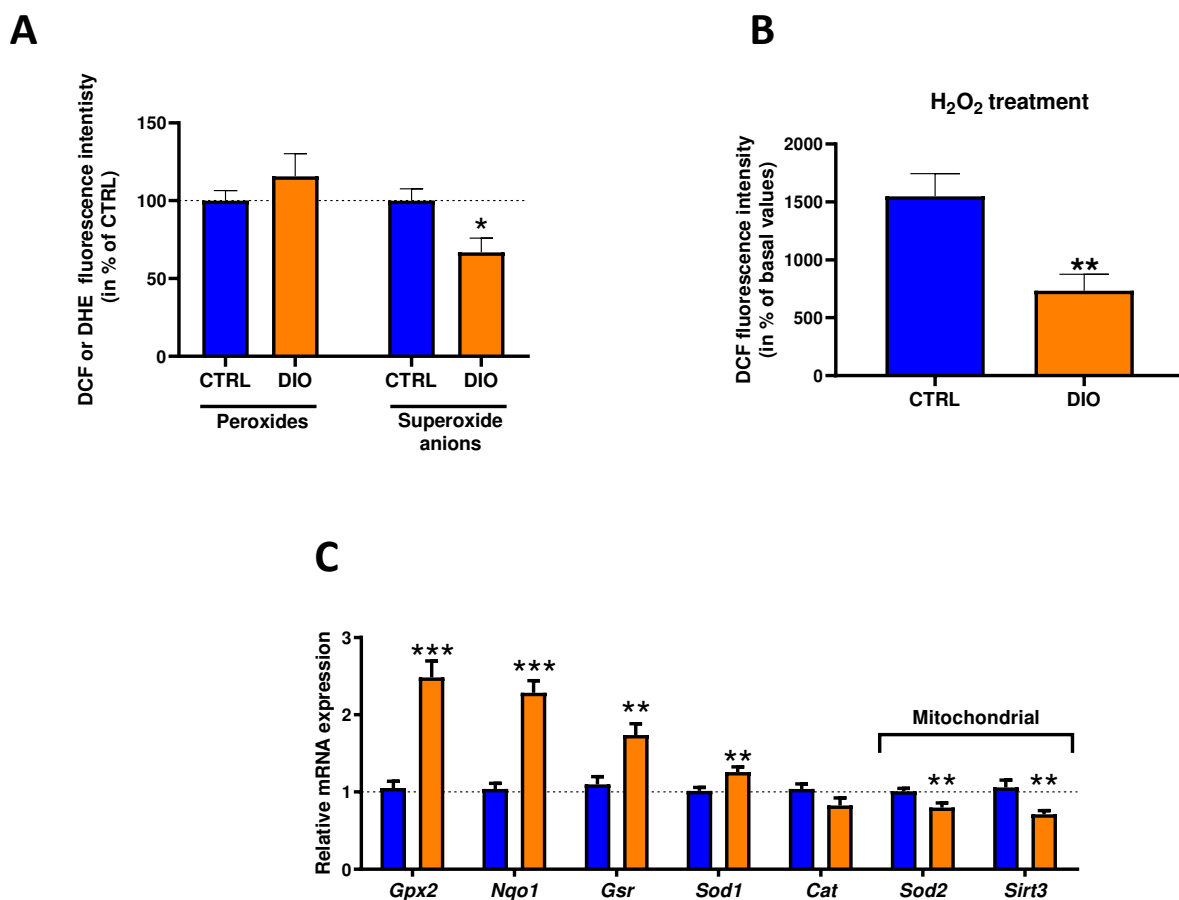




**Figure 3. DIO impairs jejunal epithelial cells (IEC) oxidative capacity through reduction of the mitochondrial number by enterocyte.** **A.** Oxygen consumption rates (OCR) of isolated IEC measured after sequential injection of oligomycin (2  $\mu$ M), FCCP (2  $\mu$ M) and rotenone and antimycin A (0.5  $\mu$ M). **B.** Basal respiration of isolated IEC. **C.** Evaluation of ATP production rate from oxidative phosphorylation of IEC. **D.** Energy map of isolated IEC at basal (full circle) and stressed (cross circle) states. **E.** Metabolic potential of isolated IEC displaying OCR and ECAR at a stressed state after FCCP injection and expressed in percentage of baseline values. **F.** mRNA relative expression of electron transport chain subunits of IEC. Values are presented as fold change relative to CTRL calculated by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. **G.** Western blot and semi-quantitative protein expression of subunits from electron transport chain of IEC normalized by Ponceau staining. Semi-quantitative results are expressed as percentage of CTRL means. **H.** TOMM20 immunostaining (red) in jejunal mucosa and measure of TOMM20 coupled fluorescence intensity normalized by surface area ( $n=3$  for CTRL and DIO). Data are expressed in percentage of CTRL. **J.** Transmission electron images of mitochondria from epithelial cells from jejunal mucosa and mitochondria number per IEC ( $n=3$  for CTRL and DIO). **K.** mRNA relative expression of genes involved in mitochondrial dynamics in IEC. Values are presented as fold change relative to CTRL calculated by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. Results are means  $\pm$  SEM. Significant results are represented as \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.001$ , \*\*\* $P<0.001$ .

## IEC antioxidant machinery is enhanced by DIO.

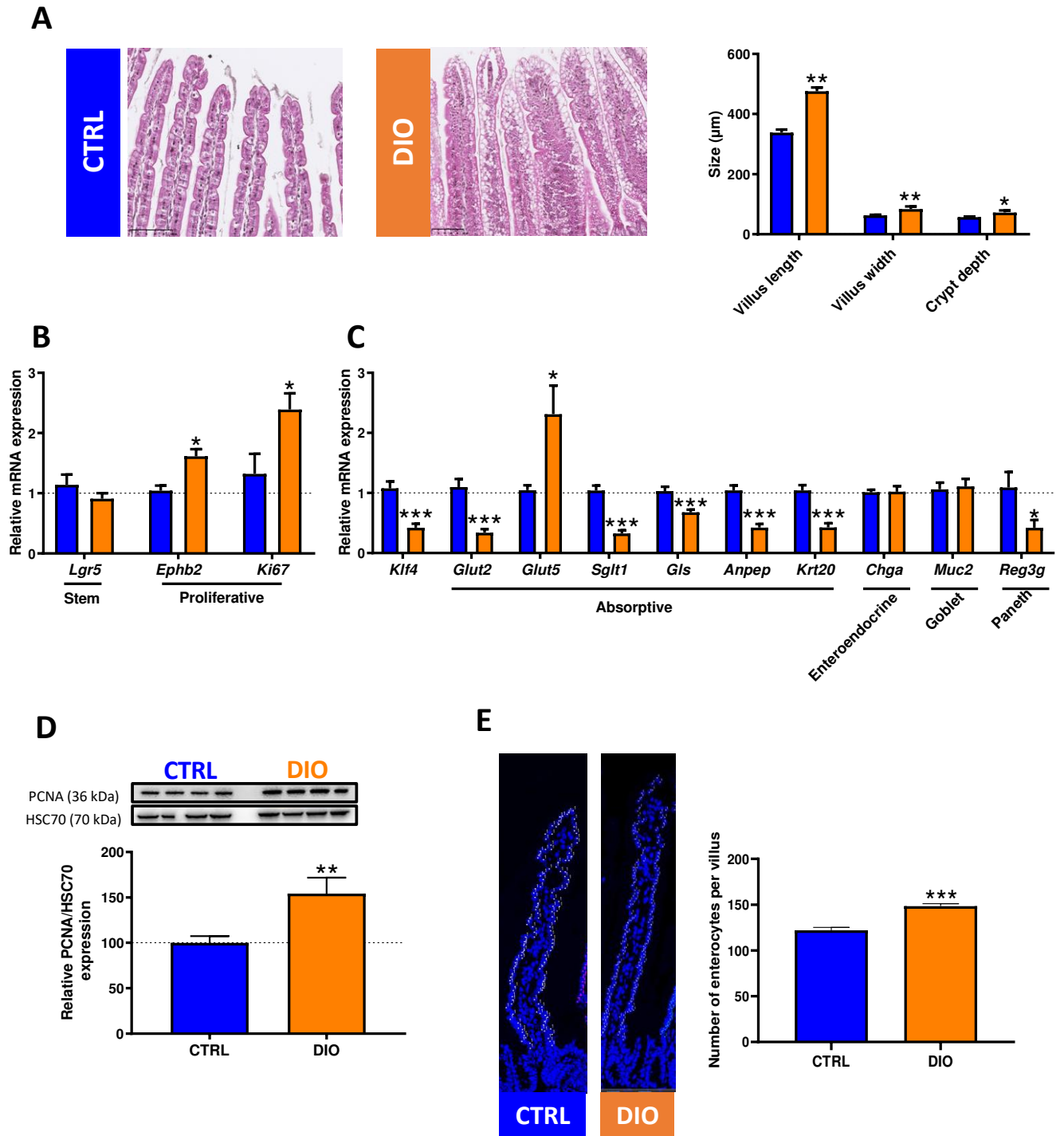
Peroxide detection in IEC was similar in both groups while superoxide anions were less abundant in IEC from DIO mice compared to CTRL ones (**Figure 4.A**). Furthermore, when IEC were submitted to an external oxidative stress induced by the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxide increase was 50% lower in IEC from DIO than CTRL mice (**Figure 4.B**). Consistent with the lower ROS detection in a situation of induced oxidative stress, mRNA relative expression of genes involved in the antioxidant machinery (*Gpx2*, *Nqo1*, *Gsr*, *Sod1*) was greatly induced in IEC from DIO mice (**Figure 4.C**). Interestingly, genes that encode the mitochondrial targeted *Sirt3* and *Sod2* were both less expressed in IEC from DIO mice than CTRL ones (**Figure 4.C**).



**Figure 4. DIO enhances antioxidant machinery of jejunal epithelial cells (IEC).** **A.** Detection of basal peroxides and cytosolic superoxide anions, respectively with H<sub>2</sub>DCFDA and DHE dyes labelling, of isolated IEC and normalized per DNA content. Results are expressed in percentage of CTRL ( $n=9$  for CTRL and DIO). **B.** Detection of peroxides after a 30 min H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (3 M) on isolated IEC with the H<sub>2</sub>DCFDA dye labelling. Results are expressed in percentage of basal values of peroxide detections ( $n=9$  for CTRL and DIO). **C.** mRNA relative expression of genes encoding for antioxidant enzymes in IEC. Values are presented as fold change relative to CTRL calculated by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method ( $n=15$  for CTRL and DIO). Results are means  $\pm$  SEM. Significant results are represented as \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.001$ , \*\*\* $P<0.001$  ( $n=9-15$  per group).

### **DIO enhances epithelial renewal and reduces mature enterocyte phenotype.**

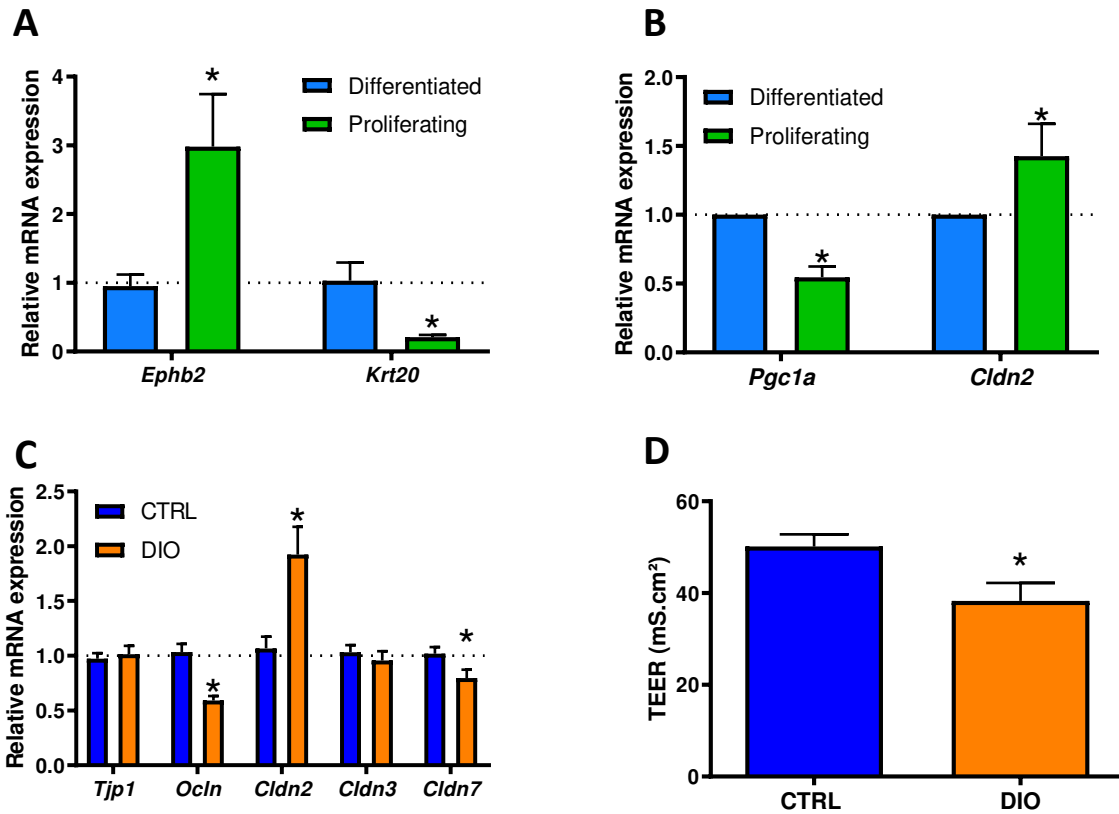
Morphometric analysis, performed on HES stained jejunal sections, showed 40% longer and 33% larger villi as well as 26% deeper crypts in the jejunum from DIO mice compared to CTRL ones (**Figure 5.A**). In line with these data, genes encoding proliferative markers (*Ephb2*; *Ki67*) were more expressed (**Figure 5.B**) whereas that of markers of differentiated absorptive enterocytes (*Anpep*; *Krt20*, *Glut2*, *Sglt-1*, *Gls*) and Paneth cells (*Reg3 $\gamma$* ) were all decreased by half in IEC from DIO mice compared to CTRL ones (**Figure 5.C**). Increase in *Glut5* expression (**Figure 5.C**) in DIO might be linked to enhanced fructose absorption, brought through drinking water. Concomitant to the increase in gene expression of proliferative markers, protein expression of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), involved in DNA replication during cell division, was 50% higher in IEC of DIO mice than that of CTRL, as showed by western blot analysis (**Figure 5.D**). In line with these hallmarks of increased IEC proliferation in DIO mice, the average number of IEC per villus was higher in DIO mice than CTRL mice (**Figure 5.E**).



**Figure 5. DIO enhances epithelial cell proliferation and reduces epithelial cell differentiation.** **A.** Histological analysis performed on haematoxylin eosin saffron staining of jejunal mucosa from CTRL and DIO mice displaying villus length, width, and crypt depths. **B.** mRNA relative expression of markers of stemness and proliferation **C.** mRNA relative expression of markers of differentiation in jejunal epithelial cells. Values are presented as fold change relative to CTRL calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. **D.** Protein expression of the proliferating cell nuclear antigen protein (PCNA) in jejunal epithelial cells determined by semi-quantitative analysis of western blot reported to the heat shock cognate protein 70 (Hsc70) expression. Values are expressed as percentage of CTRL. **E.** Number of jejunal epithelial cells per villus counted from DAPI (nuclei in blue) staining of jejunal mucosa. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. Significant results are represented as \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.001$  (n=6-15 per group).

### **DIO increases jejunal permeability through enhanced *Cldn2* expression in IEC.**

To evaluate the impact of enhanced proliferation / lower differentiation of IEC in DIO mice on gut barrier function, we first confirmed in mouse proliferative and differentiated organoids that IEC differentiation induces remodeling of *Cldn2* expression. As expected, proliferative organoids were characterized by greater *Ephb2* and lower *Krt20* expression compared to differentiated ones (**Figure 6.A**). Proliferative organoids also displayed lower expression of *Pgc1a* and increased expression of *Cldn2* compared to differentiated organoids (**Figure 6.B**). Accordingly, IEC from DIO mice displayed TJ remodeling: expression of genes encoding for the TJ proteins *Cldn7* and *Ocln* were decreased by 20 to 50% in DIO whereas that of *Cldn2* was 2-fold increased in IEC from DIO compared to CTRL mice (**Figure 6.C**). Finally, TEER measured with Ussing chambers was lower in the jejunum of DIO than CTRL mice (**Figure 6.D**), indicating a higher conductance to ions in accordance with *Cldn2* enhanced expression.



**Figure 6. DIO increases *Cldn2* expression in IEC harbouring an undifferentiated phenotype and increases epithelial permeability.** **A.** Relative mRNA expression of proliferation/differentiation markers and of **B.** *Pgc1a* and *Cldn2* in mouse differentiated and proliferating jejunal organoids. **C.** Relative mRNA expression of genes encoding for tight junction protein in jejunal epithelial cells. Relative mRNA expression is presented as fold change relative to CTRL calculated by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. **D.** Transepithelial electrical resistance of jejunal mucosa measured in Ussing chamber. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. Significant results are represented as \* $P < 0.05$  vs CTRL for *in vivo* data or vs differentiated organoids ( $n = 11-15$  mouse per group,  $n = 3-4$  different organoid lineages in proliferation and differentiated).

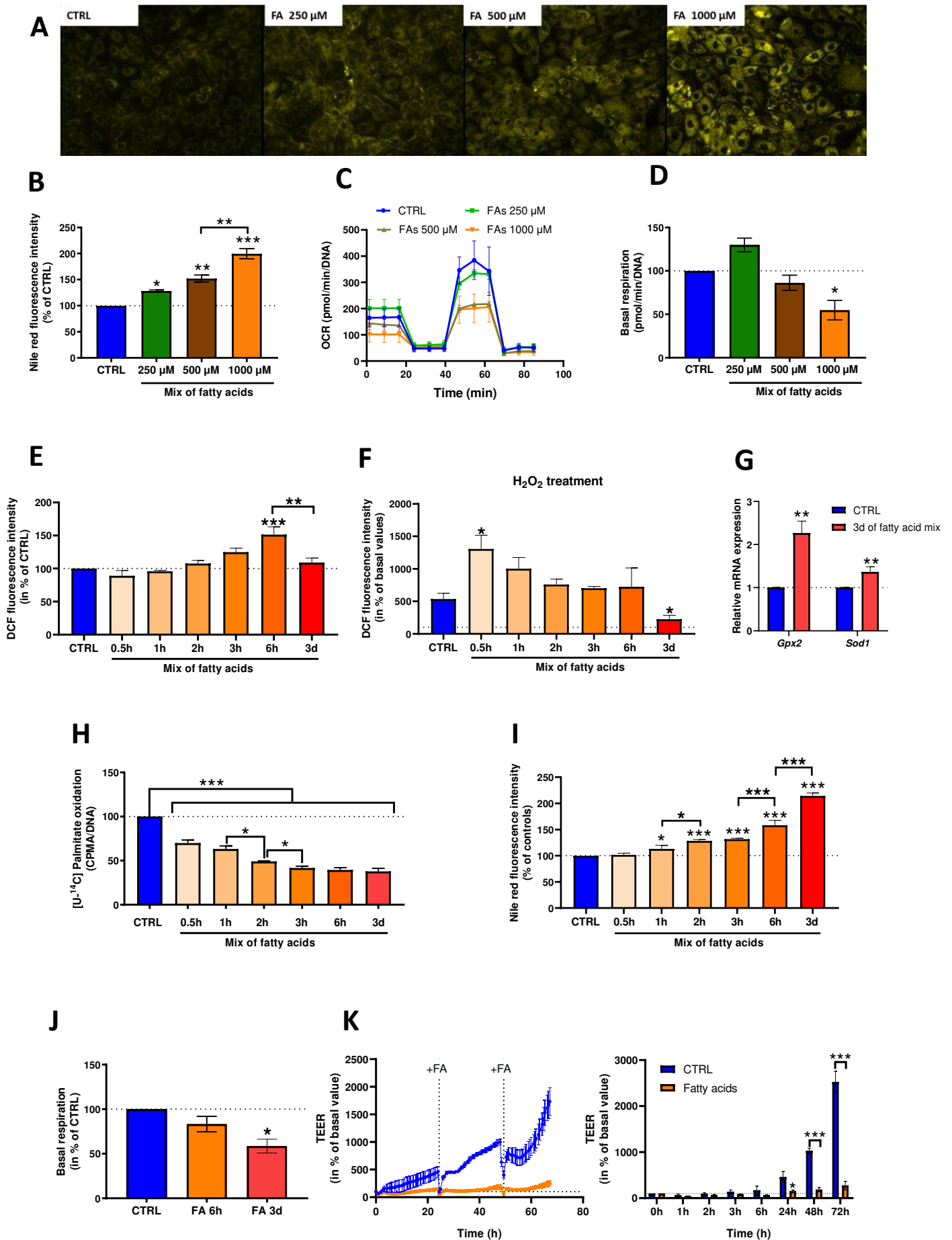
### **Reduced mitochondrial biogenesis associated with enhanced epithelial renewal and *Cldn2* expression is linked with TG accumulation in IEC.**

To determine whether TG accumulation was responsible of reduced mitochondrial biogenesis and differentiation in the jejunal epithelium of DIO mice, another model of obesity was used. It consisted in feeding mice for 12 weeks with a western diet (WD), characterized by lower lipid content than in DIO (DIO: 58% kcal vs WD: 45% kcal derived from fat). WD mice developed obesity marked by increased adiposity and hepatic steatosis whereas histology of jejunal mucosa did not display any TG accumulation. In this obesity model, mitochondrial function of IEC and *Pgc1a* expression were not modified by WD consumption compared to chow fed mice. Furthermore, the expression of genes encoding TJ proteins, including *Cldn2*, were unaltered in IEC from WD mice and the expression of proliferative markers was diminished in WD mice compared to chow fed mice (**Supplementary figure 1**).

### **Fatty acids induce rapid changes in lipid catabolism before provoking mitochondrial dysfunction and increased intestinal permeability in an *in vitro* model of enterocyte**

In order to simulate the effect of DIO on enterocytes using an *in vitro* model, we first evaluated the respective roles of dietary lipids or of the sugar-supplemented drinking water on IEC phenotype of DIO mice. The comparison of IEC lipid metabolism, bioenergetics and gene expression of mice receiving the obesogenic diet with either plain drinking water or sugar-supplemented drinking water revealed that sugar supplementation of drinking water was not involved in DIO IEC phenotype (**Supplementary Figure 2**). Thus, IPEC-J2 cells were only treated with fatty acids to simulate the obesogenic diet. IPEC-J2 cells were incubated with an equimolar mix of C12:0, C14:0, C16:0 and C18:0, the main fatty acids from the obesogenic diet used in this study. Treatment with the mix of fatty acids for 3 days induced lipid accumulation (**Figure 7.A**) in IPEC-J2 in a dose-dependent manner from 250 to 1000  $\mu$ M (**Figure 7.B**). Yet, mitochondrial function (**Figure 7.C**) was impaired only when cells were treated with fatty acids at 1 mM (**Figure 7.D**), with a 50% lower basal respiration as observed in IEC from DIO mice.





**Figure 7. Fatty acids induce rapid storage into enterocyte before it initiates mitochondrial dysfunction and increased epithelial permeability in IPEC-J2.** **A.** Nile red staining and **B.** evaluation of enterocyte steatosis by quantification of the fluorescence intensity of the IPEC-J2 after 3 days of treatment with different concentrations of an equimolar mix of C12:0, C14:0, C16:0 and C18:0. Data are represented in percentage of CTRL. **C.** OCR profile measured by Seahorse and **D.** basal respiration of IPEC-J2 cells after 3 days of treatment expressed in percentage of CTRL. **E.** Nile red staining of IPEC-J2 cells treated from 0.5 h to 3 days with the mix of fatty acids at 1 mM. Data are represented in percentage of CTRL. **F.** Basal peroxides, represented in percentage of CTRL, and **G.** peroxides after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, expressed in percentage of basal values, detected by the H<sub>2</sub>DCFDA dye after cells were treated from 0.5h to 3 days with the mix of fatty acids at 1 mM. **H.** mRNA relative expression of *Gpx2* and *Sod1* after 3 days of treatment with the fatty acid mix. Values are presented as fold change relative to CTRL calculated by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. **I.**  $\beta$ -oxidation of [U-<sup>14</sup>C]palmitic acid after cells were treated from 0.5h to 3 days with the mix of fatty acids at 1 mM. Data are expressed in percentage of CTRL. **J.** Basal mitochondrial respiration determined by Seahorse of IPEC-J2 treated for 6h or 3 days of the fatty acid mix at 1 mM. **K.** Evolution of transepithelial electrical resistance (TEER) from the onset of fatty acid treatment (Time=0h) to 3 days. Fatty acid treatment was renewed every 24h. **L.** TEER measures at 0h, 1h, 2h, 3h, 6h, 24h, 72h and 3 days. TEER data are expressed in percentage of the value before the first treatment for each condition. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. Significant results are represented as \*P<0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P<0.001 (n=3-4).

To better characterize the succession of events that initiates mitochondrial dysfunction, IPEC-J2 were treated with 1 mM of the fatty acid mix, from 0.5h to 3 days. First, fatty acids were stored in a time dependent manner, from 1h of treatment to 3 days (**Figure 7.E**). Secondly, ROS production was induced with a peak of generation at 6h and a return to basal levels at 3 days (**Figure 7.F**). Meanwhile, antioxidant machinery was induced, evaluated by the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> before peroxide detection, to be effective after 3 days of fatty acids treatments, whereas it was not effective after 0.5h of treatment, as indicated by increased peroxides detection compared to CTRL (**Figure 7.G**). Furthermore, mRNA relative expression of *Gpx2* and *Sod1* were increased after 3 days of treatment compared to CTRL (**Figure 7.H**). Yet, FAO capacity was reduced by 30% compared to CTRL from 0.5h of treatment and by 60% from 3h to 3 days (**Figure 7.I**). Basal mitochondrial respiration was not significantly altered after 6h while it was diminished by half after 3 days (**Figure 7.J**). TEER was measured along time from the beginning of the fatty acid treatment (**Figure 7.K**). Paracellular permeability was increased by fatty acid treatment from 24h to 3 days compared to CTRL (**Figure 7.L**).

## Discussion

The aim of this study was to characterize mitochondrial function and lipid metabolism in IEC in relation with intestinal epithelial cell homeostasis and epithelial permeability in a context of DIO in mouse. Here we show that excess dietary lipid consumption, reduces IEC mitochondrial number and oxidative capacity in mouse jejunum, concomitantly to altered lipid metabolism favoring enterocyte steatosis, independently of sugar in drinking water. Reduced expression of *Pgc1a* was associated with reduced differentiation and enhanced proliferation in intestinal epithelium of DIO mice, favoring a high expression of the pore forming *Cldn2* that ultimately led to increased intestinal permeability.

Accordingly to our results, one study have shown a decrease in *Pgc1a* in mouse enterocytes in response to 20 weeks of HFD (60% kcal from fats). However, the precise mechanisms that could explain the drop of *Pgc1a* expression have not been deciphered so far in the intestine. Our *in vitro* data revealed that diminished mitochondrial respiration is a downstream effect of lipid accumulation within enterocytes while *in vivo* data support the hypothesis of reduced mitochondrial respiration as the result of diminished mitochondrial biogenesis and *Pgc1a* expression compared to CTRL conditions. Accordingly, others have shown that HFD decreases expression, activity and assembly of ETC complexes from liver mitochondria associated with low ATP concentration (García-Ruiz et al., 2014). Likewise, it has been shown in muscle from obese rats that PGC1 $\alpha$  protein expression decreases in response to high TG synthesis while it increases when TG synthesis rate is diminished (Benton et al., 2006). Moreover, skeletal muscle from healthy subjects who received TG emulsion, and marked by elevated plasmatic concentrations of free fatty acids, display decreased *Pgc1a* expression as well as its downstream targets that encode for mitochondrial ETC subunits or  $\beta$ -oxidation enzymes (Richardson et al., 2005). Furthermore, PGC1 $\alpha$  protein expression is diminished by half in mouse fatty liver induced by feeding mice with a choline-deficient ethionine-supplemented diet, and is linked with decreased expression of gene encoding ETC subunits and mitochondrial mass (Aharoni-Simon et al., 2011). Decrease in mitochondrial content is also observed in the adipose tissue of obese subjects (Heinonen et al., 2015). Aharoni-Simon et al. have also shown that whereas *Pgc1a* gene expression diminishes in hepatocytes when mice are fed, whether with the control or the CDE diet, it increases after an overnight fast (Aharoni-Simon et al., 2011). This has been interpreted as a metabolic adaptation of the steatotic hepatocytes to compensate reduced mitochondrial number by stimulating mitochondrial biogenesis, FAO and energy production in fasting states. However, although *Pgc1a* expression is higher when CDE mice are fasted, its activity remained impaired in steatotic hepatocytes and marked by lower ATP concentrations and decreased expression of the PGC1 $\alpha$  target genes (Aharoni-Simon et al., 2011). Overall, studies, including ours in the

intestine, indicate that *Pgc1a* expression drops in response to overnutrition thus causing mitochondrial number and oxidative capacity reductions.

Although the precise mechanisms that lead to decreased *Pgc1a* expression is not well documented in DIO, it might be diminished in response to decreased AMP-activated protein kinase activity (AMPK). This *Pgc1a* transcriptional activator, is reduced in a context of high nutrient availability, such as dietary lipids, among which palmitic acid has been shown to inhibit AMPK expression and/or activity in aortic endothelial cells and vascular smooth muscle cells (Bharath et al., 2015; Joseph et al., 2015). Furthermore, palmitic acid has been shown to inhibit AMPK expression and/or activity by being converted in ceramide which activates protein phosphatases 2A and in turn dephosphorylates AMPK, on aortic endothelial cells and vascular smooth muscle cells. Hence, in response to high energy intake and fatty acids, AMPK activity in IEC might be decreased in our DIO model, reducing *Pgc1a* expression which might in turn decrease mitochondrial biogenesis and thus favoring lipid storage. Besides, SIRT3 has been shown to induce *Pgc1a* expression in several tissues, including cardiomyocytes (Xin et al., 2020) and skeletal muscle (Palacios et al., 2009), whose gene expression was also reduced in IEC from DIO mice compared to CTRL. However, Ramachandran *et al.* showed, that *Pgc1a* expression in IEC from HFD fed mice with IEC specific Sirt3-overexpression is still lower compared to animals fed a control diet (Ramachandran et al., 2017), thus dismissing the hypothesis of lower *Pgc1a* expression due to altered Sirt3 expression in IEC from DIO mice.

Diminished FAO capacity and enhanced lipid storage in the intestine may represent an adaptative response to avoid systemic hyperlipidemia. Indeed, Uchida *et al.* showed that gavaging mice with olive oil after they were fed with HFD (60% kcal from fat) for 6 weeks decreased mRNA expression of genes involved in lipolysis and chylomicron synthesis compared to control mice gavaged the same way (Uchida et al., 2012). This is in line with the diminished expression of *Dgat2* and *ApoB* in the IEC of our DIO mice. Collectively, our data indicated enhanced lipid entrance and storage in enterocytes and decreased FAO and export. Yet, this metabolic adaptation seems to occur only above a certain amount of lipids and/or diet duration. Indeed, acute exposure to lipids of lean mice or HFD (30% kcal from fat) feeding on a short time (2 weeks) resulted in increased expression of genes involved in fatty acid catabolism, TG and chylomicron synthesis as well as elevated FAO capacity (Kondo et al., 2006). Similarly, when using a diet with lower amount of fat (DIO: 58% kcal vs WD: 45% kcal from fat) and a shorter period (DIO: 22 weeks vs WD: 12 weeks), IEC did not display any CLD nor diminished *Pgc1a* expression or mitochondrial dysfunction. On the contrary, these alterations were already apparent as short as after 3 days of diet in the DIO group in our study (data not shown). Likewise, *in vitro* mitochondrial dysfunction was induced only in response to high concentration of fatty acids. This thereby underlines the fact that reduced mitochondrial biogenesis in IEC is provoked by overnutrition in response to overnutrition.

Although excess lipid intake diminishes mitochondrial number in enterocytes and may segregate them due to the important area they represent, spare respiratory capacity and coupling efficiency of mitochondria from IEC of DIO mice were higher compared to CTRL. Increased spare respiratory capacity indicates a better ability of IEC from DIO mice to respond to a high energetic demand and to produce ATP more efficiently than mitochondria from IEC of CTRL mice. Hence, fatty acids stored in CLD might be mobilized in a context of metabolic stress and used as an energetic substrate. Besides, D'Aquila *et al.* identified mitochondrial proteins involved in FAO in isolated fractions of CLD only in CLD from HFD fed mice but not in CTRL ones after both groups had been gavaged with olive oil (D'Aquila *et al.*, 2019). It thereby indicates an association between CLD and mitochondria as well as a metabolic adaptation of enterocytes from HFD mice to initiate a shift toward lipid catabolism to counteract excessive lipid accumulation, despite the reduced FAO capacity that may occur in steatotic enterocyte. Indeed, mitochondria that are bound to CLD have been also identified in adipocytes. These mitochondria displayed greater oxidative capacity and ATP production compared to cytoplasmic mitochondria, but presented reduced FAO capacity and rather used ATP to synthesize TG (Benador *et al.*, 2018).

Intestinal epithelium from DIO mice was marked by increased proliferation and diminished expression of differentiation markers, indicating higher number of transit-amplifying cells compared to CTRL mice. This is in accordance with recent works which showed that enhanced HFD consumption augments ISC proliferation and intestinal stemness by activating PPAR $\delta$  and PPAR $\alpha$  (Mana *et al.*, 2021). Stemness enhancement and reduced differentiation of IEC in DIO might be linked to the observed reduced mitochondrial function of IEC. Indeed, IEC differentiation into mature phenotype necessitates high OXPHOS activity that stimulates the ROS-driven p38 mitogen-activated protein kinases activation. It is thus conceivable that diminished OCR associated with high induction of antioxidant machinery in IEC from DIO mice impaired IEC differentiation by preventing the induction of the ROS-driven p38 signaling pathway.

Consistent with the increased number of undifferentiated IEC in intestine from DIO mice, *Cldn2* expression was increased and likely participated to the lower TEER observed in the jejunum from DIO mice (Luettig *et al.*, 2015). Accordingly, we showed *in vitro* that 24h of treatment with a mix of fatty acids induced an increase in epithelial permeability. Similarly, others showed that HFD induces TJ restructuring and lower expression of genes encoding nonpermissive Cldn while *Cldn2* expression was increased. Moreover, besides its role in paracellular permeability, overexpression of *Cldn2* has been shown to enhance IEC proliferation as a downstream effect in the colon of transgenic mice (Ahmad *et al.*, 2014) and *in vitro* on colon cancer cell lines (Dhawan *et al.*, 2011), which might accentuate and perpetuate the HFD-induced increase in IEC proliferation.

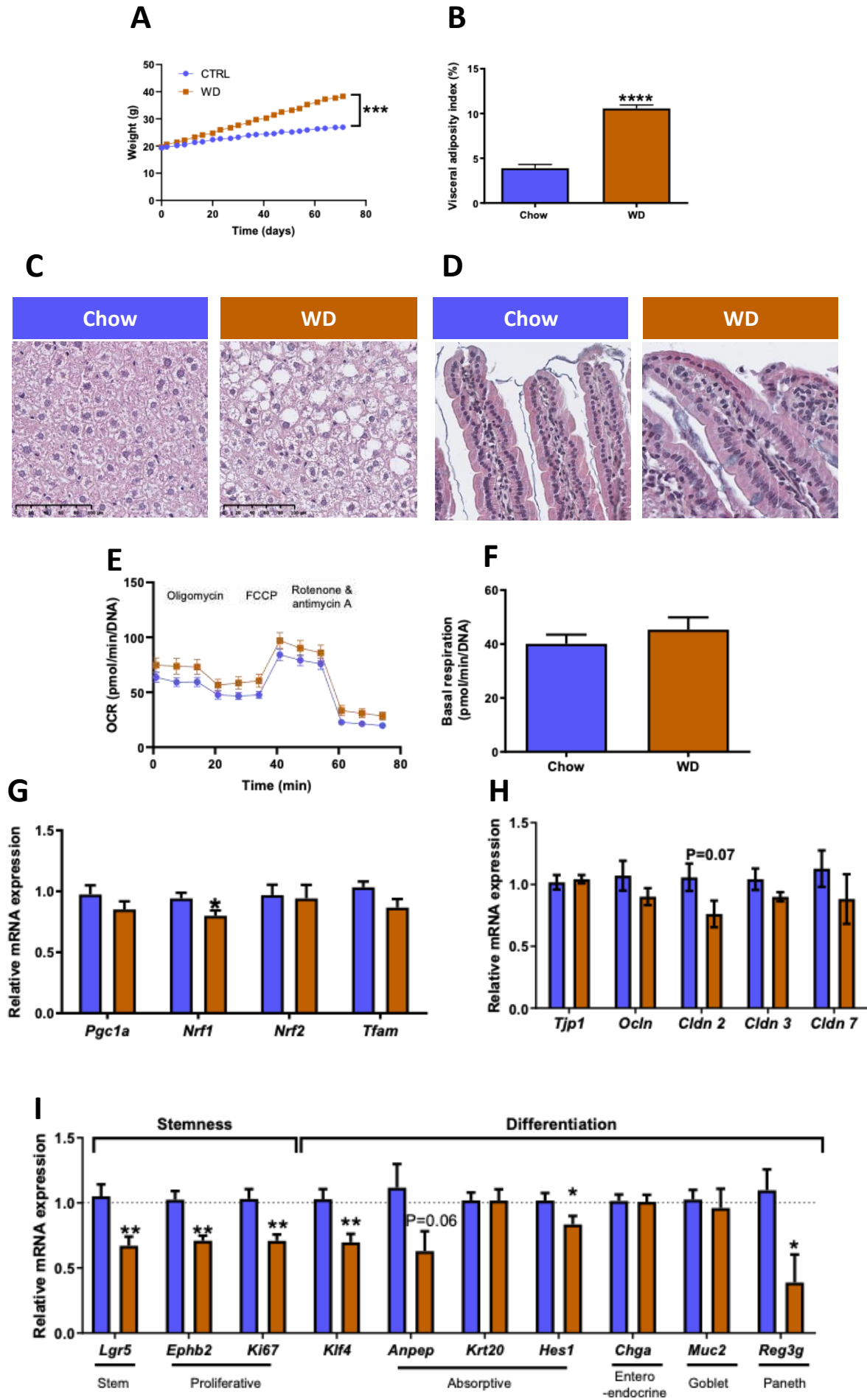
In conclusion, we showed that excessive consumption of lipids induces a decrease in mitochondrial number and in FAO capacity in jejunal enterocytes from obese mice, mediated by low expression of *Pgc1a*. The diminished mitochondrial biogenesis participates to the loss of epithelial homeostasis by favoring enhanced proliferation and immature phenotype at the expense of differentiation into mature IEC. Immature phenotype is accompanied by increased expression of the leaky claudin 2, likely increasing jejunal permeability that characterizes obesity and aggravates metabolic syndrome.

## Supplemental materiel and methods

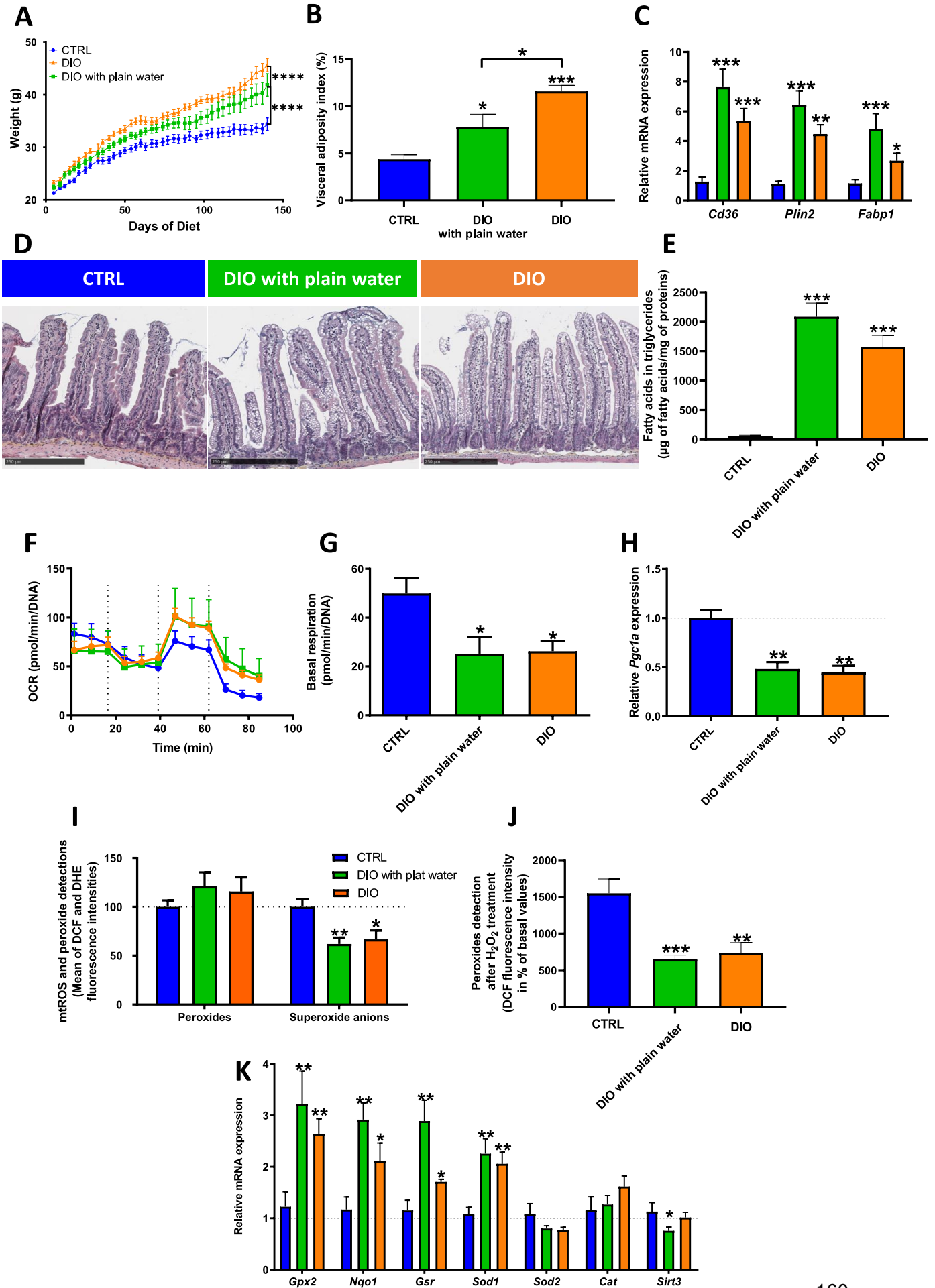
### Animal experiments

Effect of lipid content of the diet on IEC metabolism was determined on male 4-week-old C57BL/6N mice (n=24), from Envigo (Gannat, France) which were housed by group of 4 per cage at 20°C with a 12:12 h light-dark cycle. After a week with a chow diet (Envigo, Teklad Global 16% Protein Rodent Diet), mice received *ad libitum* whether the chow diet (Chow, 5% kcal from fat, n=12) or a western diet (WD, D12451, 45% kcal from fat, n=12). Euthanasia of mice, tissue collection and IEC isolation were performed as described in *Material and methods*. To determine the effect of sugar supplementation in drinking water, C57BL/6J mice received *ad libitum* a CTRL diet or an obesogenic diet with tap water (DIO with tap water, n=9) or with water supplemented with carbohydrates similar to the DIO group from this study (DIO, 45% sucrose and 55% fructose at a concentration of 42 g/L n=9). Euthanasia of mice, tissue collection and IEC isolation were performed as described in *Material and methods*.





**Supplementary figure 1. Reduced lipid content in the diet prevents enterocyte steatosis and enterocyte mitochondrial dysfunction in association with reduced proliferation in the jejunum from another model of DIO mice.** C57BL6N mice received a chow diet or a western diet (WD) for 12 weeks (see supplemental material and methods). **A.** Mouse body weight evolution along the 12 weeks of Chow diet or WD consumption. **B.** Weight of peritoneal, epididymal and abdominal fat pads expressed in percentage of mouse body weight. **C.** HES staining of liver or **D.** jejunal mucosa. **E.** OCR profiles and **F.** basal mitochondrial respiration of isolated IEC from mouse jejunum. **G.** Relative mRNA expression of mitochondrial biogenesis regulators **H.** gene encoding tight junction proteins. **I.** mRNA relative expression of markers of stemness and differentiation in jejunal epithelial cells. Relative gene expressions are presented as fold change relative to Chow calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. Significant results are represented as \*P<0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P<0.001



**Supplementary figure 2. Sugar-supplemented drinking water is not involved in enterocyte steatosis, mitochondrial dysfunction and increased antioxidant machinery observed in jejunal enterocytes from DIO mice.** **A** Mouse body weight evolution along the 22 weeks of control diet (CTRL) consumption or obesogenic diet with plain water (DIO with plain water) or water supplemented with fructose and sucrose at 42 g/L (DIO). **B**. Weight of peritoneal, epididymal and abdominal fat pads expressed in percentage of mouse body weight. **C**. mRNA relative expression of *Cd36*, *Plin2* and *Fabp1* of mouse IEC. **D**. HES staining of jejunal mucosa. **E**. Quantification of fatty acids from triglycerides of jejunal epithelial cells. **F**. OCR measures by Seahorse and **G**. basal respiration. **H**. *Pgc1a* relative expression of mouse IEC. **I**. Detection of basal peroxides and cytosolic superoxide anions with H<sub>2</sub>DCFDA and DHE dyes labelling, respectively, in isolated IEC. Results are expressed in percentage of CTRL. **J**. Detection of peroxides after a 30 min H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (3 M) of isolated IEC with the H<sub>2</sub>DCFDA dye labelling. Results are expressed in percentage of basal values of peroxide detections. **K**. mRNA expression of genes encoding for antioxidant enzymes in IEC. Relative mRNA values are presented as fold change relative to CTRL calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Results are means  $\pm$  SEM. Significant results are represented as \*P<0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P<0.001 (n=9 per group).

## Partie II.2 : La consommation d'un régime obésogène induit une stéatose entérocytaire, une diminution de l'expression de *Pgc1a* et une activation de la machinerie antioxydante dès 3 jours chez la souris

---

### Contexte

Vingt-deux semaines de consommation d'un régime obésogène provoquent une stéatose entérocytaire chez la souris, associée à une induction de la machinerie antioxydante et une diminution du nombre de mitochondries, notamment médiée par la diminution de l'expression de *Pgc1a* tel qu'exposé dans la partie II.1. Nous nous sommes demandé si ces altérations étaient dues à la chronicité du régime et/ou si nous retrouvions ces mêmes effets sur des temps plus courts. Néanmoins, aucune donnée dans la littérature ne décrit pour le moment l'effet provoqué par la consommation d'un régime obésogène sur ces paramètres d'intérêt au bout de quelques jours.

### Objectif

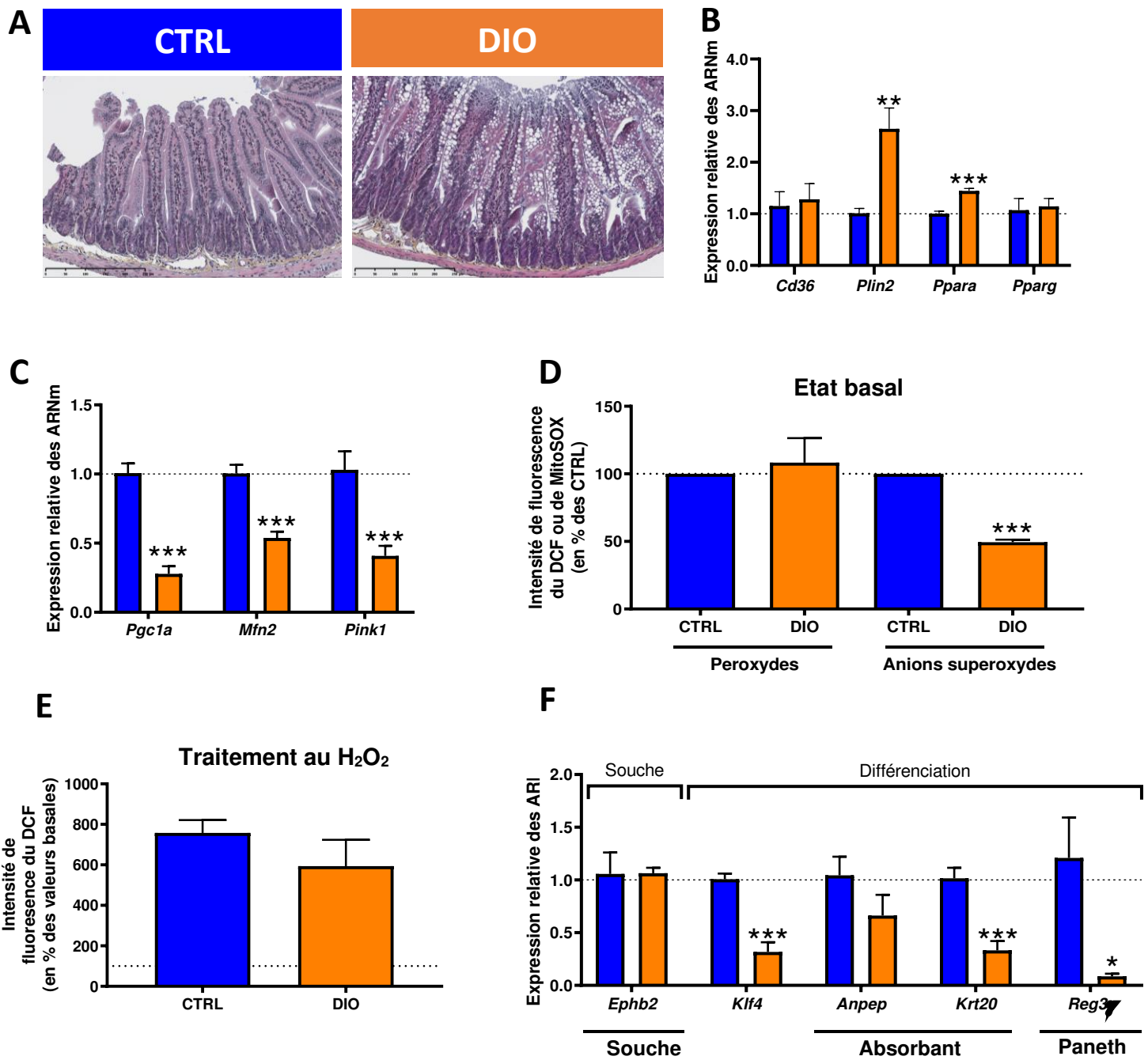
L'objectif de cette partie était de déterminer les effets provoqués par la consommation d'un régime obésogène sur la stéatose entérocytaire, l'expression de *Pgc1a* et l'induction de la machinerie antioxydante.

### Matériel et méthodes

Le matériel et les méthodes ayant servi à l'obtention des résultats présentés dans cette partie correspondent à celui présenté dans la partie II.1.

## Résultats

L'analyse histologique de la muqueuse jéjunale par coloration HES montre que les souris DIO présentent déjà après 3 jours de régime une stéatose entérocytaire (**Figure 29.A**) ainsi qu'une augmentation de l'expression de *Plin2* et de *Fabp1* (**Figure 29.B**). De plus, l'expression relative de *Pgc1a* est réduite de 60 % dans les CEI des souris DIO par rapport aux CTRL dès 3 jours de régime, de même que pour *Mfn2* et *Pink1* (**Figure 29.C**). Ces données d'expression de gènes suggèrent donc que le nombre de mitochondries, ainsi que la fusion et la mitophagie, pourraient être diminués dès 3 jours de consommation d'un régime obésogène. Cependant une caractérisation de la fonction mitochondriale avec le Seahorse serait nécessaire pour confirmer cette hypothèse. La détection des ERO des CEI a également révélé que, comme cela a été le cas après 22 semaines de régime, la quantité des peroxydes à l'état basal est similaire entre les groupes tandis que celle des anions superoxydes, détectés avec MitoSOX, est moindre dans les CEI des souris DIO (**Figure 29.D**), suggérant une induction de la machinerie antioxydante et/ou une diminution du nombre de mitochondries. Cependant, la détection des peroxydes après l'induction d'un stress oxydant par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'a pas montré de différence entre les groupes et indiquerait que la machinerie antioxydante n'est pas aussi opérationnelle à 3 jours de régime qu'à 22 semaines (**Figure 29.E**). Enfin, l'expression des marqueurs de prolifération et de différenciation montre que 3 jours de consommation du régime obésogène suffisent à diminuer l'expression de *Klf4*, *Krt20* et de *Reg3γ* chez les souris DIO. Ceci pourrait indiquer un défaut précoce de maturation des CEI (**Figure 29.F**).



**Figure 29. La consommation d'un régime obésogène dès 3 jours suffit à induire une stéatose entérocytaire associée à une induction de la machinerie antioxydante, une altération de la dynamique mitochondriale et la diminution du phénotype différencié.**

**A.** Coloration hématoxyline éosine safran de la muqueuse jéjunale de souris CTRL et consommant un régime obésogène (DIO) pendant 3 jours. **B.** Expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et **C.** régulant la dynamique mitochondriale dans les cellules épithéliales jéjunales. **D.** Détection des peroxydes à l'état basal, par la sonde H<sub>2</sub>DCFDA, et des anions superoxydes mitochondriaux, avec MitoSOX, des cellules épithéliales jéjunales isolées après 3 jours de régime. Les données ont été normalisées au Hoechst et exprimées en pourcentage des CTRL. **E.** Détection des peroxydes après l'induction d'un stress oxydant par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 M) sur des cellules épithéliales jéjunales isolées et normalisées par le Hoechst. Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs basales. **F.** Expression relative des marqueurs de caractère souche ou différencié des cellules épithéliales intestinales après 3 jours de régime DIO. (N=4 souris par groupe et par temps).



## Conclusion

Trois jours de consommation du régime DIO (utilisé dans la partie II.1), suffisent à induire une stéatose entérocytaire et l'activation de la machinerie antioxydante. De plus, l'expression de gènes régulant la dynamique mitochondriale, incluant *Pgc1a*, est diminuée après 3 jours de consommation du régime DIO et indiquerait une adaptation mitochondriale précoce des CEI face à l'accumulation des TG. Le phénotype observable à 22 semaines chez les souris DIO est par conséquent très similaire à celui observé après quelques jours de consommation d'un régime obésogène. Néanmoins, ni la fonction mitochondriale ni la perméabilité intestinale n'ont été évaluées sur de courtes périodes de consommation d'un tel régime dans nos expérimentations.

## Partie II.3 : Un traitement avec des acides gras stéarique et oléique induit une accumulation lipidique et une dysfonction mitochondriale dans un modèle murin d'organoïdes de jéjunum en prolifération et différenciés.

---

### Contexte

La consommation d'un régime obésogène pendant 22 semaines a provoqué des perturbations mitochondriales dans les cellules épithéliales intestinales jéjunales. Afin de mieux appréhender les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les perturbations mitochondriales associées à l'accumulation lipidique, un modèle d'organoïdes intestinaux a été utilisé. Ces derniers constituent une structure 3D dérivée de cellules souches multipotentes adultes, auto-organisée, se différenciant en cellules fonctionnelles multi-lignages et constituant un outil *in vitro* qui permet d'évaluer dans un modèle, simplifié mais représentatif de l'intestin, la fonction mitochondriale des CEI. Cette méthode rentre de plus dans la règle des 3R en Réduisant le nombre d'animaux utilisés et en Remplaçant l'expérimentation animale par un modèle *in vitro*. Les organoïdes sont également un modèle plus fidèle du métabolisme des CEI. En effet, les lignées classiques de CEI *in vitro* - T84, HT-29, Caco-2 – sont issues de cellules cancéreuses humaines et présentent un métabolisme basal plutôt glycolytique qu'aérobie.

### Objectifs

L'objectif du projet est de modéliser la stéatose entérocytaire dans des organoïdes intestinaux et de déterminer si un fort apport en acides gras, comme c'est le cas chez la souris obèse, est à l'origine des perturbations mitochondriales des CEI observée *in vivo*.

### Matériel et méthodes

#### Isolement des cryptes jéjunales et mise en culture

Les CEI, sous forme de cryptes et de villosités, ont été isolées à partir de jéjunum de souris C57BL6J mâles âgées de 5 semaines comme précédemment décrit (O'Rourke et al., 2016). Une fois les cellules en suspension dans du Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), elles ont été filtrées à travers un tamis de 70  $\mu\text{m}$  (VWR International, 2572267) afin de ne conserver que les cryptes en suspension. Les cryptes récoltées ont été comptées puis centrifugées à 200xg pendant 5 min à 4°C. Le surnageant a été aspiré et les cryptes ont été reprises dans 6 mL d'Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 (ADF ; ThermoFisher Scientific, 12634010). Un volume suffisant de cryptes a été prélevé afin d'ensemencer 250 cryptes après centrifugation de la suspension à 200xg pendant 5 min, par dôme de 30  $\mu\text{L}$  de Matrigel (Matrigel Corning® Growth Factor Reduced Basement Membrane Matrix, 354230,

Corning) par puits. La plaque a ensuite été retournée et placée à l'incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> pendant 10 min pour permettre au Matrigel de se solidifier sous forme de dôme. 500 µL de milieu de culture d'organoïdes (dit « *minigut* ») par puits ont ensuite été déposés, additionnés de Y-27632 à 10 mM (Sigma, Y0503) et d'*Epidermal Growth Factor* à 8 mM (EGF ; Sigma, E9644). Le milieu *minigut* est composé à moitié d'ADF supplémenté avec pénicilline/streptomycine (2% ; P/S, ThermoFisher Scientific, 15140122), d'HEPES (1%), L-Glutamine (1% ; ThermoFisher Scientific ; A2916801) et de Sérum de Veau Fœtal (SVF ; 20% ; Hyclone, SH30066.03) et l'autre moitié est du milieu conditionné de cellules L-WRN, cultivées dans du DMEM GlutaMAX (ThermoFisher Scientific, 31966-021) avec SVF (10%), récolté toutes les 24 heures pendant 4 jours.

### **Entretien de la culture d'organoïdes**

Les organoïdes sont cultivés pendant les premières 24h dans du milieu *minigut* supplémenté en Y-27632 et en EGF. Après ces 24h, le milieu de culture est remplacé tous les 2-3 jours par du *minigut* avec EGF pour maintenir la prolifération des cellules. Les organoïdes sont ensuite repiqués une fois par semaine au 1:4 (puits:puits). Le repiquage des organoïdes est réalisé par ajout de *gentle cell dissociation reagent* (GCDR ; 07174, Stemcell), après avoir retiré le milieu de culture, pendant 1 min à température ambiante. Des pipetages successifs du GCDR sur le dôme de Matrigel sont réalisés afin de le casser et de récolter les organoïdes. Le contenu de chaque puits est mélangé et mis sous agitation douce pendant 10 min à température ambiante. La suspension est ensuite centrifugée à 290xg pendant 5 min à 4°C puis le culot est repris dans de l'ADF supplémenté avec P/S (2%), HEPES (1%) et SVF. Une dizaine d'aspirations et refoulements successifs à la pipette permettent de casser les organoïdes. La suspension est ensuite centrifugée à 290xg pendant 5 min à 4°C puis le culot est repris dans du Matrigel et déposé sur plaque de la même façon que lors de l'ensemencement.

### **Induction de la différenciation**

Avant traitement, les organoïdes sont maintenus en milieu de prolifération *minigut*+EGF pendant 4 jours. La différenciation est ensuite induite pendant 48h avant traitement en cultivant les organoïdes dans du milieu *minigut*+EGF dilué au 1:10 (vol :vol) dans du milieu ADF supplémenté avec P/S, HEPES, L-Glutamine et SVF dans les mêmes proportions que citées précédemment. Pour les conditions où les organoïdes sont en prolifération, le milieu *minigut*+EGF est utilisé pendant ces 48h.

### **Traitement aux acides gras**

A l'issue des 48h de différenciation ou de maintien de la prolifération, les organoïdes sont traités pendant 24h avec un mélange d'acides gras stéarique et oléique, repris dans 0,8% de DMSO, à 150  $\mu$ M chacun dans du milieu de prolifération ou de différenciation selon la condition. Ce mélange d'acides gras est connu pour induire une stéatose hépatique sur le modèle *in vitro* HepaRG après deux semaines de culture (Bucher et al., 2018). Les organoïdes contrôles sont traités avec du DMSO à 0,8% (concentration ayant servi à reprendre le mélange d'acides gras) sur la même période.

### **Analyse de la fonction mitochondriale des organoïdes par la technologie Seahorse**

Les organoïdes ont été récoltés de la même façon qu'au cours du repiquage précédemment décrit. Ainsi, après la dernière centrifugation à 290xg pendant 5 min à 4°C, le culot a été repris dans 200  $\mu$ L de milieu Seahorse (Agilent Technologies, 102353-100) complété par 1mM de pyruvate (Agilent Technologies, réf. 103578-100), 10mM de glucose (Agilent Technologies, réf. 103577-100) et 2mM de L-glutamine (Agilent Technologies, réf. 103579-100). La suspension d'organoïdes est ensuite déposée sur une plaque Seahorse XFe24, préalablement pré-coatée au Matrigel dilué au 1 :10 (vol/vol) dans du milieu Seahorse. La plaque a ensuite été incubée 45 min à 37°C dans un incubateur sans CO<sub>2</sub>. L'analyse de la fonction mitochondriale a été réalisée à l'aide du kit Cell Mito Stress Test (Agilent, 103015-100) aux concentrations finales suivantes : Oligomycine (2  $\mu$ M), Carbonyl cyanide-4-phenylhydrazone (FCCP ; 0,5  $\mu$ M) et Antimycine A et Rotenone (0,5  $\mu$ M). Les résultats ont été normalisés par marquage au Hoechst 33258 (ThermoFisher, H3569) après fixation des organoïdes au paraformaldéhyde 4%.

### **Mesure de l'expression génique**

Les organoïdes ont été récoltés comme précédemment décrit puis repris dans du tampon de lyse RA1 fourni dans le kit d'extraction d'ARN (Macherey-Nagel, 740955.250). Les ARN totaux ont ensuite été extraits en suivant les indications du fabricant et dosés à l'aide d'un spectromètre ND-1000 (Nanodrop). L'ADNc a été synthétisé à l'aide du *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (4368814, Thermo Fisher Scientific) afin d'obtenir 1  $\mu$ g d'ADNc pour chaque échantillon dans 20  $\mu$ L d'eau (Thermo Fisher Scientific, 10977035). Les ADNc ont été dilués au 1:10 dans de l'eau et ont été utilisés pour la PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) sur des plaques à 384 puits, avec 10  $\mu$ g d'ADNc et 8  $\mu$ L du kit PowerSYBR green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, 4368813) par puits. L'expression des gènes d'intérêt a été analysée par la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  avec Hypoxanthine Phospho Ribosyl Transferase 1 (*Hprt1*) comme gène de référence.

**Tableau 10 : Liste des primers murins utilisées pour la RT-qPCR**

<b>Gène</b>	<b>Nom complet</b>	<b>Primers forward et reverse</b>
<b>Lgr5</b>	<i>Leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5</i>	GGACCAGATGCGATACCGC CAGAGGCGATGTAGGAGACTG
<b>Ephb2</b>	<i>Eph receptor B2</i>	GCGGCTACGACGAGAACAT GGCTAAGTCAAATCAGCCTCA
<b>Krt20</b>	<i>Keratin 20</i>	TTCAGTCGTCAAAGTTTTCCACCG TCCTATACAGCGAGCCACTCA
<b>Anpep</b>	<i>Aminopeptidase</i>	ATGGAAGGAGGCGTCAAGAAA CGGATAGGGCTTGGACTCTTT
<b>Muc2</b>	<i>Mucine 2</i>	TGTGGAACCGGGAAGATG GACCACAGGTATGGTTCTGGA
<b>Reg3g</b>	<i>Regenerating Family Member 3 Gamma</i>	TTCCTGTCCTCCATGATCAAA CATCCACCTCTGTTGGGTTT
<b>Cd36</b>	<i>Fatty acid translocase</i>	GCATTGGCTGGAAGAACAAAAC CCTCTGACATTTGCAGGTCTATC
<b>Plin2</b>	<i>Perilipin 2</i>	ATCTAAGCCGCTGCACACACT AGAACGCGGATATGTTTGCTG
<b>Fabp1</b>	<i>Fatty acid binding protein 1</i>	AGGAGTGCGAACTGGAGACCAT GTCTCCATTGAGTTCAGTCACGG
<b>Nd1</b>	<i>NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 1</i>	ATTACTTCTGCCAGCCTGACC GGCCCGTTTTGTTTCTGCTA
<b>Sdhb</b>	<i>Succinate Dehydrogenase Subunit D</i>	GTGAACGGCATTGGTAAAG GCTCTGTGGTGGACTACTCTC
<b>Cox4</b>	<i>Cytochrome C Oxidase Subunit 4I1</i>	AGTGTGTGAAGAGTGAAGAC GCGGTACAACCTGAACCTTCTC
<b>Atp5b</b>	<i>ATP Synthase F1 Subunit Beta</i>	GGCGACATTGTTGATTAGC GTGTTGAGCAGGAGATTCTG
<b>Gpx2</b>	<i>Glutathione Peroxidase 2</i>	GAGAACGGGTCATCATAAGG TCGGACATCAGGAGAAGT
<b>Gsr</b>	<i>Glutathione-Disulfide Reductase</i>	GACACCTCTTCTTCGACTACC CACATCCAACATTCACGCAAG
<b>Nqo1</b>	<i>NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1</i>	CTCTCAAACCAGCCTTTTCAG CAACCCCATCATTTCCAG
<b>Pgc1a</b>	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha</i>	GCAGTCGCAACATGCTCAAG GGGAACCCTTGGGGTTCATTT
<b>Hprt</b>	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>	TCCATTCCCTATGACTGTAGATTTT ATCAG AAATTT TATGTCCCCCGTTGACT

### **Coloration des lipides neutres au Nile red**

Les organoïdes cultivés en dôme de Matrigel ont été fixés au paraformaldéhyde 4% puis marqués au Hoechst 33258. Après 2 rinçages au PBS chauffé à 37°C, les puits ont été colorés au Nile red (ThermoFisher, life technologies SAS) à 1 mg/mL dans du PBS pour marquer les lipides neutres. La fluorescence a ensuite été observée à l'aide d'un microscope Zeiss AX10 à la longueur d'onde 355 nm pour le Hoechst et 520 nm pour le Nile red.

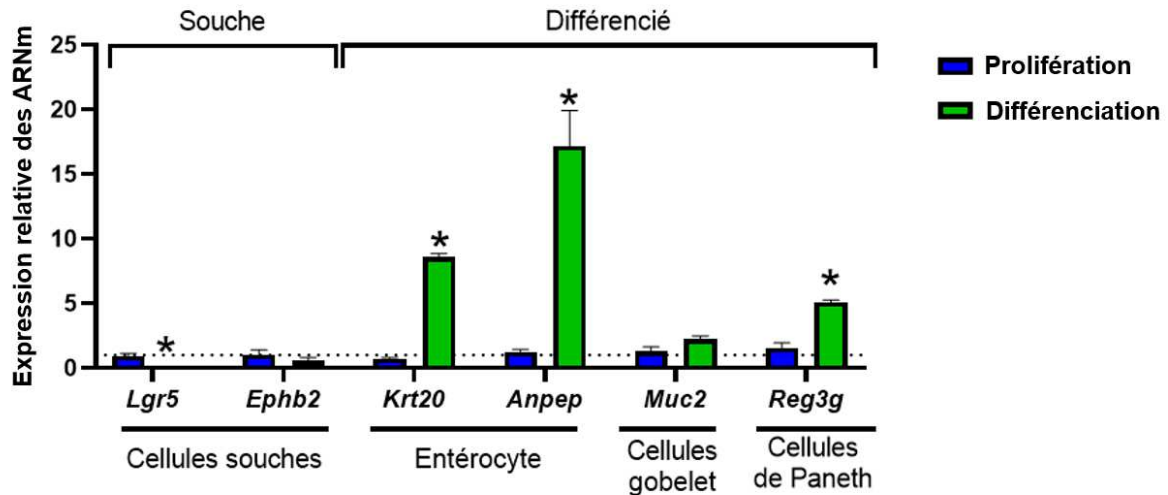
### **Analyse statistique**

Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de Student non pairé. Une valeur  $P \leq 0,05$  a été considérée comme significative. L'analyse des résultats ainsi que les figures ont été réalisées sur GraphPad Prism version 8.0.2.

## **Résultats**

### **L'induction de la différenciation des organoïdes jéjunaux augmente l'expression des marqueurs de CEI matures tandis que celle des marqueurs souches est diminuée.**

Nous avons dans un premier temps cherché à caractériser les organoïdes jéjunaux en fonction du milieu dans lequel ils étaient cultivés. Les organoïdes maintenus en prolifération pendant 4 jours puis cultivés dans un milieu de différenciation pendant 48h présentent une diminution de l'expression du marqueur souche *Lgr5*. Les marqueurs d'entérocytes matures et de cellules de Paneth sont quant à eux fortement exprimés dans les organoïdes dont la différenciation a été induite dans le milieu adéquat pendant 2 jours (**Figure 30**). Par conséquent, après 4 jours de croissance en milieu de prolifération, la culture des organoïdes pendant 48h dans un milieu appauvri en facteurs de niche de CSI, induit bien une différenciation en organoïdes jéjunaux matures.

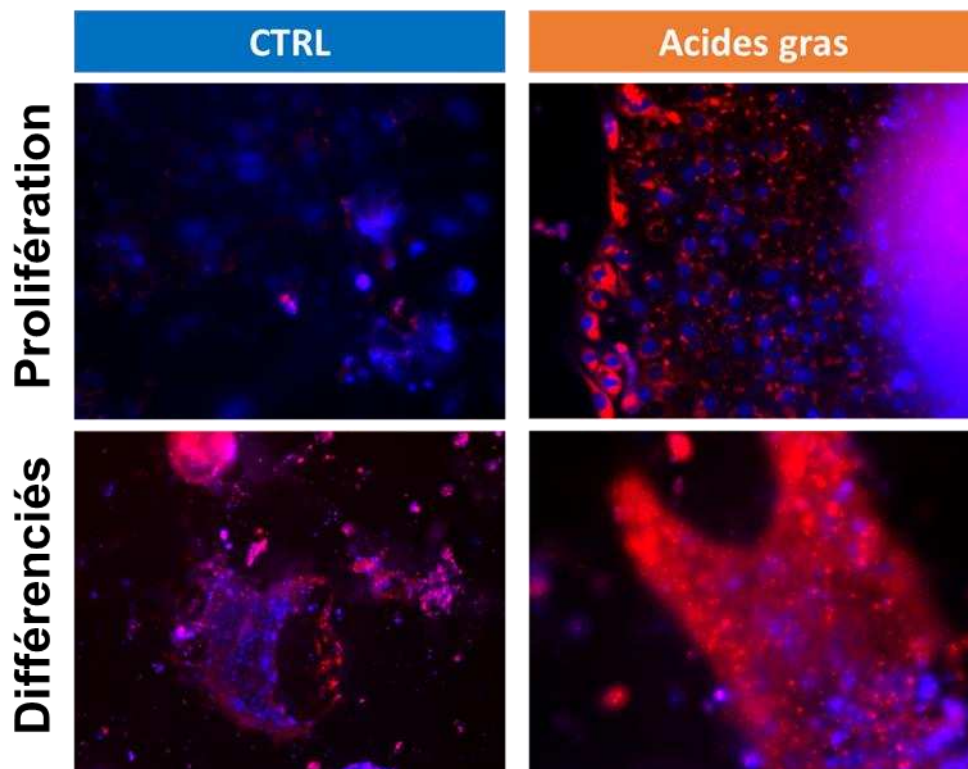


**Figure 30. Caractérisation d'organoïdes jéjunaux et de leur état de différenciation en fonction des conditions de culture.**

Expression relative des ARNm de marqueurs de cellules souches ou différenciées des organoïdes en milieu de différenciation calculée par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  en *changement relatif d'expression* par rapport aux organoïdes en prolifération. Les données sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences significatives sont représentées par \*P < 0,05 vs organoïdes en prolifération après un test Student. N=4 lignées différentes d'organoïdes pour chaque condition.

**Un traitement avec un mélange d'acides stéarique et oléique induit une augmentation de l'accumulation des lipides dans les organoïdes en prolifération et différenciés.**

Afin d'évaluer l'impact d'acides gras sur la fonction mitochondriale des organoïdes immatures et différenciés, un traitement de 24h avec les acides gras stéarique (C18:0 ; 150  $\mu$ M) et oléique (C18:1 ; 150  $\mu$ M) a été réalisé. L'observation qualitative de la coloration des lipides neutres par le *Nile red* montre une accumulation des acides gras dans les organoïdes traités, qu'ils soient en prolifération ou différenciés (**Figure 31**). Néanmoins, cette analyse demeure qualitative car la structure 3D des organoïdes empêche une mesure fiable de l'intensité de fluorescence au lecteur de plaque.



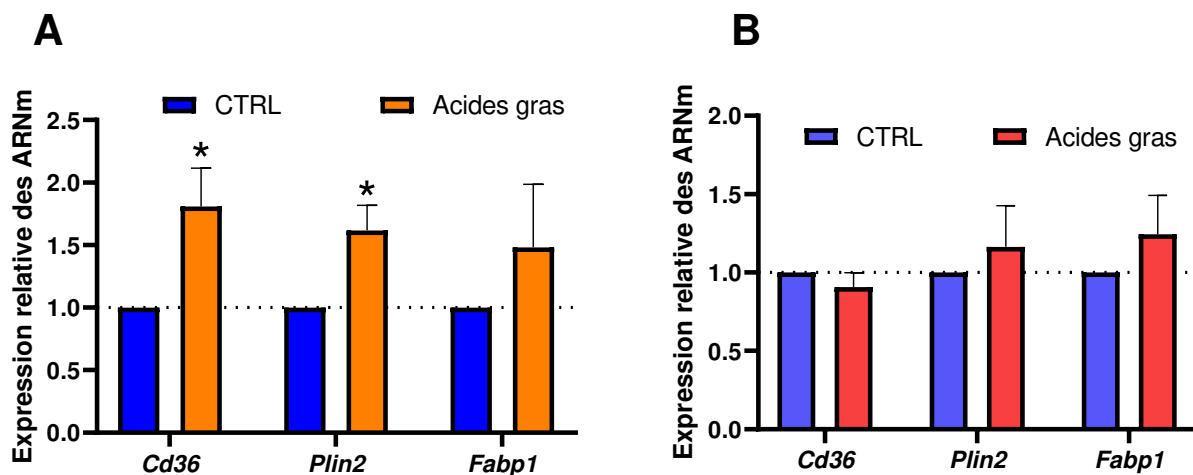
**Figure 31. Évaluation qualitative de la stéatose dans des organoïdes jéjunaux murins en prolifération et différenciés après un traitement de 24h avec du C18:0 et du C18:1 (150  $\mu$ M chacun).**

Images de microscopie à fluorescence après coloration des lipides neutres par le *Nile red* (rouge) des organoïdes jéjunaux en prolifération ou différenciés, contre-colorés avec du Hoechst (noyaux en bleu).



**Un traitement avec un mélange d'acides stéarique et oléique induit une augmentation de l'expression de *Cd36* et de *Plin2* uniquement dans les organoïdes en prolifération.**

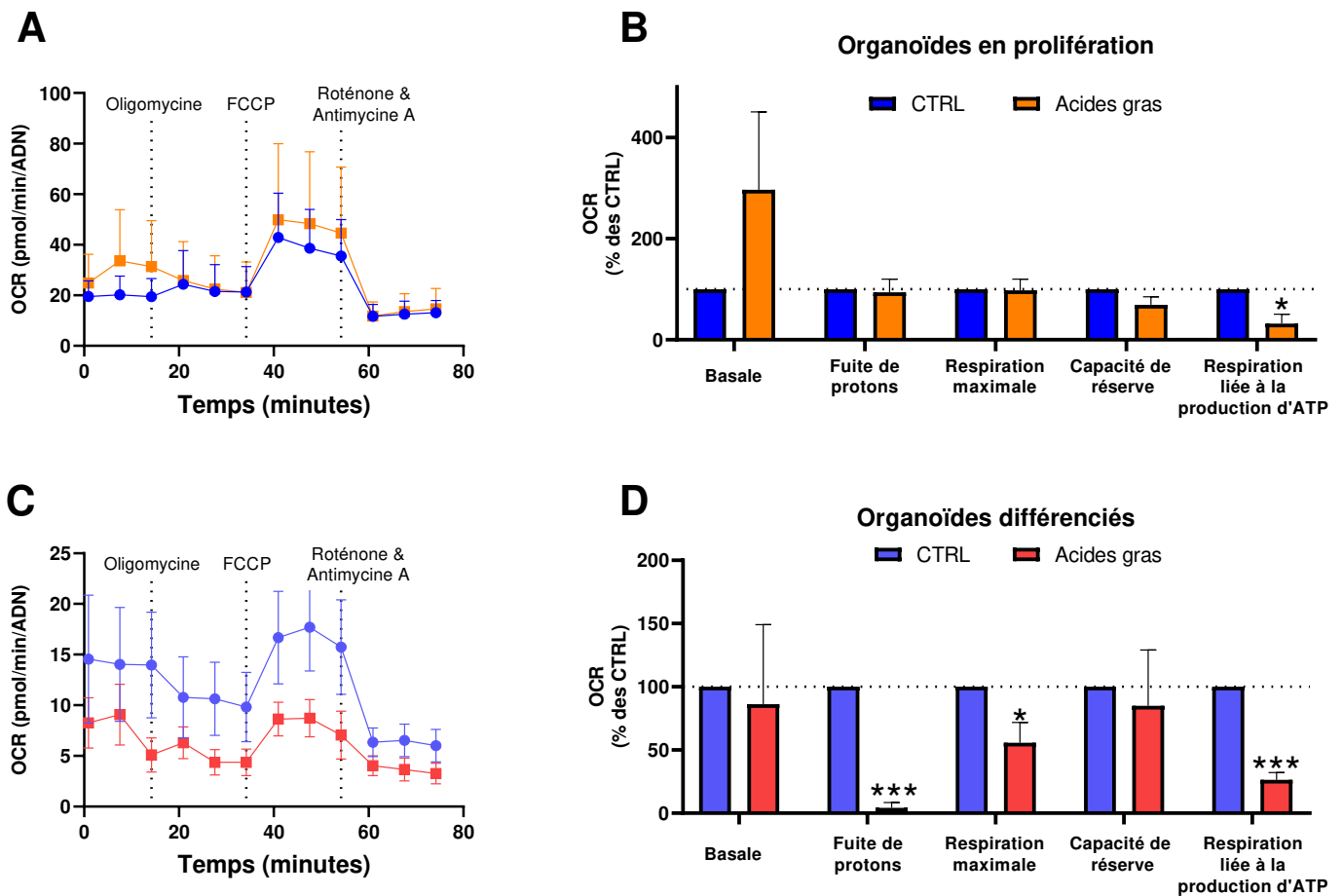
Afin de caractériser le métabolisme lipidique des organoïdes, l'expression génique de *Cd36*, de *Plin2* et de *Fabp1* a été mesurée (Figure 32.A,B). Dans les organoïdes maintenus en prolifération, les expressions de *Cd36* et *Plin2* sont augmentées à l'issue de 24h de traitement aux acides gras (Figure 32.A). En revanche, l'expression de ces gènes dans le modèle d'organoïdes différenciés n'est pas modifiée de façon significative par le traitement (Figure 32.B).



**Figure 32. Expression génique de cibles du métabolisme lipidique des entérocytes sur des organoïdes en prolifération ou différenciés traités avec un mélange d'acides gras.** Expression relative de *Cd36*, *Plin2* et *Fabp1* dans **A.** des organoïdes en prolifération ou **B.** différenciés, traités ou non avec un mélange avec de C18:0 et C18:1 à 150  $\mu$ M chacun. Les données sont exprimées en changement relatif d'expression par rapport aux organoïdes CTRL par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  et représentées en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences significatives sont représentées par \* $P < 0,05$  vs organoïdes CTRL après un test Student. N=4 lignées d'organoïdes en prolifération et différenciés.

**Un traitement avec un mélange d'acides stéarique et oléique diminue la respiration liée à la production d'ATP des organoïdes en prolifération et différenciés.**

L'effet de ces acides gras sur la fonction mitochondriale des organoïdes jéjunaux a été évaluée en utilisant la technologie Seahorse (**Figure 33**). Les données, exprimées en pourcentage des conditions CTRL, montrent une diminution significative de la respiration liée à la production d'ATP des organoïdes en prolifération en réponse aux acides gras, indiquant une modification du fonctionnement mitochondrial chez ces organoïdes (**Figure 33.A, B**). Quant aux organoïdes différenciés, leur respiration maximale est significativement diminuée par un traitement de 24h avec les acides stéarique et oléique, tout comme leur respiration liée à la production d'ATP (**Figure 33.C, D**). Ces données indiquent une atteinte du potentiel métabolique associée à une éventuelle déficience énergétique, suggérant une dysfonction mitochondriale des organoïdes différenciés induite par les acides gras.

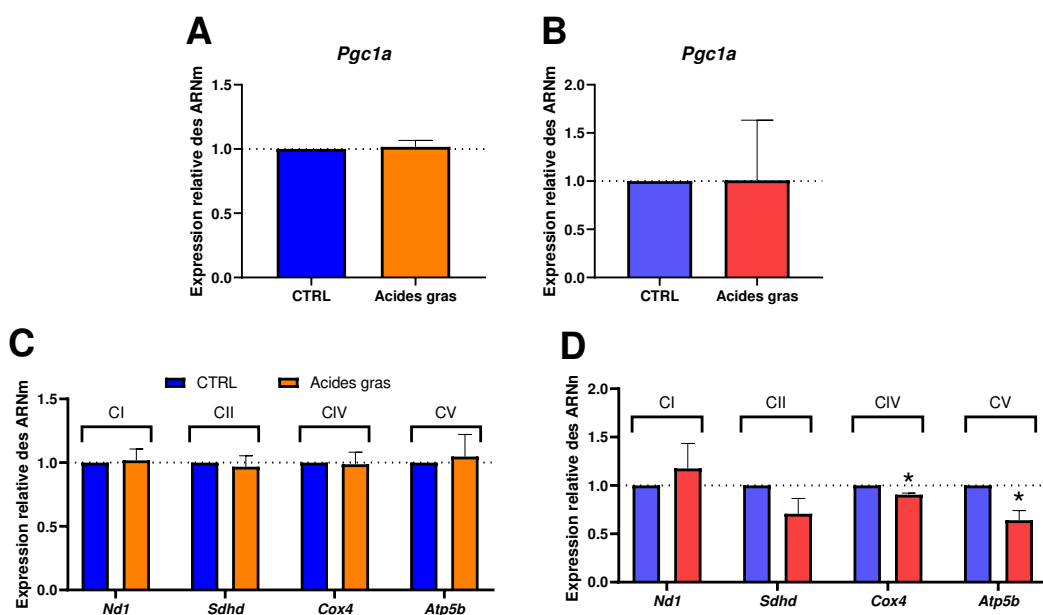


**Figure 33. Analyse du métabolisme énergétique des organoïdes en prolifération ou différenciés en réponse à un traitement de 24h avec un mélange d'acides gras.**

**A.** Taux de consommation d'oxygène (OCR) au cours du temps des organoïdes murins jéjunaux en prolifération après injection séquentielle de 2  $\mu$ M d'oligomycine, 2  $\mu$ M de FCCP et 0,5  $\mu$ M d'antimycine A et de roténone. **B.** Paramètres de bioénergétique mitochondriale des organoïdes en prolifération en réponse à un traitement aux acides gras. **C.** OCR des organoïdes murins jéjunaux différenciés selon le même schéma décrit en A. **D.** Paramètres de bioénergétique mitochondriale des organoïdes différenciés en réponse à un traitement aux acides gras. Les données sont exprimées en pourcentage des conditions CTRL et en moyennes  $\pm$  SEM. Les différences significatives sont représentées par \* $P < 0,05$  ; \*\*\* $P < 0,001$  vs CTRL après un test Student. N=4 lignées d'organoïdes en prolifération et différenciés.

**Le traitement aux acides gras ne modifie pas l'expression de *Pgc1a* tandis que les expressions de *Cox4* et *Atp5b* sont diminuées dans les organoïdes différenciés traités.**

L'expression du principal gène régulateur de la biogénèse mitochondriale *Pgc1a* n'est pas modifiée, quel que soit l'état de maturité des organoïdes, en réponse aux acides gras (**Figure 34.A,B**) et ne suggère pas d'altération de la biogénèse dans ce modèle. Bien qu'il n'y ait pas de modification de l'expression des gènes codant des sous-unités des complexes de l'OXPPOS (**Figure 34.C**), les organoïdes différenciés qui ont reçu un traitement aux acides gras montrent une diminution significative des expressions de *Cox4* et d'*Atp5b* (**Figure 34.D**) qui indiquerait une diminution de leur capacité oxydative en lien avec l'atteinte de la bioénergétique détectée/mesurée au Seahorse.

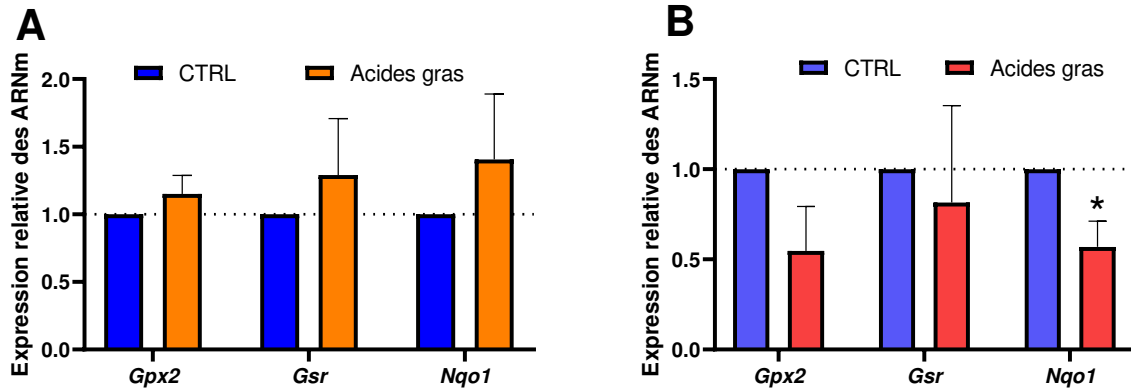


**Figure 34. Expression génique du gène régulateur de la biogénèse mitochondriale *Pgc1a* et de gènes codant pour des sous-unités des complexes de la chaîne de respiration mitochondriale dans des organoïdes en prolifération ou différenciés traités avec un mélange d'acides gras.**

Expression relative des ARNm codant *Pgc1a* dans des organoïdes en **A.** prolifération ou **B.** différenciés ou pour des sous-unités des complexes de la chaîne de respiration mitochondriale des organoïdes en **C.** prolifération ou **D.** différenciés. Les données sont exprimées en changement relatif d'expression par rapport aux organoïdes CTRL par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  et représentées en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences significatives sont représentées par \*P < 0,05 vs organoïdes CTRL après un test Student. N=4 lignées d'organoïdes en prolifération et différenciés. Abréviations : CI : Complexe I, CII : Complexe II, CIV : Complexe IV et CV : Complexe V.

## Les acides gras stéarique et oléique induisent une diminution de l'expression de *Nqo1* des organoïdes différenciés

L'expression de gènes de la machinerie antioxydante n'est pas augmentée par le traitement (**Figure 35.A**). En revanche, l'expression de *Nqo1* est diminuée de moitié dans les organoïdes différenciés et pourrait indiquer un potentiel stress oxydant dans ces organoïdes (**Figure 35.B**).



**Figure 35. Expression relative de gènes impliqués dans la machinerie antioxydante dans des organoïdes en prolifération ou différenciés traités par un mélange d'acides gras.**

Organoïdes en **A.** prolifération ou **B.** différenciés. Les données sont exprimées en changement relatif d'expression par rapport aux organoïdes CTRL par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  et représentées en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences significatives sont représentées par \* $P < 0,05$  vs organoïdes CTRL après un test Student. N=4 lignées d'organoïdes en prolifération et différenciés.

## Conclusion

Un traitement d'organoïdes jéjunaux murins avec un mélange d'acides gras stéarique et oléique à 300  $\mu$ M pendant 24h induit une stéatose entérocytaire associée à une dysfonction mitochondriale. Cette altération de la bioénergétique est notamment marquée par la diminution de la respiration liée à la production d'ATP, que ce soit sur des organoïdes en prolifération ou différenciés, associée à une diminution de l'expression de gènes codant des sous-unités des complexes IV et V de la chaîne de respiration mitochondriale des organoïdes différenciés. Néanmoins, l'expression de *Pgc1a* ou des gènes de la machinerie antioxydante n'est pas modifiée en réponse aux acides gras à la fois dans les organoïdes différenciés, à l'exception de *Nqo1*, ou en prolifération. Cette première approche avec des acides gras dont les effets stéatosants sont connus dans des hépatocytes devait se poursuivre par l'étude, en lien avec le modèle *in vivo*, de l'effet seul, ou en mélange à différentes concentrations, des acides gras du régime (C12:0 ; C14:0 ; C16:0 et C18:0) sur la fonction mitochondriale, la stéatose entérocytaire et l'état de différenciation des organoïdes. Cependant, nous n'avons pas persévéré avec ce modèle qui ne reproduisait que partiellement les modifications observées chez la souris obèse. Un traitement plus long avec les acides gras aurait peut-être été nécessaire pour reproduire le phénotype observé *in vivo* mais le maintien des organoïdes différenciés sur des temps supérieurs n'était pas possible pour des questions de viabilité. De plus, la structure 3D des organoïdes ne nous a pas permis d'appréhender pleinement la détection d'espèces réactives de l'oxygène, par le biais de sondes fluorescentes, ou de la coloration des lipides neutres.

## Partie II.4 : Les acides gras du régime DIO et ceux stockés sous forme de triglycérides dans les cellules épithéliales intestinales des souris obèses sont essentiellement du C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0.

---

### Contexte et objectif

L'analyse *in vivo* de la partie II.1 a montré que la consommation d'un régime obésogène induisait une stéatose entérocytaire et une diminution du nombre de mitochondries dans les CEI de souris obèses. Afin de mieux comprendre les mécanismes liant excès de lipides et fonction mitochondriale, nous avons cherché à reproduire sur un modèle *in vitro* d'entérocytes les effets provoqués *in vivo* par la consommation du régime obésogène. Pour ce faire, le modèle IPEC-J2 a été utilisé et a permis de comprendre l'enchaînement des événements menant à la diminution de respiration basale et à l'augmentation de TEER lors d'une surcharge lipidique (voir II.1). Cependant, dans ce travail, les effets de la nature des acides gras sur le métabolisme lipidique et la fonction mitochondriale n'ont pas été évalués. Afin de pouvoir analyser les effets des principaux acides gras apportés par le régime obésogène sur le modèle *in vitro* d'entérocytes, la composition lipidique des régimes CTRL et DIO ainsi que ceux des CEI a été analysée. .

### Matériel et méthodes

#### Extraction des acides gras issus des aliments pour souris

Deux grammes des aliments utilisés dans les régimes de la partie II.1 ont été broyés puis les acides gras extraits. L'extraction des lipides a été réalisée en ajoutant 4 mL d'un mélange de hexane/isopropanol 3:2 (volume:volume), acidifié avec 600  $\mu$ M de HCl, dans chaque échantillon. Après une agitation de 15 min à température ambiante, les échantillons ont été centrifugés à 1000xg pendant 10 min et la phase supérieure, qui contient les lipides, a été transférée dans un nouveau tube contenant 150 mM de NaCl afin de rincer la phase organique. Les tubes ont été vigoureusement agités puis centrifugés à 1000xg pendant 10 min. La phase supérieure a été transférée dans un ballon à fond rond et l'hexane a ensuite été totalement évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. La transméthylation des acides gras des lipides totaux a ensuite été réalisée en ajoutant 500  $\mu$ M de NaOH pendant 20 min à 70°C pour permettre la saponification, puis en ajoutant 1,5 M de BF<sub>3</sub> dans du méthanol pendant 20 min à 70°C, pour permettre la méthylation. Pour isoler les esters méthyliques d'acides gras (FAME), 150 mM de NaCl et 4 mL de pentane ont été ajoutés dans chaque tube. La phase supérieure contenant les FAME dans le pentane a été transférée dans un nouveau tube et évaporée comme décrit précédemment. Enfin, les FAME ont été remis en suspension dans l'hexane et 1  $\mu$ L de chaque échantillon a été injecté. Les FAME ont été analysés à l'aide d'un

chromatographe en phase gazeuse Agilent 7890N couplé à un détecteur de spectrométrie de masse 5975C (Agilent). Les acides gras totaux quantifiés par cette méthode ont été exprimés en µg/mg d'aliment.

### **Extraction des acides gras des classes de lipides des CEI**

Les acides gras des classes de lipides des CEI ont été extraits comme décrits dans le matériel et méthodes de la partie II.1 puis normalisés en µg d'acides gras par mg de protéines.

### **Analyse statistique**

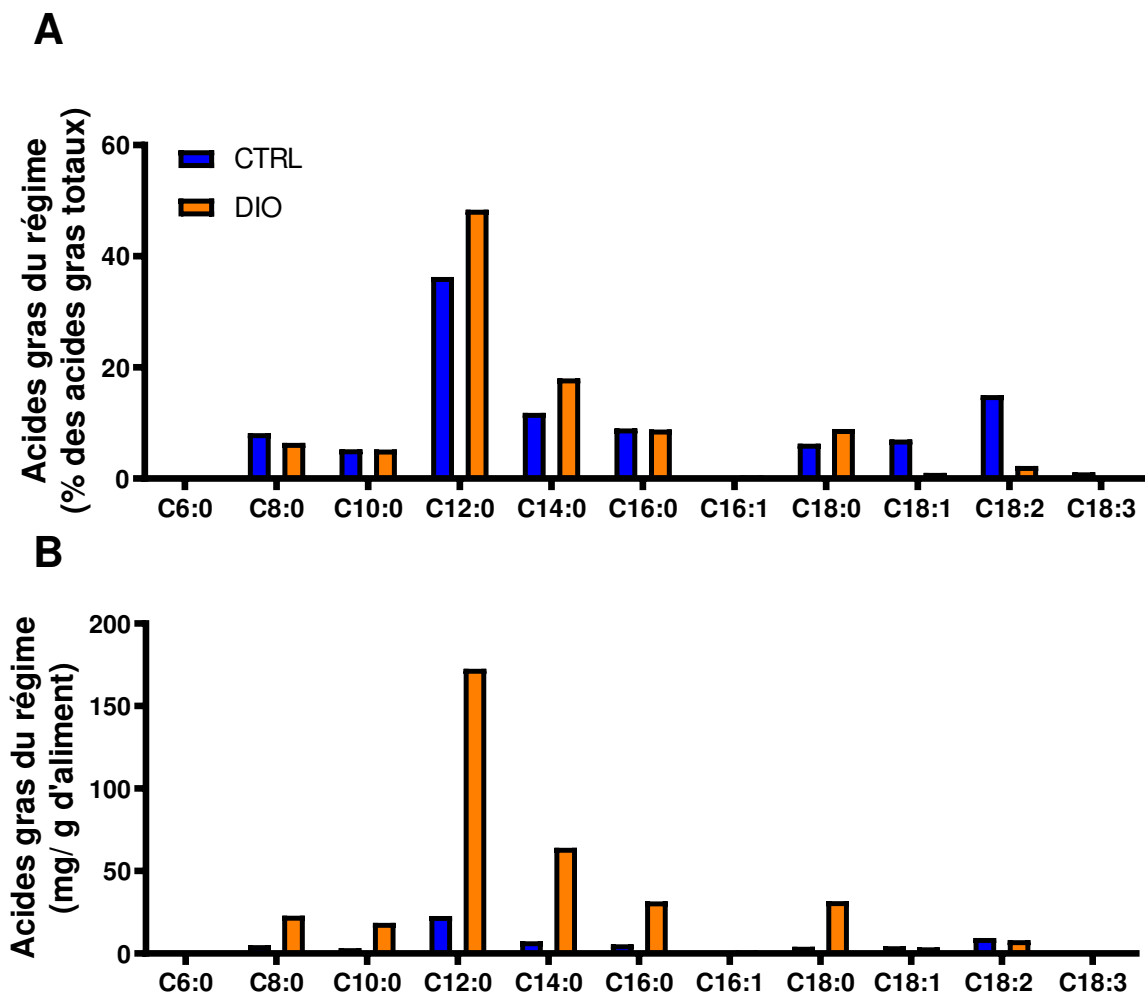
Les données sont représentées en moyenne ± SEM. Un test t de Student a été réalisé et les *P-values* du Tableau 11 ont été corrigées par l'approche *False Discovery Rate*. Une *P-value*<0,05 est considérée comme significative. Les différences significatives ont été représentées par \**P*<0,05, \*\**P*<0,01 et \*\*\**P*<0,001 vs CTRL.

### **Résultats**

**Le régime obésogène utilisé dans l'étude *in vivo* est caractérisé par un fort apport d'acides gras saturés et notamment des acides laurique, myristique, palmitique et stéarique.**

De façon intéressante, le profil relatif des acides gras entre l'aliment CTRL et le DIO est assez similaire pour les acides gras saturés (**Figure 36.A**). En revanche, les acides gras insaturés sont bien moins abondants dans le régime DIO, et notamment les acides gras essentiels polyinsaturés indispensables linoléique (C18:2) et linoléique (C18:3). La forte abondance en acide gras lauriques (C12:0) dans le régime obésogène (**Figure 36.B**) rappelle la composition de l'huile de coco, très répandue dans l'alimentation asiatique.





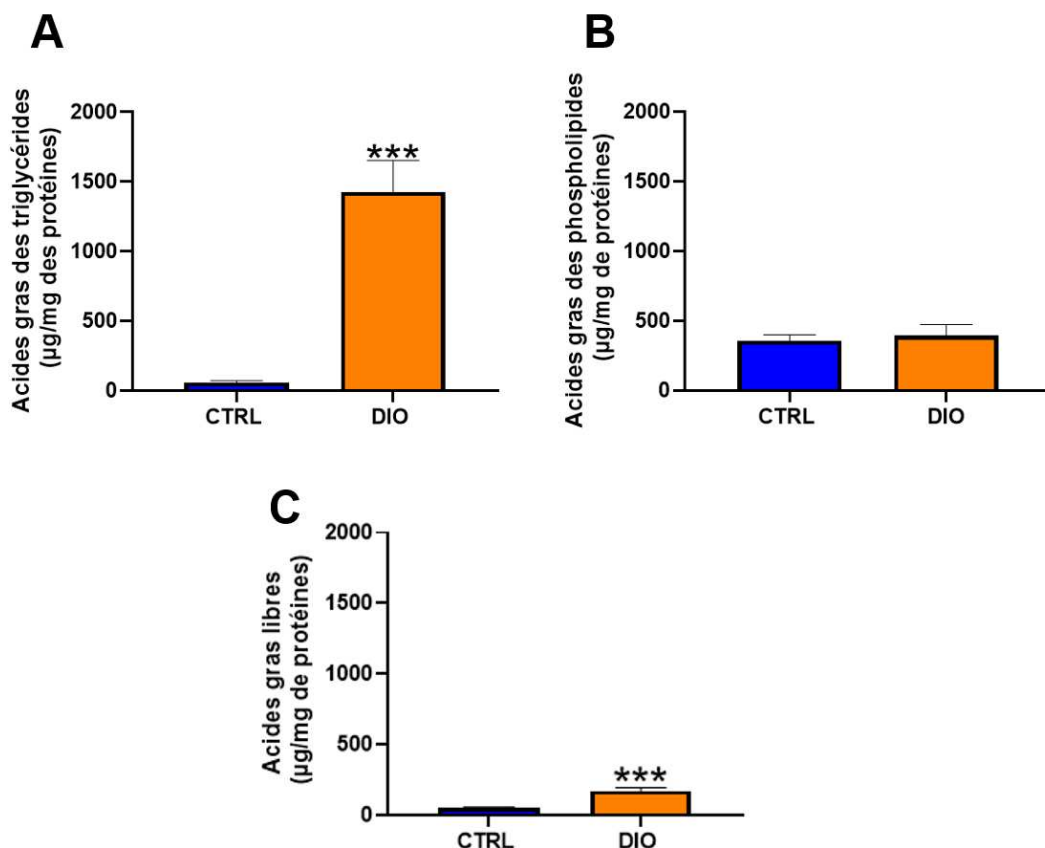
**Figure 36. Profil d'acides gras issus des aliments CTRL et DIO.**

**A.** Profils des acides gras des régimes exprimés en pourcentage des lipides totaux ou en **B.** g d'aliments

## La consommation du régime obésogène augmente le stockage des acides gras sous forme de triglycérides et la concentration d'acides gras libres dans les CEI.

Les acides gras des TG, des PL et libres, ont été quantifiés à partir des CEI isolées de jéjunum des souris CTRL et DIO. Comme vu dans la partie II.1, les acides gras des TG sont présents en plus forte abondance dans les CEI des souris DIO par rapport aux CTRL indiquant une stéatose entérocytaire (**Figure 37.A**). En revanche, il n'y a pas de différence de concentration pour les acides gras des phospholipides entre les 2 groupes (**Figure 37.B**). Quant aux acides gras libres, ceux-ci sont près de 3,5 fois plus abondants dans les CEI des souris DIO par rapport aux souris CTRL (**Figure 37.C**). Les acides gras étant retrouvés le plus souvent sous forme de TG, PL ou esters de cholestérol dans la cellule, une augmentation de la concentration des acides gras libres peut indiquer que la capacité de stockage sous forme de TG est saturée.

L'analyse des acides gras des TG des CEI montre que ce sont surtout le C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0 qui sont stockés sous cette forme (**Tableau 11**).



**Figure 37. Quantification des acides gras des triglycérides, des phospholipides et libres dans les cellules épithéliales intestinales.**

Les acides gras des **A.** triglycérides, **B.** phospholipides et **C.** libres des cellules épithéliales intestinales ont été quantifiés par GC-MS et les quantités exprimées par mg de protéines. Les données sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences significatives sont indiquées par \*\*\* $P < 0,001$  vs CTRL après un test de Student.

**Tableau 11. Quantités d'acides gras des triglycérides des cellules épithéliales intestinales exprimées en µg par mg de protéines.**

Les données sont représentées en moyenne ± SEM. Les différences significatives sont indiquées par \*\*\*P<0,001 vs CTRL après un test Student.

<b>Acide gras</b>	<b>CTRL</b>	<b>DIO</b>	<b>P-VALUE</b>
C8:0	0,42 ± 0,27	1,25 ± 2,56	<0,001
C10:0	2,29 ± 1,76	12,16 ± 29,49	<0,001
C12:0	22,93 ± 24,09	106,41 ± 248,7	<0,001
C14:0	6,78 ± 5,75	48,47 ± 124,69	<0,001
C14:1 n-5	0,07 ± 0,04	1,07 ± 2,98	<0,001
C15:0	0,36 ± 0,15	0,56 ± 0,71	<0,001
C16:0	11,08 ± 5,91	36,3 ± 76,2	<0,001
C16:1 n-9	0,28 ± 0,14	0,47 ± 0,69	<0,001
C16:1 n-7	0,83 ± 0,48	4,43 ± 10,89	<0,001
C18:0	3,70 ± 2,06	25,39 ± 65,59	<0,001
C18:1 Trans	0,04 ± 0,04	0,43 ± 1,16	<0,001
C18:1 n-9	3,79 ± 4,23	18,57 ± 44,88	<0,001
C18:1 n-7	0,17 ± 0,07	0,96 ± 2,42	0,15
C18:2 n-6	3,78 ± 2,08	3,16 ± 2,1	0,15
C18:3 n-3	0,11 ± 0,08	1,06 ± 2,87	<0,001
C20:0	0,03 ± 0,02	0,72 ± 2,08	<0,001
C20:1	0,17 ± 0,15	1,43 ± 3,89	<0,001
C20:3 n-6	0 ± 0	0,04 ± 0,12	<0,001
C20:4 n-6	0,09 ± 0,07	0,29 ± 0,59	<0,001
C22:6 n-3	0,05 ± 0,05	0,2 ± 0,46	0,01

## **Conclusion :**

**Le profil des acides gras des régimes indique que le DIO de notre étude a été obtenu par enrichissement de l'aliment CTRL avec de l'huile de coco, augmentant ainsi l'abondance des acides saturés laurique, myristique, palmitique et stéarique, au détriment de l'insaturé oléique (C18:1) et des polyinsaturés indispensables linoléique (C18:2 n-6) et linoléique (C18:3 n-3). Ces acides gras majoritaires sont également retrouvés en forte concentration dans les CEI de souris obèses sous forme de TG. Par conséquent, le C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0 ont été retenus afin de modéliser les effets induits par la consommation d'un régime obésogène sur le métabolisme lipidique, la fonction mitochondriale et la perméabilité intestinale dans un modèle *in vitro* d'entérocytes.**

## Partie II.5 : Caractérisation des effets seuls ou en mélange du C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0 sur la fonction mitochondriale, le métabolisme lipidique et la perméabilité intestinale du modèle *in vitro* d'entérocytes IPEC-J2.

---

### Contexte

Afin de mieux comprendre l'origine des perturbations mitochondriales des CEI de jéjunum de souris en réponse à la consommation d'un régime obésogène, le modèle d'organoïdes murin de jéjunum avait été utilisé. Les données obtenues ont permis de montrer qu'un traitement de 24h avec de l'acide stéarique (C18:0) et oléique (C18:1) induisait une altération de la bioénergétique cellulaire sur les organoïdes différenciés ou en prolifération. Néanmoins le modèle organoïdes employé présentait une grande variabilité, qui peut être imputée à la souris, à l'induction de la différenciation et surtout à la variabilité intrinsèque dans un puits lié à l'emplacement de l'organoïde dans le *Matrigel* (oxygénation, épaisseur, flux en nutriments). Le modèle organoïde présentait également un certain nombre de contraintes, liées à leur structure 3D et à la viabilité des organoïdes dans le temps, due à leur cycle de renouvellement. La somme de tous ces facteurs ne permettait donc pas d'appréhender au mieux la fonction mitochondriale des CEI en réponse à un traitement chronique aux acides gras.

Ainsi, dans l'optique de modéliser la prise quotidienne d'un régime obésogène sur plusieurs jours, nous avons décidé d'avoir recours à la lignée IPEC-J2. Comme montré dans la chapitre II.4, l'analyse des acides gras du régime obésogène utilisé *in vivo* ainsi que de ceux stockés sous forme de TG dans les cellules épithéliales de jéjunum de souris obèse montrent une forte abondance des acides gras saturés C12:0, C14:0, C16:0 C18:0. Néanmoins, seuls quelques articles décrivent l'effet des acides gras sur le métabolisme lipidique associé à la fonction mitochondriale de CEI, et principalement les effets provoqués par un traitements de 24h avec l'acide palmitique (C16:0) sur des lignées immortalisées de CEC. Il a en effet été montré que le C16:0 provoque l'induction d'un stress oxydant associé à des altérations du réseau et de la bioénergétique mitochondriale (Lee et al., 2020; Li et al., 2020; Yoo et al., 2021). Cependant, à l'exception du C16:0 qui est le principal acide gras saturé utilisé pour décrire les effets délétères d'un régime hyperlipidique, les effets des autres acides gras saturés à longue chaîne sur les CEI ne sont pas bien caractérisés. Des travaux récents montrent néanmoins qu'un traitement de 2 jours avec de l'acide laurique (C12:0), de 100  $\mu$ M à 250  $\mu$ M, induit la différenciation des IPEC-J2 (Yang et al., 2020), évaluée par l'activité de la phosphatase alcaline, tout comme le C18:0, jusqu'à 100  $\mu$ M (Yang et al., 2020), alors que des concentrations de l'ordre du millimolaire de l'un ou l'autre de ces acides gras favorisent leur stockage sous forme de TG et affecte la viabilité des IPEC-J2 . Les acides gras C12:0 et

myristique (C14:0) sont par ailleurs stockés de façon significativement plus importante dans des Caco-2 en comparaison des acides C16:0 et C18:0 (Tsuzuki, 2007). Concernant les données de perméabilité intestinale *in vitro*, plusieurs études montrent qu'un traitement de 24h avec du C16:0 provoque une augmentation de la conductance et du passage de FD4 à travers les Caco-2, notamment provoquée par la relocalisation des protéines de jonctions serrées et/ou la diminution de leur expression (Ghezzal et al., 2020; Gori et al., 2020). Par ailleurs, l'exposition des IPEC-J2 à un mélange de ces 4 acides gras à 250 µM chacun induit une dysfonction mitochondriale associée à une stéatose entérocytaire et une induction de la machinerie antioxydante (voir Partie II.1).

### **Objectifs et mise en œuvre expérimentale**

Les travaux présentés dans la partie II.1 montrent qu'un mélange de C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0, dans le régime ou en traitement sur les IPEC-J2, modifie la fonction mitochondriale des CEI. En faisant l'hypothèse que le C16:0 induit une dysfonction mitochondriale des CEI, l'objectif premier de cette partie est de déterminer si la dysfonction mitochondriale induite par un mélange de C12:0/C14:0/C16:0/C18:0 est due à la présence du C16:0. Le second objectif est de déterminer si la nature des acides gras influence différemment la fonction mitochondriale des CEI afin de mettre en évidence les éventuelles conséquences délétères des autres acides gras, hors C16:0, sur la fonction mitochondriale.

La stéatose entérocytaire, la fonction mitochondriale, le stress oxydant et la fonction de barrière intestinale ont été évalués dans un modèle *in vitro* de cellules épithéliales jéjunales en réponse à un mélange de C12:0, du C14:0, du C16:0 ou du C18:0 à 250 µM chacun, avec ou sans C16:0 et en réponse à un traitement chronique avec du C12:0, du C14:0, du C16:0 ou du C18:0 à 250 µM.

### **Matériel et méthodes**

A l'exception des traitements aux acides gras qui diffèrent de ceux présentés dans la partie II.1 ainsi que de la détermination de la viabilité cellulaire et de la toxicité liée aux traitements, le matériel et méthodes ayant servi à l'obtention des résultats présentés dans cette partie est rigoureusement identique à celui présenté dans la partie II.1.

### **Traitement aux acides gras**

Les IPEC-J2 ont été traitées pendant 3 jours avec un mélange de C12:0, de C14:0 et de C18:0 à 250 µM chacun supplémenté avec 250 µM de C16:0 (AG+C16:0 ; mélange à 1 mM final) ou non (AG-C16:0 ; mélange à 750 µM final). L'étude des effets des acides gras seuls a été réalisée en traitant les IPEC-J2 pendant 3 jours avec l'un de ces 4 acides gras à 250 µM. Chacun des traitements représentait une concentration finale de 0,6% de DMSO. La

condition CTRL correspondait alors aux IPEC-J2 traitées pendant 3 jours avec 0,6% de DMSO.

**Tableau 12 : Liste des primers porcins utilisées pour la RT-qPCR.**

<b>Gène</b>	<b>Nom complet</b>	<b>Primers forward et reverse</b>
<b>Nd4</b>	<i>NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 4</i>	TTATTGGTGCCGGAGGTA CTG CCCAGTTTATTCCAGGGTTCTG
<b>Sdhb</b>	<i>Succinate Dehydrogenase Complex Subunit B</i>	ACTGGATGGGCTGTACGAGT GTCGATCATCCAGCGATAGG
<b>Uqcrc1</b>	<i>Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Core Protein 1</i>	TGCACCAGTGCCACAGAGA GAGTGGTGCCATCCAGATGA
<b>Cox4</b>	<i>Cytochrome C Oxidase Subunit IV</i>	CCAAGTGGGACTACGACAAGAAC CCTGCTCGTTTTATTAGCACTGG
<b>Atp5b</b>	<i>ATP Synthase F1 Subunit Beta</i>	GGGTACCATGCAGGAAAGAATC GGCACATAGATGGCCTGTACAG
<b>Nrf1</b>	<i>Nuclear Respiratory Factor 1</i>	ACCATCCAGACAACGCAA ACTCCAGTAAGTGCTCCGAC
<b>Nrf2</b>	<i>Nuclear Respiratory Factor 2</i>	GAAAGCCCAGTCTTCATTGC TTGGAACCGTGCTAGTCTCA
<b>Tfam</b>	<i>Transcription Factor A</i>	GGTCCATCACAGGTAAAGCTGAA ATAAGATCGTTTTCGCCCACTTC
<b>Mfn2</b>	<i>Mitofusin 2</i>	CATCGCCATATAGAGGAAGG CACAGTTGAGGTCGTAGC
<b>Pink1</b>	<i>PTEN Induced Kinase 1</i>	CTCTGGTGCAGTACCCCGAT ATGACGAGGAAGAGTGTCCG
<b>Gpx2</b>	<i>Glutathione Peroxidase 2</i>	AGAATGTGGCCTCGCTCTGA GGCATTGCAGCTCGTTGAG
<b>Nqo1</b>	<i>NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1</i>	CATGGCGGTCAGAAAAGCAC ATGGCATA CAGGTCCGACAC
<b>Sod1</b>	<i>Superoxide Dismutase 1</i>	AAGGCCGTGTGTGTGCTGAA GATCACCTTCAGCCAGTCCTTT
<b>Sod2</b>	<i>Superoxide Dismutase 2</i>	GGCCTACGTGAACAACCTGA TGATTGATGTGGCCTCCACC
<b>Cat</b>	<i>Catalase</i>	TCCAGCCAGTGACCAGATGA CCCGGTCAAAGTGAGCCATT
<b>Cd36</b>	<i>Fatty Acid Translocase</i>	CCATACCCTATTCTACCAC AGGCTGCATCTGTACCATTA
<b>Plin2</b>	<i>Perilipin2</i>	ATCACTGAGGTGGTGGACAAG GCTGCATCATCCGACTTCC
<b>Tbp1</b>	<i>TATA-Box 1</i>	AACAGTTCAGTAGTTATGAGCCAGA AGATGTTCTCAAACGCTTCG

## Tests de viabilité cellulaire et de toxicité

La viabilité cellulaire a été évaluée par le test au bromure de méthylthiazolyldiphényltétrazolium (MTT) (M5655, Sigma-Aldrich) en ajoutant, après les traitements et rinçage avec du milieu complet, une solution de MTT à 0,5 mg/mL diluée dans du milieu complet pendant 3 h dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été lysées à l'aide d'un solvant (isopropanol/HCl 0,1 M + 2% de Triton-X100) pendant 1h sous légère agitation à température ambiante. L'absorbance a été lue à 570 nm en utilisant un lecteur de microplaques (BMG Labtech, POLARstar Omega). La cytotoxicité a été évaluée en mesurant l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) libérée dans les surnageants des cellules après les dernières 24h de traitement selon les instructions du fabricant du kit de détection de la cytotoxicité (11644793001, Sigma-Aldrich). Les données de LDH ont été normalisées par marquage de l'ADN double brin au Hoechst.

## Analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques entre 2 conditions ont été réalisées par un test de Student non pairé. Les analyses statistiques groupées ont été réalisées par ANOVA et test de Tukey pour les comparaisons multiples. Toutes les données ont été analysées par le logiciel GraphPad Prism version 8.0.2. Les P-values obtenues après ajustement pour les comparaisons multiples  $< 0,05$  ont été considérées comme statistiquement significatives.

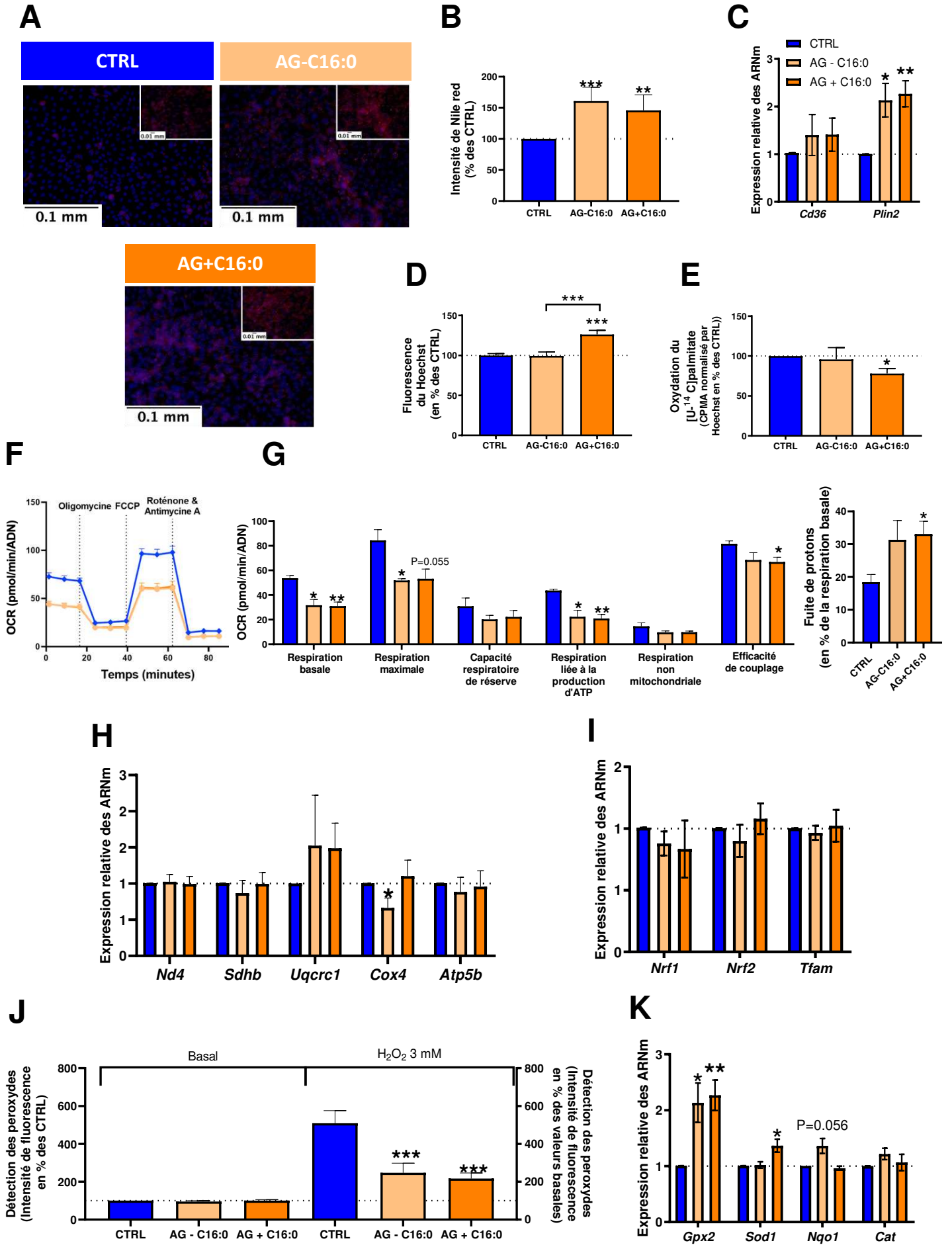
## Résultats et discussion

### La dysfonction mitochondriale des IPEC-J2 induite par un mélange de C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0 n'est pas due à la présence de C16:0.

Un traitement de 3 jours avec un mélange d'acides gras à 250  $\mu$ M chacun induit une augmentation du stockage de lipides dans les IPEC-2, de façon indépendante de la présence du C16:0 (**Figure 38.A et B**), associée à une augmentation de l'expression de *Plin2* (**Figure 38.C**). Les données d'intensité de Hoechst sont significativement augmentées dans les puits qui contiennent le mélange AG+C16:0 par rapport à la condition CTRL et à la condition AG-C16:0 (**Figure 38.D**), suggérant une augmentation de la prolifération. La capacité de  $\beta$ -oxydation de l'acide palmitique radiomarqué est quant à elle significativement diminuée uniquement dans le mélange composé des 4 acides gras (**Figure 38.E**). L'évaluation de la bioénergétique mitochondriale par Seahorse montre une diminution de la respiration basale en réponse au mélange d'acides gras, associée à une diminution des respirations maximale et liée à la production d'ATP, de façon indépendante de la présence du C16:0 dans le mélange d'acides gras (**Figure 38.F et G**). Le mélange des 4 acides gras induit également une



augmentation de la fuite de protons lorsqu'elle est exprimée en pourcentage de la respiration basale. Seule l'efficacité de couplage diffère entre les 2 types de mélange d'acides gras puisqu'elle n'est significativement diminuée que dans le mélange avec de l'acide palmitique. Concernant les expressions de gènes qui codent des sous-unités des complexes de la chaîne de respiration mitochondriale, seule *Cox4* est diminuée en réponse au mélange d'acides gras sans acide palmitique (**Figure 38.H**), tandis que l'expression de *Nrf1*, de *Nrf2* et de *Tfam* n'est pas modifiée, quelle que soit la condition (**Figure 38.I**). Enfin, bien que la détection des peroxydes par H<sub>2</sub>DCFDA à l'état basal soit similaire entre les groupes, l'induction d'un stress oxydant par l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoque une diminution de la production des peroxydes (**Figure 38.J**) associée à une forte augmentation de *Gpx2*, de façon également indépendante de la présence de l'acide palmitique dans le mélange (**Figure 38.K**). En revanche, la présence de C16:0 dans le mélange d'acides gras augmente l'expression de *Sod1* tandis que l'expression de *Nqo1* est augmentée en son absence (P=0,056), même si ces changements relatifs d'expression sont minimes.

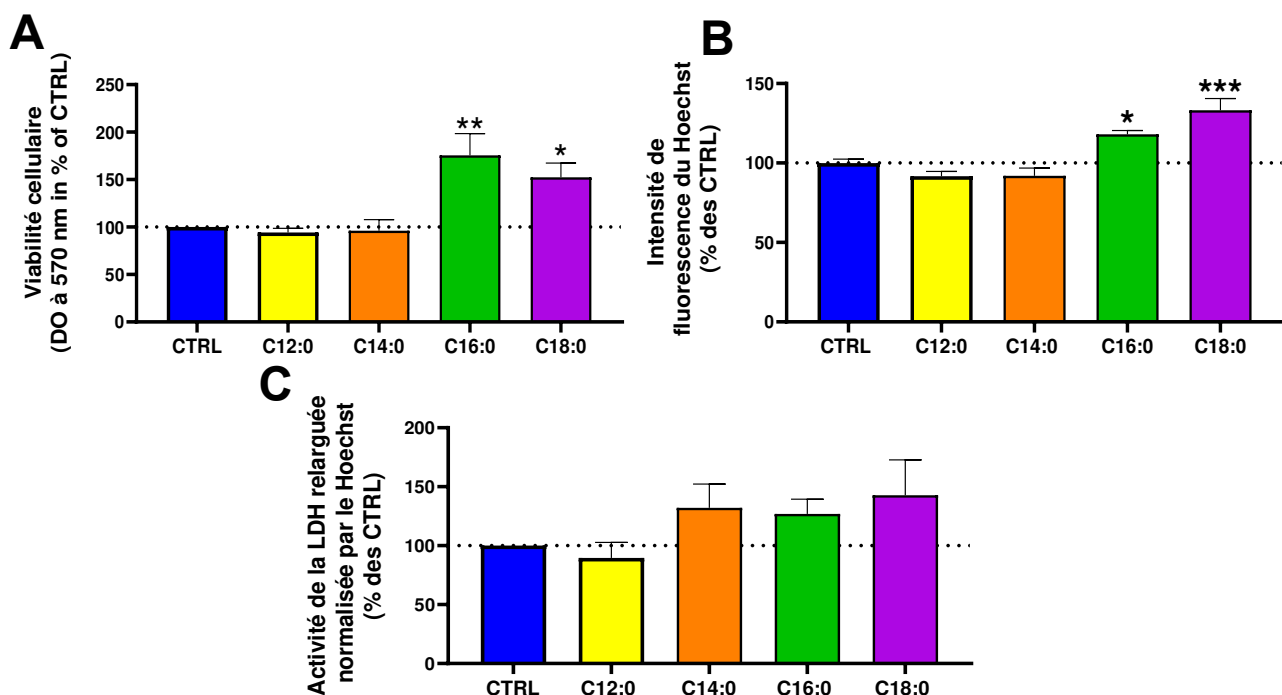


**Figure 38. Impact d'un mélange d'acides gras, avec ou sans acide palmitique, sur la stéatose entérocytaire, le métabolisme énergétique et le stress oxydant des IPEC-J2.**

Les données ont été obtenues après traitement des IPEC-J2 pendant 3 jours avec un mélange de C12:0, de C14:0 et C18:0 à 250  $\mu$ M chacun, avec le C16:0 (AG+C16:0) ou sans (AG-C16:0). La condition contrôle (CTRL) correspond à du DMSO à 0,6% final. **A.** Images représentatives de la coloration des lipides neutres (Nile red en rouge) dans les cellules IPEC-J2 contre-colorées avec du Hoechst (noyaux en bleu) après un traitement de 3 jours. **B.** Mesures de l'intensité de la fluorescence du Nile red normalisées par l'intensité de Hoechst. Les données ont été représentées en pourcentage des valeurs CTRL. **C.** Expression relative de *Cd36* et de *Plin2*. **D.** Densité de cellules évaluée par mesure de l'intensité de fluorescence du Hoechst. **E.** Capacité de  $\beta$ -oxydation de l'acide palmitique radiomarqué exprimée en pourcentage des CTRL. **F.** Profil de consommation en O<sub>2</sub> au cours du temps par analyse Seahorse. **G.** Paramètres de bioénergétique mitochondriale des IPEC-J2 après 3 jours de traitement et fuite de protons exprimée en pourcentage de la respiration basale. **H.** Expression relative des gènes codant pour des sous-unités du complexe I (*Nd4*), du complexe II (*Sdhb*), du complexe III (*Uqcrc1*), du complexe IV (*Cox4*) et du complexe V (*Atp5b*) de la chaîne de respiration mitochondriale. **I.** Expression relative de gènes régulant la biogénèse mitochondriale (*Nrf1*, *Nrf2* et *Tfam*). **J.** Détection des peroxydes à l'état basal et après traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM) par la sonde H<sub>2</sub>DCFDA. Les données ont été normalisées par coloration au Hoechst et exprimées en pourcentage du CTRL, pour les peroxydes basaux, et en pourcentage des valeurs basales, pour les peroxydes détectés après le traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **K.** Expression relative de gènes impliqués dans la machinerie antioxydante. Les expressions relatives des gènes sont exprimées en changement relatif par rapport à la condition CTRL par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Les données sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences significatives sont représentées par \*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs. CTRL.

## Les acides palmitique et stéarique induisent une augmentation de la prolifération des IPEC-J2.

Pour déterminer si d'autres acides gras pouvaient avoir un effet délétère sur la fonction mitochondriale des CEI, leurs effets individuels ont été étudiés. Dans un premier temps, la viabilité des IPEC-J2 et la toxicité induite par 3 jours de traitement avec les acides gras C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0 à 250  $\mu$ M ont été évaluées. Seuls le C16:0 et le C18:0 ont induit une augmentation du signal MTT (**Figure 39.A**) qui pourrait signifier une prolifération accrue des cellules et/ou une activité mitochondriale plus importante. Les données de Hoechst montrent par ailleurs un nombre significativement plus important de cellules en réponse à un traitement de 3 jours avec de l'acide palmitique ou stéarique et pourraient expliquer l'augmentation du signal MTT avec ces 2 acides gras (**Figure 39.B**). La toxicité des traitements, évaluée par la mesure de l'activité de la LDH relarguée dans le surnageant et normalisée par le Hoechst n'est en revanche pas plus importante pour les cellules traitées avec des acides gras en comparaison du CTRL traité avec 0,6% de DMSO (**Figure 39.C**).

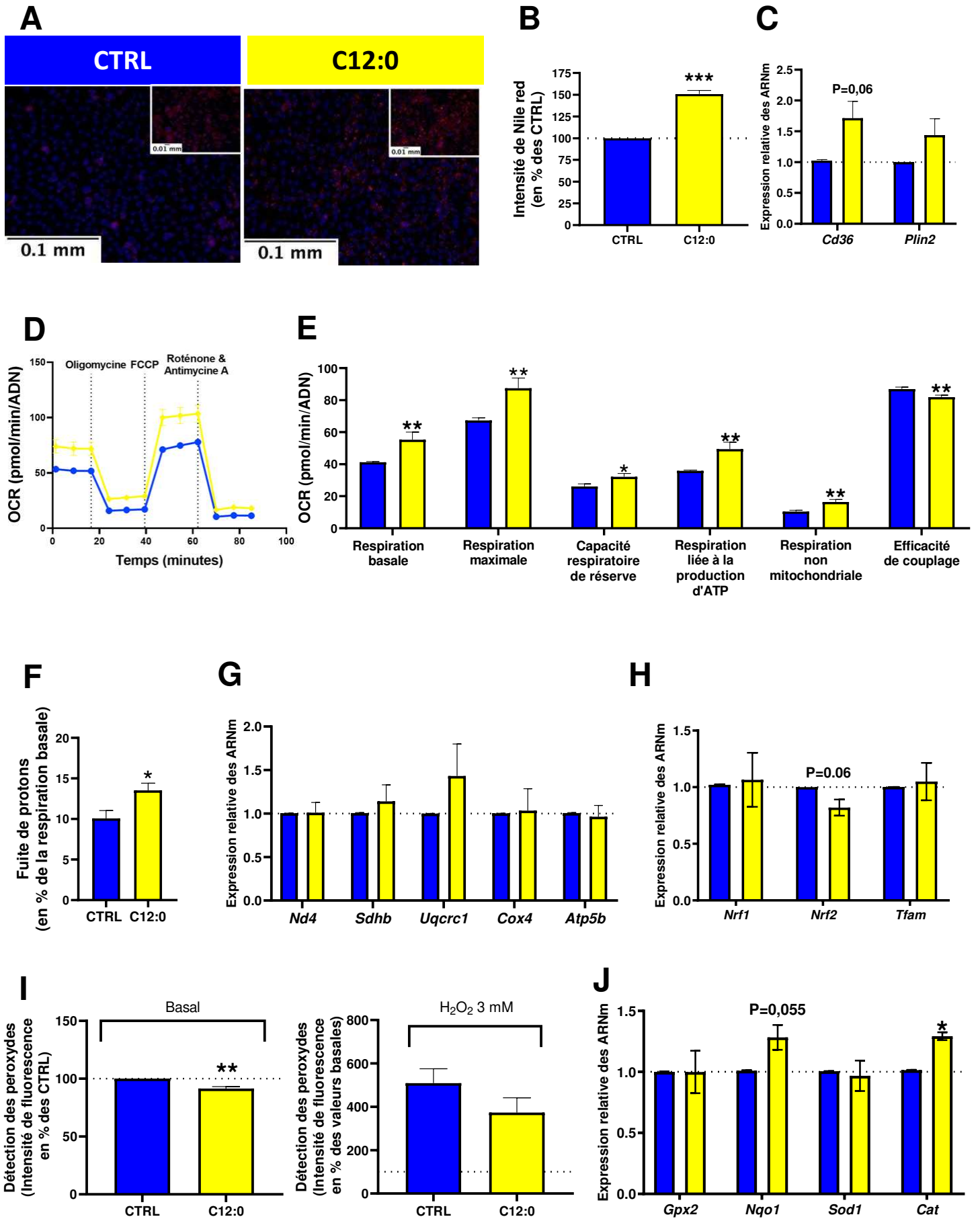


**Figure 39. Évaluation de la viabilité et de la cytotoxicité en réponse à 3 jours de traitement aux acides gras.**

Les IPEC ont été traitées pendant 3 jours avec 250  $\mu$ M de C12:0, C14:0, C16:0 ou C18:0. La condition contrôlée (CTRL) correspond à du DMSO à 0,6% final. **A.** Évaluation de la viabilité cellulaire par le test MTT à l'issue des 3 jours de traitement. **B.** Intensité de fluorescence de Hoechst après 3 jours avec l'un des acides gras. **C.** Détermination de la cytotoxicité en réponse au traitement aux acides gras par mesure de l'activité de la LDH relarguée dans le milieu de culture pendant les dernières 24h de traitement. Les données ont été représentées en pourcentage des valeurs CTRL et en moyenne  $\pm$  SEM (N=5-6 par condition). Les différences significatives sont représentées par \*P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 vs CTRL.

### **L'acide laurique stimule la fonction mitochondriale et le découplage de l'OXPPOS des IPEC-J2 en lien avec une stéatose entérocytaire macrovésiculaire et l'induction de la machinerie antioxydante.**

Les effets de l'acide laurique sur la stéatose entérocytaire, la fonction mitochondriale et le stress oxydant ont ensuite été évalués. L'observation par microscopie à fluorescence du Nile red (**Figure 40.A**), colorant les lipides neutres, associée à sa quantification (**Figure 40.B**), montrent une très nette augmentation du stockage de C12:0 dans les IPEC-J2 sous forme de gouttelettes lipidiques macrovésiculaires (grandes gouttelettes lipidiques cytosoliques), bien que l'expression des gènes *Cd36* et de *Plin2* ne soit pas augmenté de manière significative (**Figure 40.C**). L'analyse de la bioénergétique des IPEC-J2 par Seahorse montre une augmentation de la respiration liée à la production d'ATP ainsi que des respirations basale et maximale par rapport au CTRL (**Figure 40.D et E**). La fuite de protons est également augmentée par le traitement avec l'acide laurique (**Figure 40.F**), indiquant un découplage plus important de l'OXPPOS, et est d'ailleurs associée à une diminution de l'efficacité de couplage de la chaîne d'OXPPOS (**Figure 40.E**). Par ailleurs, la respiration non-mitochondriale est également augmentée par un traitement avec du C12:0. Malgré l'augmentation de l'activité mitochondriale observée en Seahorse, l'expression des gènes codant des sous-unités des complexes de la chaîne de respiration mitochondriale (**Figure 40.G**) ou impliqués dans la régulation de la biogénèse mitochondriale (**Figure 40.H**) n'est pas modifiée, suggérant une capacité oxydative similaire entre les 2 conditions. Enfin, la détection basale des peroxydes est plus faible dans les cellules traitées avec le C12:0, tandis que la production de peroxydes après l'induction d'un stress oxydant par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas modifiée par le traitement (**Figure 40.I**). De plus, l'expression de *Nqo1* et de *Cat* est augmentée (**Figure 40.J**), ce qui pourrait expliquer la moindre détection des ERO à l'état basal, malgré une activité mitochondriale importante.



**Figure 40. Impact de l'acide laurique sur la stéatose entérocytaire, la fonction mitochondriale et le stress oxydant des IPEC-J2.**

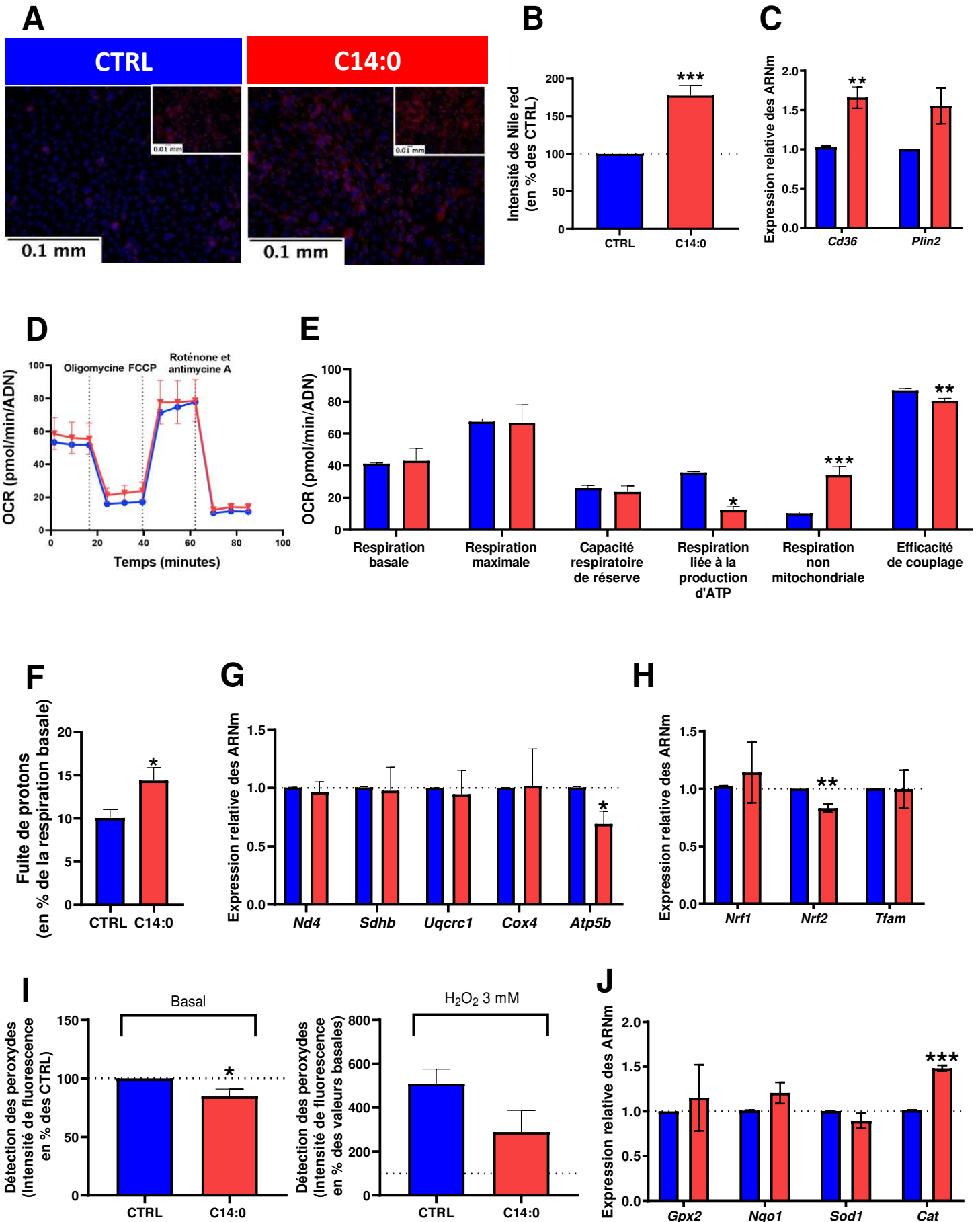
Les données ont été obtenues après traitement des IPEC-J2 pendant 3 jours avec 250  $\mu$ M de C12:0. La condition contrôle (CTRL) correspond à un traitement des cellules au DMSO à 0,6% final. **A.** Images représentatives de la coloration des lipides neutres (Nile red en rouge) dans les cellules IPEC-J2 contre-colorées avec du Hoechst (noyaux en bleu) après un traitement de 3 jours avec du C12:0. **B.** Mesure de l'intensité de la fluorescence du Nile red normalisée par l'intensité de Hoechst. Les données sont présentées en pourcentage des valeurs CTRL. **C.** Expression génique relative de *Cd36*, codant pour un transporteur d'acides gras, et de *Plin2*, une protéine des gouttelettes lipidiques cytosoliques. **D.** Taux de consommation d'oxygène (OCR) au cours du temps après l'injection séquentielle de 2  $\mu$ M d'oligomycine, 2  $\mu$ M de FCCP et 0,5  $\mu$ M d'antimycine A et de roténone. **E.** Paramètres de bioénergétique mitochondriale des IPEC-J2 après 3 jours de traitement avec le C12:0. **F.** Expression relative des gènes codant pour des sous-unités du complexe I (*Nd4*), du complexe II (*Sdhb*), du complexe III (*Uqcrc1*), du complexe IV (*Cox4*) et du complexe V (*Atp5b*) de la chaîne de respiration mitochondriale. **G.** Expression relative de gènes régulant la biogénèse mitochondriale (*Nrf1*, *Nrf2* et *Tfam*). **H.** Détection des peroxydes à l'état basal et après traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM) pendant 1h avec la sonde H<sub>2</sub>DCFDA. Les données ont été normalisées par coloration au Hoechst et exprimées en pourcentage du CTRL, pour les peroxydes basaux, et en pourcentage des valeurs basales, pour les peroxydes détectés après traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **I.** Expression relative de gènes impliqués dans la machinerie antioxydante. Les expressions relatives des gènes sont exprimées en changement relatif d'expression par rapport à la condition CTRL par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Les données sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM (N=4-8). Les différences significatives sont représentées par \*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs. CTRL.

L'augmentation de la respiration basale pourrait constituer un mécanisme permettant de compenser la fuite de protons afin d'assurer la production d'énergie. Ainsi, bien que la capacité oxydative ne soit pas modifiée au niveau génique par le C12:0, une augmentation de l'activité des complexes mitochondriaux, pouvant intervenir pour contrecarrer la fuite de protons et assurer la production d'énergie, peut expliquer l'augmentation des paramètres mitochondriaux. De plus, une augmentation de l'activité de Nqo1, située dans le cytosol, et de la catalase, retrouvée dans les peroxysomes et le cytosol, pourrait contribuer à expliquer la respiration non-mitochondriale plus importante des cellules traitées avec du C12:0.

### **L'acide myristique augmente le découplage de l'OXPHOS et induit une stéatose entérocytaire macrovésiculaire et l'activation de la machinerie antioxydante.**

Nous avons ensuite caractérisé les effets de l'acide myristique (C14:0) sur les paramètres décrits précédemment. Cet acide gras est stocké de façon importante dans les IPEC-J2 après 3 jours de traitement, comme le soulignent les données de Nile red qui laissent apparaître une stéatose plutôt macrovésiculaire (**Figure 41.A et B**). Le C14:0 induit également une augmentation significative de l'expression de *Cd36* (**Figure 41.C**). Sur la fonction mitochondriale, l'acide myristique induit une diminution de l'efficacité de couplage de la chaîne de respiration mitochondriale (**Figure 41.D**) de façon associée à une augmentation de la fuite de protons (**Figure 41.F**). L'expression d'*Atp5b* est diminuée de 30% en réponse au traitement avec l'acide myristique (**Figure 41.G**). Ces résultats d'expression génique et de bioénergétique cellulaire suggèrent de prime abord que la synthèse d'ATP est altérée par le C14:0. L'expression de *Nrf2* est de plus diminuée de 20% et pourrait indiquer une altération de la biogénèse mitochondriale et/ou de l'expression des gènes de la machinerie antioxydante, notamment régulée par *Nrf2* (**Figure 41.H**). Néanmoins, la détection des peroxydes à l'état basal est plus faible dans les cellules traitées avec du C14:0 tandis que l'induction d'un stress oxydant à l'aide d' $H_2O_2$  ne montre pas de différence entre les groupes (**Figure 41.I**). De plus, l'expression de *Gpx2*, *Nqo1* et de *Sod1* n'est pas modifiée en réponse au traitement (**Figure 41.J**). En revanche, à l'instar du C12:0, l'expression de *Cat* est augmentée par l'acide myristique et pourrait contribuer à expliquer la diminution des peroxydes à l'état basal.



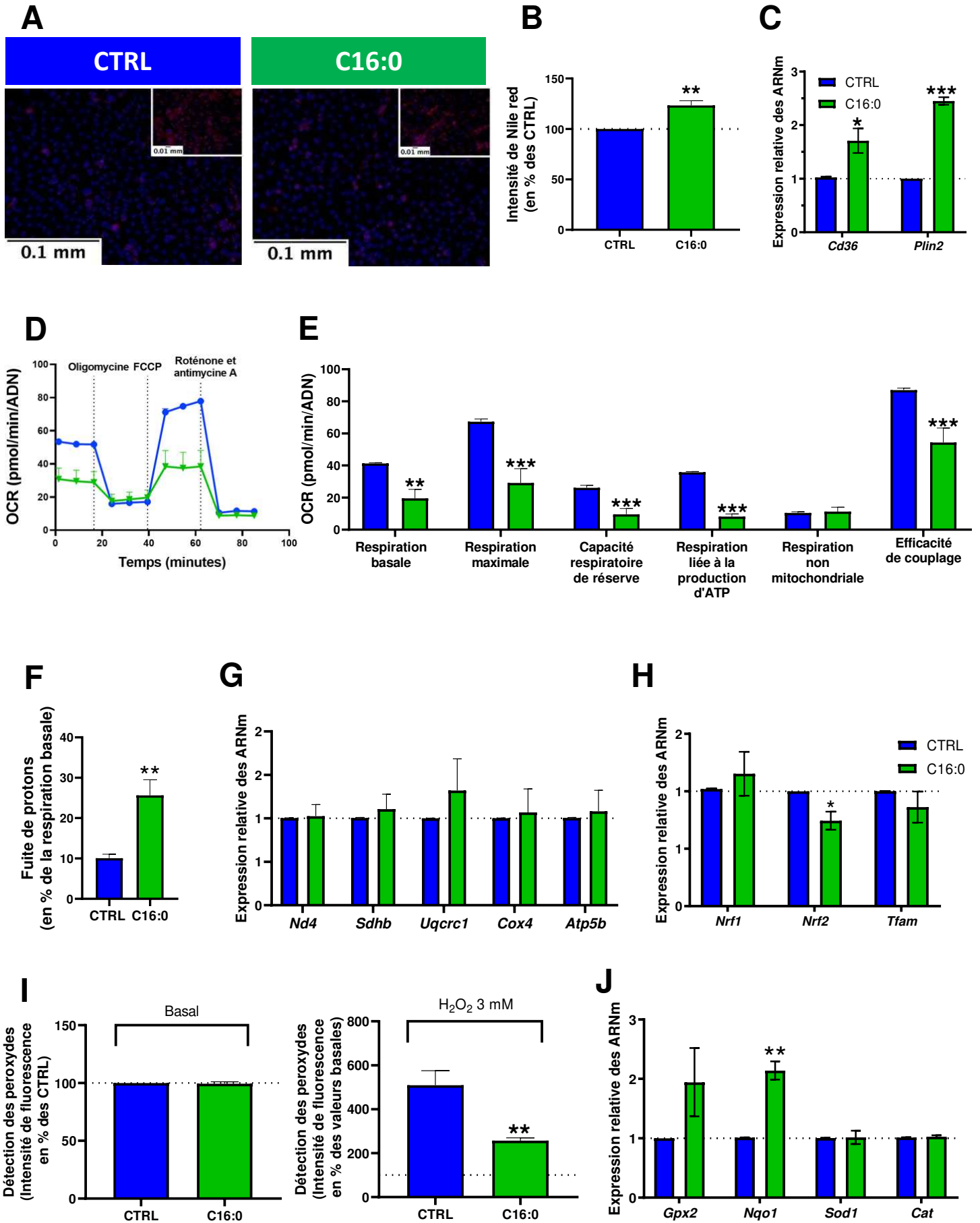


**Figure 41. Impact de l'acide myristique sur la stéatose entérocytaire, la fonction mitochondriale et le stress oxydant des IPEC-J2.**

Les données ont été obtenues après traitement des IPEC-J2 pendant 3 jours avec 250  $\mu$ M de C14:0. La condition contrôle (CTRL) correspond à un traitement au DMSO à 0,6% final. **A.** Images représentatives de la coloration des lipides neutres (Nile red en rouge) dans les cellules IPEC-J2 contre-colorées avec du Hoechst (noyaux en bleu) après un traitement de 3 jours avec du C14:0. **B.** Mesure de l'intensité de la fluorescence du Nile red normalisée par l'intensité de Hoechst. Les données sont présentées en pourcentage des valeurs CTRL. **C.** Expression relative de *Cd36* et de *Plin2*. **D.** Taux de consommation d'oxygène (OCR) au cours du temps après l'injection séquentielle de 2  $\mu$ M d'oligomycine, 2  $\mu$ M de FCCP et 0,5  $\mu$ M d'antimycine A et de roténone. **E.** Paramètres de bioénergétique mitochondriale des IPEC-J2 après 3 jours de traitement avec le C14:0. **F.** Expression relative des gènes codant pour des sous-unités de la chaîne de respiration mitochondriale. **G.** Expression relative de gènes régulant la biogénèse mitochondriale. **H.** Détection des peroxydes à l'état basal et après traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM) pendant 1h la sonde H<sub>2</sub>DCFDA. Les données ont été normalisées par la coloration au Hoechst et exprimées en pourcentage du CTRL, pour les peroxydes basaux, et en pourcentage des valeurs basales, pour les peroxydes détectés après le traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **I.** Expression relative de gènes impliqués dans la machinerie antioxydante. Les expressions relatives des gènes sont exprimées en changement relatif d'expression par rapport à la condition CTRL par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Les données sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM (N=4-6). Les différences significatives sont représentées par \*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs. CTRL.

### **L'acide palmitique provoque une dysfonction mitochondriale sévère associée à une stéatose microvésiculaire et l'induction de la machinerie antioxydante.**

L'acide palmitique s'accumule également dans les IPEC-J2 après 3 jours de traitement, plutôt sous forme microvésiculaire (**Figure 42.A et B**), caractérisée par de nombreuses petites gouttelettes lipidiques cytosoliques, et induit une augmentation de l'expression de *Cd36* ainsi que de *Plin2*, de 1,5 à 2 fois plus importante en comparaison des CTRL (**Figure 42.C**). Tout comme décrit dans la littérature, l'analyse de la bioénergétique cellulaire par le Seahorse montre une dysfonction mitochondriale induite par le C16:0 (**Figure 42.D**) qui se manifeste par une diminution des respirations basale, maximale et liée à la production d'ATP ainsi qu'un couplage de l'OXPPOS moitié moins efficace dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôle (**Figure 42.E**). La capacité respiratoire de réserve est également diminuée de moitié et indique une moins grande capacité des cellules à répondre à un stress métabolique. La fuite de protons est doublée par l'acide palmitique (**Figure 42.F**). En revanche, l'expression des gènes qui codent les sous-unités de la chaîne de respiration n'est pas modifiée par le traitement au C16:0 (**Figure 42.G**) tandis que l'expression de *Nrf2* est diminuée de 20% (**Figure 42.H**). Bien que la détection des peroxydes à l'état basal ne soit pas modifiée par le C16:0, l'expression de *Nqo1* est 2 fois plus importante dans la condition traitée par rapport aux CTRL (**Figure 42.I**) tandis que l'induction d'un stress oxydant par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoque une moindre production des peroxydes dans les cellules traitées (**Figure 42.I**).

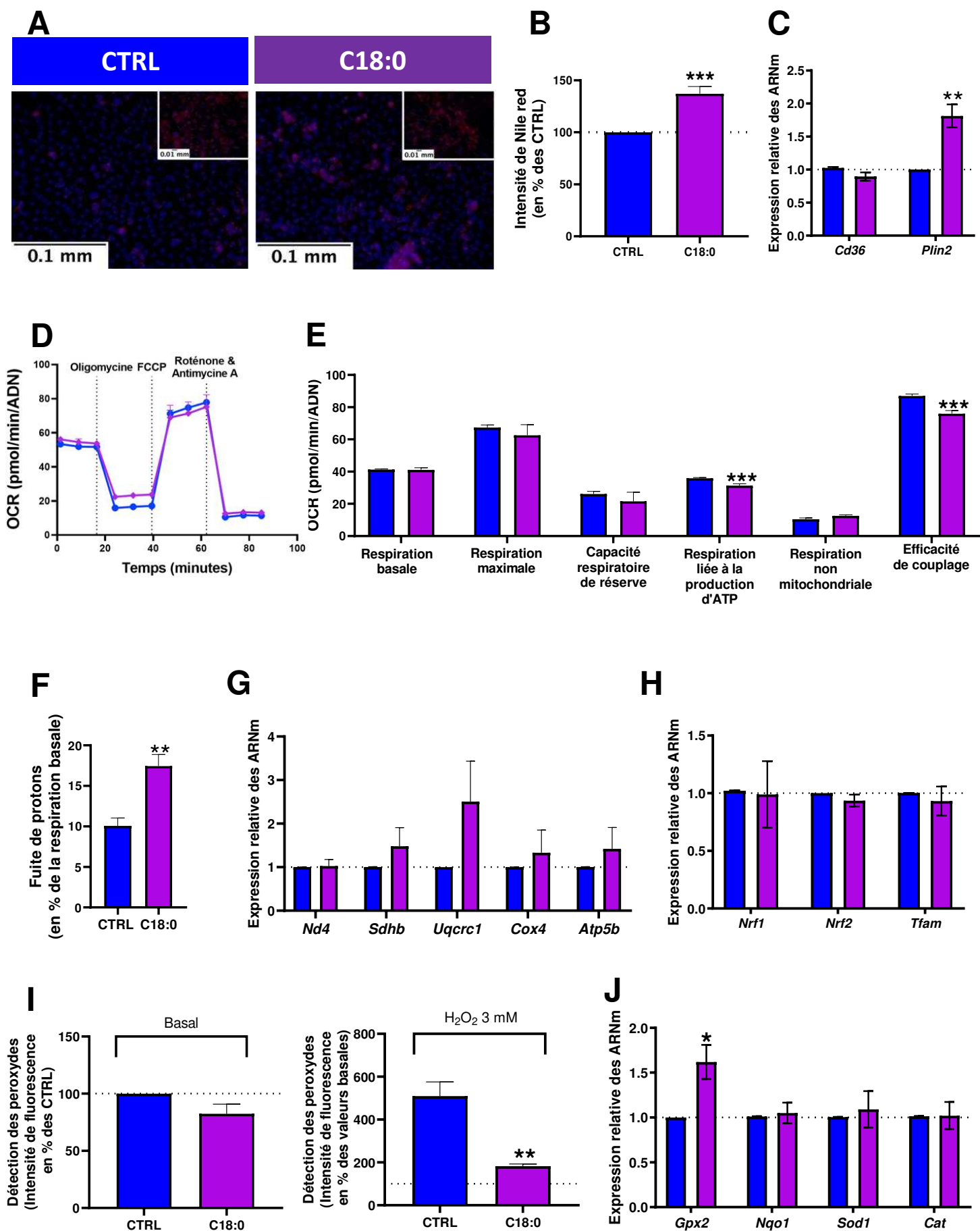


**Figure 42. Impact de l'acide palmitique sur la stéatose entérocytaire, la fonction mitochondriale et le stress oxydant des IPEC-J2.**

Les données ont été obtenues après que les IPEC-J2 aient été traitées pendant 3 jours avec 250  $\mu\text{M}$  de C16:0. La condition contrôle (CTRL) correspond à du DMSO à 0,6% final. **A.** Images représentatives de la coloration des lipides neutres (Nile red en rouge) dans les cellules IPEC-J2 contre-colorées avec du Hoechst (noyaux en bleu) après un traitement de 3 jours avec du C16:0. **B.** Mesures de l'intensité de la fluorescence du Nile red et normalisée par l'intensité de Hoechst. Les données ont été représentées en pourcentage des valeurs CTRL. **C.** Expression relative de *Cd36* et de *Plin2*. **D.** Taux de consommation d'oxygène (OCR) au cours du temps après l'injection séquentielle de 2  $\mu\text{M}$  d'oligomycine, 2  $\mu\text{M}$  de FCCP et 0,5  $\mu\text{M}$  d'antimycine A et de roténone. **E.** Paramètres de bioénergétique mitochondriale des IPEC-J2 après 3 jours de traitement avec le C16:0. **F.** Expression relative des gènes codant pour des sous-unités de la chaîne de respiration mitochondriale. **G.** Expression relative de gènes régulant la biogénèse mitochondriale. **H.** Détection des peroxydes à l'état basal et après traitement au  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3 mM) pendant 1h la sonde  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ . Les données ont été normalisées par la coloration au Hoechst et exprimées en pourcentage du CTRL, pour les peroxydes basaux, et en pourcentage des valeurs basales, pour les peroxydes détectés après le traitement au  $\text{H}_2\text{O}_2$ . **I.** Expression relative de gènes impliqués dans la machinerie antioxydante. Les expressions relatives des gènes sont exprimées en changement relatif d'expression par rapport à la condition CTRL par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Les données sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM (N=4-8). Les différences significatives sont représentées par \*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs. CTRL.

**L'acide stéarique diminue la respiration liée à la production d'ATP de façon associée à une stéatose microvésiculaire et l'induction de la machinerie antioxydante.**

Un traitement de 3 jours avec de l'acide stéarique induit également une augmentation du stockage des acides gras avec une stéatose microvésiculaire (**Figure 43.A et B**) associée à une augmentation de l'expression de *Plin2* (**Figure 43.C**). L'analyse Seahorse (**Figure 43.D**) montre une diminution de la respiration liée à la production d'ATP (**Figure 43.E**) associée à une fuite de protons (**Figure 43.F**) se traduisant par une diminution de l'efficacité de couplage (**Figure 43.E**) en réponse au traitement au C18:0 et suggérant une dépolarisation de la membrane interne mitochondriale. L'expression des gènes codant pour les complexes de la chaîne de respiration (**Figure 43.G**) et régulant la biogénèse mitochondriale (**Figure 43.H**) n'est pas modifiée par un traitement chronique à l'acide stéarique et indiquerait une capacité oxydative équivalente entre les groupes, mais rendue moins efficace du fait des fuites de protons. Quant à la détection des peroxydes, celle-ci est similaire à l'état basal entre les groupes mais l'ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> montre une diminution de la production de peroxydes par les cellules traitées avec du C18:0 en situation de stress oxydant (**Figure 43.I**), de façon associée à l'augmentation de l'expression de *Gpx2* (**Figure 43.J**).



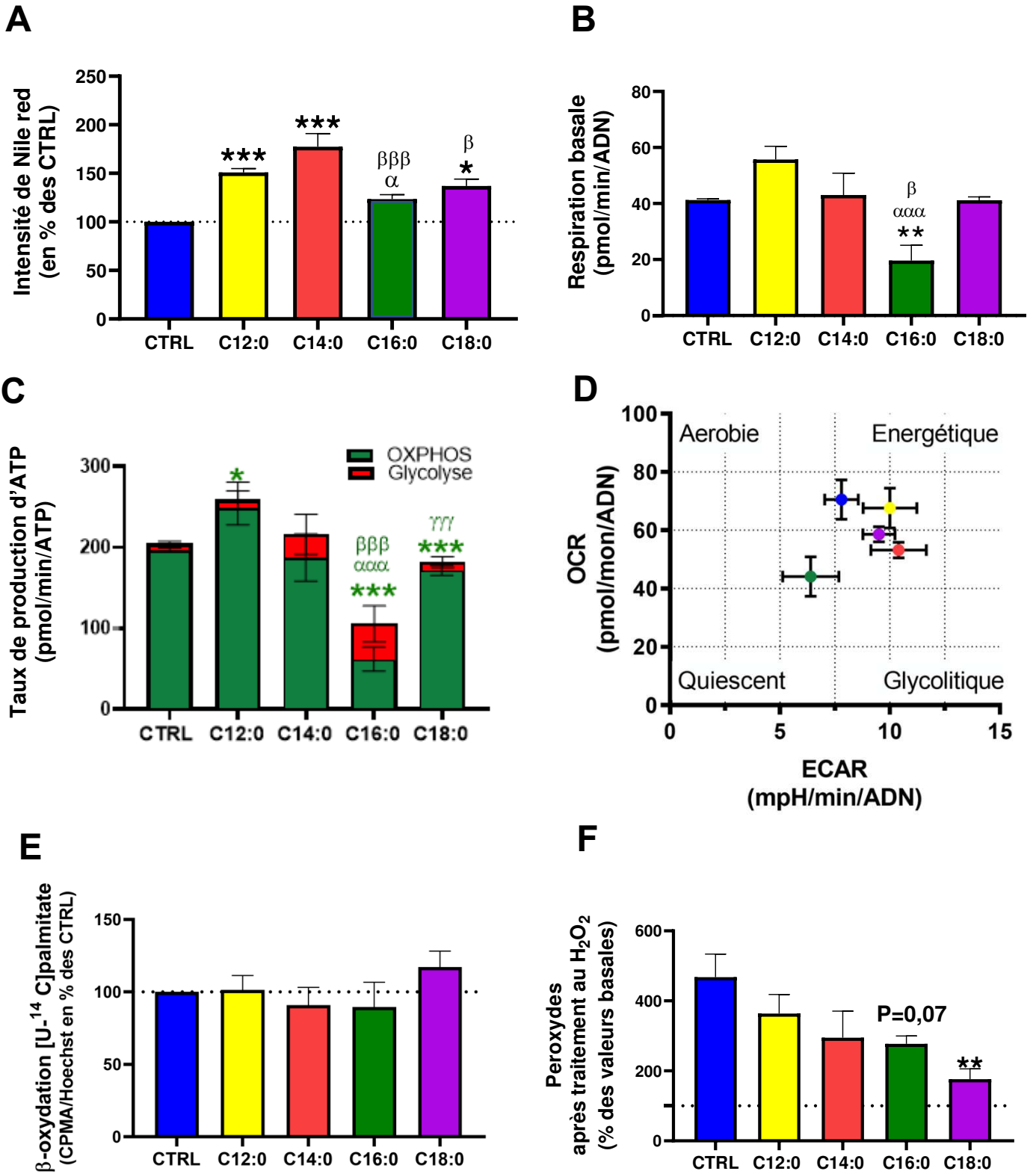
**Figure 43. Impact de l'acide stéarique sur la stéatose entérocytaire, la fonction mitochondriale et le stress oxydant des IPEC-J2.**

Les données ont été obtenues après que les IPEC-J2 aient été traitées pendant 3 jours avec 250  $\mu\text{M}$  de C18:0. La condition contrôle (CTRL) correspond à du DMSO à 0,6% final. **A.** Images représentatives de la coloration des lipides neutres (Nile red en rouge) dans les cellules IPEC-J2 contre-colorées avec du Hoechst (noyaux en bleu) après un traitement de 3 jours avec du C18:0. **B.** Mesures de l'intensité de la fluorescence du Nile red et normalisée par l'intensité de Hoechst. Les données ont été représentées en pourcentage des valeurs CTRL. **C.** Expression relative de *Cd36* et de *Plin2*. **D.** Taux de consommation d'oxygène (OCR) au cours du temps après l'injection séquentielle de 2  $\mu\text{M}$  d'oligomycine, 2  $\mu\text{M}$  de FCCP et 0,5  $\mu\text{M}$  d'antimycine A et de roténone. **E.** Paramètres de bioénergétique mitochondriale des IPEC-J2 après 3 jours de traitement avec le C18:0. **F.** Expression relative des gènes codant pour des sous-unités de la chaîne de respiration mitochondriale. **G.** Expression relative de gènes régulant la biogénèse mitochondriale. **H.** Détection des peroxydes à l'état basal et après traitement au  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3 mM) pendant 1h la sonde  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ . Les données ont été normalisées par la coloration au Hoechst et exprimées en pourcentage du CTRL, pour les peroxydes basaux, et en pourcentage des valeurs basales, pour les peroxydes détectés après le traitement au  $\text{H}_2\text{O}_2$ . **I.** Expression relative de gènes impliqués dans la machinerie antioxydante. Les expressions relatives des gènes sont exprimées en changement relatif d'expression par rapport à la condition CTRL par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Les données sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM (N=3-4). Les différences significatives sont représentées par \*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs. CTRL.



**Les acides gras palmitique et stéarique sont stockés de façon moins importante que les acides laurique et myristique mais induisent une diminution du taux de production d'ATP par OXPHOS.**

Afin de mieux comprendre les différences de réponses des IPEC-J2 aux différents acides gras testés, nous avons comparé les différents paramètres présentés précédemment. La comparaison des effets des traitements aux acides gras montrent une plus forte augmentation de l'accumulation des lipides avec le C14:0 et moindre avec le C16:0 et le C18:0 (**Figure 44.A**), comme renseigné dans la littérature sur la lignée Caco-2 (Tsunami, 2007). Cependant, les stéatoses provoquées par le C16:0 et le C18:0 sont plutôt microvésiculaires et associées à une augmentation significative de l'expression de *Plin2*. Quant à la respiration basale (**Figure 44.B**), celle-ci n'est significativement augmentée qu'avec le C12:0 tandis qu'elle est diminuée avec un traitement au C16:0 de façon associée à un phénotype quiescent des cellules traitées avec cet acide gras (**Figure 44.C**). De plus, le taux de production d'ATP par OXPHOS est plus important avec un traitement au C12:0 tandis qu'il est diminué avec le C16:0 et le C18:0. Bien que ce ne soit pas significatif, les cellules traitées avec du C16:0 pourraient avoir davantage recours à la glycolyse pour produire de l'énergie. Un traitement avec le C14 :0 pourrait également favoriser un plus grand recours à la glycolyse pour produire de l'énergie puisque, bien que cet acide gras augmente le découplage de l'OXPHOS, la respiration basale n'est pas augmentée. Le C18:0 n'altère pas quant à lui la respiration basale des IPEC-J2 mais la fuite de protons qu'il occasionne, associée à la diminution de la respiration liée à la production d'ATP, se manifeste par une diminution du taux de production d'ATP par OXPHOS (**Figure 44.D**). En dépit des différents effets que chacun de ces acides gras provoquent sur la fonction mitochondriale des IPEC-J2, aucun n'induit d'altération de la capacité de  $\beta$ -oxydation (**Figure 44.E**). Quant à la détection de peroxydes en situation de stress induit par  $H_2O_2$ , seul un traitement avec du C18:0 diminue significativement la production de peroxydes par rapport au CTRL (**Figure 44.F**).



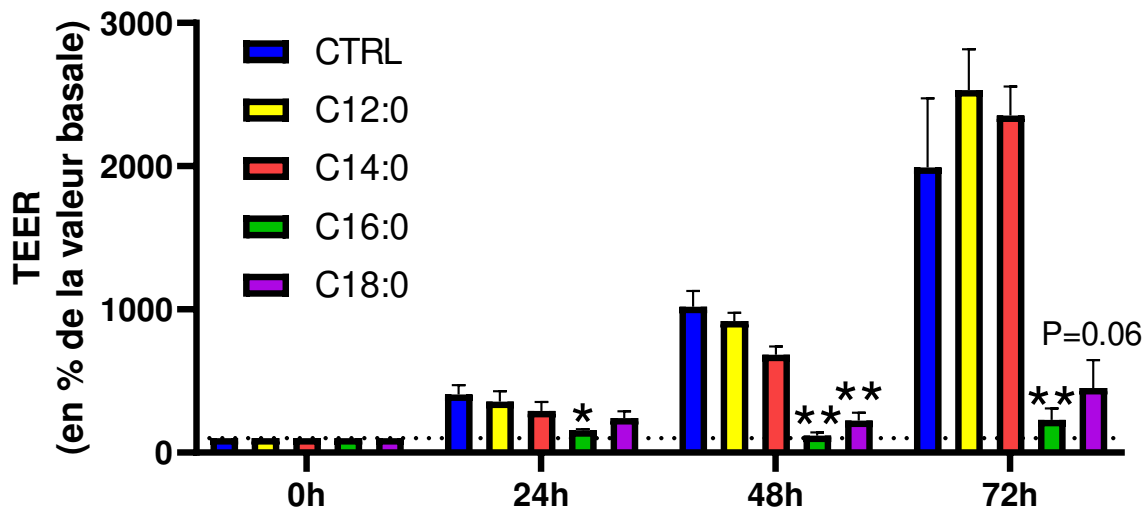
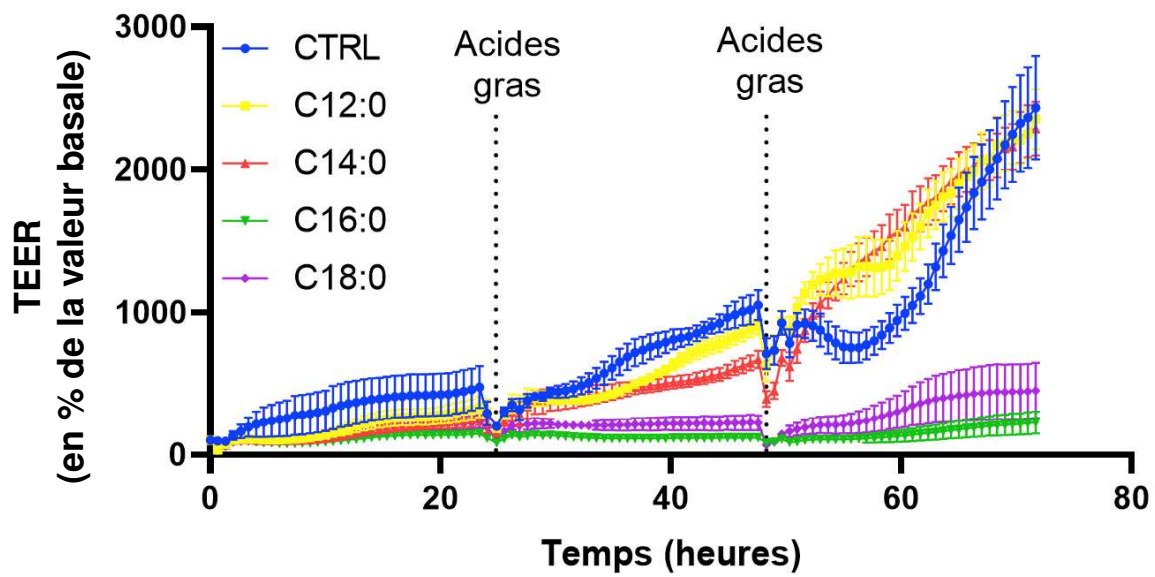
**Figure 44. Comparaison des effets de l'acide laurique, myristique, palmitique et stéarique sur la stéatose, la bioénergétique et la capacité de  $\beta$ -oxydation des IPEC-J2.**

Les données ont été obtenues après traitement des IPEC-J2 pendant 3 jours avec 250  $\mu$ M de C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0. La condition contrôle (CTRL) correspond à du DMSO à 0,6% final. **A.** Mesures de l'intensité de la fluorescence du Nile red normalisée par le Hoechst. **B.** Respiration basale des IPEC-J2 en réponse à 3 jours de traitement aux acides gras. **C.** Taux théorique de production d'ATP par phosphorylation oxydative (en vert) et par glycolyse (en rouge). **D.** Carte énergétique des IPEC-J2 après 3 jours de traitement, obtenue à partir des valeurs basales d'OCR et des taux d'acidifications extracellulaires (ECAR). **E.** Détection des peroxydes après l'induction d'un stress oxydant par un traitement  $H_2O_2$  (3 mM). Les valeurs sont exprimées en % de détection des peroxydes à l'état basal. **F.** Capacité de  $\beta$ -oxydation de l'acide palmitique  $^{14}C$  par les IPEC-J2 après 3 jours de traitement aux acides gras, exprimée en pourcentage des CTRL. Les données sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM (N=3-8). Les différences significatives sont représentées par \*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs. CTRL,  $^{\alpha\alpha\alpha}P < 0,001$  vs C12:0,  $^{\beta\beta\beta}P < 0,001$  vs C14:0,  $^{\gamma\gamma\gamma}P < 0,001$  vs C16:0.

## **Les acides palmitique et stéarique induisent une augmentation de la perméabilité épithéliale des IPEC-J2**

En faisant l'hypothèse qu'une dysfonction mitochondriale des CEI modifie la perméabilité intestinale, la TEER des IPEC-J2 a été mesurée au cours des 3 jours de traitement. La TEER est alors diminuée en réponse aux traitements avec du C16:0 et du C18:0, de façon significative après 24h de traitement. Ces résultats indiquent donc une augmentation de la perméabilité épithéliale suite au traitement avec ces 2 acides gras (**Figure 45.A et B**).

De façon intéressante, les données de TEER montrent que la perméabilité du tapis des IPEC-J2 est augmentée uniquement pour le C16:0 et le C18:0, ce qui pourrait notamment s'expliquer par une diminution de la production d'ATP induite par ces 2 acides gras ainsi que par une augmentation de la prolifération, comme indiqué par les données de Hoechst et de MTT. Ces données font écho aux résultats obtenus sur les souris DIO dont le jéjunum est caractérisé par des perturbations mitochondriales des CEI associée à une augmentation de la prolifération des CEI et une diminution de la TEER. En revanche, les différents acides gras agissent tous plus ou moins sur la fuite de protons mesurées au Seahorse, influant sur la respiration liée à la production d'ATP et l'efficacité de couplage de la chaîne d'OXPHOS. Il est en effet connu que les acides gras ont la propriété d'être des agents découplants de l'OXPHOS en transférant des protons à travers la membrane mitochondriale interne via leur groupement carboxyle et de façon catalysée par les *Uncoupling proteins* notamment (Ricquier et al., 2000; Skulachev, 1999).



**Figure 45. Effets des acides gras sur la perméabilité épithéliale des IPEC-J2.**

**A.** Résistance électrique transépithéliale (TEER) au cours des 3 jours de traitement avec 250  $\mu$ M de C12:0, C14:0, C16:0 ou C18:0 avec un renouvellement toutes les 24h du milieu. Les données sont représentées en pourcentage de la valeur précédant le premier traitement pour chaque condition. **B.** TEER toutes les 24h. La condition contrôle (CTRL) correspond à un traitement au DMSO à 0,6% final. Les données sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM à chaque mesure (N=3). Les différences significatives sont représentées par \*P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. CTRL.

## Conclusion

En définitive, selon leur nature, les acides gras exercent des effets différents sur la fonction mitochondriale des CEI. En effet, alors que le C12:0 et le C14:0 n'altèrent pas, voire augmentent, le taux de production d'ATP, les plus longues chaînes C16:0 et C18:0 induisent une dysfonction mitochondriale associée à une augmentation de la perméabilité intestinale en lien avec une moindre production d'ATP. De façon intéressante, le traitement chronique avec un mélange composé des acides gras C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0 à 250  $\mu\text{M}$  chacun reproduit la dysfonction mitochondriale et l'activation de la machinerie antioxydante, toutes deux observées avec un traitement au C16:0 seul. Pourtant, l'évaluation de la fonction mitochondriale et du stress oxydant dans un mélange d'acides gras duquel l'acide palmitique est exclu reproduit également les mêmes effets. Ces résultats montrent donc qu'un traitement avec des acides gras saturés à longue chaîne et à forte concentration *in vitro* induit une dysfonction mitochondriale associée à une stéatose entérocytaire et une activation de la machinerie antioxydante, indépendamment des effets délétères provoqués par l'acide palmitique. Néanmoins, les différences obtenues entre les mélanges avec ou sans C16:0 pourraient être liés à la concentration totale du traitement (750  $\mu\text{M}$  vs 1000  $\mu\text{M}$ ). Un autre traitement avec un mélange de C12:0, C14:0 et C18:0 à 1 mM au total serait nécessaire pour conclure sur ces résultats.

## Partie II.6 : La fucoxanthine purifiée, un caroténoïde issu des algues brunes, stimule la fonction mitochondriale, présente des effets antioxydants et diminue l'accumulation lipidique dans le modèle IPEC-J2

---

### Contexte

Les résultats des précédentes parties montrent que la consommation d'un régime obésogène diminue la fonction mitochondriale des CEI et provoque une stéatose entérocytaire. Nous avons donc cherché une molécule capable de restaurer la fonction mitochondriale des CEI et/ou de diminuer l'accumulation lipidique dans les CEI.

La société évoluant vers des méthodes plus durables, en valorisant des ressources naturelles, les algues sont apparues comme une source peu exploitée de molécules nutraceutiques dotées de propriétés qui pourraient s'avérer intéressantes pour réduire les désordres métaboliques liés à l'obésité. La fucoxanthine, un pigment xanthophylle de la famille des caroténoïdes issu d'algues brunes diminue l'accumulation d'acides gras dans des hépatocytes FL83B (Chang et al., 2018) ou les tissus adipeux de souris (Wu et al., 2014). Elle présente également des propriétés antioxydantes (Wang et al., 2018) et stimule la biogénèse mitochondriale dans le tissu adipeux de souris (Wu et al., 2014). De plus, elle exerce une activité pro-apoptotique sur cellules cancéreuses coliques humaines (modèle cellulaire Caco-2).

Dans ce contexte et dans le cadre d'un projet collaboratif avec le Centre d'Etudes et de Valorisation des Algues, notre étude a visé à évaluer les effets de la fucoxanthine sur des CEI modélisant *in vitro* le phénotype entérocytaire observé chez la souris soumise à un régime DIO. Les données présentées dans cette partie sont préparatoires à une potentielle étude *in vivo* sur un modèle d'obésité induite par le régime.

### Objectifs

Les objectifs de cette étude sont dans un premier temps, d'évaluer les effets de la fucoxanthine seule sur la fonction mitochondriale puis en réponse à un stress oxydant induit par du peroxyde d'hydrogène après un traitement préventif avec la fucoxanthine. Dans un second temps, les effets de la fucoxanthine sur l'accumulation des acides gras et le stress oxydant induit par un mélange d'acides gras sont évalués sur un modèle d'IPEC-J2 stéatosées.

## Matériel et méthodes

Les méthodes de culture de la lignée IPEC-J2 présentées dans cette partie sont similaires à celles décrites dans le matériel et méthodes de la partie précédente.

### Traitements à la fucoxanthine

Les cellules ont étéensemencées la veille des traitements dans des plaques 96 ou 24 puits à une densité de 100 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Les cellules ont été traitées 24h avec de la fucoxanthine purifiée (16337, Sigma-Aldrich) à 5, 10, 25, 50, 100 ou 250 µM. Avant traitement, la fucoxanthine a été reprise dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 100 mM puis une dilution au dixième dans du milieu de culture a été réalisée. Les traitements ont ainsi été opérés à partir de cette solution de fucoxanthine à 10 mM. Dans les cas où les effets de différentes concentrations de fucoxanthine ont été comparés, la condition contrôle correspond à du milieu de culture supplémenté avec la plus forte quantité de DMSO correspondant à la concentration la plus forte de fucoxanthine testée. Dans l'optique d'évaluer les effets antioxydants de la fucoxanthine, les IPEC-J2 ont d'abord été traitées pendant 24h avec de la fucoxanthine seule puis du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; 216763, Sigma-Aldrich), dilué à 750 µM dans le milieu de culture, a été ajouté pendant 1 h pour induire un stress oxydant.

### Activité des complexes de la chaîne de respiration mitochondriale

La mesure de l'activité des complexes de la chaîne de respiration mitochondriale a été réalisée à l'aide du Seahorse XFe24. Le jour de l'analyse, les cellules IPEC-J2ensemencées dans la plaque Seahorse XFe24 ont été rincées dans de la *mitochondrial assay solution* (MAS) préchauffée à 37°C et composée de 70 mM de sucrose (S-8501, Sigma-Aldrich), 220 mM de D-mannitol (M9546, Sigma-Aldrich), 10 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (P5655, Sigma-Aldrich), 5 mM de MgCl<sub>2</sub> (M2670, Sigma-Aldrich), 2 mM d'HEPES (H-4034, Sigma-Aldrich), 1 mM d'acide éthylène glycol-bis(β-aminoéthyl éther)-N,N,N',N'-tétraacétique (EGTA, E-4370, Sigma-Aldrich) et pH ajusté à 7,2. Juste avant l'analyse, du MAS supplémenté avec 10 mM de pyruvate (107360, Sigma-Aldrich), 4 mM d'ADP (A5285, Sigma-Aldrich) et 1 nM d'agent perméabilisant (102504-100, Agilent) et ajusté à pH 7,2 a été ajouté à chaque puits. La mesure de l'activité des complexes mitochondriaux a consisté en l'injection séquentielle de 20 µM de roténone (02150154-CF, MP Biomedicals), 100 mM de succinate (S3674, Sigma-Aldrich), 20 µM d'antimycine A (A8674, Sigma-Aldrich), et un mélange composé de 100 mM d'ascorbate (A5960, Sigma-Aldrich) avec 1 mM de dichlorhydrate de N,N,N',N'-Tétraméthyl-p-phénylènediamine (TMPD; 89890, Sigma-Aldrich). Tous les composés ont été dilués dans du MAS complet. Chaque mesure d'OCR a été effectuée 3 fois avec pour, chaque cycle, 0,5 min de mélange, 0,5 min d'attente, 2 min de mesures.



## **Co-traitements à la fucoxanthine et aux acides gras**

Afin d'analyser les effets de la fucoxanthine sur la stéatose entérocytaire et le stress oxydant des IPEC-J2, les cellules ont été traitées avec le mélange d'acides laurique, myristique, palmitique et stéarique à 250  $\mu\text{M}$  chacun et repris dans du DMSO à 0,6% final dans du milieu de culture, en co-traitement ou non avec de la fucoxanthine 100  $\mu\text{M}$ , préalablement diluée dans du milieu de culture pour atteindre 0,1% de DMSO final. La condition contrôle correspond donc à du milieu de culture supplémenté à 0,7% de DMSO final tandis que les conditions acides gras seuls et fucoxanthine sont supplémentées en DMSO pour atteindre également les 0,7% finaux.

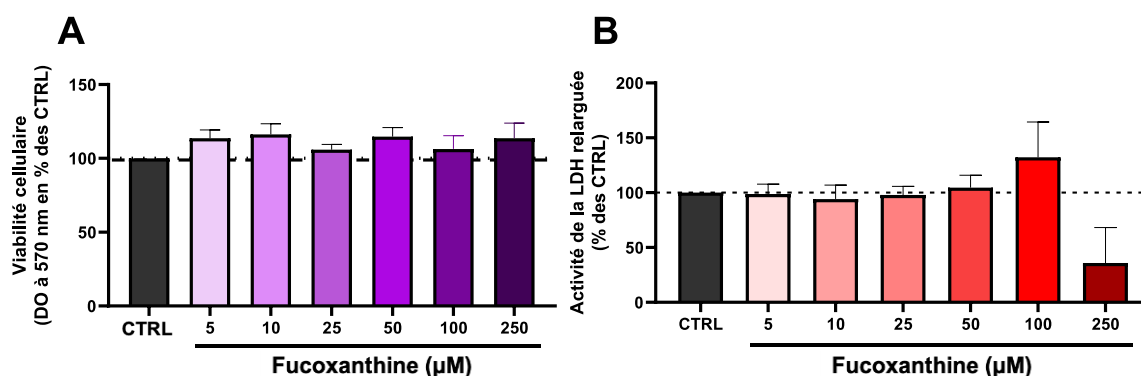
## **Analyses statistiques**

Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques entre 2 conditions ont été réalisées par un test de Student non pairé. Les analyses statistiques groupées ont été réalisées par ANOVA et test de Tukey pour les comparaisons multiples. Toutes les données ont été analysées par le logiciel GraphPad Prism version 8.0.2. Les P-values obtenues après ajustement pour les comparaisons multiples  $< 0,05$  ont été considérées comme statistiquement significatives.

## **Résultats et discussion**

### **La fucoxanthine n'altère pas la viabilité ni n'induit de mort cellulaire sur les IPEC-J2.**

Vingt-quatre heures de traitement avec de la fucoxanthine à des concentrations allant de 5 à 250  $\mu\text{M}$  n'ont pas affecté la viabilité cellulaire (**Figure 46.A**). De plus, la fucoxanthine n'exerce pas d'effet cytotoxique à ces concentrations, ni en deçà, comme en témoigne l'absence d'augmentation de l'activité de LDH relarguée dans le milieu de culture (**Figure 46.B**). Les données ont été normalisées par la quantité d'ADN (Hoeschst) afin d'éviter tout biais lié à une éventuelle densité cellulaire plus importante suite au traitement à la fucoxanthine.

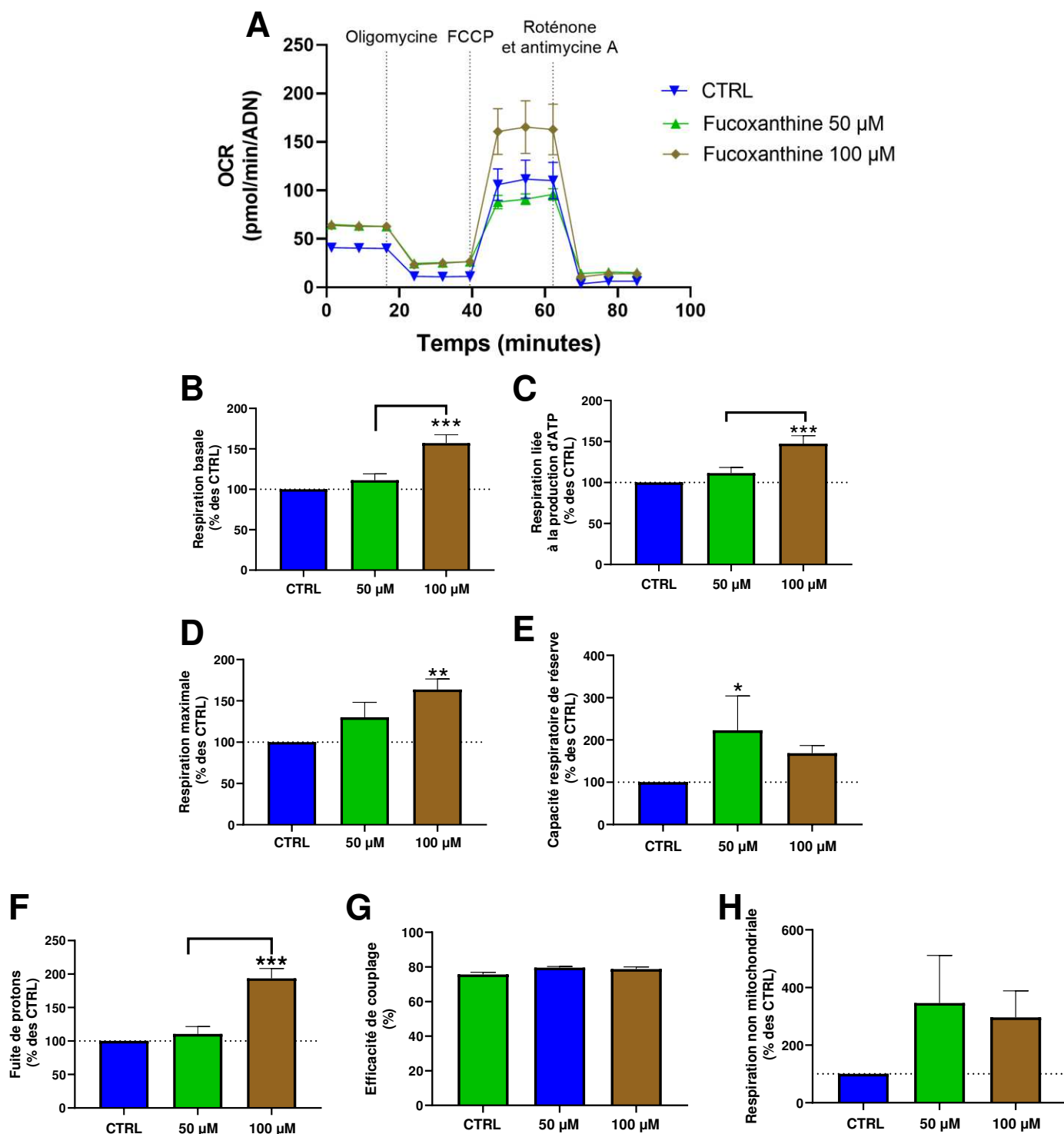


### Figure 46. Évaluation de la cytotoxicité après traitement à la fucoxanthine.

Les cellules IPEC-J2 ont été traitées pendant 24h avec de la fucoxanthine de 5 µM à 250 µM. La condition CTRL correspond à la plus forte concentration de DMSO utilisée pour reprendre la fucoxanthine, soit 0,25%. Évaluation de la cytotoxicité après traitement à la fucoxanthine **A**, par le test MTT **B**, par mesure de l'activité de la LDH relarguée dans le milieu de culture. Les données sont présentées en pourcentage des valeurs CTRL et en moyenne ± SEM.

### La fucoxanthine améliore les paramètres de bioénergétique mitochondriale.

La fonction mitochondriale a été évaluée par mesure du taux de consommation d'oxygène (OCR) après traitement des cellules avec de la fucoxanthine (50 et 100 µM) pendant 24h (**Figure 47.A**). Le calcul des paramètres de bioénergétique cellulaire à partir des courbes d'OCR montre une augmentation des respirations basale (**Figure 47.B**) et liée à la production d'ATP (**Figure 47.C**), uniquement après un pré-traitement à 100 µM de fucoxanthine. La respiration maximale est de plus uniquement augmentée avec un traitement de fucoxanthine à 100 µM par rapport au CTRL (**Figure 47.D**), tout comme la capacité respiratoire de réserve (**Figure 47.E**) et la fuite de protons (**Figure 47.F**), soulignant un effet découplant de la fucoxanthine sur la chaîne de respiration mitochondriale.



**Figure 47. Bioénergétique cellulaire après un traitement à la fucoxanthine.**

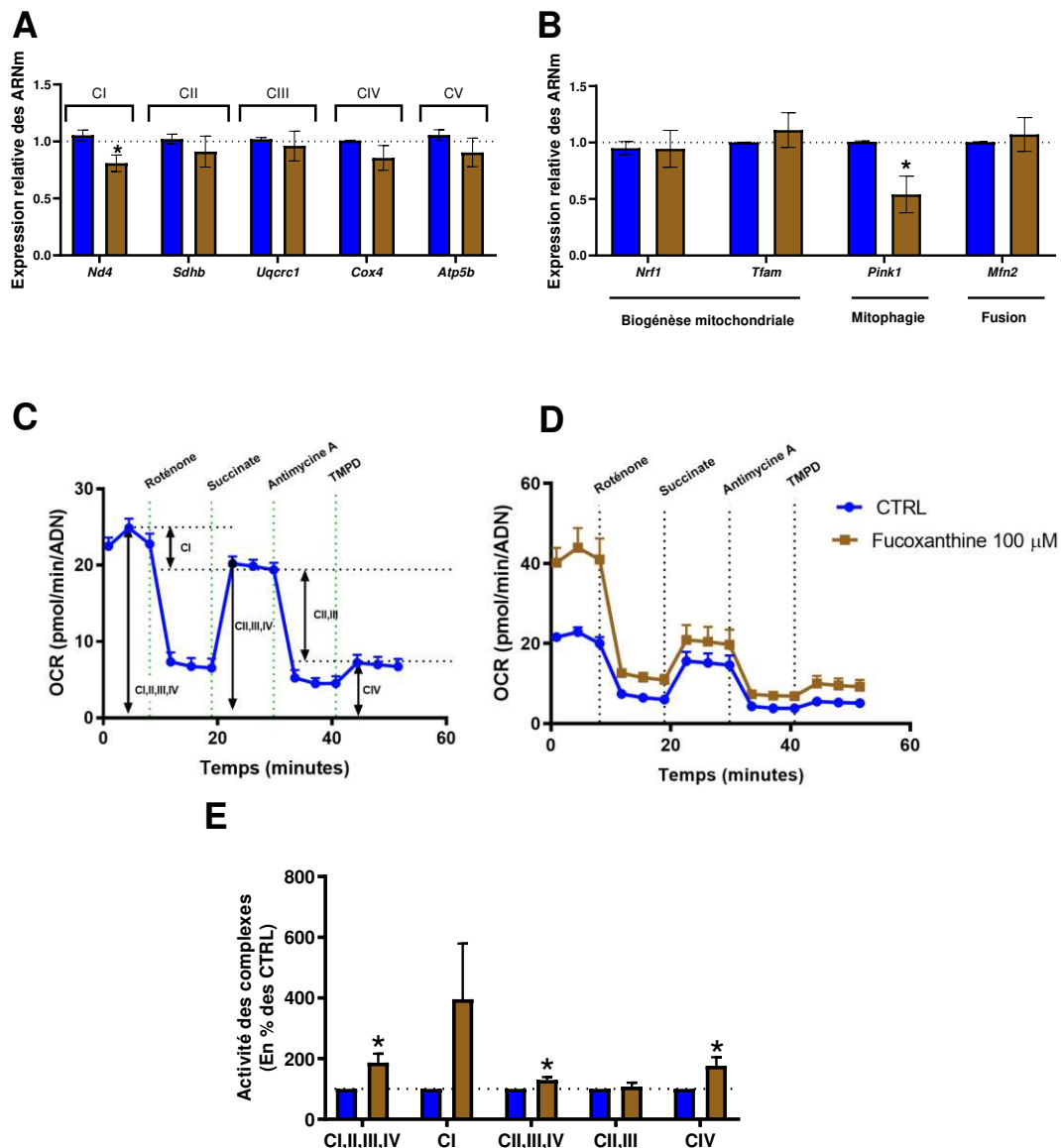
**A.** Taux de consommation d'oxygène (OCR) au cours du temps après l'injection séquentielle de 2 μM d'oligomycine, 2 μM de FCCP et 0,5 μM d'antimycine A et de roténone après traitement des cellules IPEC-J2 pendant 24h avec 50 ou 100 μM de fucoxanthine. **B.** Respiration basale. **C.** Respiration liée à la production d'ATP. **D.** Respiration maximale. **E.** Capacité respiratoire de réserve. **F.** Fuite de protons. **G.** Efficacité de couplage. **H.** Respiration non-mitochondriale. N=3 par condition. Les données sont présentées en pourcentage des valeurs CTRL et en moyenne ± SEM. Les différences significatives sont représentées par \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P < 0,001 vs CTRL et <sup>α</sup>P<0,05, <sup>αα</sup>P<0,01 vs 50 μM de fucoxanthine. N=3 par condition.

Par ailleurs, la fuite de protons augmentée (**Figure 47.F**) associée à la diminution de l'efficacité de couplage (**Figure 47.G**) pourrait s'expliquer par une dissipation du gradient de protons dans la membrane interne des mitochondries par l'intermédiaire des protéines découplantes. La fuite de protons pourrait alors apparaître comme un mécanisme adaptatif pour contrecarrer l'augmentation de l'activité des complexes, permettant la création de chaleur plutôt que d'ATP et évitant ainsi une production en surplus d'énergie (Jeon et al., 2010). A l'inverse, il n'est pas exclu que la fucoxanthine stimule la fuite de protons et qu'en contrepartie, l'activité des complexes mitochondriaux soit augmentée pour compenser les fuites. En outre, la fuite de protons peut constituer un mécanisme de défense antioxydante. Les protons libérés dans la matrice mitochondriale peuvent alimenter la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les SOD. De plus en plus de travaux montrent en effet que la fuite de protons s'apparente à un mécanisme de défense pour empêcher l'augmentation de production des ERO (Cheng et al., 2017).

#### **La fucoxanthine augmente l'activité de la chaîne de respiration mitochondriale sans modifier la dynamique mitochondriale ou la capacité oxydative.**

Afin de déterminer l'origine de l'augmentation des paramètres de bioénergétique mitochondriale, plus marquée à 100 µM de fucoxanthine qu'à 50 µM, l'expression de gènes qui codent des sous-unités des complexes de la chaîne de respiration mitochondriale a été mesurée. Les expressions relatives de ces gènes ne sont pas différentes de celles du contrôle en réponse à un traitement de 24h de fucoxanthine à 100 µM, à l'exception d'une légère diminution de *Nd4* qui code pour une sous-unité du complexe I (**Figure 48.A**). L'expression relative de gènes impliqués dans la biogénèse (*Nrf1* et *Tfam*) et la fusion (*Mfn2*) mitochondriale n'est pas non plus modifiée par le traitement (**Figure 48.B**). En revanche, l'expression de *Pink1*, impliquée dans la mitophagie, est diminuée de moitié lorsque les cellules sont traitées avec 100 µM de fucoxanthine et suggérerait que la fucoxanthine limite la destruction mitochondriale (**Figure 48.B**). L'activité des complexes de la chaîne de respiration mitochondriale a également été évaluée après 24h de traitement avec 100 µM de fucoxanthine par mesure de l'OCR en réponse à des activateurs/inhibiteurs de la chaîne respiratoire (**Figure 48.C et D**). Les données d'OCR indiquent que l'activité globale de la chaîne de respiration mitochondriale est augmentée par la fucoxanthine, et notamment celle du complexe IV (**Figure 48.E**). Par conséquent, l'augmentation de la bioénergétique mitochondriale provoquée par la fucoxanthine provient probablement d'une stimulation de l'activité des complexes mitochondriaux, sans doute en lien avec l'augmentation de la fuite de protons, plutôt que par une augmentation de la capacité oxydative des IPEC-J2. Il reste néanmoins à étayer l'hypothèse d'une augmentation de la biogénèse induite par la fucoxanthine. Il a en effet été montré que l'ajout de fucoxanthine dans l'aliment augmente l'expression de *Pgc1a*, *Mnf1* et

*Mfn2* dans du tissu adipeux de souris (Wu et al., 2014). Cependant, nous ne sommes pas parvenus pour le moment à mesurer l'expression de *Pgc1a* dans les IPE-J2.

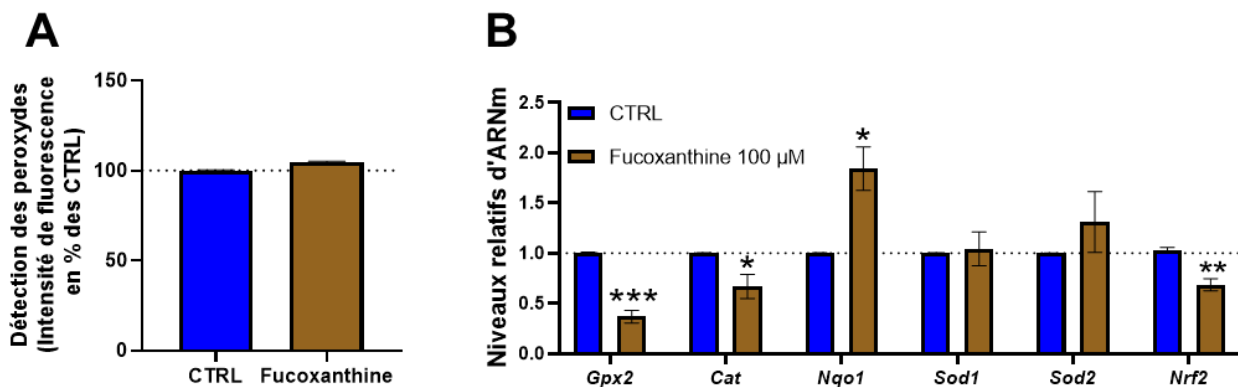


**Figure 48. Effet de la fucoxanthine sur l'activité des complexes mitochondriaux et la capacité oxydative.**

**A.** Expression relative des gènes codant pour des sous-unités du complexe I (*Nd4*), du complexe II (*Sdhd*), du complexe III (*Uqcrc1*), du complexe IV (*Cox4*) et du complexe V (*Atp5b*) de la chaîne de respiration mitochondriale. **B.** Expression relative de gènes régulant la biogénèse mitochondriale (*Nrf1*, et *Tfam*), la fission (*Pink1*) et la fusion (*Mfn2*). **C.** Schéma décrivant la mesure de l'activité des complexes de la chaîne de respiration mitochondriale en réponse à l'injection de roténone (2 µM), succinate (10 mM), antimycine A (2 µM) et TMPD (100 µM). **D.** Mesure de l'OCR en réponse aux activateurs et perturbateurs des complexes de la chaîne de respiration mitochondriale et **E.** activité des complexes de la chaîne de respiration mitochondriale après un traitement de 24h avec 100 µM de fucoxanthine. Les données sont représentées en pourcentage des valeurs CTRL. Les expressions relatives des gènes sont exprimées en changement relatif d'expression par rapport à la condition CTRL par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Les différences significatives sont représentées par \*P < 0,05 vs. CTRL. N=3 par condition.

### La fucoxanthine diminue l'induction de la machinerie antioxydante à l'état basal.

Étant donné la forte activité mitochondriale en réponse à 100  $\mu\text{M}$  de fucoxanthine, les ERO ont été mesurées. Néanmoins, aucune différence de détection des peroxydes entre le traitement à la fucoxanthine et le contrôle n'a été mesurée (**Figure 49.A**). De plus, la mesure de l'expression de gènes de la machinerie antioxydante montre que la fucoxanthine augmente l'expression de *Nqo1* tandis que celle de *Gpx2*, *Cat* et *Nrf2* sont diminuées (**Figure 49.B**). Il est donc possible que la fucoxanthine exerce un effet anti-oxydant propre à sa structure qui se substitue à la défense antioxydante de la cellule mais nécessiterait néanmoins *Nqo1*. Ces résultats indiquent donc une modification de l'homéostasie redox par la fucoxanthine à l'état basal.



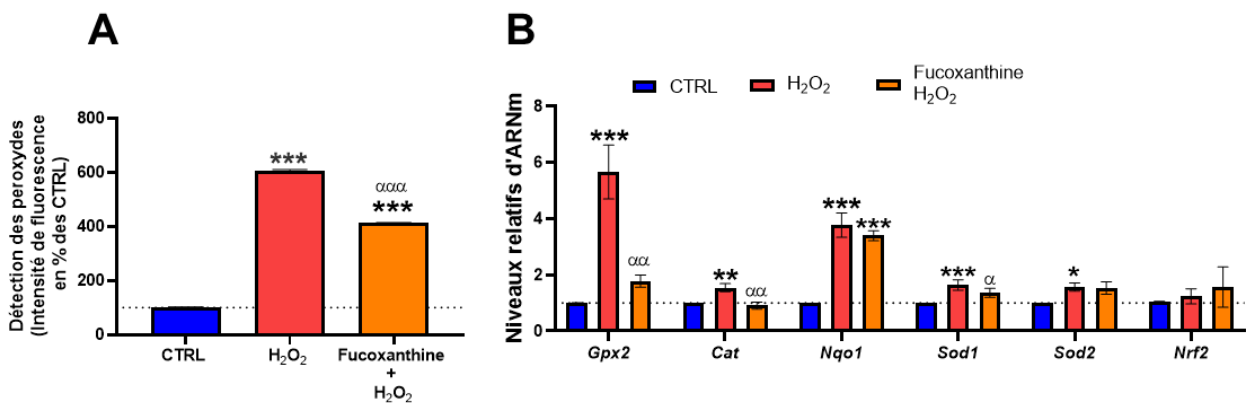
**Figure 49. Effet de la fucoxanthine sur la production de peroxydes et sur l'expression de gènes de la machinerie antioxydante.**

Les IPEC-J2 ont été traitées à la fucoxanthine à 100  $\mu\text{M}$  pendant 24h. **A.** Détection des peroxydes à l'état basal par la sonde  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , exprimées en pourcentage des CTRL. **B.** Expressions relatives des gènes codant des enzymes de la machinerie antioxydante. Les expressions des gènes sont exprimées en changement relatif d'expression par rapport à la condition CTRL par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Les différences significatives sont représentées par \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  vs. CTRL.  $N=3$  par condition.

**La fucoxanthine diminue la production de peroxydes en situation de stress oxydant et prévient la forte induction de la machinerie antioxydante.**

Afin d'évaluer l'éventuel effet antioxydant de la fucoxanthine dans notre modèle cellulaire, les IPEC-J2 ont été pré-traitées avec 100  $\mu\text{M}$  de fucoxanthine pendant 24h. Un stress oxydant a ensuite été induit par l'ajout de 750  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pendant 1h. Le pré-traitement à la fucoxanthine entraîne une diminution de la production d'ERO induite par le traitement  $\text{H}_2\text{O}_2$  seul et confirme les propriétés antioxydantes de la fucoxanthine dans notre modèle (**Figure 50.A**). De plus, un pré-traitement à la fucoxanthine prévient l'augmentation de l'expression relative de gènes impliqués dans la réponse antioxydante (*Gpx2*, *Cat*, *Sod1*) par rapport au  $\text{H}_2\text{O}_2$  seul, sans pour autant présenter les mêmes niveaux d'expression que les CTRL (**Figure 50.B**). En revanche, l'expression de *Nqo1* est également augmentée similairement au traitement avec de la fucoxanthine seule (**Figure 50.B**).

L'effet anti-oxydant de la fucoxanthine pourrait tout d'abord provenir de sa structure. Elle présente en effet une liaison allénique permettant la neutralisation des radicaux libres de l'oxygène, piégeant ainsi les ERO et évitant les dommages cellulaires (Wu et al., 2014). Néanmoins le mécanisme expliquant la modification de l'expression des gènes de la machinerie antioxydante n'est pas connu. Une inhibition de l'expression de ces gènes par la fucoxanthine est envisageable. Il a par ailleurs été montré dans un modèle *in vitro* d'hépatocytes que la fucoxanthine induit d'abord une augmentation des ERO qui activent la phosphorylation de p38 et ERK favorisant ainsi la translocation de Nrf2 dans le noyau et la transcription de gènes de la machinerie antioxydante tel que *Nqo1* (Liu et al., 2011; Wang et al., 2018). Les auteurs ont également montré que la fucoxanthine n'augmente pas l'expression de *Nrf2* directement mais induit plutôt son activation. Bien que dans notre modèle, l'expression de *Nrf2* soit diminuée en réponse à un traitement à la fucoxanthine, celle de *Nqo1* est augmentée. Il serait par conséquent pertinent de mesurer l'activité de Nrf2.



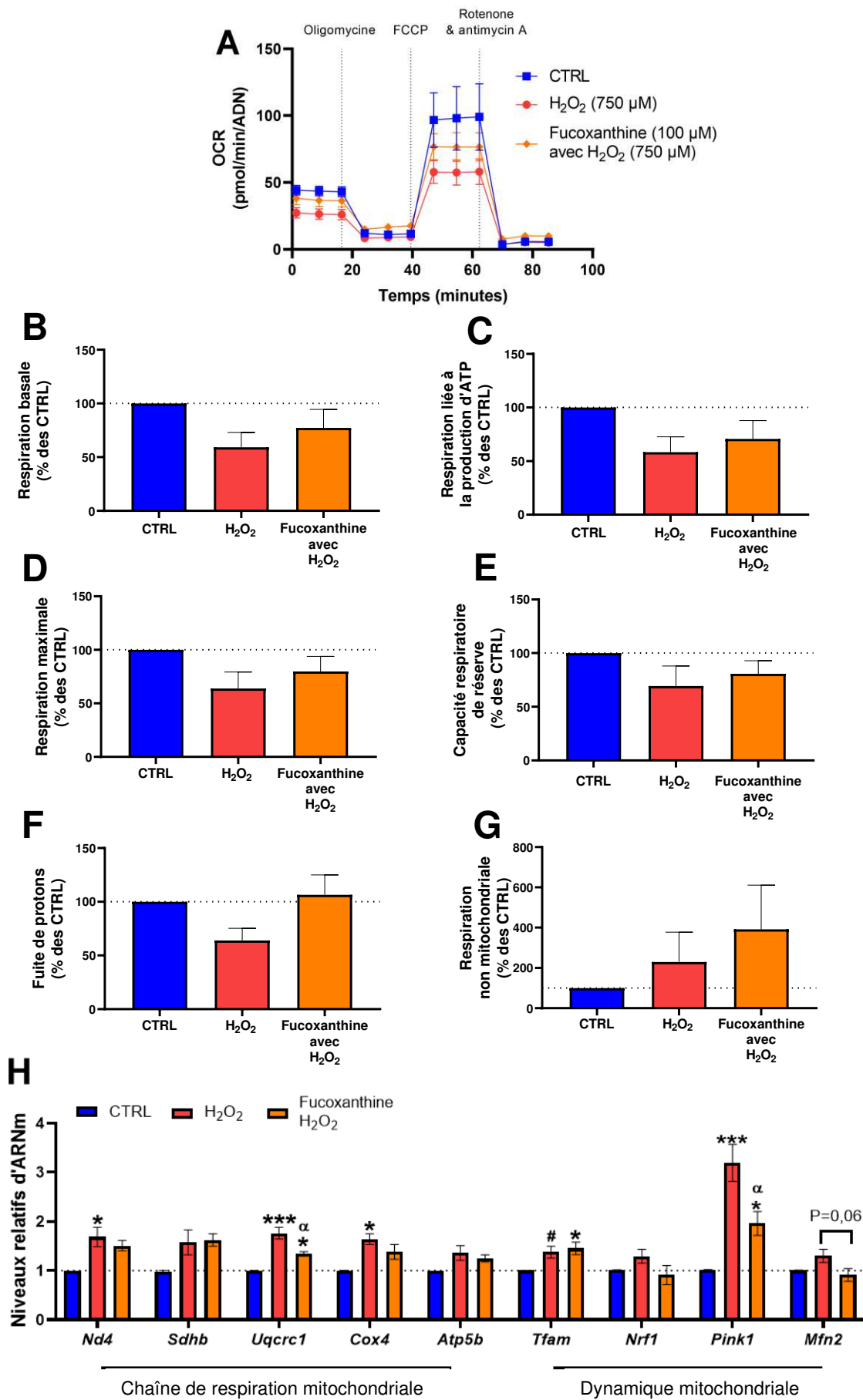
### Figure 50. Effet de la fucoxanthine sur la production de peroxydes et l'activation de la machinerie antioxydante des IPEC-J2 en situation de stress oxydant.

Les IPEC-J2 ont été traitées à la fucoxanthine pendant 24 h avec ou sans l'induction *a posteriori* d'un stress oxydant stimulé par l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (750 μM) pendant 1 h. **A.** Détection des peroxydes par la sonde H<sub>2</sub>DCFDA. Les données sont normalisées par coloration au Hoechst et exprimées en pourcentage des valeurs basales de détection des peroxydes. **B.** Expression relative de gènes de la machinerie antioxydante, exprimée en changement relatif par rapport à la condition CTRL par la méthode du 2<sup>-ΔΔCt</sup>. Les différences significatives sont représentées par \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 vs. CTRL et αP < 0,05 et ααP < 0,01 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. N=3 par condition.

### Un prétraitement à la fucoxanthine exerce un effet protecteur sur la respiration mitochondriale après induction d'un stress oxydant.

La bioénergétique cellulaire a ensuite été évaluée en réponse à pré-traitement de 24h avec 100 μM de fucoxanthine puis à l'induction d'un stress oxydant par ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 750 μM pendant 1h (**Figure 51.A**). Un pré-traitement de fucoxanthine, ne prévient pas de façon significative les fortes diminutions des respirations basale (**Figure 51.B**), liée à la production d'ATP (**Figure 51.C**) et maximale (**Figure 51.D**) ainsi que de la capacité respiratoire de réserve (**Figure 51.E**) induite par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En revanche, un effet protecteur du pré-traitement à la fucoxanthine s'observe par l'expression de gènes qui codent les complexes de la CTE, qui demeure équivalente à celle des CTRL, là où le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seul augmente leur expression (**Figure 51.H**). De plus, l'expression de *Pink1* est significativement diminuée par un pré-traitement à la fucoxanthine en réponse au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en comparaison de la condition H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seul (**Figure 51.H**), et suggère de nouveau un effet protecteur de la fucoxanthine sur l'élimination des mitochondries. Il semblerait également qu'en situation de stress oxydant, la fucoxanthine promeuve la formation de nouvelles mitochondries puisque l'expression de *Tfam* est augmentée par rapport aux CTRL.



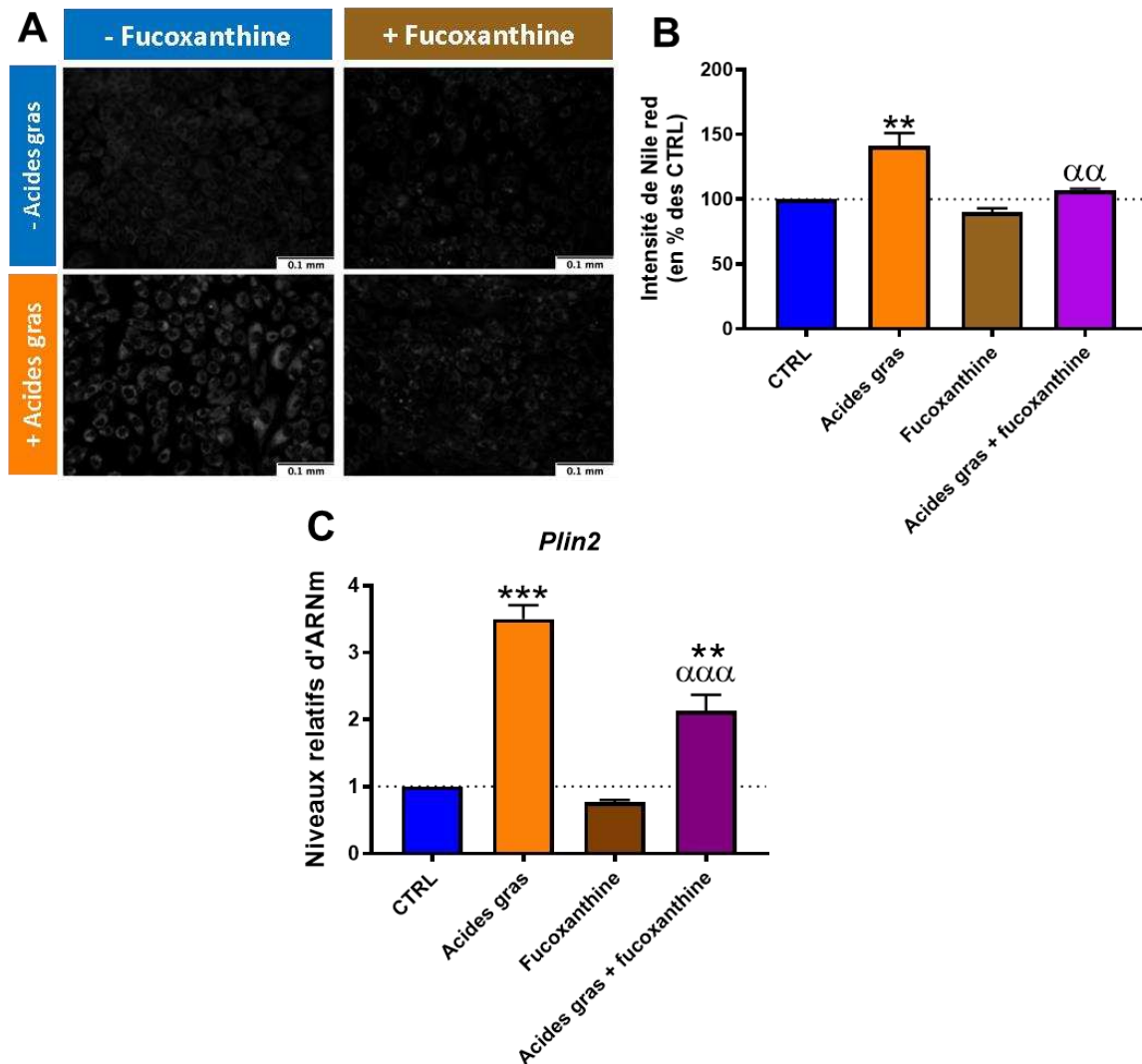


**Figure 51. Effet de la fucoxanthine sur la bioénergétique cellulaire en situation de stress oxydant.**

Les IPEC-J2 ont été traitées à la fucoxanthine (100  $\mu\text{M}$ ) pendant 24 h avec ou sans induction *a posteriori* d'un stress oxydant stimulé par l'ajout de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (750  $\mu\text{M}$ ) pendant 1 h. **A.** OCR au cours du temps après l'injection séquentielle de 2  $\mu\text{M}$  d'oligomycine, 2  $\mu\text{M}$  de FCCP et 0,5  $\mu\text{M}$  d'antimycine A et de roténone. **B.** Respiration basale. **C.** Respiration liée à la production d'ATP. **D.** Respiration maximale. **E.** Capacité respiratoire de réserve. **F.** Fuite de protons. **G.** Respiration non-mitochondriale. **H.** Expression relative de gènes codant pour des sous-unités des complexes mitochondriaux et régulant la dynamique mitochondriale. Les données de bioénergétique sont exprimées en pourcentage des CTRL. L'expression relative des gènes est exprimée en changement relatif par rapport à la condition CTRL par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Les différences significatives sont représentées par \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  vs. CTRL et  $^{\alpha}P < 0,05$ ,  $^{\alpha\alpha}P < 0,01$ ,  $^{\alpha\alpha\alpha}P < 0,001$  vs.  $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $N=3$  par condition.

**La fucoxanthine prévient la stéatose entérocytaire induite par un traitement avec un mélange d'acides gras saturés.**

Étant donné les effets antioxydants intéressants de la fucoxanthine et son potentiel effet anti-stéatose décrit dans la littérature, les IPEC-J2 ont été co-traitées pendant 3 jours avec le mélange des acides laurique, myristique, palmitique et stéarique à 250  $\mu\text{M}$  chacun, avec ou sans fucoxanthine. L'effet de la fucoxanthine a d'abord été évalué sur l'accumulation des acides gras. Les analyses qualitative (**Figure 52.A**) et quantitative (**Figure 52.B**) après coloration des lipides au Nile red montrent que la fucoxanthine diminue fortement l'accumulation des acides gras sous forme de gouttelettes lipidiques dans les cellules. De façon associée, l'expression de *Plin2* en réponse au co-traitement fucoxanthine avec les acides gras est moindre par rapport à la condition acides gras seuls (**Figure 52.C**).

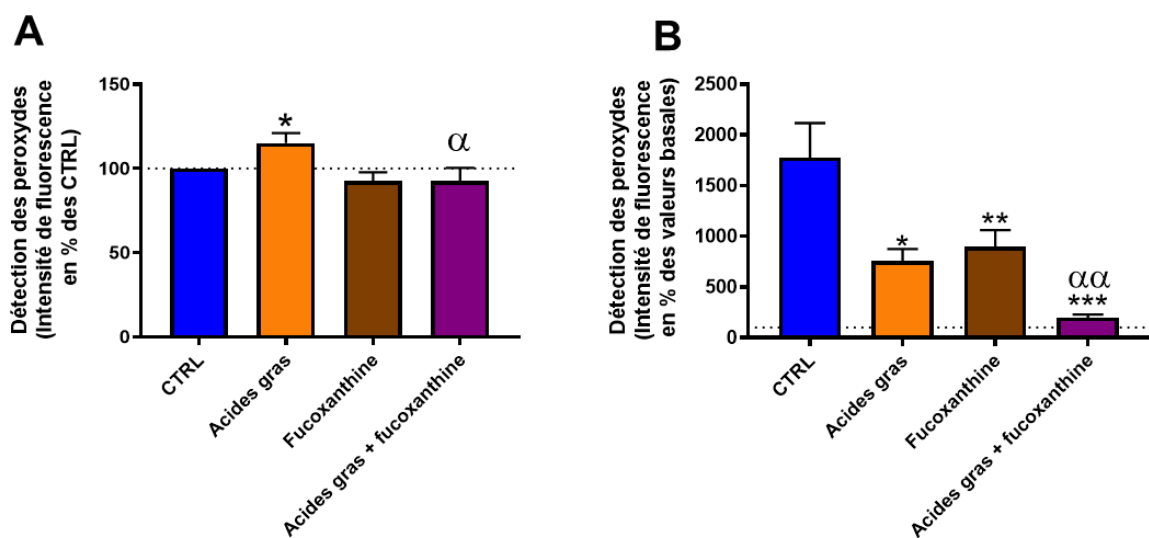


**Figure 52. Effets de la fucoxanthine sur la stéatose entérocytaire des IPEC-J2 traitées avec un mélange d'acides gras.**

**A.** Images représentatives de la coloration des lipides neutres dans les cellules IPEC-J2 après un co-traitement de 3 jours avec un mélange de C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0 à 250  $\mu$ M chacun et 100  $\mu$ M de fucoxanthine. **B.** Mesures de l'intensité de la fluorescence de la coloration des lipides neutres au Nile red normalisées par l'intensité de marquage nucléaire au Hoechst. Les données sont présentées en pourcentage des valeurs CTRL. Les différences significatives sont représentées par \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  vs CTRL,  $\alpha\alpha P < 0,01$ ,  $\alpha\alpha\alpha P < 0,001$  vs acides gras.  $N=3$  par condition.

## La fucoxanthine prévient l'accumulation des peroxydes induite par les acides gras et le peroxyde d'hydrogène.

Les potentialités antioxydantes de la fucoxanthine ont également été testées dans ce modèle par détection des peroxydes. Alors qu'un traitement de 3 jours avec le mélange d'acides gras induit une légère accumulation des peroxydes dans les cellules, un co-traitement avec de la fucoxanthine empêche l'émergence de ce stress oxydant (**Figure 53.A**). De plus, en réponse au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la production de peroxydes par les cellules ayant été traitées avec de la fucoxanthine et des acides gras est significativement plus faible par rapport à la condition acides gras seuls ou fucoxanthine seule, suggérant une forte activation de la machinerie antioxydante dans ces conditions (**Figure 53.B**).



**Figure 53. Effet de la fucoxanthine sur la production de peroxydes des IPEC-J2 stéatosées en situations basale et de stress oxydant.**

Les IPEC-J2 ont été co-traitées avec un mélange de C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0 à 250 μM chacun et 100 μM de fucoxanthine pendant 3 jours. Un stress oxydant a été induit *a posteriori* par l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM) pendant 1h. **A.** Détection des peroxydes par la sonde H<sub>2</sub>DCFDA à l'état basal et **B.** après l'induction du stress oxydant. Les données sont exprimées en pourcentage des CTRL à l'état basal et en pourcentage des valeurs basales de détection des peroxydes pour les données obtenues en situation de stress oxydant. N=3 par condition. Les différences significatives sont représentées par \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 vs CTRL, <sup>α</sup>P < 0,05, <sup>αα</sup>P < 0,01 vs acides gras. N=3 par condition.

## **Conclusion**

**La fucoxanthine présente donc des effets stimulateurs de la fonction mitochondriale et antioxydant dans ce modèle intestinal qui pourraient s'avérer bénéfiques dans un contexte d'obésité, marqué par une dysfonction mitochondriale des CEI et un stress oxydant induits par une accumulation lipidique.**

## Conclusion de la partie II : impact d'une surcharge en lipides sur la fonction mitochondriale des CEI *in vivo* et *in vitro* et conséquences sur l'homéostasie jéjunale

---

Nous montrons dans cette partie que la consommation d'un régime obésogène induit une augmentation du stockage des lipides dans les cellules épithéliales de jéjunum, à l'origine d'une diminution du nombre de mitochondries et de la dynamique mitochondriale, de la capacité  $\beta$ -oxydative et de l'induction de la machinerie antioxydante. Cette perturbation de la bioénergétique des CEI est associée à une augmentation de la prolifération, au détriment de la différenciation en CEI matures, favorisant une expression importante de la *Cldn2* dans l'épithélium jéjunal des souris DIO et contribuant à l'augmentation de la TEER du jéjunum. Bien que les acides gras saturés du régime obésogène (C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0) présentent tous des effets pro-stéatosants, seuls le C16:0 et le C18:0 provoquent une sévère dysfonction mitochondriale des CEI, caractérisée par une diminution du taux de production d'ATP, associée à une augmentation du nombre de cellules et de la TEER sur le modèle d'entérocytes *in vitro* IPEC-J2. Néanmoins, un mélange d'acides gras à forte concentration (1 mM) reproduit la diminution de la capacité oxydative des IPEC-J2, indépendamment des effets qu'ils induisent seuls, associée à une augmentation du nombre de cellules et de la TEER des entérocytes stéatosés. En outre, la fucoxanthine diminue l'accumulation lipidique dans les IPEC-J2 et présente des effets stimulateurs et protecteurs de la fonction mitochondriale, faisant d'elle une perspective thérapeutique prometteuse.

**PARTIE III : MODIFICATIONS DE  
L'ENVIRONNEMENT LUMINAL COLIQUE INDUITES  
PAR UN REGIME OBESOGENE ET FONCTION  
MITOCHONDRIALE DES CELLULES EPITHELIALES  
COLIQUES**

---

## **PARTIE III : MODIFICATIONS DE L'ENVIRONNEMENT LUMINAL COLIQUE INDUITES PAR UN REGIME OBESOGENE ET FONCTION MITOCHONDRIALE DES CELLULES EPITHELIALES COLIQUES**

---

### **Contexte**

Tout comme dans la première partie, nous nous sommes intéressés aux effets provoqués par la consommation d'un régime obésogène sur la fonction mitochondriale des CECI et sur l'homéostasie intestinale mais cette fois dans le côlon. Les données présentées dans la littérature montrent qu'un régime obésogène augmente, de façon non systématique, la perméabilité colique (Hamilton et al., 2015; Stenman et al., 2012) et modifie l'environnement luminal colique (Hamilton et al., 2015). De plus, certains auteurs ont mis en évidence une diminution de la concentration épithéliale d'ATP et de l'expression de gènes codant des sous-unités de l'ETC dans les CEC de souris obèses, bien qu'aucune analyse de la fonction mitochondriale n'ait été réalisée. De plus, ces études suggèrent que l'altération de la bioénergétique mitochondriale des CEC est due à une augmentation du catabolisme des acides gras alimentaires associée à l'induction d'un stress oxydant. Le traitement de lignées immortalisées de colonocytes (HCT-116 et Caco-2) avec de l'acide palmitique *in vitro* induit en effet une dysfonction mitochondriale et une augmentation de la production des ERO (Li et al., 2020; Yoo et al., 2021).

### **Hypothèse**

Nous faisons l'hypothèse que des modifications de l'environnement luminal, induites par la consommation d'un régime obésogène, modulent la fonction mitochondriale des CEC via l'action de métabolites bactériens délétères et/ou l'augmentation du catabolisme lipidique des CEC.

### **Objectif**

Les objectifs de cette partie sont donc : i. d'évaluer la fonction mitochondriale des CEC et la perméabilité colique de souris obèses ; ii. de caractériser l'environnement luminal colique et le catabolisme lipidique des CEC.

### **Démarche expérimentale**

Des souris C57BL/6J ont été nourries avec le régime CTRL ou le régime DIO, présentés dans la partie II. A l'issue des 22 semaines de régime, l'obésité a été caractérisée par mesure du poids des tissus adipeux viscéraux, le dosage du cholestérol et des triglycérides et de la LBP sériques. Le côlon des souris ainsi que le contenu colique ont été prélevés et la



perméabilité de la muqueuse colique évaluée par mesure *ex vivo* du passage de FD4 en chambres de Ussing. Les cryptes coliques ont été isolées puis la fonction mitochondriale caractérisée par analyse Seahorse et mesure d'expression génique à partir des ARN totaux extraits de ces cryptes. Le microbiote colique des souris a été caractérisé par séquençage de l'ADN codant les ARN 16S. Les voies métaboliques du microbiote des souris CTRL et DIO ont été prédites par l'outil informatique PICRUST2 à partir des genres identifiés par les analyses 16S. Les métabolites de l'environnement luminal colique ont également été quantifiés par spectroscopie RMN et par dosage des sulfures au bleu de méthylène afin d'identifier le (ou les) métabolite(s) bactériens susceptibles d'induire une dysfonction mitochondriale. Le catabolisme lipidique des cryptes coliques a également été caractérisé par quantification des acides gras totaux du contenu caecal et des cryptes coliques et par mesure de la  $\beta$ -oxydation de l'acide palmitique radiomarqué par les cryptes. Les peroxydes et les anions superoxydes mitochondriaux ont été détectés à partir des cryptes coliques et l'expression des gènes des machineries pro- et antioxydantes a été mesurée. Un modèle d'organoïdes coliques murins a été développé, à partir de cryptes coliques provenant de souris C57BL/6J, et traité pendant 48h avec 250 et 500  $\mu$ M de sodium sulfure ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) avant d'évaluer la fonction mitochondriale des organoïdes au Seahorse. Les effets des sulfures sur l'activité du complexe IV de la chaîne de respiration mitochondriale ont finalement été caractérisés par mesure de son activité au Seahorse en réponse à une injection aigue de 20 et 100  $\mu$ M de  $\text{Na}_2\text{S}$  sur des mitochondries isolées provenant de cryptes coliques de souris C57BL/6J, nourries pendant 1 semaine avec le régime CTRL.

### **Résultats marquants de la partie III : Modifications de l'environnement luminal colique induites par un régime obésogène et fonction mitochondriale des cellules épithéliales coliques**

- La consommation d'un régime obésogène induit une dysfonction mitochondriale des cellules épithéliales des cryptes coliques, marquée par une diminution des respirations basale, maximale et liée à la production d'ATP, et associée à une augmentation de la perméabilité colique.
- Ni la capacité oxydative ni la dynamique mitochondriale des CEC ne sont modifiées par la consommation d'un régime obésogène.
- Bien que les acides gras alimentaires soient présents en quantité importante dans le contenu caecal des souris obèses, ils ne sont pas plus concentrés dans les CEC des souris DIO que dans celles de souris CTRL. De plus la capacité de  $\beta$ -oxydation des acides gras des CEC des souris DIO ne diffère pas de celle des souris CTRL.

- La consommation d'un régime obésogène induit une dysbiose et une augmentation de l'abondance relative des Desulfovibrionaceae, des acides biliaires et de la concentration de sulfures dans la lumière colique. La prédiction des voies métaboliques du microbiote montre un enrichissement de la voie de réduction des sulfates en sulfures chez les souris DIO par rapport aux CTRL.
- Le traitement chronique d'organoïdes coliques murins avec des sulfures reproduit la dysfonction mitochondriale des CEC des souris obèses.
- L'exposition aigue de mitochondries isolées à partir de cryptes coliques à des sulfures diminue l'activité du complexe IV indépendamment de la concentration en sulfures.

**Nous montrons dans cette partie que la consommation d'un régime obésogène provoque une dysbiose dans le côlon, favorisant la production de sulfures par les Desulfovibrionaceae et la dysfonction mitochondriale des CEC, indépendamment du catabolisme lipidique de ces cellules. La dysfonction mitochondriale des CEC pourrait provenir d'une diminution de l'activité du complexe IV induite par la production luminale des sulfures. La défaillance de l'approvisionnement énergétique résultant probablement de cette dysfonction mitochondriale, pourrait favoriser la perte de l'homéostasie intestinale et notamment une augmentation de sa perméabilité, à l'origine d'une endotoxémie métabolique.**

## Obesogenic diet leads to luminal overproduction of the complex IV inhibitor H<sub>2</sub>S and mitochondrial dysfunction in mouse colonocytes

Thomas Guerbette<sup>1</sup>, Martin Beaumont<sup>2</sup>, Mireille Andriamihaja<sup>3</sup>, Vincent Ciesielski<sup>1,4</sup>, Jean-Baptiste Perrin<sup>1</sup>, Régis Janvier<sup>1</sup>, Gwénaëlle Randuineau<sup>1</sup>, Patricia Leroyer<sup>1</sup>, Olivier Loréal<sup>1</sup>, Vincent Rioux<sup>1,4</sup>, Gaëlle Boudry<sup>1\*</sup>, Annaïg Lan<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Institut Numecan, INRAE, INSERM, Univ Rennes 1, Rennes, France

<sup>2</sup> GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Castanet-Tolosan, France

<sup>3</sup> UMR PNCA, AgroParisTech, INRAE, Université Paris-Saclay, Paris, France

<sup>4</sup> Institut Agro, Univ Rennes 1, INRAE, INSERM, NuMeCan, Rennes, France

\*Equal contributions

No conflicts of interest exist.

Corresponding author: Annaïg Lan, [annaig.lan@agroparistech.fr](mailto:annaig.lan@agroparistech.fr)

### Abstract

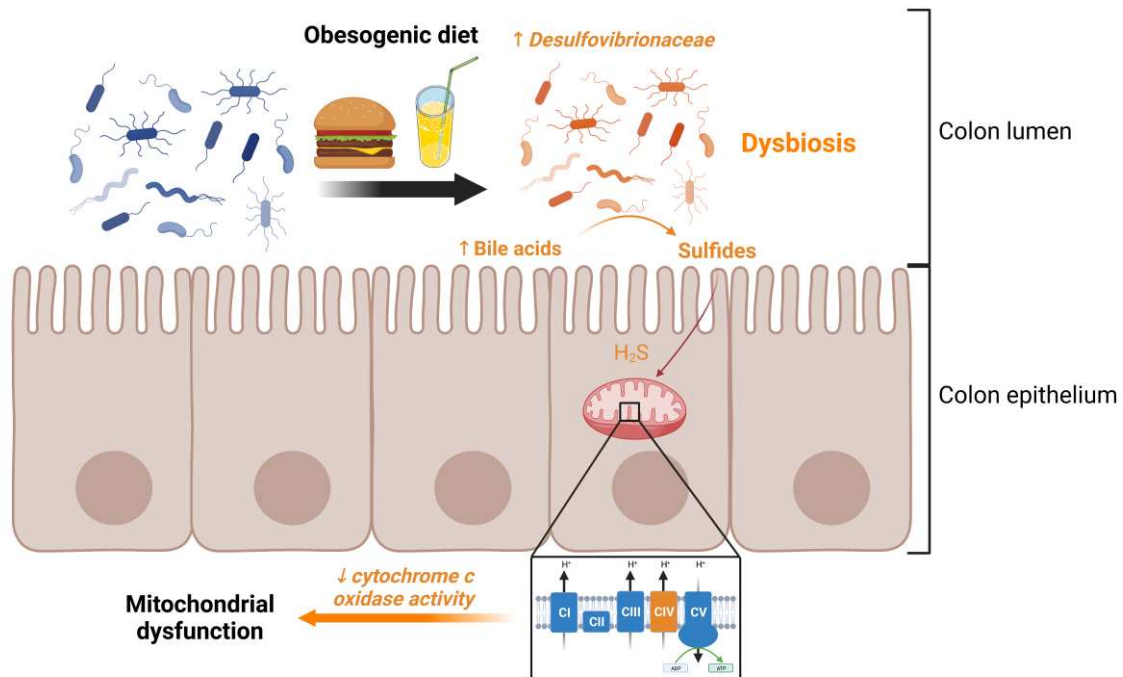
**Background & Aims:** Obesity is characterized by systemic low-grade inflammation associated with disturbances of intestinal homeostasis and microbiota dysbiosis. Mitochondrial metabolism sustains epithelial homeostasis by providing energy to colonic epithelial cells (CEC) but can be altered by dietary modulations of the luminal environment. Our study aimed at evaluating whether consumption of an obesogenic diet alters mitochondrial function of CEC in mouse.

**Methods:** Mice were fed for 22 weeks with a 58% kcal fat diet (diet-induced obesity (DIO) group) or a 10% kcal fat diet (control diet, CTRL). Colonic crypts were isolated to assess mitochondrial function while colonic content was collected to characterize microbiota and metabolites.

**Results:** DIO mice developed obesity, intestinal hyperpermeability and increased endotoxemia. Analysis of isolated colonic crypt bioenergetics revealed a mitochondrial dysfunction marked by decreased basal and maximal respirations and a lower respiration linked to ATP production in DIO mice. Yet, CEC gene expression of mitochondrial respiration chain complexes and mitochondrial dynamics were not altered in DIO mice. In parallel, DIO mice displayed increased colonic bile acid concentrations, associated with higher abundance of Desulfovibrionaceae. Sulfide concentration was markedly increased in the colon content of DIO mice. Hence, chronic treatment of CTRL mouse colon organoids with sodium sulfide provoked mitochondrial dysfunction similar to that observed *in vivo* in DIO mice while acute exposure of isolated mitochondria from CEC of CTRL mice to sodium sulfide diminished complex IV activity.

**Conclusion:** Our study provides new insights into colon mitochondrial dysfunction in obesity by revealing that increased sulfide production by DIO-induced dysbiosis impairs complex IV activity in mouse CEC.

### Graphical abstract



### Abbreviations

CEC: Colonic epithelial cells; DIO: Diet induced obesity; ECAR: Extracellular acidification rate; ETC: Electron transport chain; FAME: Fatty acid methyl ester; LBP: Lipopolysaccharide binding protein; OCR: Oxygen consumption rate; OXPHOS: Oxidative phosphorylation; ROS: Reactive oxygen species; SCFA: Short chain fatty acid.

### Funding information

TG was partly funded by a Region Bretagne grant #300000592.

## Introduction

Obesity and overweight are spreading worldwide, notably due to obesogenic diet consumption, containing high fat/sugar levels. They cause the death of 4 million people each year due to complications, such as cardiovascular diseases or cancers, which are associated with low-grade inflammation (Calder et al., 2011; Minihane et al., 2015). Animal models of diet-induced obesity (DIO) have reported that excess body fat was associated with metabolic endotoxemia (Minihane et al., 2015), alterations of the gut luminal environment (Hamilton et al., 2015) and of intestinal permeability (Cani et al., 2009), observed in mouse colon (Hamilton et al., 2015; Stenman et al., 2012) and in the small intestine in human obesity (Genser et al., 2018). Colonic homeostasis relies on the crosstalk between the microbiota, the intestinal epithelium, and the host immune system. Hence, the intestinal epithelium acts as a barrier, made of intestinal epithelial cells associated to each other by tight junctions and of protective mucus layer. Active transport of water and electrolytes, rapid epithelial cell renewal and maintaining of intestinal barrier are high energy consuming process. This energy is mainly supplied by mitochondria that produce energy via oxidative phosphorylation (OXPHOS) (Guerbette et al., 2022). Yet, mitochondrial dysfunction, defined as any mechanism that reduces efficiency of OXPHOS and leads to decreased levels of cellular ATP, weakens intestinal epithelial barrier function (Guerbette et al., 2022). Indeed, uncoupling OXPHOS in intestinal T84 cells provoked an increase of *Escherichia coli* translocation (Lewis et al., 2008; McKay et al., 2020; Wang et al., 2014). To date, some signs of energetic defects in colonic epithelial cells (CEC) of DIO mice have been observed in several studies. DIO mice presented swollen mitochondria (Sun et al., 2018) associated with decreased amounts of ATP in CECs (Lee et al., 2020), or reduced expression of genes encoding electron transport chain (ETC) subunits (Lee et al., 2020; Yoo et al., 2021). Decreased mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity and elevated intracellular lactate levels in CEC also suggest a metabolic shift toward glycolysis in DIO (Yoo et al., 2021). Nevertheless, no study has performed a complete functional evaluation of mitochondrial function of CEC in DIO mice so far. Moreover, the mechanisms whereby obesogenic diet consumption could lead to mitochondrial dysfunction are unclear. It is believed that mitochondrial dysfunction in DIO could be a downstream consequence of increased dietary fatty acid  $\beta$ -oxidation that generates reactive oxygen species (ROS). Indeed, treating CEC with palmitic acid *in vitro* induces mitochondrial dysfunction and ROS generation (Li et al., 2020; Yoo et al., 2021). Yet, the colon is not the preferential site of dietary lipid absorption, weakening this hypothesis. Moreover, diet composition alters the luminal environment composition, especially the quantity and/or variety of diet-derived bacterial metabolites (Lone et al., 2018), some of which being detrimental or beneficial to CEC according to their concentration, by acting on mitochondria (Guerbette et al., 2022).

Thus, because of the central role of mitochondrial function in the maintenance of intestinal epithelium homeostasis, we aimed at better characterizing mitochondrial function of CEC in DIO mice and to uncover the possible role of microbiota dysbiosis and alteration of the colonic luminal environment.

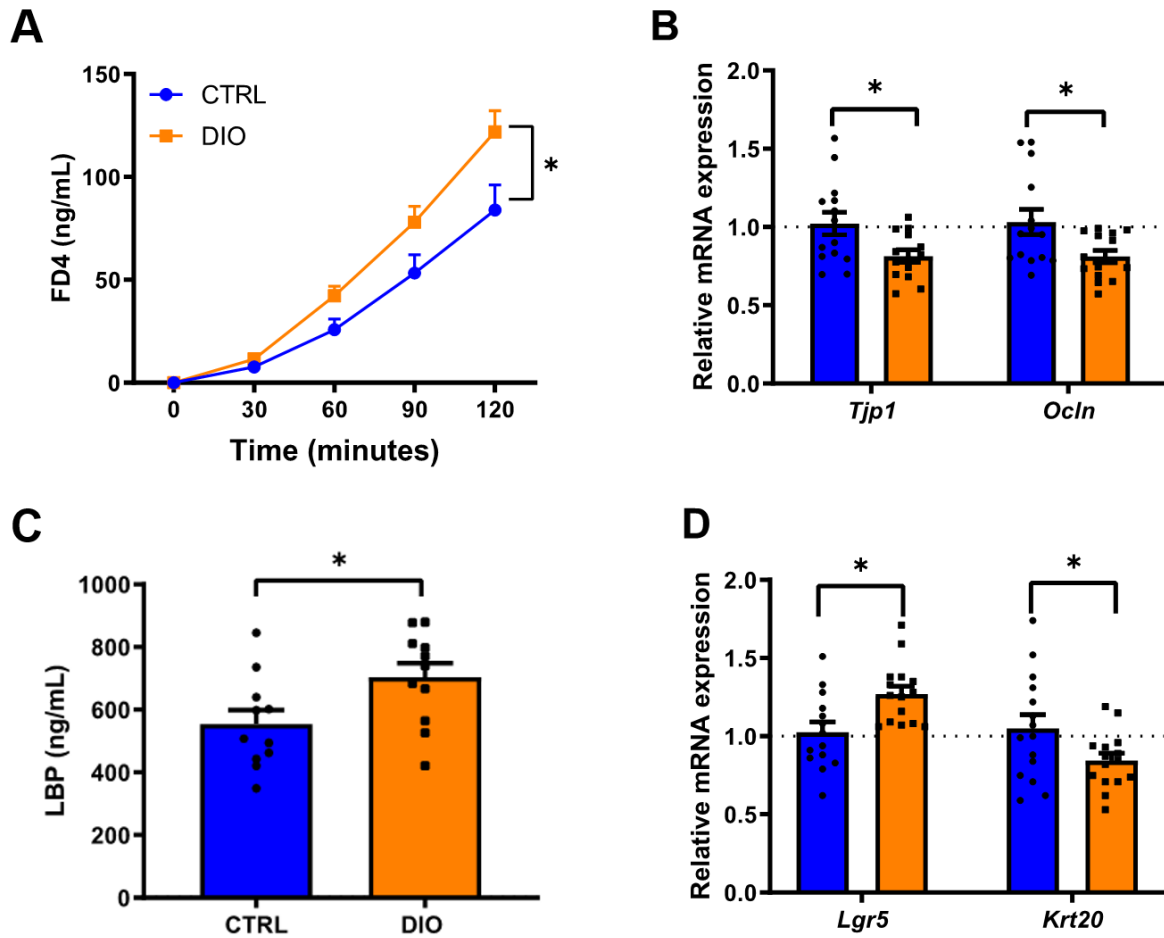
## Results

### Characterization of diet induced obesity

DIO mice that were fed an obesogenic diet for 22 weeks displayed a 43% body weight increase compared to CTRL mice (CTRL:  $32.5 \pm 0.9$  vs DIO:  $46.4 \pm 1.7$  g,  $P < 0.001$ ) and a marked visceral adiposity index (CTRL:  $2.2 \pm 0.3$  vs DIO:  $6.7 \pm 0.4$  %,  $P < 0.001$ ). DIO phenotype was also characterized by increased serum concentrations of total cholesterol (CTRL:  $2.4 \pm 0.3$  vs DIO:  $3.6 \pm 0.8$  mmol/L,  $P < 0.001$ ) and triglycerides (CTRL:  $0.8 \pm 0.1$  vs DIO:  $1.3 \pm 0.2$  mmol/L,  $P = 0.002$ ).

### Colonic paracellular permeability is increased in DIO mice in association with endotoxemia

FITC–Dextran (FD4) passage through the colonic mucosa from DIO mice was significantly higher than in CTRL mice, indicating an increase in colonic paracellular permeability (**Figure 1.A**). Moreover, gene expressions of *Tjp1* and *Ocln*, encoding tight junction proteins, were decreased by 20% in colonic crypts from DIO mice compared to CTRL mice (**Figure 1.B**). Concentration of circulating LBP was higher in DIO than in CTRL mice (**Figure 1.C**), suggesting metabolic endotoxemia. Furthermore, mRNA relative expression of the stem cell marker *Lgr5* was higher in isolated crypts from DIO mice while in contrast, the expression of the mature colonocyte marker *Krt20* was decreased by obesogenic diet (**Figure 1.D**), suggesting a less mature phenotype of CEC from DIO mice.

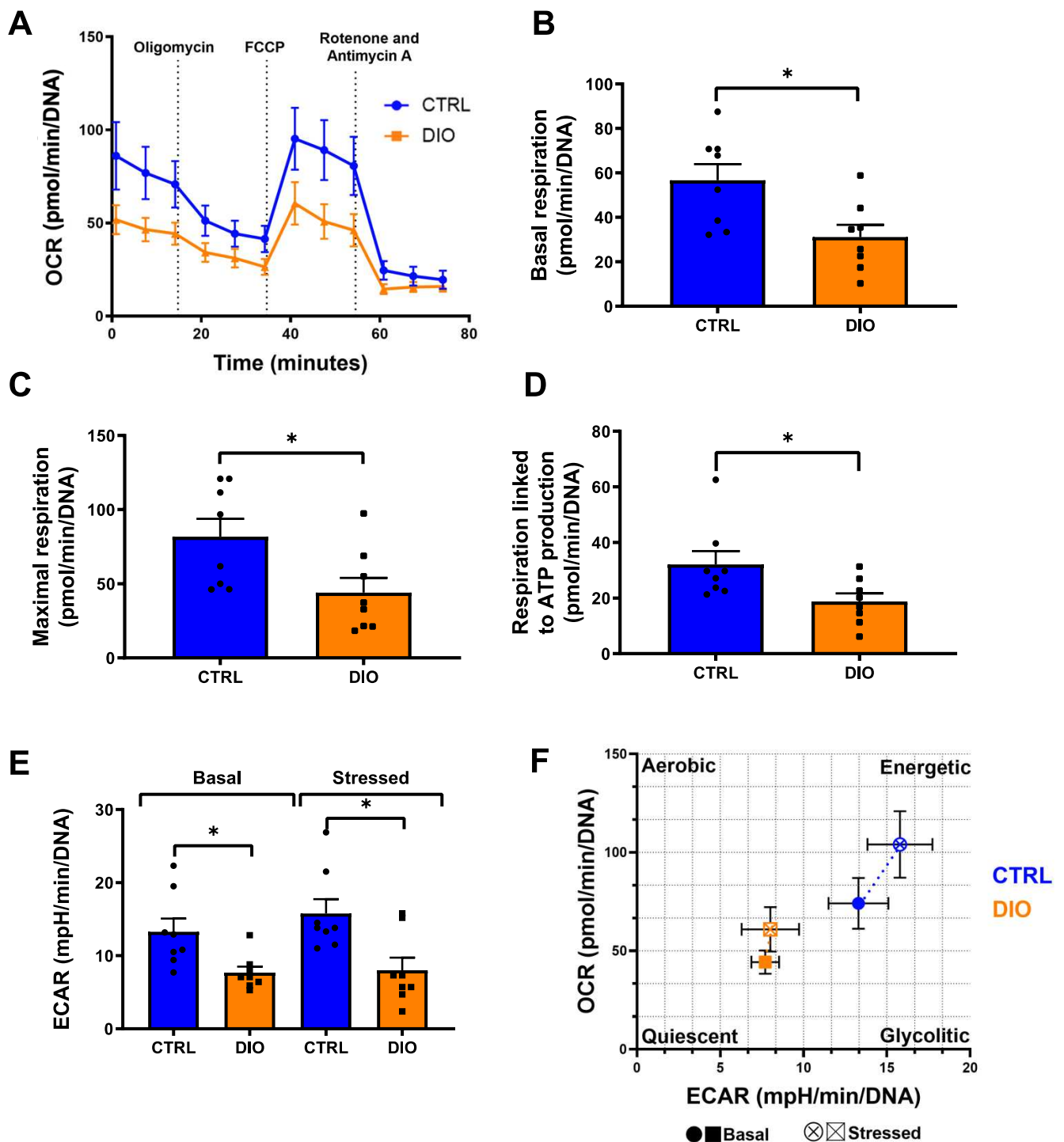


**Figure 1. Obesity-related changes in colonic permeability and crypt maturation.** **A.** FITC-dextran 4000 kDa (FD4) flux across mouse colonic mucosa mounted in Ussing chambers ( $n=12$  for CTRL and DIO). **B.** Relative mRNA expression of tight junction protein of mouse colonic crypts ( $n=15$  for CTRL and DIO). **C.** Lipopolysaccharide binding protein (LBP) concentration in serum samples ( $n=11$  for CTRL and DIO). **D.** Relative mRNA expression of *Lgr5*, a marker of stem cells, and *Krt20*, for differentiated colonocytes, in mouse colonic crypts ( $n=15$  for CTRL and DIO). Values are represented as means  $\pm$  SEM. Significant differences are represented as  $*P \leq 0.05$  vs. CTRL.

### **DIO induces mitochondrial dysfunction of colonic crypts marked by decreased basal and maximal respirations as well as ATP production-linked respiration**

To assess mitochondrial function of colonic crypts, oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) of isolated colonic crypts from CTRL and DIO mice were measured using the Seahorse technology (**Figure 2.A**). Basal respiration of isolated colonic crypts from DIO mice was 2-fold lower than in CTRL mice (**Figure 2.B**). Similarly, maximal respiration, measured after the injection of the protonophore carbonyl cyanide-4-phenylhydrazone (FCCP) was reduced in isolated crypts from DIO compared to CTRL mice (**Figure 2.C**). ATP production-linked respiration of isolated colonic crypts were also lower in DIO mice (**Figure 2.D**), suggesting an impairment of ATP production in both basal and stressed conditions. Glycolysis was evaluated by the ECAR measures which were lower in colonic crypts from DIO mice compared to those from CTRL, in both basal condition and under metabolic stress obtained by injection of FCCP (**Figure 2.E**). Moreover, although the relative mRNA expressions of *Phosphofructokinase 1* (CTRL:  $1.01 \pm 0.03$  vs DIO:  $0.97 \pm 0.03$ ) and *Pyruvate Kinase M2* (CTRL:  $1.01 \pm 0.07$  vs DIO:  $0.97 \pm 0.04$ ), encoding for enzymes of glycolysis, were unmodified by DIO, the expression of *Hexokinase 1*, the enzyme that initiates glycolysis, was diminished by 20% in colonic crypts from DIO mice (CTRL:  $1.03 \pm 0.07$  vs DIO:  $0.80 \pm 0.04$ ,  $P < 0.001$ ). Consistent with the lower basal and maximal respirations and the lower ECAR of isolated colonic crypts from DIO mice compared to CTRL, metabolic phenotype showed a lower metabolic potential in colonic crypts from DIO mice in both basal and stressed states compared to CTRL mice (**Figure 2.F**).





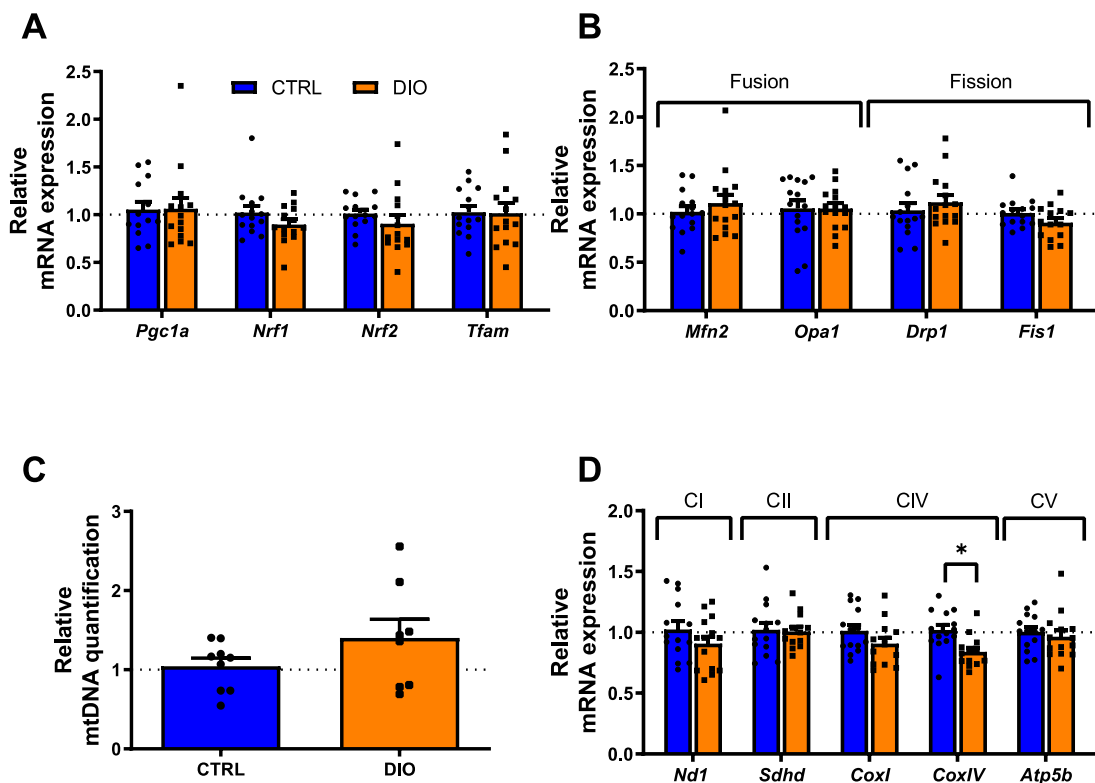
**Figure 2. Obesity-induced mouse colonic crypt mitochondrial dysfunction.** **A.** Oxygen consumption rates (OCR) of mouse colonic crypts after sequential injection of oligomycin, FCCP and antimycin A with rotenone. **B.** Basal respiration, **C.** maximal respiration, **D.** respiration linked to ATP production. **E.** Extracellular acidification rates (ECAR) at basal and stressed states. **F.** Energy map of colonic crypts in basal (solid circle) or stressed (open circle) conditions obtained from OCR and ECAR. Values are means  $\pm$  SEM. Significant differences are represented as \* $P \leq 0.05$  vs. CTRL ( $n=8$  for CTRL and DIO).

### Mitochondrial dynamics of colonic crypts is not altered by DIO

The mitochondrial dysfunction of isolated colonic crypts observed in DIO mice could reflect alterations of mitochondrial dynamics that would modulate the number of mitochondria in CEC. Yet, mRNA expressions of genes involved in mitochondrial biogenesis regulation, fusion and fission in colonic crypts were similar between groups (**Figure 3.A and 3.B**). Relative quantification of mtDNA showed similar contents between groups suggesting equivalent mitochondrial mass in isolated crypts, regardless of the diet (**Figure 3.C**).

### DIO decreases *CoxIV* expression of colonic crypts

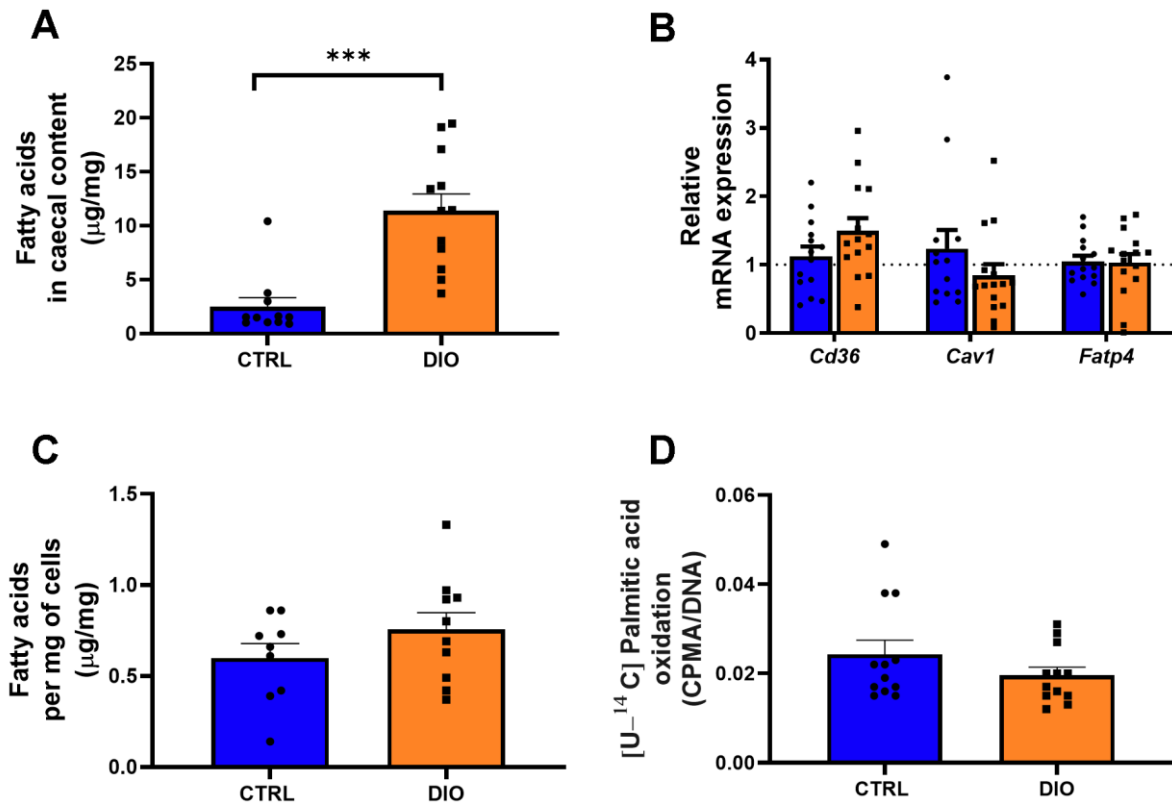
We next evaluated whether mitochondrial oxidative capacity in colonic crypts from DIO mice was impaired. While obesogenic diet consumption did not modify gene expression of subunits from mitochondrial complexes I, II, and V in isolated colonic crypts, *CoxIV* expression was 18% lower in isolated colonic crypts from DIO mice compared to CTRL mice (**Figure 3.D**).



**Figure 3. Mitochondrial dynamics of colonic crypts from mice is unaltered by DIO while *CoxIV* expression is diminished.** Relative mRNA expression of genes encoding **A.** mitochondrial biogenesis regulators and **B.** targets of mitochondrial fusion and fission ( $n=15$  for CTRL and DIO). **C.** Evaluation of mtDNA content normalized to nuclear DNA ( $n=9$  for CTRL and DIO). **D.** Relative mRNA expression of genes encoding subunits of ETC complexes: *Nd1* of mitochondrial NADH dehydrogenase, *Sdhb* of Succinate dehydrogenase, *CoxI* and *CoxIV* of cytochrome c oxidase and *Atp5b* of ATP synthase ( $n=15$  for CTRL and DIO). Abbreviations: CI, complex I; CII, complex II; CIII, complex III; CIV, Complex IV CV, complex V. Values are means  $\pm$  SEM. Significant differences are represented as  $*P \leq 0.05$  vs. CTRL.

### **Fatty acids are increased in the colonic content from DIO mice, but they are not more absorbed or $\beta$ -oxidized by isolated crypts**

We next wanted to clarify whether enhanced dietary fatty acid metabolism of isolated crypts was responsible for an oxidative stress and subsequent alteration of mitochondrial function. Fatty acid concentrations in the caecal content from DIO mice were 4.5-fold higher compared to that of CTRL (**Figure 4.A**). The relative concentration of glycerol was also higher in the colon from DIO mice (**Supplementary Table 1**) and could be related to a higher concentration of triglycerides. Yet, gene expression of the fatty acid transporters *Cd36*, *Fatp4* and *Cav1* was similar in colonic crypts from both groups (**Figure 4.B**). Moreover, colonic crypts from DIO mice displayed equivalent fatty acid concentrations compared to CTRL mice (**Figure 4.C**). Hence, [U-<sup>14</sup>C]palmitic acid  $\beta$ -oxidation capacity was similar in both groups (**Figure 4.D**). We next evaluated if there was any sign of oxidative stress in isolated crypts provoked by DIO. mtROS and peroxides were measured respectively with MitoSOX and H<sub>2</sub>DCFDA dyes in isolated colonic crypts. No significant difference of ROS detection was observed between groups (**Table 1**). Moreover, expression of genes coding enzymes involved in pro- and antioxidant machineries was similar in isolated colonic crypts from DIO and CTRL mice (**Table 1**). Taken together, these results dismissed the hypothesis of oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction through enhanced dietary fatty acid catabolism in isolated crypts from DIO mice.



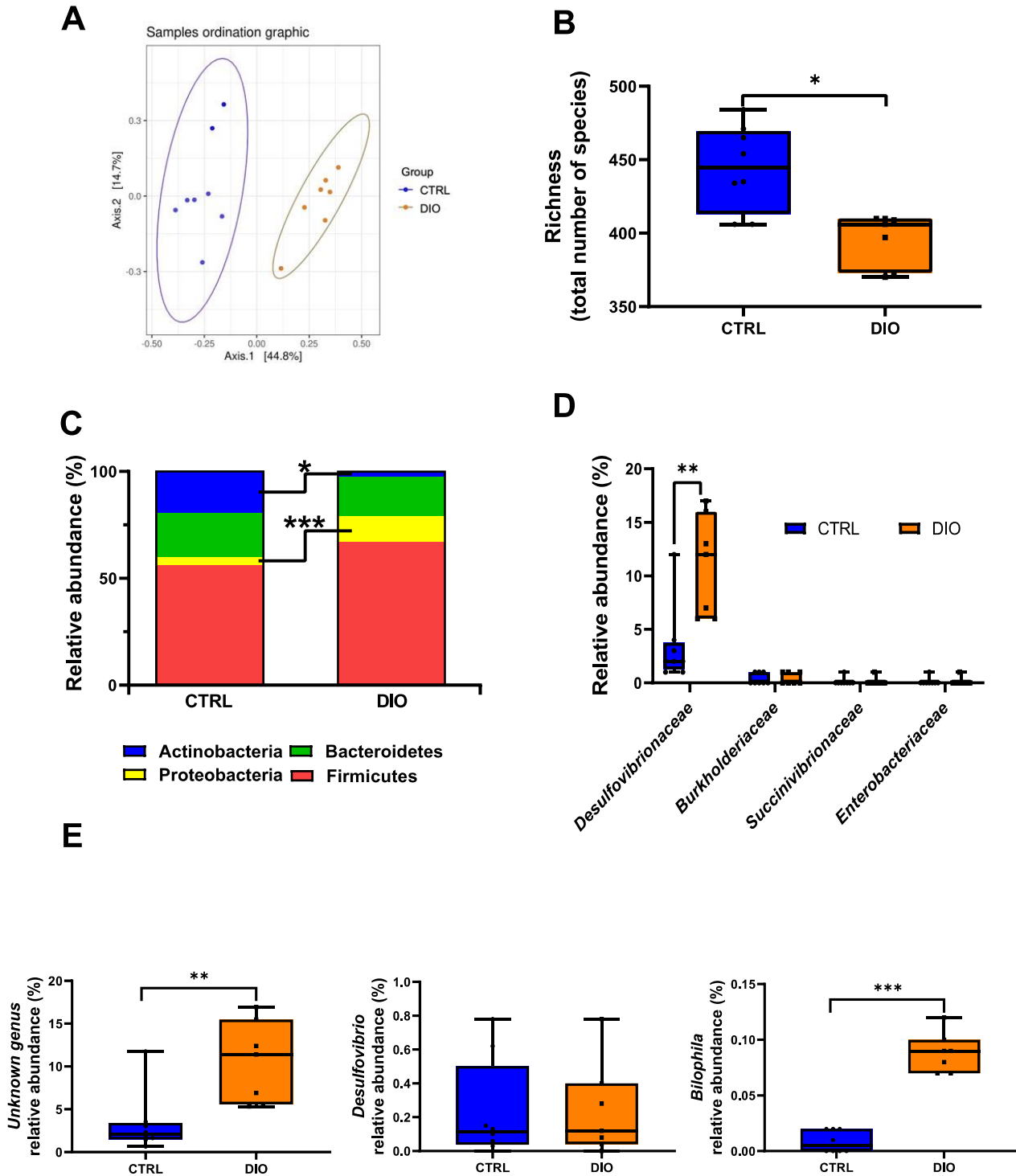
**Figure 4. DIO does not enhance fatty acid metabolism of mouse colonic crypts. A.** Quantification of total fatty acids in caecal content by GC-MS ( $n=10$  for CTRL and  $n=12$  for DIO). **B.** Relative mRNA expression of fatty acid transporters in colonic crypts ( $n=15$  for CTRL and DIO). **C.** Quantification of total fatty acids in colonic crypts by GC-MS ( $n=9$  for CTRL and  $n=10$  for DIO). **D.** Measurement of [U-<sup>14</sup>C]palmitic acid oxidation in colonic crypts ( $n=12$  for CTRL and DIO). Values are means  $\pm$  SEM. Significant differences are represented as  $***P \leq 0.001$  vs. CTRL.

### **DIO induces colonic microbiota dysbiosis and increases the relative abundance of Desulfovibrionaceae**

We next hypothesized that the mitochondrial dysfunction observed in DIO mouse colonic crypts could be due to alterations of microbiota composition or activities. Thus, the colonic microbiota was characterized in both groups. Principal coordinates analysis, based on Jaccard distances, revealed that the colonic microbiota was different between the two groups (**Figure 5.A, PERMANOVA P<0.001**). Colonic microbiota from DIO mice was characterized by reduced richness (number of observed OTUs) (**Figure 5.B**). Regarding phyla relative abundance (**Figure 5.C**), while the one of Actinobacteria was significantly lower in the colon of DIO mice compared to that of CTRL mice (19.5% vs 2.5% for WD, P=0.04), Proteobacteria relative abundance was 3 times greater in the colonic lumen of DIO mice (3.9% vs 11.8%, P <0.005) which was mostly driven by high proportions of Desulfovibrionaceae (**Figure 5.D**). Within this family, an unknown genus was far more abundant in DIO mice colonic lumen as well as *Bilophila* (**Figure 5.E**).

### **Relative concentrations of short chain fatty acids in the colonic content are not modified by DIO**

Since gut microbiota-derived short chain fatty acids (SCFA), notably butyrate, are major energetic fuels for CECs, we evaluated if the dysbiosis observed in DIO mice led to changes in SCFA luminal concentrations. NMR-based metabolomics of colonic content revealed that the relative concentrations of butyrate (CTRL: 100.0 ± 11.3% vs DIO: 91.9 ± 6.8%), propionate (CTRL: 100 ± 22.3% vs DIO: 94.4 ± 14.3%) and acetate (CTRL: 100.0 ± 15.9% vs DIO: 85.8 ± 8.3%) were equivalent in both groups. The relative concentrations of other metabolites identified in the colonic luminal environment are presented in **Supplementary Table 1**.



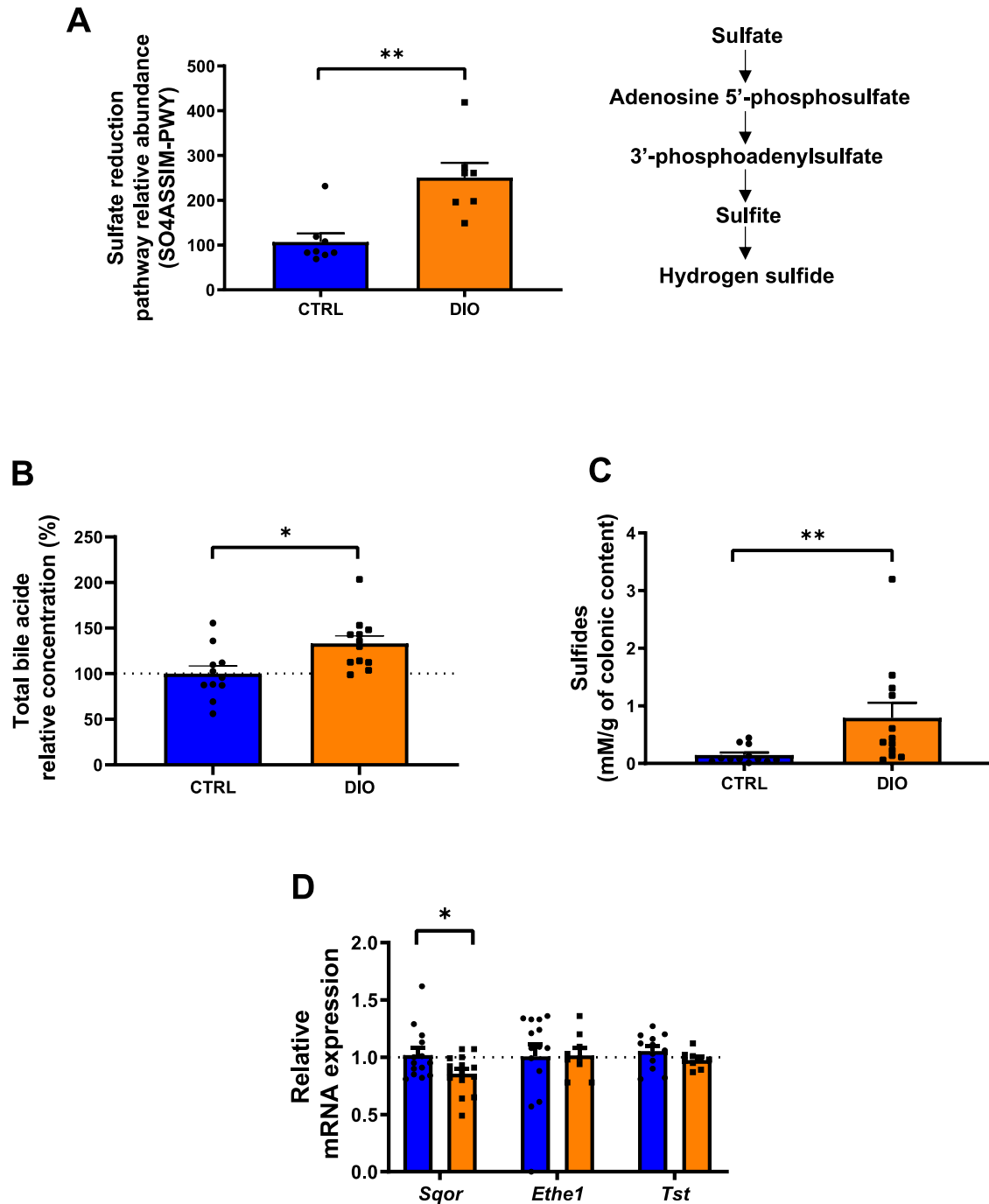
**Figure 5. DIO induces gut microbiota dysbiosis favoring the growth of sulfur-reducing bacteria.** Microbiota analyses were performed from 16S rRNA gene amplicon sequencing of colonic content from CTRL and DIO mice showing **A.**  $\beta$ -diversity, **B.** richness, **C.** relative abundance of the four main phyla, **D.** families from the Proteobacteria phylum and **E.** genera from the Desulfovibrionaceae family. Values in box plots are minimum to maximum with a line at median ( $n=8$  for CTRL and  $n=7$  for DIO). Significant differences are represented as \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$  vs. CTRL.

### **DIO induces a gut microbiota metabolic shift towards sulfide production**

We next used PICRUSt2 to predict functional pathways in the colonic microbiota of CTRL and DIO mice (**Supplementary Table 2**). The relative abundance of the sulfate reduction pathway (SO4ASSIM-PWY) was increased in the gut microbiota of DIO mice (**Figure 6.A**). Indeed, within the Desulfovibrionaceae family, *Desulfovibrio spp* produce hydrogen sulfide from sulfate and cysteine while *Bilophila wadsworthia* is known to produce H<sub>2</sub>S from taurine degradation and sulfite. The relative concentration of total bile acids evaluated by NMR was increased by 33% in the colonic lumen of DIO mice (Figure 6.B). In contrast, the relative concentration of taurine in the colon content was not different between groups (**Supplementary Table 1**). Furthermore, sulfide concentration in the colonic content of DIO mice was significantly increased compared to CTRL ones (**Figure 6.C**). Expression of gene encoding the mitochondrial H<sub>2</sub>S detoxification machinery revealed that *Sqor* was diminished by 15% in isolated colonic crypts from DIO mice while *Ethe1* and *Tst* expressions were not modified by the diet (**Figure 6.D**).

### **Another mouse model of DIO with lower lipid level on a shorter time reproduces the dysbiosis-related mitochondrial dysfunction of colonic crypts**

In another mouse model of DIO, fed for 12 weeks with a western diet (WD) characterized by lower lipid content (45% kcal derived from fat), we found that colon from WD mice was also characterized by a dysbiosis marked by increased abundance of Desulfovibrionaceae, especially *Bilophila*, as well as higher concentrations of bile acids in the colonic content. Mitochondrial basal respiration of isolated colonic crypts was also lower in WD mice compared to CTRL (**Supplementary figure 2**). Overall, these data suggested that sulfide produced from Desulfovibrionaceae through bacterial conversion of sulfate or taurine associated with bile acids may impair mitochondrial function of colonic crypts from mice fed high-fat diets.

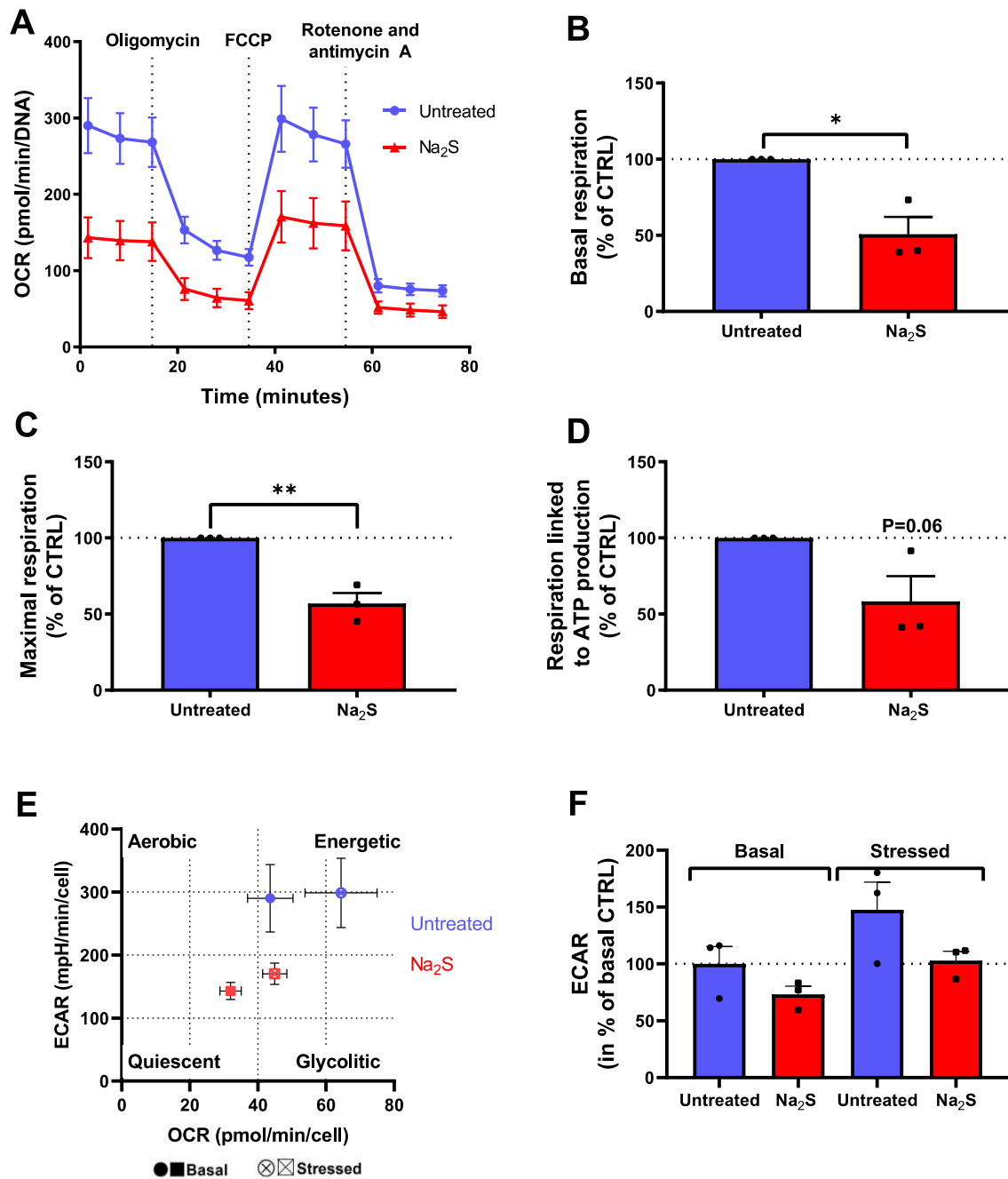


**Figure 6. DIO enhances sulfide production through bacterial pathways related to sulfate reduction and increased bile acid concentration.** **A.** Relative abundance in the colonic microbiota of the predicted pathway - sulfate reduction “SO4ASSIM-PWY” ( $n=8$  for CTRL and  $n=7$  for DIO). **B.** Relative concentration of bile acids in colonic content detected by  $H^1$ -NMR ( $n=11$  for CTRL and  $n=12$  for DIO). **C.** Sulfide concentrations in colonic contents ( $n=12$  for CTRL and  $n=12$  for DIO). **D.** Relative mRNA expression of the mitochondrial hydrogen sulfide detoxification enzymes in colonic crypts ( $n=15$  for CTRL and DIO). Values are means  $\pm$  SEM. Significant differences are represented as \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$  vs. CTRL.



### **Chronic exposure of murine colonic organoids to sodium sulfide elicits a mitochondrial dysfunction similar to that observed *in vivo***

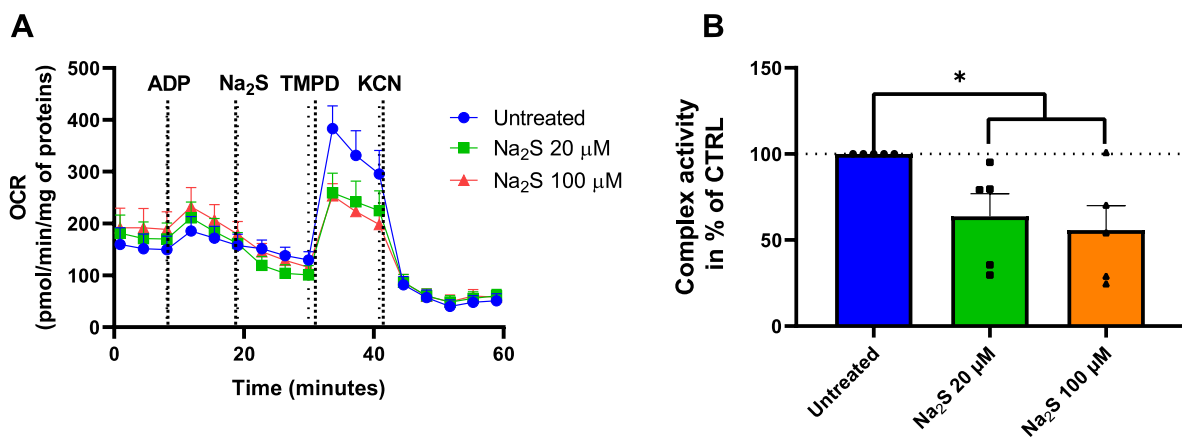
To evaluate the potential deleterious effect of chronic sulfide exposure on CEC mitochondria, organoids from mouse colon were treated for 48h with 500  $\mu\text{M}$  sodium sulfide ( $\text{Na}_2\text{S}$ ), a sulfide donor. Mitochondrial function of these organoids was evaluated via the Seahorse technology (**Figure 7.A**). Chronic treatment with  $\text{Na}_2\text{S}$  impaired basal respiration (**Figure 7.B**) as well as maximal respiration (**Figure 7.C**), compared to that from untreated organoids. Respiration linked to ATP synthesis also seemed diminished by the treatment, although differences between the  $\text{Na}_2\text{S}$ -treated and the untreated organoids was not significant (**Figure 7.D, P=0.06**). Moreover, while global metabolic phenotype of organoids treated with  $\text{Na}_2\text{S}$  was quiescent at basal state, it seemed shifted toward a more glycolytic phenotype in a situation of metabolic stress (**Figure 7.E**) although difference between ECAR at basal and stressed states was not significant in treated organoids (**Figure 7.F**). Interestingly, chronic exposure to 200  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S}$  did not elicit defects of mitochondrial bioenergetics or glycolysis of mouse colon organoids (**Supplementary figure 3**).



**Figure 7. Chronic treatment with sodium sulfide (Na<sub>2</sub>S) elicits CEC mitochondrial dysfunction in murine organoids similar to that observed in DIO mice.** **A.** OCR of murine colonic organoids after 48h treatment with 500  $\mu$ M Na<sub>2</sub>S. Sequential injections were oligomycin, FCCP and antimycin A with rotenone. **B.** Basal respiration, **C.** maximal respiration, **D.** respiration linked to ATP production of murine colonic organoids represented in percentage of untreated organoids. **E.** Energy map of untreated and Na<sub>2</sub>S-treated organoids. **F.** ECAR of murine colonic organoids expressed in percentage of the untreated condition at basal state. Values are means  $\pm$  SEM. Significant differences are represented as \*P  $\leq$  0.05, \*\*P  $\leq$  0.01, \*\*\*P  $\leq$  0.001 vs. CTRL ( $n=3$  for untreated and Na<sub>2</sub>S-treated organoids).

## Acute exposure of isolated mitochondria from mouse CEC to sodium sulfide decreases complex IV activity

Finally, we evaluated whether activity of complex IV, which gene expression was reduced in isolated crypts from DIO mouse compared to CTRL, was affected by sulfide. Mitochondria were isolated from colonic crypts of mouse that had received the CTRL diet for 2 weeks and complex IV activity was assayed in presence or absence of  $\text{Na}_2\text{S}$ . Increase in the respiration rate following ADP injection confirmed that oxidative phosphorylation of isolated mitochondria was functional (**Figure 8.A**). Acute treatment of isolated mitochondria with  $\text{Na}_2\text{S}$  elicited a decrease in OCR after N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD) injection, indicating a lower cytochrome c oxidase activity, regardless of the  $\text{Na}_2\text{S}$  concentration (**Figure 8.B**).



**Figure 8. Acute exposure with  $\text{Na}_2\text{S}$  of isolated mitochondria from mouse CEC diminishes cytochrome c oxidase activity. A** OCR of isolated mitochondria from CEC of mouse. **B.** Cytochrome c oxidase activity in percentage of the untreated condition. Values are means  $\pm$  SEM, Significant differences are represented as  $*P \leq 0.05$  vs. CTRL ( $n=5$  mice).

## Discussion

In this study, we aimed to better characterize CEC mitochondrial function in DIO and to decipher the underlying mechanisms of mitochondrial dysfunction if any. Here, we showed that mitochondria from DIO mouse isolated crypts displayed decreased basal, maximal and ATP production linked respirations, indicative of a mitochondrial dysfunction. Yet, obesogenic diet consumption did not alter colonic crypt fatty acid metabolism nor elicited oxidative stress but favored sulfide production from Desulfovibrionaceae. In addition, chronic treatment of mouse colonic organoids with sodium sulfide reproduced the *in vivo* mitochondrial alterations whereas an acute exposure of isolated mitochondria from mouse isolated crypts to sodium sulfide markedly decreased cytochrome c oxidase activity. Overall, our data support the hypothesis of increased sulfide production by colon dysbiotic microbiota in a context of DIO that impairs

mitochondrial complex IV activity leading to mitochondrial dysfunction of CEC, regardless of CEC fatty acid metabolism and oxidative stress.

Since obesogenic diet are rich in saturated fatty acids and considering their deleterious impact on mitochondrial function in other tissues (Koliaki et al., 2015; Wojtczak and Schönfeld, 1993) and on CEC *in vitro* (Lee et al., 2020; Li et al., 2020; Sun et al., 2018), several authors have hypothesized that enhanced fatty acid oxidation may generate oxidative stress in CEC leading to mitochondrial dysfunction. This organelle is indeed considered as the primary target of ROS-induced intracellular damages. In the small intestine, a metabolic shift toward lipid catabolism in enterocytes has been demonstrated in a context of obesity (Guerbette et al., 2022), both in humans (Tremblay et al., 2013) and in animal models (D'Aquila et al., 2019), marked by enhanced lipid storage and increased  $\beta$ -oxidation (Kondo et al., 2006). Concomitant to these metabolic alterations, oxidative stress has been observed in the small intestine mucosa from obese mice (Gil-Cardoso et al., 2017; Qiao et al., 2013) from which may emerge mitochondrial dysfunction. However, the colon is not known as a site of dietary fatty acid absorption since most of lipids are absorbed in the small intestine. Nevertheless, hypothesizing that excessive dietary lipids may reach the colon, several authors showed that treating colonocyte with palmitic acid *in vitro* increased ROS generation, altered mitochondrial network, and decreased respiratory rates (Lee et al., 2020; Li and Li, 2020; Sun et al., 2018). However, despite the higher abundance of fatty acids in the caecal content from DIO mice, our data on lipid metabolism in CEC neither support the hypothesis of greater absorption and catabolism of fatty acids nor diet-induced oxidative stress in isolated crypts from DIO mice.

In accordance with previous works led on obese humans (Palmas et al., 2021) or animals (Devkota et al., 2012; Natividad et al., 2018; Zhang et al., 2010), our study shows that obesogenic diet enhances the relative abundance of Desulfovibrionaceae. Moreover, *Bilophila wadsworthia* is a bile-tolerant bacteria whose abundance is increased by HFD (David et al. 2014), and produces H<sub>2</sub>S through taurine degradation (Laue, Denger, et Cook 1997). Bile acids, including sulfated bile acids and taurine-conjugated, are increased in response to high-fat feeding in obese humans (Ou et al. 2012) and mice (Murakami, Tanabe, et Suzuki 2016). Besides, bacterial degradation of taurocholic acid in HFD favors *Bilophila wadsworthia* abundance (Devkota et al. 2012). Accordingly, higher concentrations of bile acids were found in the colonic luminal environment of our DIO-fed mice. In mouse, taurine conjugated bile acids are preponderant compared to the glycine conjugated ones and contrary to human (Li et al. 2019). Hence, most sulfur in DIO mice should arise from bacterial degradation of taurine.

Relative abundance of Desulfovibrionaceae is also increased in obese subjects (Palmas et al. 2021) and suggests that existence of a Desulfovibrionaceae-induced mitochondrial dysfunction of CEC may occur in human as well.

While 22 weeks of DIO in mice induced mitochondrial dysfunction in epithelial cells of isolated crypts, we also showed that feeding mice during 12 weeks with lower amounts of fat (45% in WD vs 58% kcal derived from lipids in DIO) provoked increased abundance of *Bilophila* and bile acid concentrations associated with reduced basal respiration of isolated crypts from WD mice too. This suggested an association between microbiota-derived sulfide and CEC mitochondrial function.

Although sulfides are difficult to be measured *in situ* given their volatility, they can approximately be found at concentrations ranging from 0.2 mM to 2.0 mM in the colon (Macfarlane et al., 1992; Magee et al., 2000). According to their concentration, sulfides can be energetic fuel or metabolic perturbators. Acute exposure of HT-29 Glc<sup>-/+</sup> to NaHS at concentrations below 20  $\mu$ M indeed stimulated O<sub>2</sub> consumption and ATP production whereas at concentrations higher than 65  $\mu$ M, it inhibited CEC respiration through reduced mitochondrial cytochrome c oxidase activity (Mimoun et al., 2012), by binding to its heme center (Hill et al., 1984). In the present study, acute exposure of mouse CEC isolated mitochondria to 100  $\mu$ M Na<sub>2</sub>S impaired cytochrome c oxidase activity. Surprisingly, at 20  $\mu$ M, where sulfides are supposed to stimulate colonocyte respiration (Mimoun et al., 2012), cytochrome c oxidase activity was also impaired. This is in accordance with a study in rat liver isolated mitochondria showing that sulfides promoted ATP generation and mitochondrial respiration at very low dose (below 3  $\mu$ M) whereas it acted already as a metabolic perturbator at 10  $\mu$ M (Módis et al., 2013). To assess the effect of H<sub>2</sub>S on mouse CEC respiration, we used mouse colonic organoids, which were treated with 500  $\mu$ M Na<sub>2</sub>S, an intermediate concentration between the sulfide concentration measured in the colon of our DIO mice and those reported in human colon (Macfarlane et al., 1992). Herein, chronic exposure of organoids to sodium sulfide reproduced the mitochondrial dysfunction observed *in vivo* in isolated crypts from DIO mice. However, although we and others demonstrated that H<sub>2</sub>S is deleterious for the cytochrome c oxidase activity above 20  $\mu$ M, we also showed that a chronic exposure of mouse colon organoids to 200  $\mu$ M Na<sub>2</sub>S did not elicit mitochondrial dysfunction. This raises the question of the actual H<sub>2</sub>S concentration to which mitochondria from colonocytes are exposed *in vitro* and *in vivo* considering its volatility, its diffusion through culture media/lumen and membranes as well as eventual binding with cytosolic compounds. We have to acknowledge that measures of mitochondrial respiration of DIO mouse isolated colonic crypts or chronically Na<sub>2</sub>S treated colonic organoids with the Seahorse technology were not performed in presence of sulfide. Yet, H<sub>2</sub>S impairment of cytochrome c oxidase seems reversible in a dose-dependent

manner as shown *in vitro* in HT-29 after acute exposure to NaHS (Leschelle et al., 2005). However, others have showed that the H<sub>2</sub>S-driven blocking of complex IV, after a rat inhaled H<sub>2</sub>S, persisted between the time when mitochondria were isolated from its lung until the complex activity measurement was performed (Khan et al., 1990). Moreover, expression of *CoxIV*, encoding one of the 14 subunits that constitute complex IV, was diminished in DIO mouse colonic crypts, likely contributing to the observed decrease in mitochondrial oxidative capacity. In line with this result, a 24 h exposure *in vitro* of HT-29 colon cells to 1 mM NaHS diminished the protein expression of complex IV subunits I and II (Leschelle et al., 2005). Overall, our data strengthen the hypothesis of an H<sub>2</sub>S-induced mitochondrial dysfunction involving the complex IV of the ETC in a context of obesogenic diet consumption.

Some authors demonstrated that high fat feeding in mice resulted in increased intracellular lactate concentrations and decreased pyruvate dehydrogenase activity of CEC (Lee et al., 2020; Yoo et al., 2021) which suggested a metabolic shift of CEC towards glycolysis to maintain energetic production while OXPHOS was impaired. In the same line, lactate production was increased *in vitro* after treating HT-29 cells with 1 mM NaHS for 24h, indicating increased glycolysis to sustain ATP generation in case of OXPHOS impairment (Leschelle et al., 2005). However, in our model, ECAR and *Hexokinase1* expression were lower in colonic crypts from DIO mice compared to CTRL ones, suggesting lower glycolysis in DIO mouse isolated crypts while it remained the same than the control condition in Na<sub>2</sub>S-treated colonic organoids. Taken together, our data do not support the hypothesis of a metabolic shift toward glycolysis in case of sulfide exposure or DIO. Thus, glucose, that can be absorbed from blood circulation by colonocytes, is probably not used as a metabolic substrate by isolated crypts from DIO mice to sustain ATP production. As for SCFA, their relative concentration were not modified in the colon of our DIO mice nor in the feces from other models of obese mice (Lu et al., 2016) while human obesity is often associated with increased fecal concentrations of SCFA, including butyrate (Kim et al., 2019). Since a metabolic shift did not occur towards glycolysis to sustain CEC energetic needs, butyrate oxidation may still occur in colonocytes but could be diminished by the deleterious effect of H<sub>2</sub>S on the ETC, leading to decreased ATP production.

In conclusion, we showed here that consumption of an obesogenic diet provoked colon dysbiosis, favoring sulfide production and CEC mitochondrial dysfunction, regardless of CEC lipid metabolism, but likely due to H<sub>2</sub>S-driven impairment of cytochrome c oxidase. This CEC energy supply failing could promote the loss of intestinal homeostasis and notably its permeability, aggravating metabolic endotoxemia or even increasing susceptibility to intestinal inflammation.

## Material and methods

### Animal experiment

Animal procedures were performed in accordance with French law and approved by the Comité Rennais d’Ethique en Expérimentation Animale and by the Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS#22076-2019091911225127 v4). Thirty-two 4-week-old C57BL/6J male mice, from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) were housed by group of 4 per cage at 20°C with a 12:12 h light-dark cycle. After an acclimation week with a chow diet (5% kcal fat, Envigo, Gannat, France), animals were divided into 2 groups and received *ad libitum* for 22 weeks either a control diet (CTRL, D12328; 10% kcal fat, Research Diets, New Brunswick, NJ, n=17) and plain water or an obesogenic diet (DIO, D12331, 58% kcal fat, Research Diets, n=15) and drinking water supplemented with a mix of carbohydrates (45% sucrose and 55% fructose) at 42 g/L. Animals were euthanized through intracardiac puncture following sedation by isoflurane. Four centimeters of proximal colon were maintained in cold Hanks’ Balanced Salt Solution (HBSS, 14170112, Gibco, Illkirch, France) until colon crypt isolation, 1 cm maintained in Krebs buffer for immediate permeability assay in Ussing chamber. Luminal colonic content was removed and snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further microbiota and metabolomic analysis. For the sulfide assay, colonic content was homogenized in deoxygenated PBS 1:10 (weight/volume) using the tissue homogenizer Minilys (Bertin-corp, P000673-MLYS0-A, Rockville, USA). Deoxygenated PBS was obtained after a 48h incubation into an anaerobic enclosure. Blood samples were left on ice for 2 h and then centrifugated at 240xg for 10 min. Serum was aliquoted and stored at -80°C.

For complex IV activity assay on isolated mitochondria, 5 male C57BL/6J mice from Janvier Labs were acclimated for a week with a chow diet and then received the CTRL diet *ad libitum* for 2 weeks before euthanasia.

### Evaluation of diet induced obesity

Adiposity visceral index was obtained through the sum of abdominal, peritoneal and epididymal fat pad weights related to body weight and expressed as percentage. To determine endotoxemia, concentration of lipopolysaccharide binding protein (LBP) from serum samples, diluted at 1:75, was measured by ELISA following the manufacturer’s instruction (EK1274, Tebubio, Le Perray-en-Yvelines, France). Cholesterol and triglycerides in serum were measured in the Biochemistry Department at the Rennes University Hospital.

### **Colonic permeability**

Colonic permeability was measured using Ussing chambers as previously described (Ben Fradj et al., 2022) using FD4 (FD4, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) as a permeability marker.

### **Colonic crypt isolation**

Isolation of colonic crypts was performed as previously described (Fan et al., 2015) and consisted in incubating colon in pre-warmed 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid/HBSS solution (pH=8), for 30 min at 37°C. To allow crypt isolation, colon was hardly agitated in cold HBSS and isolated crypts were counted under an inverted microscope. After addition of 10% fetal bovine serum (SH30066.03, HyClone, GE Healthcare, Chicago, USA) isolated crypts were centrifuged for 5 min at 200xg and resuspended into Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12 (ADF, 12634010, Gibco) supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 1% 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (15630106, Gibco), to stabilize pH. Isolated crypts were then immediately used for metabolic analyses, ROS detection and fatty acid  $\beta$ -oxidation while the remaining crypts were centrifugated, 350xg for 5 min, and resuspended in lysis buffer RA1 (Macherey-Nagel, Hoerd, France) and stored at -80°C for further RNA or DNA extraction.

### **qPCR and evaluation of mitochondrial mass in isolated colonic crypts**

Isolated colonic crypt RNAs were extracted following the manufacturer's protocol (740955.250, Macherey-Nagel) and assayed using a Spectrometer ND-1000 (Nanodrop). cDNA was synthesized using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) from 1  $\mu$ g RNA for each sample in 20  $\mu$ L of nuclease-free water. cDNAs were diluted 1:10 in nuclease-free water (10977035, ThermoFisher Scientific) and were used for real time quantitative PCR (RT-qPCR) on 384-well plates filled with 2  $\mu$ L of cDNA samples, 5  $\mu$ L of PowerSYBR green PCR Master Mix kit (4368813, ThermoFisher Scientific), 0.2  $\mu$ L of each primer at 10  $\mu$ M (Eurogentec) and 2.6  $\mu$ L of nuclease-free water. The expression of the genes of interest was analyzed using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method with Hypoxanthine Phospho Ribosyl Transferase 1 (*Hprt1*) as housekeeping gene. For the evaluation of mitochondrial mass, total DNA was extracted from isolated colonic crypts using the Qiagen DNeasy Blood & Tissue kit (69504, Qiagen, Les Ulis, France) following the manufacturer's instructions. Mitochondrial content was assayed by qPCR as described above by amplifying a portion of mtDNA (mt-Co1) and normalized by amplifying a nuclear fraction (haptoglobine). The primer sequences are available on demand.



### **Extracellular flux analysis of isolated colonic crypts**

Metabolic analysis of isolated colonic crypts was performed with the extracellular flux analyzer Seahorse XFe24 (Agilent Seahorse XF technology). Prior to the experiment, Seahorse cell culture plate from the seahorse XFe24 Fluxpak (102340-100, Agilent, Les Ulis, France) was coated with 50  $\mu$ L per well of 1:10 Matrigel (Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced Basement Membrane Matrix, 354230, Boulogne-Billancourt, France) diluted in the Seahorse medium (Agilent, 102353-100) for 1h at room temperature (RT) and stored at 4°C overnight. Cartridge plate was hydrated with calibrate buffer and incubated overnight at 37°C. One hour before crypt seeding, the plate was warmed up at RT, diluted Matrigel was removed and wells were washed twice with 50  $\mu$ L of Seahorse medium. 50  $\mu$ L of Seahorse complete medium, containing 1 mM pyruvate, 2 mM L-glutamine, 10 mM glucose, was added to each well. Isolated crypts in ADF were centrifugated, 300xg for 5 min, and resuspended in Seahorse complete medium (500 crypts/50 $\mu$ L). 50  $\mu$ L of crypt suspension were seeded per well of the 24-Seahorse culture plate completed with 450  $\mu$ L of warm Seahorse complete medium. Plate was then incubated 45 min at 37°C in a non-CO<sub>2</sub> incubator, to de-gas the plate, while the machine calibrated. Mitochondrial function analysis was performed using the Cell Mito Stress Test kit (103015-100, Agilent) at the following final concentrations: Oligomycin (2  $\mu$ M), an inhibitor of ATP synthase to determine the proton leak, FCCP (0.5  $\mu$ M), to measure the maximal respiration, and Antimycin A and Rotenone (0.5  $\mu$ M), to determine the non-mitochondrial respiration. Three measurement cycles of oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were performed at basal state before any injection, and at metabolic stressed state, stimulated by the FCCP injection. Measures consisted in cycles of 3 min mix, 2 min wait and 3 min measurement after each injection. At the end of the assay, cells were fixed and stained with Hoechst 33258 (H3569, ThermoFisher Scientific), which stains double strand DNA, for normalization.

### **Total lipid assay on colonic crypts and caecum contents**

Colonic crypts and caecum contents were weighted and sonicated in 1 mL of PBS. 100  $\mu$ g of C17:0 was added to each sample as an internal standard for quantification. Lipid extraction was performed by adding 4 mL of a mix of 3:2 (volume:volume) hexane/isopropanol, acidified with 600  $\mu$ M HCl, in each sample. After a 15 min agitation at room temperature, samples were centrifugated at 1000xg for 10 min and the upper phase, which contains lipids, was transferred to a new tube containing 150 mM NaCl in order to rinse the organic phase. The tubes were vigorously shaken and centrifugated at 1000xg for 3 min. Hexane was then totally evaporated with nitrogen flow at 55°C. Transmethylation of fatty acids from total lipids was then performed by adding 500  $\mu$ M NaOH for 20 min at 70°C to allow saponification, and then adding 1.5 M BF<sub>3</sub> in methanol for 20 min at 70°C, to allow methylation. To isolate fatty

acid methyl esters (FAME), 150 mM NaCl and pentane were added in each tube. The upper phase containing the FAME into pentane was transferred into a new tube and evaporated as previously described. Finally, FAME were resuspended in hexane and 1  $\mu$ L of each sample were injected. Total FAME were analyzed using a Agilent 7890N gas chromatograph coupled to a 5975C mass spectrometry detector (Agilent) as previously described (Drouin et al., 2019). The total fatty acids quantified by this method and expressed as  $\mu$ g/mg of caecum content or  $\mu$ g/mg of colonic crypt cells were used as a proxy of total lipid content.

### **Fatty acid $\beta$ -oxidation assay of isolated colonic crypts**

Isolated colonic crypts were centrifugated at 300xg for 5 min, resuspended in 1:4 (volume/volume) Matrigel diluted in William's medium (A12176-01, Gibco) and 40  $\mu$ L per well were seed on a 96 well plate. Another plate, plated in the same condition, was used to normalize by DNA content with Hoechst staining. The plate for fatty acid  $\beta$ -oxidation assay was incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> to allow the Matrigel to solidify. William's medium containing 1% BSA, 100  $\mu$ M palmitic acid (P5585, Sigma-Aldrich), 1 mM L-Carnitine (C0283, Sigma-Aldrich) and 0.05  $\mu$ Ci/mL [U-<sup>14</sup>C]-palmitic acid (NEC534050UC, Perkin Elmer) was then added to each well (100  $\mu$ L) and the plate was incubated for 3 h in a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. Then, 1 M perchloric acid was added to each well (100  $\mu$ L) and incubated at 37°C for 5 min to allow palmitic acid precipitation. The content of each well was then centrifugated at 2000xg for 10 min. Supernatants containing radioactive metabolites from palmitic acid  $\beta$ -oxidation were collected and transferred in 4 mL of scintillation fluid. A liquid scintillation analyzer (TRI-CARB 4910TR, PerkinElmer) recorded the disintegrations per minutes of each sample.

### **ROS detection in mouse isolated colonic crypts**

Three thousand isolated colonic crypts were centrifugated at 300xg for 5 min and resuspended in 10  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCFDA (D399, ThermoFisher scientific), to detect peroxides, or in 10  $\mu$ M MitoSOX (M36008, ThermoFisher scientific), to detect mitochondrial superoxide anions, both diluted in PBS. Crypts were incubated for 30 min at 37°C and protected from light. Then they were centrifugated at 300xg for 5 min and resuspended in PBS. ROS were detected by measuring DCF fluorescence intensity at ex485/em590 and MitoSOX at ex520/em590 using the POLARstar Omega microplate reader (BMG Labtech). Results were normalized by measuring the Hoechst fluorescence intensity.

### **Colonic content microbiota composition analysis**

Bacterial DNA was extracted from colonic content samples using the ZR fecal DNA Miniprep kit (D6010, Zymo Research, Irvine, USA). The V3-V4 region of 16S rRNA gene was amplified using the following primers:

CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACTCCTACGGGAGGCAGCAG(V3F) and GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCC(V4R), Taq Phusion (New England Biolabs, Évry-Courcouronnes, France) and dNTP (New England Biolabs) for 25 cycles (10s to 98°C, 30s at 45°C, and 45s at 72°C). Agarose gel electrophoresis was performed to verify amplicon purity before sequencing using Illumina MiSeq technology, performed at the Genotoul GeT-PlaGe platform (Toulouse, France). The raw sequences were analyzed using the FROGS bioinformatics pipeline to obtain the richness (number of species) and  $\beta$ -diversity parameters as well as the relative abundances of the different taxa for each sample as already described (Arnaud et al., 2020). 16S sequence fasta file of the colonic microbiota data and associated metadata are available on the following link: <https://doi.org/10.57745/GJXAGJ>.

### **Metabolome analysis of colonic contents by $^1\text{H-NMR}$**

Metabolome analysis was performed by using  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy as described before (Beaumont et al., 2020). Briefly, colonic content (approximately 50 mg) was homogenized in phosphate buffer (pH 7) prepared in  $\text{D}_2\text{O}$  and containing the internal standard trimethylsilylpropanoic acid (1 mM) using a FastPrep Instrument (MP biomedical, Irvine, CA). After centrifugation at 12 000xg for 10 min at 4°C, the supernatant was collected. The pellet was resuspended in phosphate buffer, homogenized, and centrifuged as described above. The two supernatants were mixed together and centrifuged twice at 18 000xg for 30 min at 4°C. Finally, the resulting supernatant was transferred into a 5 mm NMR tube. All NMR spectra were obtained with a Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence on an Avance III HD NMR spectrometer and analyzed on the MetaboHUB-MetaToul-AXIOM metabolomics platform (Toulouse, France). Raw spectra were processed in R (4.2.0) with the ASICS package (2.12.0) (Lefort et al., 2019) for baseline correction, normalization by total area and bucketing (0.01 ppm bins). Metabolites were identified by comparison with the spectra of pure compounds and are presented in Supplementary Table 1. For each metabolite, a bucket corresponding to a peak non-overlapping with peaks from other metabolites was selected for quantification. The relative concentration of each metabolite was calculated by dividing the area under the curve of the corresponding bucket with the mean area of the same bucket in the CTRL group.

### **Prediction of the functional potential of the colon microbiota**

PICRUSt2 was used for prediction of metagenome functions (Douglas et al., 2020) as implemented in FROGS (Escudié et al., 2018) according to the guidelines. The 16S rRNA gene sequences of operational taxonomic unit (OTU) identified by FROGS were placed in the

PICRUSt2 reference tree with epa-ng. 84 OTUs (representing 0.04% of the total number of sequences) were removed from analysis due to an alignment length < 80%. Hidden state prediction was performed with the maximum parsimony method with MetaCyc EC-Numbers. OTUs with a nearest sequenced taxon index > 0.2 were excluded from analysis to improve accuracy of prediction. Based on this threshold, 60.6 % OTUs were kept for functional prediction, representing 72.7% of the total number of sequences. For each sample, the abundance of MetaCyc pathways was predicted and normalized by the total abundance of all pathways.

### **Evaluation of sulfide concentrations in colonic contents**

Sulfide concentrations were evaluated by adapting a protocol from Strocchi *et al* (Strocchi et al., 1992). After homogenization in deoxygenated PBS, colonic content was diluted 1:10 (volume/volume) in deoxygenated water. Five hundred  $\mu\text{L}$  of zinc acetate 654 mM (383317, Sigma-Aldrich) was added to 1.5 mL of the latter homogenate. The reagent was prepared by diluting N,N-dimethyl-p-phenylenediamine sulfate (28.5 mM, 186384, Sigma-Aldrich), ferric chloride (36.7 mM, 236489, Sigma-Aldrich) in 50% hydrochloric acid (300 mL). Each homogenate was incubated with a solution containing the reagent, 327 mM zinc acetate and 50% hydrochloric acid for 20 min at RT. Samples were then centrifugated at 12 000xg, 3 min and absorbance of the supernatants was read at 670 nm. Several concentrations of sodium sulfide (0.2  $\mu\text{M}$  to 1 mM) diluted in the same reactive solution were used to generate a standard curve and estimate sulfide concentration. Results were normalized by mg of colonic content.

### **Culture of intestinal organoids and extracellular flux analysis**

Crypt colon mouse C57BL/6JOLA Hsd were obtained following the protocol described above. The EDTA/HBSS solution was supplemented with 10 $\mu\text{M}$  Y27632 (dihydrochloride, Peprotech 1293823) and penicillin/streptomycin (PS) 1%. The pellet of colonic crypts obtained after a 5 min centrifugation at 200xg was resuspended in DMEM/F12 (12634010, Gibco) supplemented with 1% PS and centrifuged at 200xg. Isolated colonic crypts were embedded in 20  $\mu\text{L}$  Matrigel and seeded on 48 well-plate (750 crypts/well) and cultured in proliferative medium (Wnt 3A, R-Spondin, Noggin conditioned medium)/DMEM F12, 50/50, v/v), 15% FBS, 1% PS) at 37°C, under 10% humidified CO<sub>2</sub> with Y-27632 10 $\mu\text{M}$  added in the medium to avoid anoikis for the first 24h. At day 5, organoids were harvested by adding 0.5 mL Tryple Express for 5 min before breaking them by pipetting up and down 4 times. Then, organoids were rinsed with cold ADF and centrifuged at 200xg. Organoid suspension (50  $\mu\text{L}$ ) dissolved in their medium (50 organoids/well) were seeded in precoated matrigel plate Xfp with 10 $\mu\text{L}$  of 10% Matrigel /Seahorse Medium (DMEM XF medium HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> free modified pH 7.4 containing 25 mM

glucose, 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate). After solidification of Matrigel at 37°C for 30 min, organoids were treated or not with Na<sub>2</sub>S 500 µM dissolved in proliferative medium for 48 h. The proliferative medium was changed each morning and evening in order to maintain the H<sub>2</sub>S concentration closed to the setpoint concentration. OCR and ECAR were determined by Seahorse extracellular XFp Flux Analysis. Before the run, plates and cartridges were prepared following the same protocol than for isolated colonic crypts. Three measurement cycles of OCR and ECAR were performed without any exogen agent to determine basal respiration, in the presence of oligomycin (1.5 µM), FCCP (1 µM) and antimycin A/rotenone (0.5 µM). Cycles consisted in cycles of 3 min mix, 3 min of measurements after each injection. At the end of the assay, results were normalized by measuring the Hoechst fluorescence intensity of organoids.

### **Measure of mitochondrial complex IV activity using the Seahorse technology**

Mitochondria from mouse colonic crypts were isolated using a protocol adapted from Frezza *et al* (Frezza et al., 2007). Briefly, colonic crypts were isolated as described earlier. Pellet was resuspended in 1 mL of mitochondrial isolation buffer containing sucrose (70 mM, S-8501, Sigma-Aldrich), D-mannitol (210 mM, M9546, Sigma-Aldrich), HEPES (2 mM) and ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA, 1 mM E-4370, Sigma-Aldrich), all diluted in water at pH 7.2. The suspension was maintained in ice and homogenized using a dounce. Homogenized suspension was then centrifuged at 700xg for 10 min at 4°C. The resulting supernatant containing mitochondria was then collected and centrifugated at 8000xg for 10 min at 4°C. The pellet, considered as isolated mitochondria, was resuspended into 1 mL of mitochondrial assay solution, consisting in sucrose (70 mM), D-mannitol (220 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mM, P5655, Sigma-Aldrich), MgCl<sub>2</sub> (5 mM, M2670, Sigma-Aldrich), HEPES (2 mM), EGTA (1 mM) diluted in water pH 7.2. Mitochondria were then seeded onto Seahorse 24 well plate which was then centrifugated at 2000xg for 20 min at 4°C. Additional 450 µL of mitochondrial assay solution were added to each well and the run was launched. OCR was measured in response to ADP (4 mM), Na<sub>2</sub>S (or mitochondrial assay solution as control), TMPD (500 µM, 87890 Sigma-Aldrich / 2 mM, A5960, Sigma-Aldrich), which reduces cytochrome c and thus activates complex IV, and potassium cyanide (KCN, 2 mM, 60178, Sigma-Aldrich), which blocks complex IV activity and allow to determine its own activity. Data were normalized by mg of proteins per well using the BCA protein assay kit (23225, ThermoFisher Scientific).

### **Statistical analysis**

Data are represented as mean ± SEM. Shapiro-Wilk normality test was performed on each data set, followed by a parametric test (Unpaired t-test) between CTRL and DIO mice, if both data sets followed a normal distribution, or a non-parametric test (Mann-Whitney test)

otherwise. Data from organoids were analyzed using unpaired t-test. A 2-way ANOVA was used to determine the effect of diet and time on FD4 flux through mouse colon mounted in Ussing chamber. PERMANOVA was performed on data from principal coordinates analysis, based on Jaccard distances, to determine if bacterial populations were different between groups. Statistical analysis and graphs were performed on GraphPad Prism version 8.0.2. The PLS-DA was performed with the mixOmics package (6.20.0) in R (4.2.0). Univariate analyses of metabolite relative quantifications and of the relative abundances of microbiota predicted functions were performed non-parametric Kruskal-Wallis test in R. The obtained P-values were adjusted for multiple comparisons using the false discovery rate procedure. P-value  $\leq 0.05$  was considered significant.

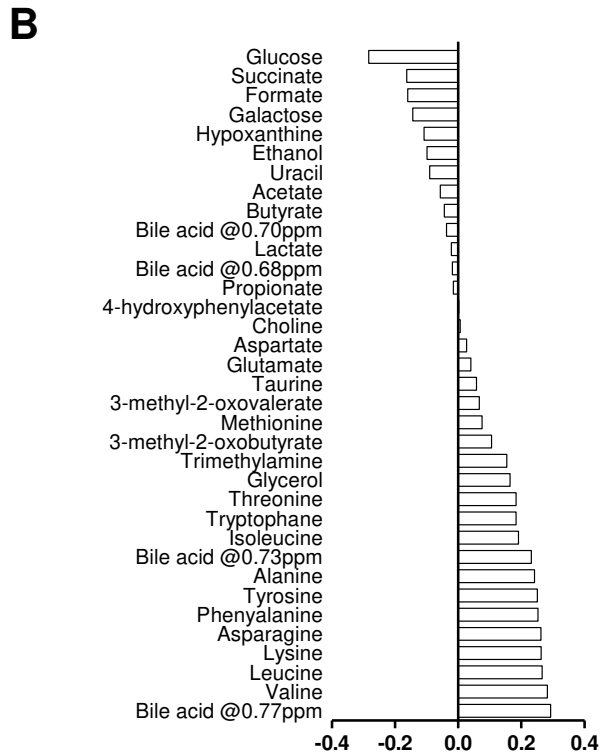
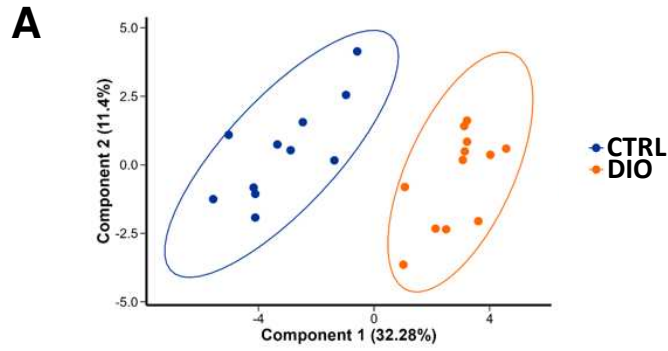
**Supplementary Table 1: Relative concentrations of metabolites in colonic content analyzed by <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics.** Data are represented in percentage of CTRL and as mean ± SEM of area under the curve normalized by total area. s: singulet, d: doublet, t: triplet, m: multiplet.

Metabolite	Peak used for quantification	CTRL	DIO	ADJUSTED P-VALUE	P-VALUE
Bile acid at 0.73 ppm	0.73 ppm (s)	100.0 ± 18.2	179 ± 53.1	<b>&lt;0.001</b>	<0.001
Bile acid at 0.77 ppm	0.77 ppm (s)	100.0 ± 30.4	343.4 ± 78.7	<b>&lt;0.001</b>	<0.001
Bile acid at 0.70 ppm	0.70 ppm (s)	100.0 ± 39.1	91.6 ± 37.2	0.747	0.622
Bile acid at 0.68 ppm	0.68 ppm (s)	100.0 ± 46.3	95.4 ± 39.7	0.827	0.758
Taurine	3.28 ppm (t)	100.0 ± 108.6	147 ± 154.5	0.275	0.176
Propionate	1.06 ppm (t)	100.0 ± 74.0	94.4 ± 49.5	0.827	0.758
Butyrate	0.90 ppm (t)	100.0 ± 37.5	92 ± 23.5	0.878	0.854
Acetate	0.92 ppm (s)	100.0 ± 52.8	85.8 ± 28.9	0.878	0.854
3-methyl-2-oxobutyrate	1.10 ppm (d)	100.0 ± 66.6	160.8 ± 111.1	0.251	0.140
3-methyl-2-oxovalerate	1.13 ppm (d)	100.0 ± 102.2	194.6 ± 308.4	0.545	0.424
4-hydroxyphenylacetate	7.17 ppm (d)	100.0 ± 30.2	100.4 ± 33.8	0.827	0.758
Leucine	0.97 ppm (t)	100.0 ± 22.2	155.4 ± 18.1	<b>&lt;0.001</b>	<0.001
Valine	1.05 ppm (d)	100.0 ± 27.0	183.6 ± 22.5	<b>&lt;0.001</b>	<0.001
Alanine	1.49 ppm (d)	100.0 ± 24.6	154.3 ± 26	<b>&lt;0.001</b>	<0.001
Lysine	3.03 ppm (m)	100.0 ± 33.9	178.1 ± 25	<b>&lt;0.001</b>	<0.001
Tyrosine	6.91 ppm (d)	100.0 ± 29.3	165.5 ± 27.1	<b>&lt;0.001</b>	<0.001
Phenylalanine	7.43 ppm (t)	100.0 ± 37.2	180.6 ± 30.4	<b>&lt;0.001</b>	<0.001
Asparagine	2.95 ppm (d)	100.0 ± 39.0	238.4 ± 62.3	<b>&lt;0.001</b>	<0.001
Isoleucine	1.01 ppm (d)	100.0 ± 15.6	121.5 ± 15.4	<b>0.013</b>	0.005
Tryptophane	7.74 ppm (d)	100.0 ± 32.1	139 ± 27.5	<b>0.013</b>	0.006
Threonine	4.26 ppm (m)	100.0 ± 35.7	137.1 ± 19.6	<b>0.031</b>	0.014
Methionine	2.65 ppm (t)	100.0 ± 35.7	114.4 ± 27.2	0.328	0.218
Glutamate	2.36 ppm (m)	100.0 ± 43.2	108.9 ± 31.4	0.545	0.424
Aspartate	2.71 ppm (d)	100.0 ± 28.1	106.6 ± 50.4	0.902	0.902
Trimethylamine	2.88 ppm (s)	100.0 ± 48.1	141.3 ± 31.3	0.053	0.027
Choline	3.20 ppm (s)	100.0 ± 72.5	102.2 ± 32	0.409	0.295
Lactate	4.12 ppm (d)	100.0 ± 26.8	96.5 ± 27.4	0.747	0.622
Glucose	5.24 ppm (d)	100.0 ± 20.9	47.1 ± 7.9	<b>&lt;0.001</b>	<0.001
Glycerol	3.65 ppm (d)	100.0 ± 55.8	210.5 ± 125	<b>0.013</b>	0.006
Galactose	5.28 ppm (d)	100.0 ± 25.7	75.7 ± 25.6	0.053	0.027
Formate	8.46 ppm (s)	100.0 ± 64.0	51 ± 13.1	<b>0.013</b>	0.004
Succinate	2.41 ppm (s)	100.0 ± 69.5	41.4 ± 30	<b>0.013</b>	0.006
Ethanol	1.19 ppm (t)	100.0 ± 81.0	63.4 ± 29.1	0.409	0.295
Hypoxanthine	8.21 ppm (d)	100.0 ± 45.0	74.9 ± 27.5	0.251	0.140
Uracil	5.80 ppm (d)	100.0 ± 31.5	83.6 ± 27.6	0.275	0.176

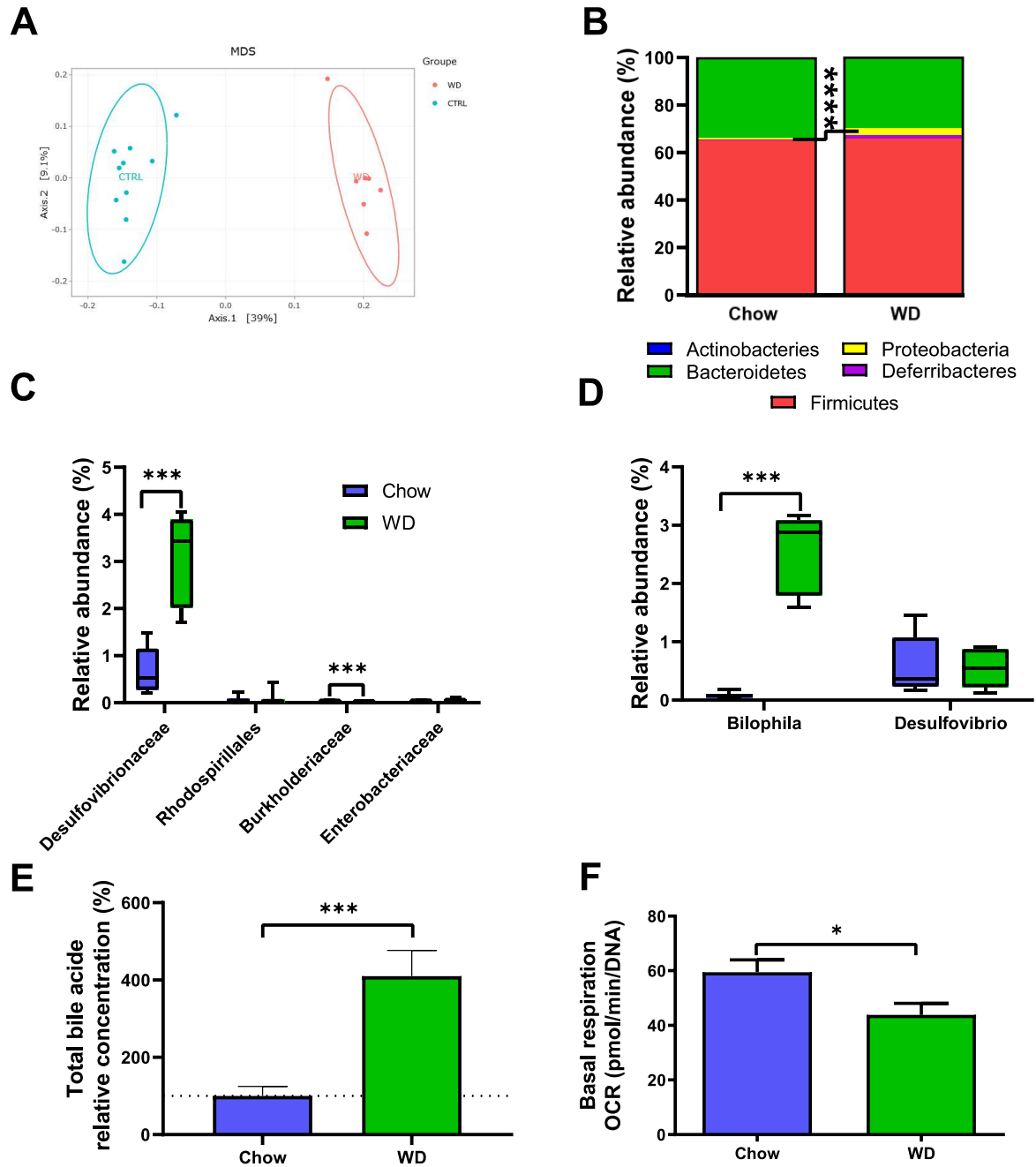
**Supplementary Table 2: Relative abundances of metabolic pathways of the colonic microbiota predicted by PICRUSt2.** Data are presented as log<sub>2</sub> fold change of DIO versus CTRL. Pathways with a | log<sub>2</sub> fold change | >2 are presented.

BIOCYC ID	PATHWAY	ADJUSTED P-VALUE	LOG <sub>2</sub> FOLD CHANGE
PWY0-862	(5Z)-dodec-5-enoate biosynthesis	0.041	2.68
GALACTARDEG-PWY	D-galactarate degradation I	0.028	2.67
GLUCARGALACTSUPER-PWY	superpathway of D-glucarate and D-galactarate degradation	0.028	2.67
P341-PWY	glycolysis V (Pyrococcus)	0.028	2.07
PWY-5860	superpathway of demethylmenaquinol-6 biosynthesis I	0.028	1.87
PWY-5862	superpathway of demethylmenaquinol-9 biosynthesis	0.028	1.87
GLUCARDEG-PWY	D-glucarate degradation I	0.03	1.84
PWY-5896	superpathway of menaquinol-10 biosynthesis	0.028	1.81
PWY-5850	superpathway of menaquinol-6 biosynthesis I	0.028	1.81
PWY-5845	superpathway of menaquinol-9 biosynthesis	0.028	1.81
PWY-1861	formaldehyde assimilation II (RuMP Cycle)	0.028	1.76
RUMP-PWY	formaldehyde oxidation I	0.028	1.64
NAD-BIOSYNTHESIS-II	NAD salvage pathway II	0.036	1.62
PWY-5705	allantoin degradation to glyoxylate III	0.028	1.39
PWY-6478	GDP-D-glycero- $\alpha$ -D-manno-heptose biosynthesis	0.044	1.34
PWY-7013	L-1,2-propanediol degradation	0.030	1.32
SO4ASSIM-PWY	sulfate reduction I (assimilatory)	0.039	1.23
SULFATE-CYS-PWY	superpathway of sulfate assimilation and cysteine biosynthesis	0.039	1.18
PWY-6507	4-deoxy-L-threo-hex-4-enopyranuronate degradation	0.041	1.13
PWY-5345	superpathway of L-methionine biosynthesis (by sulfhydrylation)	0.039	1.08
PWY-7332	superpathway of UDP-N-acetylglucosamine-derived O-antigen building blocks biosynthesis	0.041	1.08
PWY-5384	sucrose degradation IV (sucrose phosphorylase)	0.044	-1.63
PWY-7377	cob(II)yrinate a,c-diamide biosynthesis I (early cobalt insertion)	0.044	-2.36
PWY-6876	isopropanol biosynthesis	0.036	-4.50

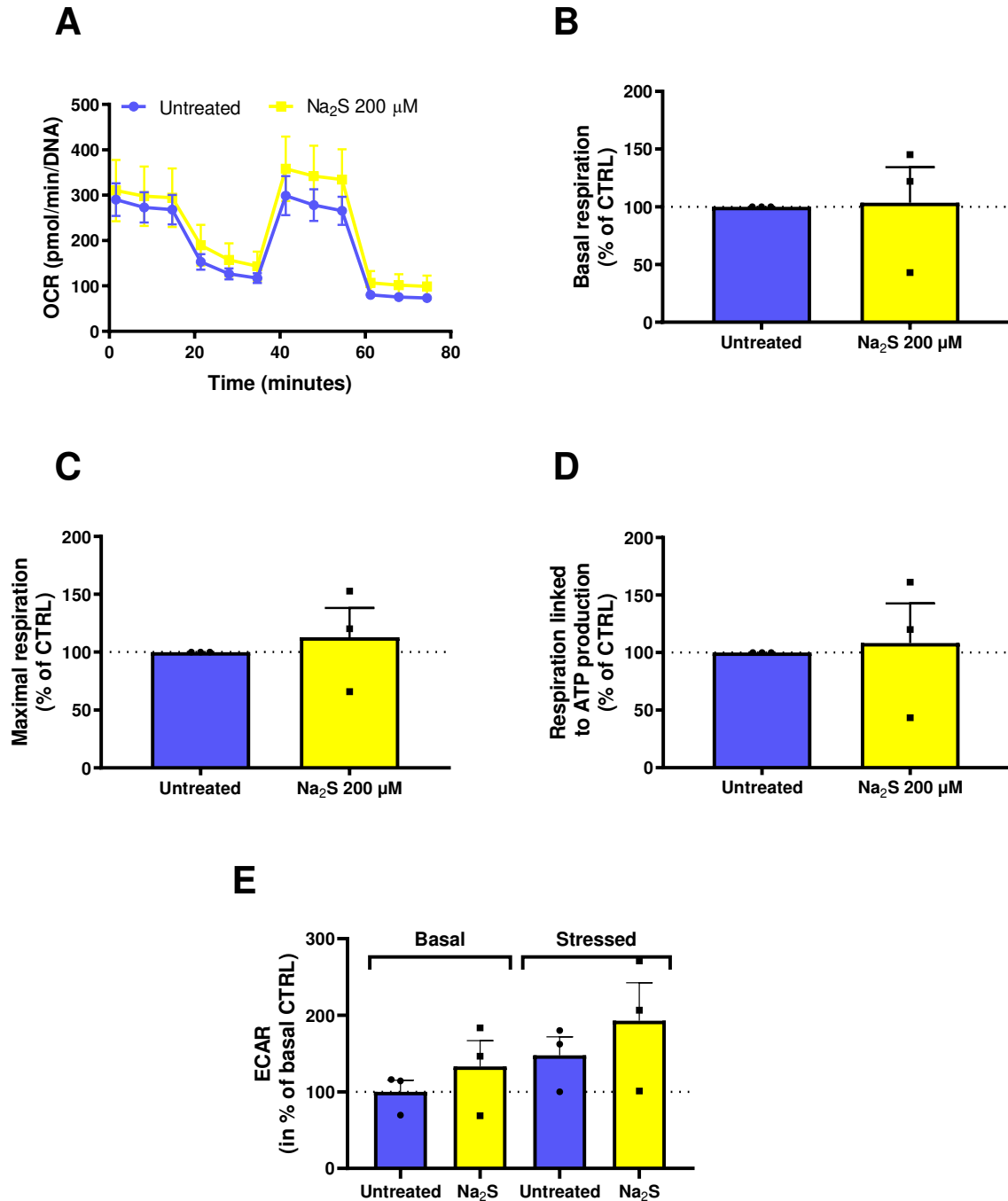




**Supplementary figure 1. (A) Partial Least-Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) of relative concentrations of metabolites in colonic content measured by  $^1\text{H-NMR}$  from CTRL and DIO mice and (B) loadings of the component 1 of the PLS-DA.**



**Supplementary figure 2. Another model of DIO for 12 weeks induces gut microbiota dysbiosis favoring the growth of sulfur-reducing bacteria and reduces mitochondrial respiration of colonic crypts.** Microbiota analyses were performed by 16S rRNA gene amplicon sequencing of colonic luminal content collected from C57BL6N mice after 12 weeks of chow or western diet (WD) (see Supplementary material and methods): **(A)**  $\beta$ -diversity, **(B)** relative abundance of the five main phyla, **(C)** families from the Proteobacteria phylum and **(D)** genera from the Desulfovibrionaceae family ( $n=10$  for chow and  $n=7$  for DIO). **(E)** Relative concentration of bile acids in the colonic content detected by NMR ( $n=12$  for chow and  $n=9$  for WD). **(F)** Basal respiration of isolated colonic crypts from chow and WD mice measured with the Seahorse technology ( $n=12$  for chow and  $n=9$  for WD). Values in box plots are minimum to maximum with a line at median. Values in histograms are means  $\pm$  SEM. Significant differences are represented as \* $P \leq 0.05$ , \*\*\* $P \leq 0.001$  vs. CTRL.



**Supplementary figure 3. Chronic exposure to 200  $\mu\text{M}$  of  $\text{Na}_2\text{S}$  of mouse colon organoids does not impair mitochondrial bioenergetics.** (A) OCR of murine colonic organoids after 48 h treatment with 200  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S}$  or not. Sequential injections were 1.5  $\mu\text{mol/L}$  oligomycin, 2  $\mu\text{mol/L}$  FCCP and 0.5  $\mu\text{mol/L}$  of antimycin A and rotenone. (B) Basal respiration, (C) maximal respiration and (D) respiration linked to ATP production of murine colonic organoids represented in percentage of no  $\text{Na}_2\text{S}$  condition. (E) ECAR of murine colonic organoids expressed in percentage of the no  $\text{Na}_2\text{S}$  condition. Values are means  $\pm$  SEM ( $n=3$  for untreated and  $\text{Na}_2\text{S}$ -treated organoids).

## Supplemental material and methods

### Animal experiment

Twenty-four male 4-week-old C57BL/6N mice, from Envigo (Gannat, France) were housed by group of 4 per cage at 20°C with a 12:12 h light-dark cycle. After an acclimation week with a chow diet (Envigo, Teklad Global 16% Protein Rodent Diet), animals were divided into 2 groups and received *ad libitum* for 12 weeks the chow diet (Chow, 5% kcal from fat, n=12) or a western diet (WD, D12451, 45% kcal from fat, n=12). Animals were euthanized through intracardiac puncture following sedation by isoflurane. Colon was removed and 4 cm were maintained in cold Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco, 14170112) until colonic crypt isolation as described in *Material and methods*. Luminal colonic content was removed and snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further bile acid quantifications (<sup>1</sup>H-NMR) and microbial analysis, both performed as described in *Material and methods*.

### Extracellular flux analysis of isolated colonic crypts

Metabolic analysis of isolated colonic crypts was performed as described in *Material and methods* using the Cell Mito Stress Test kit at the following final concentrations: Oligomycin (2 μM), FCCP (2 μM) and Antimycin A and Rotenone (0.5 μM).

## **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

---

## DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

---

Mon projet de thèse avait pour objectif de déterminer si la consommation d'un régime obésogène modifiait la fonction mitochondriale des cellules épithéliales d'intestin grêle et de côlon et si oui, d'en déterminer les mécanismes associés et son impact sur l'homéostasie intestinale dans un modèle murin d'obésité.

La consommation d'un régime obésogène provoque une modification de la fonction mitochondriale des cellules épithéliales jéjunales et coliques ainsi qu'une augmentation de perméabilité intestinale, selon des mécanismes différents en fonction du segment intestinal et de l'environnement auquel les CEI/CEC sont exposées. Ainsi dans le jéjunum, les données *in vivo* et *in vitro* montrent que l'augmentation du stockage des lipides intracellulaire sous forme de CLD émanant du régime induit une perturbation de la dynamique mitochondriale, marquée par une diminution du nombre de mitochondries, de l'expression de *Pgc1a*, et de la capacité oxydative des CEI. Cette modification de la bioénergétique des CEI est associée à une augmentation de la prolifération et une diminution du phénotype mature des CEI ainsi qu'une importante expression de *Cldn2*, claudine permissive pouvant contribuer à l'augmentation de la perméabilité jéjunale observée. Par ailleurs, les données obtenues *in vitro* montrent que le C18:0 et le C16:0 à 250 µM induisent une dysfonction mitochondriale et une augmentation de la perméabilité tandis que le C12:0 et le C14:0 n'altèrent pas, voir stimulent, la fonction mitochondriale des IPEC-J2. Ces résultats suggèrent qu'en dehors de leurs effets en mélange à forte concentration, les acides gras ont des effets différents selon leur nature. De plus, le traitement avec le mélange de ces 4 acides gras induit d'abord une accumulation des TG et une augmentation précoce, et transitoire, des peroxydes avant de provoquer une augmentation de la perméabilité épithéliale et une diminution de la respiration basale des IPEC-J2.

Dans le côlon, bien que les acides gras du régime soient fortement concentrés dans la lumière, ils ne sont pas absorbés par les CEC et leur catabolisme lipidique n'est pas modifié. En revanche, la consommation d'un régime obésogène augmente l'abondance des Desulfovibrionaceae et des sulfures dans l'environnement luminal colique en association avec une augmentation de la perméabilité colique. Les données obtenues à partir d'un modèle d'organoïdes coliques murins montrent qu'un traitement chronique avec des sulfures reproduit la dysfonction mitochondriale des CEC des souris DIO, marquée par une diminution des respirations basale, maximale et liée à la production d'ATP. De plus, l'exposition aigue de mitochondries isolées de CEC murines à des sulfures provoque une diminution de l'activité du complexe IV de la chaîne de respiration mitochondriale.

## I. Shift métabolique dans l'entérocyte et fonction mitochondriale des CEI dans un contexte de DIO

Une perspective de notre étude serait d'approfondir la caractérisation du métabolisme énergétique des CEI dans un contexte de DIO afin de mettre en évidence un éventuel shift métabolique vers la  $\beta$ -oxydation, au détriment de l'oxydation de la glutamine. En effet, malgré la baisse de capacité  $\beta$ -oxydative des CEI des souris DIO, la présence d'une grande quantité de lipides dans la lumière intestinale et dans les CLD nous laisse supposer une activité de  $\beta$ -oxydation élevée. Seules quelques études décrivent pour le moment une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le catabolisme lipidique, tandis que l'expression des gènes codant des enzymes de la glycolyse sont diminuées (Kondo et al., 2006; Ramachandran et al., 2017; Zembroski et al., 2021). De même, dans les CEI de nos souris DIO, l'expression de *Hk1*, des transporteurs de glucose et de *Gls*, codant la glutaminase, est diminuée, tandis que l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique est augmentée (*Ppara*, *Pparg*, *Fabp1*) voire non modifiée (*Cpt1*, *Medium-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase* ; données non montrées). La dépendance énergétique des CEI de souris CTRL ou DIO à l'une ou l'autre de ces voies pourrait être déterminée en mesurant la consommation d'oxygène au Seahorse en réponse à l'injection d'inhibiteurs bloquant la *Gls*, *Hk1* ou *Cpt1*.

Il serait également pertinent de mesurer l'activité des complexes de l'OXPPOS afin de déterminer une éventuelle altération de leur fonctionnement chez les souris DIO. En effet, bien que nous ayons montré une baisse du nombre de mitochondries chez les souris DIO, les données obtenues au Seahorse montrent une augmentation de la capacité respiratoire de réserve et de l'efficacité de couplage des CEI de souris DIO. Il est donc possible que les mitochondries des CEI de souris DIO soient tout aussi fonctionnelles voire plus efficaces que celles des souris CTRL pour produire de l'énergie. Nos résultats montrent que la consommation d'un régime obésogène diminue le nombre de mitochondries dans les CEI d'intestin grêle sans pour autant montrer des signes de dysfonction au sens strict, définie comme étant l'ensemble des mécanismes qui conduisent à une diminution de l'efficacité de l'OXPPOS et de la production d'ATP. Nous avons choisi de ne pas mesurer la concentration d'ATP des CEI *ex vivo* car étant donné le temps nécessaire à l'isolement des cellules, les mesures d'ATP ne seraient pas représentatives des stocks cellulaires *in vivo*. Néanmoins, la mesure de l'activité des complexes de l'OXPPOS des CEI permettrait de savoir si la chaîne de respiration est plus ou moins active/efficace pour produire de l'énergie. La mesure des concentrations en ATP et de l'activité des complexes pourrait cependant être réalisée sur le modèle *in vitro* IPEC-J2 traité avec les acides gras du régime, perspective envisagée pour poursuivre ce travail.

Une autre perspective serait d'identifier et de caractériser la bioénergétique des mitochondries liées aux CLD. En effet, D'Aquila *et al.* montrent, après avoir gavé des souris avec de l'huile d'olive, que des protéines mitochondriales impliquées dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras sont retrouvées dans des fractions isolées de CLD issues des CEI de souris HFD, tandis qu'elles ne sont pas présentes dans les CLD des CTRL (D'Aquila *et al.*, 2019), indiquant une association entre les CLD et les mitochondries chez les souris HFD. Ces auteurs ont ainsi suggéré que la consommation d'un régime obésogène induit une adaptation métabolique des entérocytes de souris HFD caractérisée par une association entre mitochondries et CLD et une éventuelle augmentation du catabolisme lipidique, visant à contrer l'accumulation excessive de lipides. Dans le tissu adipeux, il a par ailleurs été mis en évidence que des mitochondries peuvent se lier aux CLD et présentent une plus grande capacité oxydative et de production d'ATP par rapport aux mitochondries cytosoliques des mêmes cellules (Benador *et al.*, 2018). Une perspective pour notre étude serait de déterminer la répartition des mitochondries par observation en microscopie électronique et/ou par immunomarquage des mitochondries, et coloration des CLD.

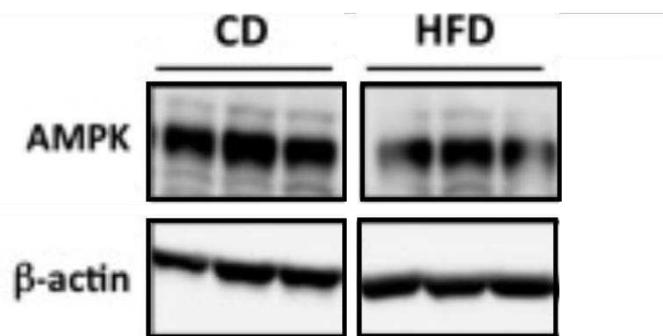
## II. Métabolisme énergétique et régulation de l'expression de *Pgc1a*

Les données obtenues *in vivo* montrent que quelques jours de consommation d'un régime obésogène suffisent à induire une stéatose entérocytaire et une diminution de l'expression de *Pgc1a* (Partie II.2). *In vitro*, nous ne sommes pas parvenus à mesurer l'expression de *Pgc1a* sur le modèle IPEC-J2, que ce soit par la technologie SYBR Green avec différentes amorces ou par la méthodologie TaqMan. L'une des perspectives de ce projet consiste donc à trouver un moyen de mesurer l'expression de ce master gène régulateur de la biogénèse mitochondriale au cours de l'accumulation des TG dans les IPEC-J2 en réponse au mélange d'acides gras présenté précédemment afin de compléter ces données. Il serait également intéressant d'estimer la masse mitochondriale des IPEC-J2 en quantifiant l'ADNmt par qPCR.

Nous n'avons pas non plus exploré les mécanismes qui pourraient expliquer la diminution de *Pgc1a* mais plusieurs hypothèses sont envisageables. Bien que la régulation de l'expression de *Pgc1a* dans l'intestin, à l'état physiologique et dans un contexte de DIO, ne soit pas beaucoup documentée, les données obtenues dans d'autres tissus stéatosés suggèrent plusieurs voies de régulation possibles. L'augmentation du ratio AMP/ATP constitue l'une des principales voies permettant l'activation de la transcription de *Pgc1a*. Ce mécanisme survient notamment dans le cas d'une période de jeûne et consiste en l'activation d'AMPK (Aharoni-Simon *et al.*, 2011) ou de l'AMPc (Louet *et al.*, 2002), puis en la transcription de *Pgc1a* par fixation de la *C-AMP Response Element-binding protein* phosphorylée sur son



promoteur. Une consommation importante de lipides réduit l'activité de l'AMPK dans plusieurs tissus, notamment le foie, le tissu adipeux et les muscles squelettiques (Zhao et al., 2020). Ainsi, il est concevable qu'en réponse à une surconsommation de lipides, l'activité de l'AMPK des CEI soit rapidement diminuée, réduisant l'expression et l'activité de PGC1 $\alpha$  et entraînant la diminution de la biogénèse mitochondriale, de la  $\beta$ -oxydation et favorisant le stockage des lipides. Un article récent a rapporté l'expression protéique d'AMPK par western blot dans des CEI isolées d'iléum de souris après 16 semaines de régime HFD (60% kcal en lipides). Malgré l'absence de semi-quantification des western blots, l'expression d'AMPK semble diminuée entre les souris recevant le régime CTRL ou le régime HFD (60% kcal dérivés des lipides ; **Figure 54**) (Olivier et al., 2021). Aucune autre donnée sur l'expression ou l'activité d'AMPK dans l'intestin de souris sous régime DIO n'est disponible dans la littérature à notre connaissance. Il serait donc intéressant de mesurer l'activité d'AMPK des CEI au cours du temps pendant la consommation d'un régime obésogène *in vivo*, ou d'un traitement aux acides gras *in vitro*.



**Figure 54. Analyse par western blot de l'expression de l'AMPK dans les cellules épithéliales intestinales de souris obèses.**

Les cellules épithéliales ont été isolées à partir d'iléon de souris nourries avec un régime contrôle (CD ; 10% kcal dérivés des lipides) ou HFD (60% kcal des lipides). Données extraites de (Olivier et al., 2021).

L'expression de *Pgc1a* peut également être déclenchée par Sirt1 lors d'une augmentation du ratio NAD<sup>+</sup>/NADH qui survient également dans les hépatocytes en période de jeûne (Rodgers et al., 2005). Néanmoins cette même étude a montré sur des hépatocytes de rat *in vitro* que l'activation de la transcription de *Pgc1a* par Sirt1 ne provoque pas d'effet sur la biogénèse mitochondriale mais active plutôt l'expression des gènes impliqués dans la néoglucogénèse. Par ailleurs, l'expression de *Pgc1a* est également induite par Sirt3 (Xin et al., 2020), dont l'expression est diminuée dans les CEI de nos souris DIO. Cependant, la surexpression de *Sirt3* dans les CEI de souris obèses n'augmente pas l'expression de *Pgc1a* (Ramachandran et al., 2017), affaiblissant cette hypothèse.

Par conséquent, l'hypothèse la plus plausible pour expliquer la diminution de l'expression de *Pgc1a* dans les CEI des souris DIO semble être une diminution de l'activité

d'AMPK en réponse à une importante consommation de lipides. L'activité d'AMPK étant dépendante de l'état énergétique des cellules (Bharath et al., 2015; Joseph et al., 2015), il est possible que celle-ci soit inhibée dans les CEI des souris DIO compte tenu de l'important rendement énergétique que constituent les acides gras et malgré les adaptations métaboliques observées. D'un point de vue mécanistique, il serait intéressant d'activer AMPK avec de l'*adenosine analog 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside* (AICAR) ou par manipulation génétique sur des organoïdes jéjunaux en prolifération afin de voir si l'expression de *Pgc1a* et la différenciation sont induits.

### III. Homéostasie redox dans les CEI des souris DIO

Étonnamment, peu de données sur le stress oxydant dans l'intestin grêle de souris DIO sont disponibles dans la littérature. Cependant, l'augmentation de la détection des peroxydes dans des homogénats de duodénum et d'iléon de souris et de rat ayant été nourris de 8 (21% de lipides en masse) à 17 semaines (23% de lipides en masse) avec un HFD (Gil-Cardoso et al., 2017; Qiao et al., 2013) suggère un stress oxydant de la muqueuse intestinale induit par le régime. Pourtant dans notre modèle de DIO, nous n'avons pas mesuré d'augmentation de détection basale de peroxydes et d'anions superoxydes dans les CEI. Nous ne pouvons pas exclure en revanche qu'il y ait une augmentation de la production des ERO dans les cellules de la lamina propria des souris DIO. De plus, les concentrations équivalentes d'ERO dans les CEI des souris CTRL et DIO pourraient notamment s'expliquer par l'induction de l'expression des gènes impliqués dans la machinerie antioxydante des CEI des souris DIO pour contrecarrer l'éventuelle augmentation de la production des ERO. De façon similaire, nos données obtenues après 3 jours de consommation du régime DIO ne montrent pas d'augmentation des ERO chez les souris DIO, voire une diminution de la détection des anions superoxydes mitochondriaux. L'expression des gènes de la machinerie antioxydante est également déjà induite. Une étude à des temps encore plus précoces que 3 jours est probablement nécessaire pour évaluer l'émergence extrêmement rapide du stress oxydant dans les CEI. En effet, la cinétique de détection des ERO sur le modèle *in vitro* IPEC-J2 montre que la détection des peroxydes est plus importante à 6h et moindre après 3 jours de traitement aux acides gras. Ces données suggèrent donc que les CEI s'adaptent face à la consommation d'un régime riche en lipides en augmentant leurs défenses antioxydantes pour contrer l'éventuelle augmentation des ERO induites par le catabolisme lipidique (Seifert et al., 2010; Zhang et al., 2019).

#### IV. Axes thérapeutiques contre les complications associées à l'obésité ciblant le métabolisme lipidique des CEI

Les données de quantifications d'acides gras des CEI murines indiquent un important stockage des acides gras C12:0, C14:0, C16:0 et C18:0 sous forme de TG dans les CEI ainsi qu'une concentration plus élevée d'acides gras libres dans les CEI des souris DIO. Cette augmentation de la concentration des acides gras libres dans les CEI des souris DIO et la diminution de l'expression de *Dgat1*, impliqué dans la resynthèse des acides gras en TG, semblent témoigner d'une capacité de stockage en TG des CEI saturée. Toutefois, la diminution de l'expression d'*ApoB* suggère également que l'export des acides gras en chylomicrons est également altéré. L'augmentation du stockage des acides gras sous forme de CLD dans les CEI associée à la diminution de l'export des chylomicrons pourrait être un mécanisme d'adaptation des CEI permettant de limiter l'hyperlipidémie. Il serait par conséquent intéressant de mesurer l'expression génique d'*ApoB* et de doser l'ApoB par ELISA dans le surnageant de culture des IPEC-J2 au cours du temps de traitement aux acides gras afin de déterminer le moment d'apparition de cette adaptation métabolique.

Étant donné la saturation probable du stockage des acides gras sous forme de TG dans les CLD et la concentration des acides gras libres plus élevée dans les CEI, augmenter la  $\beta$ -oxydation pourrait s'avérer être un axe thérapeutique pour restaurer la fonction mitochondriale des CEI et l'homéostasie intestinale. Plusieurs études ont en effet montré que l'augmentation de la  $\beta$ -oxydation des CEI dans un contexte de DIO, *via* la surexpression de *Cpt1* ou *Sirt3* (Ramachandran et al., 2017) ou en inhibant HDAC3 (Dávalos-Salas et al., 2019), améliore les complications associées à l'obésité. Ainsi, une piste thérapeutique pourrait être d'augmenter la  $\beta$ -oxydation en restaurant la biogénèse mitochondriale. Ceci pourrait se faire en induisant l'expression de *Pgc1a* *via* des agonistes d'AMPK tel que l'AICAR comme proposé précédemment. Cette molécule a en effet été montrée comme augmentant l'expression de *Pgc1a* et des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique dans le muscle de souris HFD (Lee et al., 2006). Néanmoins, comme discuté dans la partie **VIII.1.3** de l'introduction de ce manuscrit, augmenter la  $\beta$ -oxydation pourrait induire une production importante d'ERO. Ainsi, et malgré l'induction de la machinerie antioxydante observée dans les CEI *in vivo*, l'augmentation pharmacologique du catabolisme lipidique devrait être associée à un apport d'antioxydants afin de bien contrôler l'homéostasie redox des CEI. Outre supplémenter les régimes avec de l'AICAR, l'ajout de fucoxanthine, qui présente des effets antioxydants, pourrait donc constituer une piste thérapeutique intéressante pour améliorer la fonction mitochondriale et augmenter le catabolisme lipidique. Bien que ses effets n'aient pas été encore bien caractérisés dans notre modèle IPEC-J2 traité avec des acides gras par manque

de temps, nous avons montré qu'un traitement à la fucoxanthine limite l'accumulation des lipides dans ce modèle.

Une autre stratégie thérapeutique consisterait à bloquer l'accumulation des TG dans les CEI en inhibant l'expression/activité des acteurs impliqués dans leur formation et notamment Plin2. En effet, des souris KO pour Plin2 consommant un régime HFD présentent une moindre stéatose intestinale et une augmentation de l'excrétion des TG dans les fèces par rapport aux souris HFD sauvages (Frank et al., 2015). Parmi les acteurs possibles, un axe de recherche sur le rôle du microbiote jéjunal dans l'absorption des lipides suite à la consommation d'un HFD émerge actuellement (Martinez-Guryn et al., 2018). Certaines espèces bactériennes diminuent en effet l'export des lipides en chylomicrons en initiant une reprogrammation métabolique des CEI. Ainsi, la sécrétion de malonyl-CoA par *Lactobacillus paracasei* bloque l'activité de Cpt1 des CEI et favorise le stockage des lipides dans l'entérocyte. A l'inverse, la production d'acétate par *E. coli* active la voie AMPK/PGC1 $\alpha$ /PPAR $\alpha$  et augmente le catabolisme lipidique des CEI (Araújo et al., 2020; Tazi et al., 2018). Par ailleurs, la colonisation des souris HFD par *Lactobacillus paracasei* prévient l'augmentation du poids corporel induite par le régime et indique une nouvelle fois que l'accumulation des TG dans les CEI constituerait un mécanisme de protection contre l'hyperlipidémie. Une perspective à notre étude serait donc de caractériser le microbiote adhérent de la muqueuse jéjunale des souris DIO et de le moduler afin de déterminer son impact sur le métabolisme lipidique de l'entérocyte.

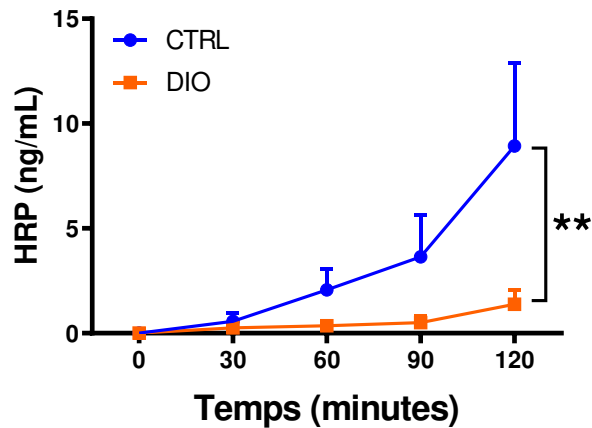
Outre les axes thérapeutiques qui s'appuient sur l'amélioration du catabolisme lipidique des CEI, il convient de se demander quels pourraient être les effets provoqués par l'arrêt de la consommation d'un régime obésogène sur la fonction mitochondriale des CEI et l'homéostasie intestinale, sur le court et le long terme. Concernant les effets à court terme, il a été montré qu'un jeûne d'une nuit chez des souris ayant consommé un régime déficient en choline et supplémenté en éthionine augmente l'expression de *Pgc1a* mais pas son activité qui reste diminuée par rapport à celle des contrôles (Aharoni-Simon et al., 2011), suggérant une empreinte induite par la stéatose dans ces cellules. Il est par conséquent concevable que suite à l'arrêt de la consommation d'un régime obésogène, l'activité de PGC1 $\alpha$  dans les CEI soit toujours altérée et ne permette pas d'augmenter la biogénèse mitochondriale. Cela étant, l'intestin se renouvelle tous les 3-5 jours. Il serait donc intéressant d'étudier la fonction mitochondriale, et notamment la dynamique mitochondriale, et le métabolisme lipidique sur les jours suivants l'arrêt du régime obésogène.

## V. Homéostasie jéjunale et fonction mitochondriale

Nos données *in vivo* ont montré que l'épithélium jéjunale des souris DIO est caractérisé par une augmentation de la prolifération et du nombre de CEI. Ces données sont par ailleurs confortées par celles obtenues *in vitro* sur le modèle IPEC-J2 dans lequel les acides palmitique et stéarique augmentent tout deux le signal MTT en association, tout comme pour le mélange des 4 acides gras testés, à une augmentation du nombre de cellules, indiquant une augmentation de la prolifération cellulaire. Pour compléter ces données, il serait intéressant de procéder à une analyse du cycle cellulaire en réponse aux différents acides gras *in vitro* et d'évaluer la prolifération cellulaire *in vivo* avec un marquage à la bromodeoxyuridine. Toutefois, les mécanismes qui conduisent à une augmentation de la prolifération des CEI dans un contexte de DIO ne sont pas encore bien décrits. Récemment, Mana *et al.* ont montré sur des modèles d'organoïdes intestinaux que les acides gras d'un HFD favorisent la prolifération des CSI par l'intermédiaire de l'activation de PPAR $\delta$  et PPAR $\alpha$  associée à une augmentation de la  $\beta$ -oxydation de ces acides gras dans ces cellules (Mana *et al.*, 2021). Le blocage de la  $\beta$ -oxydation par un inhibiteur de Cpt1, l'étomoxir, dans les organoïdes intestinaux empêche l'hyperprolifération induite par les acides gras (Mana *et al.*, 2021). Même si nos données montrent une diminution de la capacité de  $\beta$ -oxydation des CEI, la quantité de lipides disponibles, à la fois dans les CLD et dans la lumière intestinale, résulte probablement en une activité de  $\beta$ -oxydation relativement élevée.

Par ailleurs, l'augmentation de la prolifération cellulaire est associée à une augmentation de l'expression de la *Cldn2* dans les CEI des souris DIO et pourrait contribuer à expliquer l'augmentation de la TEER jéjunale chez les souris DIO, comme le suggèrent certains travaux (R.Ahmad *et al.*, 2017). De plus, dans le côlon de souris, la surexpression de *Cldn2* augmente la prolifération des colonocytes (Ahmad *et al.*, 2014), ce qui pourrait amplifier le phénomène de prolifération des CEI si ce même mécanisme existe au niveau jéjunale. En outre, *in vivo* chez la souris et *in vitro* sur Caco-2, AMPK, en association avec le métabolisme énergétique, joue un rôle majeur dans l'induction de la différenciation des CEI, en activant Cdx2. Augmenter l'activité d'AMPK, en traitant des Caco-2 avec de l'AICAR, augmente la TEER de la monocouche cellulaire (Sun *et al.*, 2017). En revanche, des souris KO AMPK présentent une diminution de la différenciation des CEI de jéjunum et de l'expression des protéines des jonctions serrées. Ainsi, un fort apport de lipides issus de l'alimentation pourrait diminuer l'activité AMPK des CEI, induisant une diminution de l'expression de *Pgc1a* et de la fonction mitochondriale, diminuant la différenciation des CEI et augmentant la prolifération des cellules non-différenciées surexprimant *Cldn2*, augmentant ainsi la perméabilité intestinale.

Toutefois, les données de TEER obtenues dans notre modèle de DIO contrastent avec la diminution de la perméabilité jéjunale à l'HRP (40 kDa) que nous avons mesurée en chambre de Ussing (**Figure 55**).



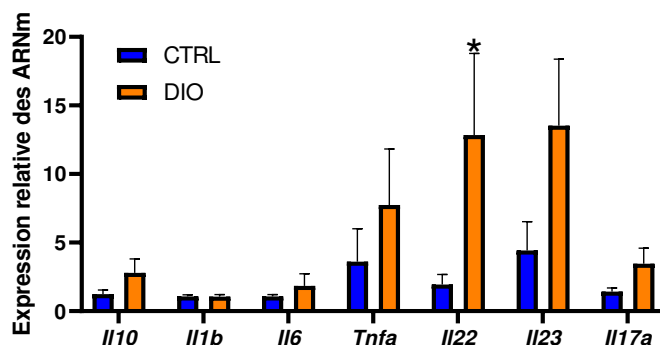
**Figure 55. La consommation d'un régime obésogène pendant 22 semaines diminue la perméabilité transcellulaire chez la souris.**

**A.** Mesure du flux de horseradish peroxidase (HRP) à travers la muqueuse jéjunale des souris CTRL et DIO montée en chambres de Ussing. Les valeurs sont représentées en moyennes  $\pm$  SEM à chaque temps de mesure. Les résultats significatifs sont représentés par  $**P < 0,001$  après le test de comparaisons multiples de Tukey à 120 min.

Cette diminution surprenante de la perméabilité transcellulaire pourrait s'expliquer par une diminution de moitié de la taille des microvillosités des CEI des souris DIO, mesurée à partir des images obtenues en microscopie électronique (CTRL :  $1,84 \pm 0,11$  vs DIO :  $0,95 \pm 0,03$   $\mu\text{m}$ ,  $P < 0,0001$ ). La diminution par 2 de la surface d'échange des CEI pourrait par conséquent entraîner une moindre activité d'endocytose au niveau apical, mécanisme de base de la perméabilité transcellulaire (Ménard et al., 2010). Par ailleurs, la réduction de la taille des microvillosités dans un contexte de DIO peut être mise en lien avec la diminution de l'expression des transporteurs des nutriments non lipidiques et peut être interprétée comme un phénomène d'épargne énergétique consistant à conserver de l'énergie pour le stockage des lipides et le renouvellement épithélial plutôt que pour l'absorption des nutriments. Enfin, il faut également noter que les marqueurs utilisés pour caractériser la différenciation des CEI codent tous pour des protéines membranaires ou du cytosquelette. Il n'est donc pas exclu que la diminution de leur expression soit due à la diminution de la taille des microvillosités et/ou à des perturbations du trafic cellulaire causé par la surcharge en gouttelettes lipidiques.

De plus, l'importante stéatose entérocytaire des CEI des souris DIO est susceptible de bloquer le passage du HRP à travers la muqueuse jéjunale et expliquer les données obtenues en chambres de Ussing où est mesurée l'apparition de ces molécules dans le compartiment séreux des chambres.

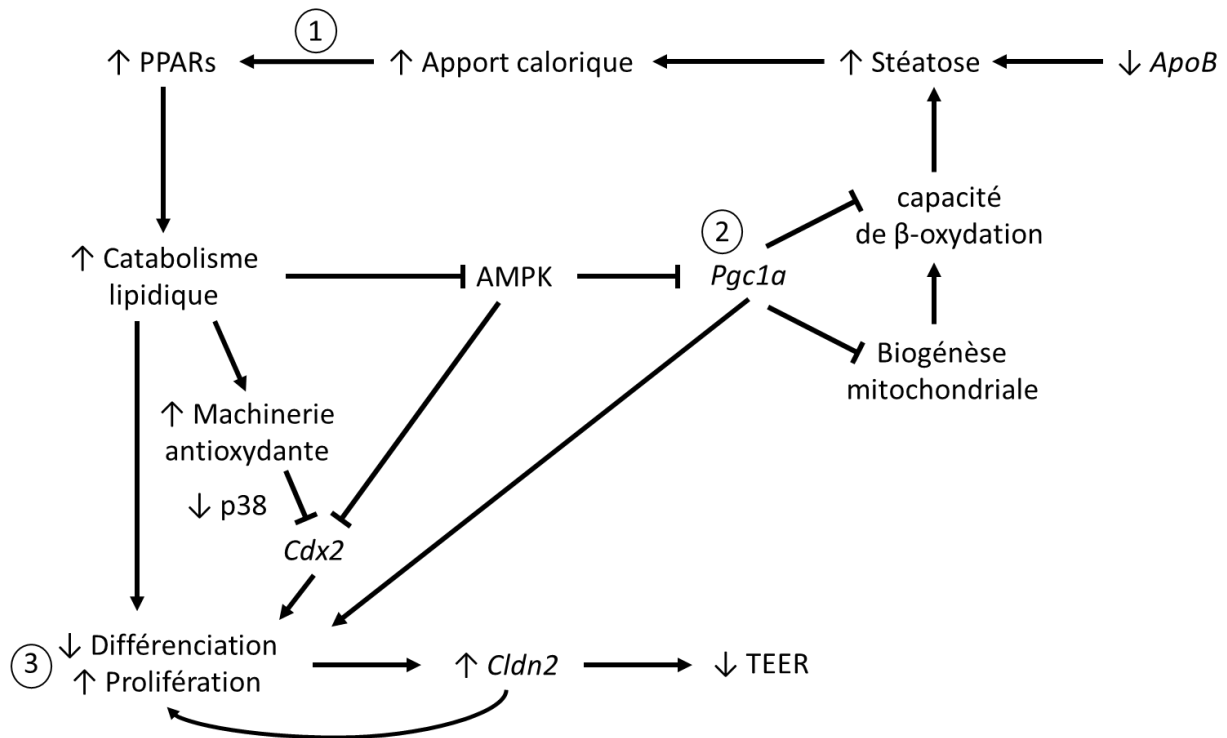
En parallèle de ces données de perméabilité, nous avons mesuré une augmentation de la concentration sérique de LBP dans les souris DIO, ce qui indique une endotoxémie métabolique. En outre, mis à part l'augmentation de l'expression d'*Il22*, ni l'expression des gènes codant des cytokines dans la muqueuse intestinale (**Figure 56**), ni l'analyse histologique de la muqueuse jéjunale n'ont montré de signe de modulation de l'inflammation intestinale tels que ceux renseignés dans le **Tableau 2** de l'introduction bibliographique.



**Figure 56. La consommation d'un régime obésogène pendant 22 semaines induit une augmentation de l'expression de *Il22* dans la muqueuse jéjunale.**

Les données sont exprimées en changement relatif d'expression par rapport aux CTRL par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  et représentées en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences significatives sont représentées par \* $P < 0,05$  vs CTRL après un test de Mann-Whitney. N=8-9 souris par groupe

La synthèse des éléments de cette discussion permet de proposer le schéma suivant pour expliquer l'augmentation de la perméabilité intestinale induite par des altérations métaboliques des CEI dans le jéjunum :



**Figure 57. Mécanismes potentiels décrivant les liens entre perturbations métaboliques des CEI, l'augmentation de la prolifération et augmentation de la perméabilité intestinale.**

① La consommation d'un régime obésogène augmente l'apport calorique issu des lipides dans les cellules épithéliales intestinales (CEI), provoquant initialement une augmentation de l'expression des PPARs et du catabolisme lipidique et une activation précoce de la machinerie antioxydante, et diminuant l'activité d'AMPK. ② La diminution de l'activité AMPK et l'accumulation des lipides dans les CEI, induisent une chute de l'expression de *Pgc1a* à l'origine d'une diminution de la biogénèse mitochondriale et de la diminution globale de la capacité de β-oxydation des CEI. La consommation chronique d'un régime hyperlipidique associée à la diminution de la capacité β-oxydative, entretient un phénotype de stéatose entérocytaire et maintiendrait une faible activité d'AMPK et de PGC1α. ③ La diminution de l'activité AMPK associée à une éventuelle inactivation de p38 par les ERO, dont la formation est bloquée par la machinerie antioxydante, dans les cellules progénitrices et l'augmentation de l'expression des PPARs dans les cellules souches favoriserait une augmentation de la prolifération et de l'expression de *Cldn2* dans les CEI immatures et augmenterait finalement la perméabilité intestinale.



## **VI. Effets des sulfures sur la fuite de protons de la chaîne de respiration mitochondriale dans le côlon**

Ces travaux de thèse ont mis en évidence une augmentation de l'abondance des Desulfovibrionaceae et de la concentration des sulfures dans le côlon des souris DIO. Les données obtenues sur des organoïdes coliques murins et sur des mitochondries isolées de CEC montrent qu'une exposition chronique ou aiguë à des sulfures induit une dysfonction mitochondriale, identique à celle obtenue *in vivo*, et diminue l'activité du complexe IV. Parallèlement à leurs effets délétères sur l'activité du complexe IV, qui pourraient être dus à la propriété des sulfures d'interagir avec l'hème du complexe IV (Hill et al., 1984), des concentrations élevées de sulfures présentent un effet découplant du gradient de protons à travers la MMI dans la lignée cellulaire HT-29 (Leschelle et al., 2005). L'augmentation de la fuite de protons provoquée par les sulfures est souvent interprétée comme un mécanisme adaptatif visant à empêcher l'induction d'un stress oxydant (Leschelle et al., 2005) puisque le découplage partiel de l'OXPPOS, médié par les protéines de découplage (UCP), est associé à une production limitée d'ERO (Hirschenson et al., 2022). Cela pourrait contribuer à expliquer pourquoi la détection des ERO est similaire dans les CEC des souris DIO par rapport aux CTRL. Cependant, notre analyse bioénergétique via la technologie Seahorse a montré une diminution de la fuite de protons dans les cryptes isolées des souris DIO et après le traitement aux sulfures des organoïdes coliques. Néanmoins, il faut rappeler que la mesure de la fuite de protons par le Seahorse est indirecte, puisqu'elle est reposée sur une mesure de la consommation d'oxygène. Ainsi, des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour mesurer le potentiel de la membrane mitochondriale afin de confirmer si la fuite de protons est augmentée par les sulfures dans nos conditions. En outre, étant donnée l'augmentation de l'activité du complexe IV induite par la fucoxanthine sur le modèle IPEC-J2, il serait intéressant de traiter des CEC *in vitro* avec de la fucoxanthine après une exposition aux sulfures et de mesurer l'activité du complexe IV pour mettre en évidence un éventuel effet protecteur de ce composé, avant un éventuel essai *in vivo*.

## **VII. Sulfures et machinerie de détoxification des CEC**

Les CEC possèdent des mécanismes de détoxification des sulfures que nous avons partiellement étudiés. Par exemple, la consommation d'un régime riche en protéines, aboutissant à une production accrue de sulfures dans le côlon, induit l'expression de *Sqor* dans les colonocytes de rat et qui interprétée comme une réponse adaptative des CEC pour détoxifier le H<sub>2</sub>S (Beaumont et al., 2016). Cependant, l'expression de *Sqor* est diminuée dans

les CEC de notre modèle de DIO. La diminution de son expression pourrait s'expliquer par un phénotype moins mature des CEC dans le côlon des souris DIO, marqués par une diminution de l'expression de *Krt20* et une augmentation de *Lgr5*. En effet, des données récentes *in vitro* montrent que SQOR est exprimée lorsque les cellules Caco-2 atteignent un état de colonocyte mature (Scheller et al., 2022). Cependant, l'évolution de l'expression de SQOR en fonction de l'état de différenciation des colonocytes n'est pas claire car son expression est réduite dans les cellules HT-29 après 7 jours de culture par rapport à 2 jours (Mimoun et al., 2012).

### **VIII. Sulfures, fonction mitochondriale et homéostasie de l'épithélium colique**

Nos résultats ont permis de mettre en évidence des associations entre l'augmentation de l'abondance des bactéries de la famille des Desulfovibrionaceae dans le côlon, tout comme dans d'autres modèles d'obésité (Devkota et al., 2012; Natividad et al., 2018; Palmas et al., 2021; Zhang et al., 2010), et une dysfonction mitochondriale associée à une hyperperméabilité colique mesurée avec le FD4. Néanmoins, le lien mécanistique entre ces éléments reste à montrer *in vivo* et/ou *in vitro*. A l'instar de l'étude menée par Devkota *et al.* il serait ainsi intéressant de gaver des souris avec de l'acide taurocholique, ou des composés sulfatés, dans le but d'augmenter l'abondance des *Bilophila*, ou plus généralement des Desulfovibrionaceae, puis d'analyser la fonction mitochondriale des CEC, et notamment l'activité du complexe IV, associée à la mesure de la perméabilité colique et des concentrations de sulfures (Devkota et al., 2012). En outre, un modèle *in vivo* pourrait être également développé dans lequel les souris seraient gavées avec les bactéries d'intérêt comme dans l'étude de Natividad *et al.* (Natividad et al., 2018) tandis qu'*in vitro*, des CEC pourraient être traitées avec des sulfures pour analyser leur fonction mitochondriale et la perméabilité intestinale.

Toutefois, l'une des limites de notre étude est que nous ne sommes pas en mesure de déterminer précisément le genre de la Desulfovibrionaceae dont l'abondance relative est la plus augmentée dans le côlon des souris DIO. L'analyse des séquences de l'ADN codant l'ARN 16S indique qu'elle s'apparente à la bactérie sulfato-réductrice *Mailhella* dont la documentation est encore pauvre à son sujet. De plus, il serait intéressant d'identifier plus précisément les acides biliaires retrouvés dans l'environnement luminal colique des souris DIO afin de valider l'hypothèse d'une augmentation de la production de sulfure à partir de l'acide taurocholique par les *Bilophila*.

## IX. Influence de la durée du régime et de la quantité de lipides dans les altérations métaboliques des CEI

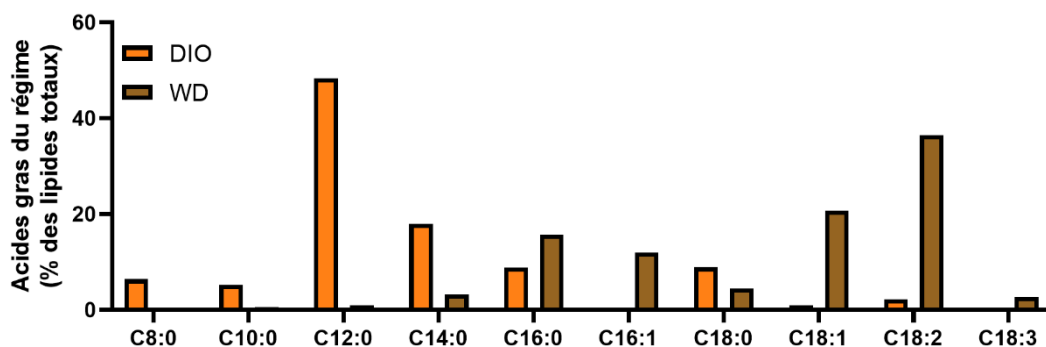
La consommation d'un régime obésogène (58% kcal en lipides) pendant 22 semaines a induit une stéatose entérocytaire associée à une diminution du nombre de mitochondries et de la capacité de  $\beta$ -oxydation dans les CEI de nos souris DIO. Pour évaluer si la consommation du régime DIO avait des effets très précoces, nous avons également étudié le phénotype des CEI de souris après 3 jours de consommation du régime DIO. Ces 3 jours de consommation d'un régime très riche en lipides suffisaient à induire une stéatose entérocytaire et une diminution de l'expression de *Pgc1a* dans les CEI. Ni la capacité de  $\beta$ -oxydation ni la fonction mitochondriale n'ont été évaluées au bout de 3 jours de consommation du régime DIO mais ces 2 paramètres sont probablement diminués dès 3 jours étant donné la forte baisse de l'expression de *Pgc1a*. Ainsi, *in vivo*, les adaptations métaboliques des cellules semblent acquises très rapidement et une étude sur des temps encore plus courts (de 1h à 3j) serait nécessaire pour valider l'enchaînement des événements au niveau des CEI. De plus, les données obtenues sur IPEC-J2 montrent que la capacité de  $\beta$ -oxydation est diminuée dès 30 min de traitement aux acides gras, indiquant une adaptation précoce de ces cellules face à une entrée importante de lipides. Toutefois, la respiration basale des IPEC-J2 n'est pas encore diminuée de manière significative après 6h de traitement, pour le devenir à 3 jours, et suggère que la réduction des fonctions mitochondriales et de la capacité oxydative des CEI, est provoquée par l'accumulation croissante des TG dans le CEI.

Outre l'effet durée du régime, la quantité de lipides consommée joue un rôle majeur dans l'apparition des désordres métaboliques des CEI dans le jéjunum. En effet, sur une durée de 12 semaines, les CEI de souris ayant consommé un WD, dont l'apport en lipides est plus faible que le DIO (DIO : 58% kcal vs WD : 45% kcal de graisses), ne présentent ni CLD, ni de modification de l'expression de *Pgc1a* ou de dysfonction mitochondriale. Nos données obtenues *in vitro* sur le modèle IPEC-J2 confirment également que la diminution de la capacité de  $\beta$ -oxydation des CEI et de la respiration mitochondriale en réponse à un mélange d'acides gras ne sont effectives que pour de fortes concentrations en lipides (1 mM). De plus, des données ont montré qu'une exposition aiguë aux acides gras, après gavage à l'huile d'olive, chez des souris normo-pondérales (Uchida et al., 2012) ou bien la consommation d'un HFD (30 % de lipides en masse) pendant deux semaines (Kondo et al., 2006) favorisent un shift métabolique des entérocytes vers le catabolisme lipidique. Celui-ci se manifeste par une augmentation de la capacité de  $\beta$ -oxydation, de l'expression de gènes associés ainsi que de ceux impliqués dans la synthèse des TG et des chylomicrons. Toutefois, chez des souris HFD (60% kcal dérivés des lipides), bien que l'expression des gènes impliqués dans la  $\beta$ -oxydation et le stockage des TG dans les CEI soit plus élevée que chez les souris normo-pondérales, le

gavage de ces souris DIO avec de l'huile d'olive diminue l'expression de ces gènes (Uchida et al., 2012), indiquant une adaptation des entérocytes lorsqu'ils sont soumis à une importante quantité de lipides, y compris sur un temps court de 2 semaines. Ainsi, une consommation modérée de lipides, quel que soit la durée, semble favoriser leur catabolisme et leur export, tandis qu'une surcharge lipidique dans les CEI induit de rapides adaptations métaboliques, caractérisées par une augmentation du stockage des lipides dans les CLD au détriment de leur  $\beta$ -oxydation et de leur export.

## X. De l'importance du choix des régimes hyperlipidiques et de leurs contrôles

Outre les effets provoqués par un fort apport en lipides, il est important de questionner la pertinence de la composition en acides gras des régimes dans les modèles d'obésité en termes de composition en acides gras. En effet, les profils des acides gras réalisés à partir des régimes CTRL et DIO montrent une richesse en acide laurique qui rappelle la composition de l'huile de coco ou de coprah, toutes deux issues de la noix de coco, ou encore de l'huile de palme, extraite des noyaux des fruits du palmier. Néanmoins alors que l'huile de palme, riche en acide palmitique, est plus communément retrouvée dans les régimes gras occidentaux, les huiles à base d'acide laurique sont peu communes dans les WD et sont plutôt retrouvées dans la cuisine asiatique et notamment dans les Philippines. Les régimes occidentaux actuels comportent en effet, en plus des sucres raffinés, des acides gras saturés à plus longue chaîne (des acides palmitique et stéarique notamment retrouvés dans la viande) et des acides gras polyinsaturés n-6 au détriment des acides gras polyinsaturés n-3 (abondants notamment dans le poisson et les aliments d'origine végétale). Ainsi, le WD utilisé dans notre étude *in vivo* est plus fidèle, du point de vue de sa composition en acides gras, que le DIO pour reproduire le mode de consommation occidental actuel (**Figure 58**).



**Figure 58. Profil des acides gras en pourcentage des lipides totaux des régimes Diet-Induced Obesity (DIO ; D12331) et Western Diet (WD ; D12451).**

Aucune accumulation de lipides ou dysfonction mitochondriale n'a été identifiée dans les CEI des souris WD à 12 semaines. Néanmoins, les régimes WD et DIO ne présentent pas les mêmes apports caloriques dérivés des lipides (DIO : 58% kcal vs WD : 45% kcal en lipides). Il serait donc intéressant d'envisager une étude *in vivo* comparant les effets des 2 régimes obésogènes avec les mêmes proportions et profils d'acides gras mais en réajustant leurs quantités pour que les régimes soient isocaloriques. Nos données obtenues avec les mélanges d'acides gras *in vitro* indiquent cependant que la quantité des acides gras joue un rôle plus prépondérant dans l'apparition de la stéatose et la dysfonction mitochondriale que leur nature puisque la présence ou l'absence de C16:0 dans le mélange d'acides gras à des concentrations supérieures à 750  $\mu\text{M}$  ne modifient pas l'effet du mélange d'acides gras sur le métabolisme énergétique des IPEC-J2. Toutefois, ces données reposent sur des mélanges équimolaires d'acides gras (à 250  $\mu\text{M}$  chacun), tandis que dans l'alimentation, les acides gras ne sont pas apportés à la même proportion. Des expérimentations supplémentaires doivent être menées en comparant les effets des mélanges à des concentrations finales identiques et/ou en faisant varier les proportions de chaque acide gras dans le mélange pour se rapprocher de celles des régimes. Il conviendrait également d'étudier l'impact des régimes hyperlipidiques sur la fonction mitochondriale des CEI et l'homéostasie intestinale chez l'Homme. En effet, bien qu'il ait été montré et décrit chez de nombreuses espèces animales qu'un fort apport en lipides induit une augmentation de leur stockage dans les CEI, peu d'études sont disponibles chez l'Homme. Néanmoins certains travaux ont réalisé la preuve de concept de l'existence des CLD chez l'Homme, quelques heures après qu'ils aient consommé de fortes quantités de lipides, et jusqu'à 18h (Chavez–Jauregui et al., 2010; Robertson et al., 2003; Xiao et al., 2019). Nous nous sommes rapprochés du service d'anatomopathologie de l'hôpital Pontchaillou à Rennes afin d'obtenir des coupes histologiques de muqueuse jéjunale de sujets obèses opérés d'un bypass. Néanmoins, ces patients, à jeun de la veille, ne présentaient pas d'accumulation lipidique visible dans les CEI.

Concernant l'eau sucrée, les données obtenues *in vivo* montrent que la supplémentation en sucres dans l'eau avec un DIO n'a pas d'effet supplémentaire à ceux causés par le DIO seul. Il a en revanche été montré chez l'Homme que l'ingestion de glucose, après un fort apport en lipides, permettait aux CEI de remobiliser les acides gras stockés dans leur CLD pour les exporter (Robertson et al., 2003). Bien que les mécanismes soient encore incertains, l'augmentation de l'export des lipides hors de l'entérocyte pourrait être liée à un effet de l'insuline et à une stimulation de l'activité des lipases qui dégradent les TG. Toutefois, ces données ont été obtenus sur des sujets non-obèses tandis que les souris DIO de notre étude sont probablement résistantes à l'insuline.

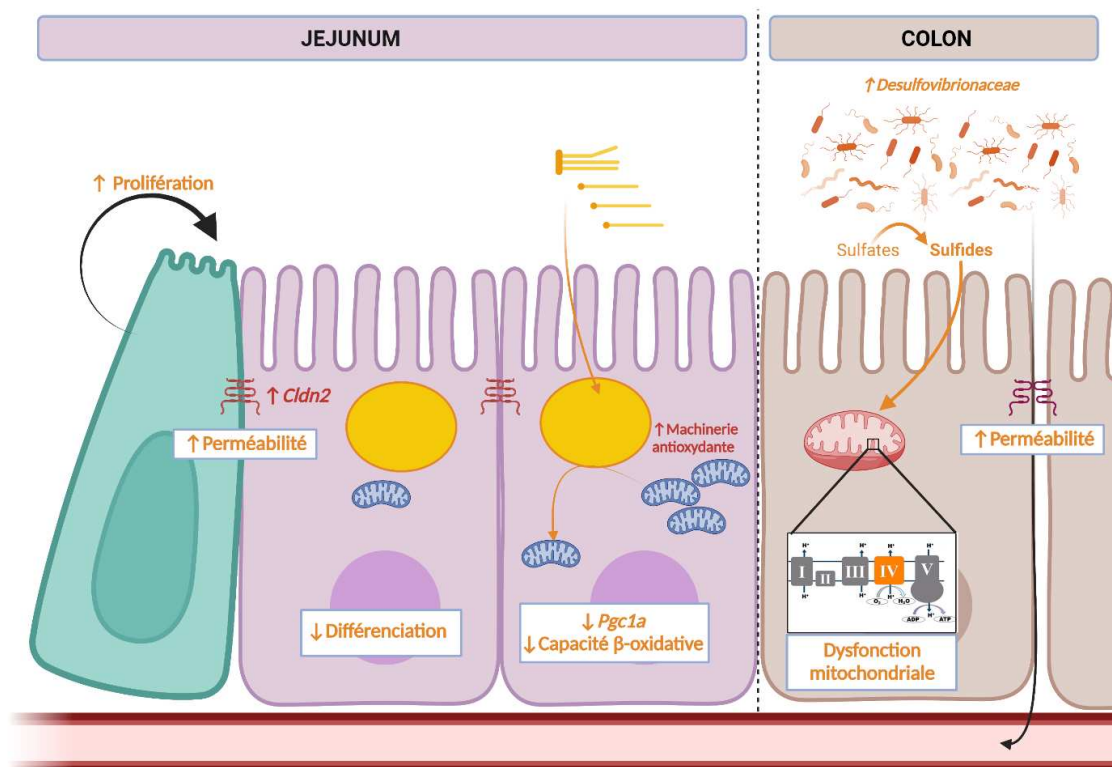
Outre le choix des régimes obésogènes, celui des régimes contrôles joue également un rôle majeur. Le régime Chow, servant de contrôle au groupe WD dans notre étude, présente

en effet un apport en fibres plus diversifié que le régime CTRL, dont la source de fibres est essentiellement de la cellulose. Le régime Chow constitue de fait un régime standard d'alimentation des rongeurs tandis que le régime CTRL correspond à la version *low fat* du DIO, bien que les proportions de chaque acide gras ne soient pas les mêmes. Ainsi, l'analyse de la fonction mitochondriale des CEI du jéjunum des souris CTRL et Chow après 12 semaines de régime montre une meilleure bioénergétique mitochondriale des CEI de souris Chow et notamment une plus grande capacité respiratoire de réserve (données non montrées).

Toutefois, il reste difficile de comparer les données entre les souris CTRL/DIO et celles des souris Chow/WD car ces deux expérimentations ont été faites sur des souches différentes (C57BL/6J et C57BL/6N respectivement). Les souris C57BL/6J portent une mutation sur le gène *nicotinamide nucleotide transhydrogenase* (Nnt) qui, en réponse à un HFD, les rend plus prônes à la prise de poids et d'adiposité ainsi qu'à une perte plus importante de la tolérance au glucose en comparaison aux C57BL/6N (Nicholson et al., 2010). Il a de plus été montré à partir de mitochondries issues de foie de souris C57BL/6J que la mutation de Nnt réduit la formation de la forme réduite NADP entraînant des perturbations de l'homéostasie redox des cellules hépatiques (Ronchi et al., 2013).

## CONCLUSION

En conclusion, les travaux menés dans le cadre de cette thèse ont montré que la consommation excessive de lipides induit une diminution du nombre de mitochondries et de la capacité  $\beta$ -oxydative des cellules épithéliales de jéjunum de souris obèses, médiée par une faible expression de *Pgc1a*. Cette diminution de la biogénèse mitochondriale est susceptible de participer à la perte de l'homéostasie épithéliale, marquée par une prolifération accrue des CEI, une augmentation du nombre de cellules immatures et de l'expression de la claudine permissive *Cldn2*, contribuant à l'augmentation de perméabilité intestinale. Dans le côlon, la consommation d'un tel régime augmente également la perméabilité et induit une dysfonction mitochondriale des CEC par des mécanismes probablement associés à l'augmentation de l'abondance des Desulfovibrionaceae et de la concentration des sulfures, inhibiteurs du complexe IV de la chaîne de respiration mitochondriale (**Figure 59**). L'ensemble de ces données ouvre des perspectives de développement d'approches thérapeutiques ciblant le métabolisme énergétique des CEI afin de réduire les risques d'apparition des complications liées à l'obésité.



**Figure 59.** Schéma bilan des effets provoqués par la consommation d'un régime obésogène sur la fonction mitochondriale des cellules épithéliales jéjunales et coliques et l'homéostasie intestinale.

## RÉFÉRENCES

---

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R., Walker, J.E., 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621–628. <https://doi.org/10.1038/370621a0>
- Adibi, S.A., Mercer, D.W., 1973. Protein Digestion in Human Intestine as Reflected in Luminal, Mucosal, and Plasma Amino Acid Concentrations after Meals. *J. Clin. Invest.* 52, 1586–1594. <https://doi.org/10.1172/JCI107335>
- Aharoni-Simon, M., Hann-Obercyger, M., Pen, S., Madar, Z., Tirosh, O., 2011. Fatty liver is associated with impaired activity of PPAR $\gamma$ -coactivator 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) and mitochondrial biogenesis in mice. *Lab Invest* 91, 1018–1028. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.55>
- Ahmad, M.S., Alsaleh, M., Kimhofer, T., Ahmad, S., Jamal, W., Wali, S.O., Nicholson, J.K., Damanhour, Z.A., Holmes, E., 2017. Metabolic Phenotype of Obesity in a Saudi Population. *J. Proteome Res.* 10.
- Ahmad, R., Chaturvedi, R., Olivares-Villagómez, D., Habib, T., Asim, M., Shivesh, P., Polk, D.B., Wilson, K.T., Washington, M.K., Van Kaer, L., Dhawan, P., Singh, A.B., 2014. Targeted colonic claudin-2 expression renders resistance to epithelial injury, induces immune suppression, and protects from colitis. *Mucosal Immunol* 7, 1340–1353. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.21>
- Ahmad, R., Rah, B., Bastola, D., Dhawan, P., Singh, A.B., 2017a. Obesity-induces Organ and Tissue Specific Tight Junction Restructuring and Barrier Deregulation by Claudin Switching. *Sci Rep* 7, 5125. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04989-8>
- Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W., Nussberger, S., 2001. Tom40, the Pore-Forming Component of the Protein-Conducting Tom Channel in the Outer Membrane of Mitochondria. *J Cell Biol* 153, 1151–1160. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.6.1151>
- Akira, S., Takeda, K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499–511. <https://doi.org/10.1038/nri1391>
- Alex, S., Lange, K., Amolo, T., Grinstead, J.S., Haakonsson, A.K., Szalowska, E., Koppen, A., Mudde, K., Haenen, D., Al-Lahham, S., Roelofsen, H., Houtman, R., van der Burg, B., Mandrup, S., Bonvin, A.M.J.J., Kalkhoven, E., Müller, M., Hooiveld, G.J., Kersten, S., 2013. Short-Chain Fatty Acids Stimulate Angiopoietin-Like 4 Synthesis in Human Colon Adenocarcinoma Cells by Activating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ . *Mol Cell Biol* 33, 1303–1316. <https://doi.org/10.1128/MCB.00858-12>
- Ali, M.A., Poortvliet, E., Strömberg, R., Yngve, A., 2011. Polyamines in foods: development of a food database. *Food Nutr Res* 55, 10.3402/fnr.v55i0.5572. <https://doi.org/10.3402/fnr.v55i0.5572>
- Allen, A., Carroll, N.J.H., 1985. Adherent and soluble mucus in the stomach and duodenum. *Digest Dis Sci* 30, 55S-62S. <https://doi.org/10.1007/BF01309386>
- Alpers, D.H., 2000. Is glutamine a unique fuel for small intestinal cells?: Current Opinion in Gastroenterology 16, 155. <https://doi.org/10.1097/00001574-200003000-00010>
- Amar, J., Burcelin, R., Ruidavets, J.B., Cani, P.D., Fauvel, J., Alessi, M.C., Chamontin, B., Ferrières, J., 2008. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition* 87, 1219–1223. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.5.1219>
- Andriamihaja, M., Chaumontet, C., Tome, D., Blachier, F., 2009. Butyrate metabolism in human colon carcinoma cells: Implications concerning its growth-inhibitory effect. *Journal of Cellular Physiology* 218, 58–65. <https://doi.org/10.1002/jcp.21556>



- Andriamihaja, M., Davila, A.-M., Eklou-Lawson, M., Petit, N., Delpal, S., Allek, F., Blais, A., Delteil, C., Tomé, D., Blachier, F., 2010. Colon luminal content and epithelial cell morphology are markedly modified in rats fed with a high-protein diet. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 299, G1030–G1037. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00149.2010>
- Andriamihaja, M., Lan, A., Beaumont, M., Audebert, M., Wong, X., Yamada, K., Yin, Y., Tomé, D., Carrasco-Pozo, C., Gotteland, M., Kong, X., Blachier, F., 2015. The deleterious metabolic and genotoxic effects of the bacterial metabolite p-cresol on colonic epithelial cells. *Free Radical Biology and Medicine* 85, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.004>
- Appriou, Z., Nay, K., Pierre, N., Saligaut, D., Lefeuvre-Orfila, L., Martin, B., Cavey, T., Ropert, M., Loréal, O., Rannou-Bekono, F., Derbré, F., 2019. Skeletal muscle ceramides do not contribute to physical inactivity-induced insulin resistance. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 44, 1180–1188. <https://doi.org/10.1139/apnm-2018-0850>
- Araújo, J.R., Tazi, A., Burlen-Defranoux, O., Vichier-Guerre, S., Nigro, G., Licandro, H., Demignot, S., Sansonetti, P.J., 2020. Fermentation Products of Commensal Bacteria Alter Enterocyte Lipid Metabolism. *Cell Host Microbe* 27, 358-375.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.01.028>
- Archer, S.L., 2013. Mitochondrial Dynamics — Mitochondrial Fission and Fusion in Human Diseases. *New England Journal of Medicine* 369, 2236–2251. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1215233>
- Armand, L., Andriamihaja, M., Gellenoncourt, S., Bitane, V., Lan, A., Blachier, F., 2019. In vitro impact of amino acid-derived bacterial metabolites on colonocyte mitochondrial activity, oxidative stress response and DNA integrity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1863, 1292–1301. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.04.018>
- Arnaud, A.P., Rome, V., Richard, M., Formal, M., David-Le Gall, S., Boudry, G., 2020. Post-natal co-development of the microbiota and gut barrier function follows different paths in the small and large intestine in piglets. *The FASEB Journal* 34, 1430–1446. <https://doi.org/10.1096/fj.201902514R>
- Aron-Wisniewsky, J., Doré, J., Clement, K., 2012. The importance of the gut microbiota after bariatric surgery. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9, 590–598. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.161>
- Aron-Wisniewsky, J., Gaborit, B., Dutour, A., Clement, K., 2013. Gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease: new insights. *Clinical Microbiology and Infection* 19, 338–348. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12140>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Doré, J., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Bork, P., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Ashy, A.A., Ardawi, M.S.M., 1988. Glucose, glutamine, and ketone-body metabolism in human enterocytes. *Metabolism* 37, 602–609. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(88\)90179-5](https://doi.org/10.1016/0026-0495(88)90179-5)
- Bánfi, B., Maturana, A., Jaconi, S., Arnaudeau, S., Laforge, T., Sinha, B., Ligeti, E., Demaurex, N., Krause, K.-H., 2000. A Mammalian H<sup>+</sup> Channel Generated Through

- Alternative Splicing of the NADPH Oxidase Homolog NOH-1. *Science* 287, 138–142. <https://doi.org/10.1126/science.287.5450.138>
- Bano, D., Prehn, J.H.M., 2018. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. *EBioMedicine* 30, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.03.016>
- Bardocz, S., Grant, G., Brown, D., Pusztai, A., 1998. Putrescine as a source of instant energy in the small intestine of the rat. *Gut* 42, 24–28.
- Barker, N., 2014. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 19–33. <https://doi.org/10.1038/nrm3721>
- Barmeyer, C., Schulzke, J.D., Fromm, M., 2015. Claudin-related intestinal diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 42, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.05.006>
- Barton, L.L., Ritz, N.L., Fauque, G.D., Lin, H.C., 2017. Sulfur Cycling and the Intestinal Microbiome. *Dig Dis Sci* 62, 2241–2257. <https://doi.org/10.1007/s10620-017-4689-5>
- Battelli, M.G., Polito, L., Bortolotti, M., Bolognesi, A., 2016. Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects. *Oxid Med Cell Longev* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3527579>
- Beaumont, M., Andriamihaja, M., Lan, A., Khodorova, N., Audebert, M., Blouin, J.-M., Grauso, M., Lancha, L., Benetti, P.-H., Benamouzig, R., Tomé, D., Bouillaud, F., Davila, A.-M., Blachier, F., 2016. Detrimental effects for colonocytes of an increased exposure to luminal hydrogen sulfide: The adaptive response. *Free Radical Biology and Medicine* 93, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.028>
- Beaumont, M., Paës, C., Mussard, E., Knudsen, C., Cauquil, L., Aymard, P., Barilly, C., Gabinaud, B., Zemb, O., Fourre, S., Gautier, R., Lencina, C., Eutamène, H., Theodorou, V., Canlet, C., Combes, S., 2020. Gut microbiota derived metabolites contribute to intestinal barrier maturation at the suckling-to-weaning transition. *Gut Microbes* 11, 1268–1286. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1747335>
- Bellafante, E., Morgano, A., Salvatore, L., Murzilli, S., Tullio, G.D., D’Orazio, A., Latorre, D., Villani, G., Moschetta, A., 2014. PGC-1 $\beta$  promotes enterocyte lifespan and tumorigenesis in the intestine. *PNAS* 111, E4523–E4531. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415279111>
- Belmonte, L., Coëffier, M., Le Pessot, F., Miralles-Barrachina, O., Hiron, M., Leplingard, A., Lemeland, J.-F., Hecketsweiler, B., Daveau, M., Ducrotté, P., Déchelotte, P., 2007. Effects of glutamine supplementation on gut barrier, glutathione content and acute phase response in malnourished rats during inflammatory shock. *World J Gastroenterol* 13, 2833–2840. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i20.2833>
- Ben Fradj, S., Nédélec, E., Salvi, J., Fouesnard, M., Huillet, M., Pallot, G., Cansell, C., Sanchez, C., Philippe, C., Gigot, V., Lemoine, A., Tromprier, D., Henry, T., Petrilli, V., Py, B.F., Guillou, H., Loiseau, N., Ellero-Simatos, S., Nahon, J.-L., Rovère, C., Grober, J., Boudry, G., Douard, V., Benani, A., 2022. Evidence for Constitutive Microbiota-Dependent Short-Term Control of Food Intake in Mice: Is There a Link with Inflammation, Oxidative Stress, Endotoxemia, and GLP-1? *Antioxid Redox Signal* 37, 349–369. <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0095>
- Benador, I.Y., Veliova, M., Mahdavian, K., Petcherski, A., Wikstrom, J.D., Assali, E., Acín-Peréz, R., Shum, M., Oliveira, M.F., Cinti, S., Sztalryd, C., Barshop, W.D., Wohlschlegel, J.A., Corkey, B.E., Liesa, M., Shirihai, O.S., 2018. Mitochondria Bound to Lipid Droplets Have Unique Bioenergetics, Composition, and Dynamics That Support Lipid Droplet Expansion. *Cell Metab* 27, 869–885.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.003>

- Bentala, H., Verweij, W.R., der Vlag, A.H.-V., van Loenen-Weemaes, A.M., Meijer, D.K.F., Poelstra, K., 2002. Removal of Phosphate from Lipid A as a Strategy to Detoxify Lipopolysaccharide. *Shock* 18, 561–566.
- Benton, C.R., Han, X.-X., Febbraio, M., Graham, T.E., Bonen, A., 2006. Inverse relationship between PGC-1 $\alpha$  protein expression and triacylglycerol accumulation in rodent skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 100, 377–383. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00781.2005>
- Berendsen, P.B., Blanchette-Mackie, J., 1983. Morphological Changes in Lipid Droplets within Cells of the Duodenal Transition Zone in Suckling Rats. *NEO* 43, 92–102. <https://doi.org/10.1159/000241643>
- Berger, E., Rath, E., Yuan, D., Waldschmitt, N., Khaloian, S., Allgäuer, M., Staszewski, O., Lobner, E.M., Schöttl, T., Giesbertz, P., Coleman, O.I., Prinz, M., Weber, A., Gerhard, M., Klingenspor, M., Janssen, K.-P., Heikenwalder, M., Haller, D., 2016. Mitochondrial function controls intestinal epithelial stemness and proliferation. *Nature Communications* 7, 1–17. <https://doi.org/10.1038/ncomms13171>
- Bernardini, C., Algeri, C., Mantia, L.D., Zannoni, A., Salaroli, R., Trombetti, F., Forni, M., Pagliarani, A., Nesci, S., 2021. Relationship between serum concentration, functional parameters and cell bioenergetics in IPEC-J2 cell line. *Histochem Cell Biol* 156, 59–67. <https://doi.org/10.1007/s00418-021-01981-2>
- Berriot-Varoqueaux, N., Dannoura, A.H., Moreau, A., Verthier, N., Sassolas, A., Cadiot, G., Lachaux, A., Munck, A., Schmitz, J., Aggerbeck, L.P., Samson-Bouma, M.E., 2001. Apolipoprotein B48 glycosylation in abetalipoproteinemia and Anderson’s disease. *Gastroenterology* 121, 1101–1108. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.29331>
- Bertrand, J., Marion-Letellier, R., Azhar, S., Chan, P., Legrand, R., Goichon, A., Ghouzali, I., Aziz, M., Vaudry, D., Savoye, G., Déchelotte, P., Coëffier, M., 2015. Glutamine enema regulates colonic ubiquitinated proteins but not proteasome activities during TNBS-induced colitis leading to increased mitochondrial activity. *Proteomics* 15, 2198–2210. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400304>
- Beyaz, S., Mana, M.D., Roper, J., Kedrin, D., Saadatpour, A., Hong, S.-J., Bauer-Rowe, K.E., Xifaras, M.E., Akkad, A., Arias, E., Pinello, L., Katz, Y., Shinagare, S., Abu-Remaileh, M., Mihaylova, M.M., Lamming, D.W., Dogum, R., Guo, G., Bell, G.W., Selig, M., Nielsen, G.P., Gupta, N., Ferrone, C.R., Deshpande, V., Yuan, G.-C., Orkin, S.H., Sabatini, D.M., Yilmaz, Ö.H., 2016. High-fat diet enhances stemness and tumorigenicity of intestinal progenitors. *Nature* 531, 53–58. <https://doi.org/10.1038/nature17173>
- Bezirtzoglou, E.E.V., 2012. Intestinal cytochromes P450 regulating the intestinal microbiota and its probiotic profile. *Microb Ecol Health Dis* 23. <https://doi.org/10.3402/mehd.v23i0.18370>
- Bharath, L.P., Ruan, T., Li, Y., Ravindran, A., Wan, X., Nhan, J.K., Walker, M.L., Deeter, L., Goodrich, R., Johnson, E., Munday, D., Mueller, R., Kunz, D., Jones, D., Reese, V., Summers, S.A., Babu, P.V.A., Holland, W.L., Zhang, Q.-J., Abel, E.D., Symons, J.D., 2015. Ceramide-Initiated Protein Phosphatase 2A Activation Contributes to Arterial Dysfunction In Vivo. *Diabetes* 64, 3914–3926. <https://doi.org/10.2337/db15-0244>
- Birkett, A., Muir, J., Phillips, J., Jones, G., O’Dea, K., 1996. Resistant starch lowers fecal concentrations of ammonia and phenols in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 63, 766–772. <https://doi.org/10.1093/ajcn/63.5.766>
- Blachier, F., Andriamihaja, M., Larraufie, P., Ahn, E., Lan, A., Kim, E., 2021. Production of hydrogen sulfide by the intestinal microbiota and epithelial cells and consequences for the colonic and rectal mucosa. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 320, G125–G135. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00261.2020>

- Blachier, F., Boutry, C., Bos, C., Tomé, D., 2009. Metabolism and functions of l-glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines. *Am J Clin Nutr* 90, 814S-821S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27462S>
- Blachier, F., Guihot-Joubrel, G., Vaugelade, P., Boucher, J.L., Bernard, F., Duée, P.-H., Cynober, L., 1999. Portal Hyperglutamatemia after Dietary Supplementation with Monosodium Glutamate in Pigs. *DIG* 60, 349–357. <https://doi.org/10.1159/000007682>
- Boudry, G., Jury, J., Yang, P.C., Perdue, M.H., 2007. Chronic psychological stress alters epithelial cell turn-over in rat ileum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 292, G1228–G1232. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00358.2006>
- Brennan, I.M., Luscombe-Marsh, N.D., Seimon, R.V., Otto, B., Horowitz, M., Wishart, J.M., Feinle-Bisset, C., 2012. Effects of fat, protein, and carbohydrate and protein load on appetite, plasma cholecystokinin, peptide YY, and ghrelin, and energy intake in lean and obese men. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303, G129-140. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00478.2011>
- Brignardello, J., Morales, P., Diaz, E., Romero, J., Brunser, O., Gotteland, M., 2010. Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 32, 1307–1314. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04475.x>
- Browning, L.M., Mugridge, O., Dixon, A.K., Aitken, S.W., Prentice, A.M., Jebb, S.A., 2011. Measuring abdominal adipose tissue: comparison of simpler methods with MRI. *Obes Facts* 4, 9–15. <https://doi.org/10.1159/000324546>
- Bucher, S., Le Guillou, D., Allard, J., Pinon, G., Begriche, K., Tête, A., Sergent, O., Lagadic-Gossman, D., Fromenty, B., 2018. Possible Involvement of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in a Cellular Model of NAFLD Progression Induced by Benzo[a]pyrene/Ethanol CoExposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2018/4396403>
- Byndloss, M.X., Olsan, E.E., Rivera-Chávez, F., Tiffany, C.R., Cevallos, S.A., Lokken, K.L., Torres, T.P., Byndloss, A.J., Faber, F., Gao, Y., Litvak, Y., Lopez, C.A., Xu, G., Napoli, E., Giuliivi, C., Tsolis, R.M., Revzin, A., Lebrilla, C.B., Bäuml, A.J., 2017. Microbiota-activated PPAR- $\gamma$  signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science* 357, 570–575. <https://doi.org/10.1126/science.aam9949>
- Cai, X., Chen, X., Wang, X., Xu, C., Guo, Q., Zhu, L., Zhu, S., Xu, J., 2013. Pre-protective effect of lipoic acid on injury induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in IPEC-J2 cells. *Mol Cell Biochem* 378, 73–81. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1595-9>
- Calder, P.C., 1997. n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cytokine Production in Health and Disease. *ANM* 41, 203–234. <https://doi.org/10.1159/000177997>
- Calder, P.C., Ahluwalia, N., Brouns, F., Buetler, T., Clement, K., Cunningham, K., Esposito, K., Jönsson, L.S., Kolb, H., Lansink, M., Marcos, A., Margioris, A., Matusheski, N., Nordmann, H., O'Brien, J., Pugliese, G., Rizkalla, S., Schalkwijk, C., Tuomilehto, J., Wärnberg, J., Watzl, B., Winklhofer-Roob, B.M., 2011. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *British Journal of Nutrition* 106, S1–S78. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005460>
- Calvani, R., Miccheli, A., Capuani, G., Tomassini Miccheli, A., Puccetti, C., Delfini, M., Iaconelli, A., Nanni, G., Mingrone, G., 2010. Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabotype. *Int J Obes* 34, 1095–1098. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.44>
- Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J.-F., Gibson, G.R., Casteilla, L., Delzenne, N.M.,

- Alessi, M.C., Burcelin, R., 2007. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* 56, 1761–1772. <https://doi.org/10.2337/db06-1491>
- Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., Burcelin, R., 2008. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* 57, 1470–1481. <https://doi.org/10.2337/db07-1403>
- Cani, P.D., Jordan, B.F., 2018. Gut microbiota-mediated inflammation in obesity: a link with gastrointestinal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15, 671–682. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0025-6>
- Cani, P.D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D.M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M., 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58, 1091–1103. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.165886>
- Capps, G.J., Samuels, D.C., Chinnery, P.F., 2003. A Model of the Nuclear Control of Mitochondrial DNA Replication. *Journal of Theoretical Biology* 221, 565–583. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2003.3207>
- Cartwright, I.J., Higgins, J.A., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104229200>
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., Pfanner, N., 2009. Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell* 138, 628–644. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.005>
- Chan, D.C., 2006. Mitochondrial Fusion and Fission in Mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 79–99. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104638>
- Chang, Y.-H., Chen, Y.-L., Huang, W.-C., Liou, C.-J., 2018. Fucoxanthin attenuates fatty acid-induced lipid accumulation in FL83B hepatocytes through regulated Sirt1/AMPK signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 495, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.022>
- Chavez-Jauregui, R.N., Mattes, R.D., Parks, E.J., 2010. Dynamics of Fat Absorption and Effect of Sham Feeding on Postprandial Lipema. *Gastroenterology* 139, 1538–1548. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.05.002>
- Chen, L., Vasoya, R.P., Toke, N.H., Parthasarathy, A., Luo, S., Chiles, E., Flores, J., Gao, N., Bonder, E.M., Su, X., Verzi, M.P., 2020. HNF4 Regulates Fatty Acid Oxidation and is Required for Renewal of Intestinal Stem Cells in Mice. *Gastroenterology* 158, 985–999.e9. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.031>
- Cheng, D., Nelson, T.C., Chen, J., Walker, S.G., Wardwell-Swanson, J., Meegalla, R., Taub, R., Billheimer, J.T., Ramaker, M., Feder, J.N., 2003. Identification of acyl coenzyme A:monoacylglycerol acyltransferase 3, an intestinal specific enzyme implicated in dietary fat absorption. *J Biol Chem* 278, 13611–13614. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300042200>
- Cheng, J., Nanayakkara, G., Shao, Y., Cueto, R., Wang, L., Yang, W.Y., Tian, Y., Wang, H., Yang, X., 2017. Mitochondrial Proton Leak Plays a Critical Role in Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. *Adv Exp Med Biol* 982, 359–370. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6_20)
- Cheng, M.Y., Hartl, F.U., Horwich, A.L., 1990. The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly. *Nature* 348, 455–458. <https://doi.org/10.1038/348455a0>
- Chimerel, C., Emery, E., Summers, D.K., Keyser, U., Gribble, F.M., Reimann, F., 2014. Bacterial Metabolite Indole Modulates Incretin Secretion from Intestinal

- Enteroendocrine L Cells. *Cell Reports* 9, 1202–1208.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.032>
- Chimerel, C., Murray, A.J., Oldewurtel, E.R., Summers, D.K., Keyser, U.F., 2013. The Effect of Bacterial Signal Indole on the Electrical Properties of Lipid Membranes. *ChemPhysChem* 14, 417–423. <https://doi.org/10.1002/cphc.201200793>
- Chinopoulos, C., Tretter, L., Adam-Vizi, V., 1999. Depolarization of In Situ Mitochondria Due to Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in Nerve Terminals. *Journal of Neurochemistry* 73, 220–228. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0730220.x>
- Chung, S., Dzeja, P.P., Faustino, R.S., Perez-Terzic, C., Behfar, A., Terzic, A., 2007. Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. *Nat Rev Cardiol* 4, S60–S67. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio0766>
- Cifarelli, V., Abumrad, N.A., 2018. Intestinal CD36 and Other Key Proteins of Lipid Utilization: Role in Absorption and Gut Homeostasis. *Compr Physiol* 8, 493–507. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170026>
- Clara, R., Schumacher, M., Ramachandran, D., Fedele, S., Krieger, J.-P., Langhans, W., Mansouri, A., 2017. Metabolic Adaptation of the Small Intestine to Short- and Medium-Term High-Fat Diet Exposure: INTESTINAL METABOLIC ADAPTATION TO HFD. *J. Cell. Physiol* 232, 167–175. <https://doi.org/10.1002/jcp.25402>
- Clarysse, S., Tack, J., Lammert, F., Duchateau, G., Reppas, C., Augustijns, P., 2009. Postprandial Evolution in Composition and Characteristics of Human Duodenal Fluids in Different Nutritional States. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98, 1177–1192. <https://doi.org/10.1002/jps.21502>
- Codoñer-Franch, P., Tavárez-Alonso, S., Murria-Estal, R., Herrera-Martín, G., Alonso-Iglesias, E., 2011. Polyamines Are Increased in Obese Children and Are Related to Markers of Oxidative/Nitrosative Stress and Angiogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96, 2821–2825. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0531>
- Cordain, L., Eaton, S.B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B.A., O’Keefe, J.H., Brand-Miller, J., 2005. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81, 341–354. <https://doi.org/10.1093/ajcn.81.2.341>
- Creely, S.J., McTernan, P.G., Kusminski, C.M., Fisher, ff M., Da Silva, N.F., Khanolkar, M., Evans, M., Harte, A.L., Kumar, S., 2007. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E740–747. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00302.2006>
- Cremin, J.D., Fitch, M.D., Fleming, S.E., 2003. Glucose alleviates ammonia-induced inhibition of short-chain fatty acid metabolism in rat colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 285, G105–G114. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00437.2002>
- Cummings, J.H., Hill, M.J., Bone, E.S., Branch, W.J., Jenkins, D.J.A., 1979. The effect of meat protein and dietary fiber on colonic function and metabolism II. Bacterial metabolites in feces and urine. *The American Journal of Clinical Nutrition* 32, 2094–2101. <https://doi.org/10.1093/ajcn/32.10.2094>
- Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P., Macfarlane, G.T., 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28, 1221–1227. <https://doi.org/10.1136/gut.28.10.1221>
- Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., Puigserver, P., 2007. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1–PGC-1 $\alpha$  transcriptional complex. *Nature* 450, 736–740. <https://doi.org/10.1038/nature06322>

- Dagda, R.K., Cherra, S.J., Kulich, S.M., Tandon, A., Park, D., Chu, C.T., 2009. Loss of PINK1 Function Promotes Mitophagy through Effects on Oxidative Stress and Mitochondrial Fission. *J Biol Chem* 284, 13843–13855. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808515200>
- Dalby, M.J., Aviello, G., Ross, A.W., Walker, A.W., Barrett, P., Morgan, P.J., 2018. Diet induced obesity is independent of metabolic endotoxemia and TLR4 signalling, but markedly increases hypothalamic expression of the acute phase protein, SerpinA3N. *Sci Rep* 8, 15648. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33928-4>
- Damms-Machado, A., Louis, S., Schnitzer, A., Volynets, V., Rings, A., Basrai, M., Bischoff, S.C., 2017. Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. *The American Journal of Clinical Nutrition* 105, 127–135. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.131110>
- D'Aquila, T., Hung, Y.-H., Carreiro, A., Buhman, K.K., 2017. Recent discoveries on absorption of dietary fat: Presence, synthesis, and metabolism of cytoplasmic lipid droplets within enterocytes 50.
- D'Aquila, T., Zembroski, A.S., Buhman, K.K., 2019a. Diet Induced Obesity Alters Intestinal Cytoplasmic Lipid Droplet Morphology and Proteome in the Postprandial Response to Dietary Fat. *Front. Physiol.* 10, 180. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00180>
- Dávalos-Salas, M., Montgomery, M.K., Reehorst, C.M., Nightingale, R., Ng, I., Anderton, H., Al-Obaidi, S., Lesmana, A., Scott, C.M., Ioannidis, P., Kalra, H., Keerthikumar, S., Tögel, L., Rigopoulos, A., Gong, S.J., Williams, D.S., Yoganantharaja, P., Bell-Anderson, K., Mathivanan, S., Gibert, Y., Hiebert, S., Scott, A.M., Watt, M.J., Mariadason, J.M., 2019. Deletion of intestinal Hdac3 remodels the lipidome of enterocytes and protects mice from diet-induced obesity. *Nat Commun* 10, 5291. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13180-8>
- De Jong, B.J.P., Kalkman, C., Hülsmann, W.C., 1978. Monoacylglycerol metabolism in rat small intestinal epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 530, 67–77. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(78\)90127-3](https://doi.org/10.1016/0005-2760(78)90127-3)
- de Oliveira Otto, M.C., Mozaffarian, D., Kromhout, D., Bertoni, A.G., Sibley, C.T., Jacobs, D.R., Nettleton, J.A., 2012. Dietary intake of saturated fat by food source and incident cardiovascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis1234. *Am J Clin Nutr* 96, 397–404. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.037770>
- de Souza, R.J., Mente, A., Maroleanu, A., Cozma, A.I., Ha, V., Kishibe, T., Uleryk, E., Budylowski, P., Schünemann, H., Beyene, J., Anand, S.S., 2015. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 351, h3978. <https://doi.org/10.1136/bmj.h3978>
- Dehghan, M., Mente, A., Zhang, X., Swaminathan, S., Li, W., Mohan, V., Iqbal, R., Kumar, R., Wentzel-Viljoen, E., Rosengren, A., Amma, L.I., Avezum, A., Chifamba, J., Diaz, R., Khatib, R., Lear, S., Lopez-Jaramillo, P., Liu, X., Gupta, R., Mohammadifard, N., Gao, N., Oguz, A., Ramli, A.S., Seron, P., Sun, Y., Szuba, A., Tsolekile, L., Wielgosz, A., Yusuf, R., Hussein Yusufali, A., Teo, K.K., Rangarajan, S., Dagenais, G., Bangdiwala, S.I., Islam, S., Anand, S.S., Yusuf, S., Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) study investigators, 2017. Associations of fats and carbohydrate intake with cardiovascular disease and mortality in 18 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *Lancet* 390, 2050–2062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32252-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32252-3)
- Demignot, S., Beilstein, F., Morel, E., 2014. Triglyceride-rich lipoproteins and cytosolic lipid droplets in enterocytes: Key players in intestinal physiology and metabolic disorders.

- Biochimie, Lipids in Metabolic Diseases 96, 48–55.  
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.07.009>
- D’Errico, I., Salvatore, L., Murzilli, S., Lo Sasso, G., Latorre, D., Martelli, N., Egorova, A.V., Polishuck, R., Madeyski-Bengtson, K., Lelliott, C., Vidal-Puig, A.J., Seibel, P., Villani, G., Moschetta, A., 2011a. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha (PGC1alpha) is a metabolic regulator of intestinal epithelial cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 6603–6608.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1016354108>
- D’Errico, I., Sasso, G.L., Salvatore, L., Murzilli, S., Martelli, N., Cristofaro, M., Latorre, D., Villani, G., Moschetta, A., 2011b. Bax is necessary for PGC1 $\alpha$  pro-apoptotic effect in colorectal cancer cells. *Cell Cycle* 10, 2937–2945.  
<https://doi.org/10.4161/cc.10.17.16791>
- De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchamp, A., Bäckhed, F., Mithieux, G., 2014. Microbiota-Generated Metabolites Promote Metabolic Benefits via Gut-Brain Neural Circuits. *Cell* 156, 84–96.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.016>
- Devkota, S., Wang, Y., Musch, M., Leone, V., Fehlner-Peach, H., Nadimpalli, A., Antonopoulos, D.A., Jabri, B., Chang, E.B., 2012. Dietary fat-induced taurocholic acid production promotes pathobiont and colitis in IL-10<sup>-/-</sup> mice. *Nature* 487, 104–108. <https://doi.org/10.1038/nature11225>
- Dhawan, P., Ahmad, R., Chaturvedi, R., Smith, J.J., Midha, R., Mittal, M.K., Krishnan, M., Chen, X., Eschrich, S., Yeatman, T.J., Harris, R.C., Washington, M.K., Wilson, K.T., Beauchamp, R.D., Singh, A.B., 2011. Claudin-2 expression increases tumorigenicity of colon cancer cells: role of epidermal growth factor receptor activation. *Oncogene* 30, 3234–3247. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.43>
- Ding, S., Chi, M.M., Scull, B.P., Rigby, R., Schwerbrock, N.M.J., Magness, S., Jobin, C., Lund, P.K., 2010. High-Fat Diet: Bacteria Interactions Promote Intestinal Inflammation Which Precedes and Correlates with Obesity and Insulin Resistance in Mouse. *PLOS ONE* 5, e12191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012191>
- Doherty, G.J., McMahon, H.T., 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78, 857–902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>
- Donohoe, D.R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O’Connell, T.M., Bunger, M.K., Bultman, S.J., 2011. The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell Metab* 13, 517–526.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.018>
- Douglas, G.M., Maffei, V.J., Zaneveld, J.R., Yurgel, S.N., Brown, J.R., Taylor, C.M., Huttenhower, C., Langille, M.G.I., 2020. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat Biotechnol* 38, 685–688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Drouin, G., Catheline, D., Guillocheau, E., Gueret, P., Baudry, C., Le Ruyet, P., Rioux, V., Legrand, P., 2019. Comparative effects of dietary n-3 docosapentaenoic acid (DPA), DHA and EPA on plasma lipid parameters, oxidative status and fatty acid tissue composition. *J Nutr Biochem* 63, 186–196.  
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.09.029>
- Drover, V.A., Ajmal, M., Nassir, F., Davidson, N.O., Nauli, A.M., Sahoo, D., Tso, P., Abumrad, N.A., 2005. CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J Clin Invest* 115, 1290–1297.  
<https://doi.org/10.1172/JCI200521514>
- Dubuquoy, L., Rousseaux, C., Thuru, X., Peyrin-Biroulet, L., Romano, O., Chavatte, P., Chamaillard, M., Desreumaux, P., 2006. PPAR $\gamma$  as a new therapeutic target in



- inflammatory bowel diseases. *Gut* 55, 1341–1349.  
<https://doi.org/10.1136/gut.2006.093484>
- Dufour, G., Demers, M.-J., Gagné, D., Dydensborg, A.B., Teller, I.C., Bouchard, V., Degongre, I., Beaulieu, J.-F., Cheng, J.Q., Fujita, N., Tsuruo, T., Vallée, K., Vachon, P.H., 2004. Human Intestinal Epithelial Cell Survival and Anoikis DIFFERENTIATION STATE-DISTINCT REGULATION AND ROLES OF PROTEIN KINASE B/Akt ISOFORMS. *J. Biol. Chem.* 279, 44113–44122.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M405323200>
- Duncan, M., Thomas, A.D., Cluny, N.L., Patel, A., Patel, K.D., Lutz, B., Piomelli, D., Alexander, S.P.H., Sharkey, K.A., 2008. Distribution and function of monoacylglycerol lipase in the gastrointestinal tract. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 295, G1255–G1265.  
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.90500.2008>
- Duncan, S.H., Belenguer, A., Holtrop, G., Johnstone, A.M., Flint, H.J., Lobley, G.E., 2007. Reduced Dietary Intake of Carbohydrates by Obese Subjects Results in Decreased Concentrations of Butyrate and Butyrate-Producing Bacteria in Feces. *Appl Environ Microbiol* 73, 1073–1078. <https://doi.org/10.1128/AEM.02340-06>
- Eisenberg, T., Abdellatif, M., Schroeder, S., Primessnig, U., Stekovic, S., Pendl, T., Harger, A., Schipke, J., Zimmermann, A., Schmidt, A., Tong, M., Ruckenstuhl, C., Dammbroeck, C., Gross, A.S., Herbst, V., Magnes, C., Trausinger, G., Narath, S., Meinitzer, A., Hu, Z., Kirsch, A., Eller, K., Gutierrez, D.-C., Büttner, S., Pietrocola, F., Knittelfelder, O., Schrepfer, E., Rockenfeller, P., Simonini, C., Rahn, A., Horsch, M., Moreth, K., Beckers, J., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Neff, F., Janik, D., Rathkolb, B., Rozman, J., de Angelis, M.H., Moustafa, T., Haemmerle, G., Mayr, M., Willeit, P., von Frieling-Salewsky, M., Pieske, B., Scorrano, L., Pieber, T., Pechlaner, R., Willeit, J., Sigrist, S.J., Linke, W.A., Mühlfeld, C., Sadoshima, J., Dengjel, J., Kiechl, S., Kroemer, G., Sedej, S., Madeo, F., 2016. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nat Med* 22, 1428–1438.  
<https://doi.org/10.1038/nm.4222>
- El-Hattab, A.W., Suleiman, J., Almannai, M., Scaglia, F., 2018. Mitochondrial dynamics: Biological roles, molecular machinery, and related diseases. *Molecular Genetics and Metabolism* 125, 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.10.003>
- Elustondo, P.A., Negoda, A., Kane, C.L., Kane, D.A., Pavlov, E.V., 2015. Spermine selectively inhibits high-conductance, but not low-conductance calcium-induced permeability transition pore. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1847, 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2014.10.007>
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Everard, A., Lazarevic, V., Gaïa, N., Johansson, M., Ståhlman, M., Backhed, F., Delzenne, N.M., Schrenzel, J., François, P., Cani, P.D., 2014. Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *ISME J* 8, 2116–2130. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.45>
- Ezzati, M., Hoorn, S.V., Lawes, C.M.M., Leach, R., James, W.P.T., Lopez, A.D., Rodgers, A., Murray, C.J.L., 2005. Rethinking the “Diseases of Affluence” Paradigm: Global Patterns of Nutritional Risks in Relation to Economic Development. *PLOS Medicine* 2, e133. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020133>
- Falkenberg, M., 2018. Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway. *Essays Biochem* 62, 287–296. <https://doi.org/10.1042/EBC20170100>

- Fan, Y.-Y., Davidson, L.A., Callaway, E.S., Wright, G.A., Safe, S., Chapkin, R.S., 2015. A bioassay to measure energy metabolism in mouse colonic crypts, organoids, and sorted stem cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 309, G1–G9. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00052.2015>
- Fato, R., Bergamini, C., Leoni, S., Lenaz, G., 2008. Mitochondrial production of reactive oxygen species: Role of Complex I and quinone analogues. *BioFactors* 32, 31–39. <https://doi.org/10.1002/biof.5520320105>
- Ferraris, R.P., Yasharpour, S., Lloyd, K.C., Mirzayan, R., Diamond, J.M., 1990. Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions. *Am J Physiol* 259, G822–837. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1990.259.5.G822>
- Finck, B.N., Kelly, D.P., 2006. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 116, 615–622. <https://doi.org/10.1172/JCI27794>
- Fingar, D.C., Blenis, J., 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23, 3151–3171. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207542>
- Finlayson, G., 2017. Food addiction and obesity: unnecessary medicalization of hedonic overeating. *Nat Rev Endocrinol* 13, 493–498. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.61>
- Folmes, C.D.L., Nelson, T.J., Martinez-Fernandez, A., Arrell, D.K., Lindor, J.Z., Dzeja, P.P., Ikeda, Y., Perez-Terzic, C., Terzic, A., 2011. Somatic Oxidative Bioenergetics Transitions into Pluripotency-Dependent Glycolysis to Facilitate Nuclear Reprogramming. *Cell Metabolism* 14, 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.011>
- Frank, D.N., Bales, E.S., Monks, J., Jackman, M.J., MacLean, P.S., Ir, D., Robertson, C.E., Orlicky, D.J., McManaman, J.L., 2015. Perilipin-2 Modulates Lipid Absorption and Microbiome Responses in the Mouse Intestine. *PLOS ONE* 10, e0131944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131944>
- Fransson, Å., Ruusala, A., Aspenström, P., 2003. Atypical Rho GTPases Have Roles in Mitochondrial Homeostasis and Apoptosis\*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 6495–6502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208609200>
- Frezza, C., Cipolat, S., Scorrano, L., 2007. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc* 2, 287–295. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.478>
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., Voeltz, G.K., 2011. ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science* 334, 358–362. <https://doi.org/10.1126/science.1207385>
- Friis-Hansen, L., Sundler, F., Li, Y., Gillespie, P.J., Saunders, T.L., Greenson, J.K., Owyang, C., Rehfeld, J.F., Samuelson, L.C., 1998. Impaired gastric acid secretion in gastrin-deficient mice. *Am J Physiol* 274, G561–568. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.274.3.G561>
- Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y., 2008. Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem Cell Biol* 130, 263–279. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0449-0>
- Fujiyama, Y., Hokari, R., Miura, S., Watanabe, C., Komoto, S., Oyama, T., Kurihara, C., Nagata, H., Hibi, T., 2007. Butter feeding enhances TNF- $\alpha$  production from macrophages and lymphocyte adherence in murine small intestinal microvessels. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22, 1838–1845. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04905.x>
- Furuta, G.T., Turner, J.R., Taylor, C.T., Hershberg, R.M., Comerford, K., Narravula, S., Podolsky, D.K., Colgan, S.P., 2001. Hypoxia-Inducible Factor 1–Dependent Induction

- of Intestinal Trefoil Factor Protects Barrier Function during Hypoxia. *J Exp Med* 193, 1027–1034. <https://doi.org/10.1084/jem.193.9.1027>
- Gangwar, R., Meena, A.S., Shukla, P.K., Nagaraja, A.S., Dorniak, P.L., Pallikuth, S., Waters, C.M., Sood, A., Rao, R., 2017. Calcium-mediated oxidative stress: a common mechanism in tight junction disruption by different types of cellular stress. *Biochemical Journal* 474, 731–749. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160679>
- García-Ruiz, I., Solís-Muñoz, P., Fernández-Moreira, D., Grau, M., Colina, F., Muñoz-Yagüe, T., Solís-Herruzo, J.A., 2014. High-fat diet decreases activity of the oxidative phosphorylation complexes and causes nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Disease Models & Mechanisms* 7, 1287–1296. <https://doi.org/10.1242/dmm.016766>
- Garidou, L., Pomié, C., Klopp, P., Waget, A., Charpentier, J., Aloulou, M., Giry, A., Serino, M., Stenman, L., Lahtinen, S., Dray, C., Iacovoni, J.S., Courtney, M., Collet, X., Amar, J., Servant, F., Lelouvier, B., Valet, P., Eberl, G., Fazilleau, N., Douin-Echinard, V., Heymes, C., Burcelin, R., 2015. The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing ROR $\gamma$ t and Controls Metabolic Disease. *Cell Metab* 22, 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.001>
- Genser, L., Aguanno, D., Soula, H.A., Dong, L., Trystram, L., Assmann, K., Salem, J.-E., Vaillant, J.-C., Oppert, J.-M., Laugerette, F., Michalski, M.-C., Wind, P., Rousset, M., Brot-Laroche, E., Leturque, A., Clément, K., Thenet, S., Poitou, C., 2018. Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes. *The Journal of Pathology* 246, 217–230. <https://doi.org/10.1002/path.5134>
- Ghanim, H., Abuaysheh, S., Sia, C.L., Korzeniewski, K., Chaudhuri, A., Fernandez-Real, J.M., Dandona, P., 2009. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance. *Diabetes Care* 32, 2281–2287. <https://doi.org/10.2337/dc09-0979>
- Ghezzal, S., Postal, B.G., Quevrain, E., Brot, L., Seksik, P., Leturque, A., Thenet, S., Carrière, V., 2020. Palmitic acid damages gut epithelium integrity and initiates inflammatory cytokine production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1865, 158530. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.158530>
- Ghosh, S.S., Wang, J., Yannie, P.J., Ghosh, S., 2020. Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development. *Journal of the Endocrine Society* 4, bvz039. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvz039>
- Gibson, G.R., Macfarlane, G.T., Cummings, J.H., 1988. Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut. *J Appl Bacteriol* 65, 103–111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb01498.x>
- Gil-Cardoso, K., Ginés, I., Pinent, M., Ardévol, A., Terra, X., Blay, M., 2017a. A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats. *Br J Nutr* 117, 218–229. <https://doi.org/10.1017/S0007114516004608>
- Gill, C.I.R., McDougall, G.J., Glidewell, S., Stewart, D., Shen, Q., Tuohy, K., Dobbin, A., Boyd, A., Brown, E., Haldar, S., Rowland, I.R., 2010. Profiling of Phenols in Human Fecal Water after Raspberry Supplementation. *J. Agric. Food Chem.* 58, 10389–10395. <https://doi.org/10.1021/jf1017143>
- Gordon, J.I., Elshourbagy, N., Lowe, J.B., Liao, W.S., Alpers, D.H., Taylor, J.M., 1985. Tissue specific expression and developmental regulation of two genes coding for rat fatty acid binding proteins. *Journal of Biological Chemistry* 260, 1995–1998. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)89501-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)89501-1)

- Gori, M., Altomare, A., Cocca, S., Solida, E., Ribolsi, M., Carotti, S., Rainer, A., Francesconi, M., Morini, S., Cicala, M., Guarino, M.P.L., 2020. Palmitic Acid Affects Intestinal Epithelial Barrier Integrity and Permeability In Vitro. *Antioxidants (Basel)* 9, E417. <https://doi.org/10.3390/antiox9050417>
- Gostner, A., Blaut, M., Schäffer, V., Kozianowski, G., Theis, S., Klingeberg, M., Dombrowski, Y., Martin, D., Ehrhardt, S., Taras, D., Schwiertz, A., Kleessen, B., Lühns, H., Schaubert, J., Dorbath, D., Menzel, T., Scheppach, W., 2006. Effect of isomalt consumption on faecal microflora and colonic metabolism in healthy volunteers. *Br J Nutr* 95, 40–50. <https://doi.org/10.1079/bjn20051589>
- Gray, M.W., Burger, G., Lang, B.F., 2001. The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol* 2, reviews1018.1-reviews1018.5.
- Guasch-Ferré, M., Babio, N., Martínez-González, M.A., Corella, D., Ros, E., Martín-Peláez, S., Estruch, R., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Fiol, M., Santos-Lozano, J.M., Serra-Majem, L., Bulló, M., Toledo, E., Barragán, R., Fitó, M., Gea, A., Salas-Salvadó, J., PREDIMED Study Investigators, 2015. Dietary fat intake and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality in a population at high risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 102, 1563–1573. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.116046>
- Guerbette, T., Boudry, G., Lan, A., 2022. Mitochondrial function in intestinal epithelium homeostasis and modulation in diet-induced obesity. *Molecular Metabolism* 101546. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101546>
- Gulhane, M., Murray, L., Lourie, R., Tong, H., Sheng, Y.H., Wang, R., Kang, A., Schreiber, V., Wong, K.Y., Magor, G., Denman, S., Begun, J., Florin, T.H., Perkins, A., Cuív, P.Ó., McGuckin, M.A., Hasnain, S.Z., 2016. High Fat Diets Induce Colonic Epithelial Cell Stress and Inflammation that is Reversed by IL-22. *Sci Rep* 6, 28990. <https://doi.org/10.1038/srep28990>
- Guo, F.-F., Yu, T.-C., Hong, J., Fang, J.-Y., 2016. Emerging Roles of Hydrogen Sulfide in Inflammatory and Neoplastic Colonic Diseases. *Frontiers in Physiology* 7.
- Gureev, A.P., Shaforostova, E.A., Starkov, A.A., Popov, V.N., 2017. Simplified qPCR method for detecting excessive mtDNA damage induced by exogenous factors. *Toxicology* 382, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.03.010>
- Hallows, W.C., Lee, S., Denu, J.M., 2006. Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 10230–10235. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604392103>
- Hamacher-Brady, A., Brady, N.R., 2016. Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 775–795. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2087-8>
- Hamer, H.M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F.J., Brummer, R.-J., 2008. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 27, 104–119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x>
- Hamilton, M.K., Boudry, G., Lemay, D.G., Raybould, H.E., 2015. Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 308, G840–G851. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00029.2015>
- Hamosh, M., Scow, R.O., 1973. Lingual Lipase and Its Role in the Digestion of Dietary Lipid. *J Clin Invest* 52, 88–95. <https://doi.org/10.1172/JCI107177>
- Haynes, C.M., Fiorese, C.J., Lin, Y.-F., 2013. Evaluating and responding to mitochondrial dysfunction: The UPRmt and beyond. *Trends Cell Biol* 23, 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.02.002>

- He, C., Hart, P.C., Germain, D., Bonini, M.G., 2016. SOD2 and the mitochondrial UPR: partners regulating cellular phenotypic transitions. *Trends Biochem Sci* 41, 568–577. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.04.004>
- Heinonen, S., Buzkova, J., Muniandy, M., Kaksonen, R., Ollikainen, M., Ismail, K., Hakkarainen, A., Lundbom, J., Lundbom, N., Vuolteenaho, K., Moilanen, E., Kaprio, J., Rissanen, A., Suomalainen, A., Pietiläinen, K.H., 2015. Impaired Mitochondrial Biogenesis in Adipose Tissue in Acquired Obesity. *Diabetes* 64, 3135–3145. <https://doi.org/10.2337/db14-1937>
- Helander, H.F., Fändriks, L., 2014. Surface area of the digestive tract – revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49, 681–689. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.898326>
- Hengstermann, S., Valentini, L., Schaper, L., Buning, C., Koernicke, T., Maritschnegg, M., Buhner, S., Tillinger, W., Regano, N., Guglielmi, F., Winklhofer-Roob, B.M., Lochs, H., 2008. Altered status of antioxidant vitamins and fatty acids in patients with inactive inflammatory bowel disease. *Clinical Nutrition* 27, 571–578. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2008.01.007>
- Hill, B.C., Woon, T.C., Nicholls, P., Peterson, J., Greenwood, C., Thomson, A.J., 1984. Interactions of sulphide and other ligands with cytochrome c oxidase. An electron-paramagnetic-resonance study. *Biochem J* 224, 591–600.
- Hirschenson, J., Melgar-Bermudez, E., Mailloux, R.J., 2022. The Uncoupling Proteins: A Systematic Review on the Mechanism Used in the Prevention of Oxidative Stress. *Antioxidants* 11, 322. <https://doi.org/10.3390/antiox11020322>
- Hirst, B.H., 1993. Dietary regulation of intestinal nutrient carriers. *Proc. Nutr. Soc.* 52, 315–324. <https://doi.org/10.1079/PNS19930067>
- Holmes, J.L., Van Itallie, C.M., Rasmussen, J.E., Anderson, J.M., 2006. Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expression Patterns* 6, 581–588. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2005.12.001>
- Houde, M., Laprise, P., Jean, D., Blais, M., Asselin, C., Rivard, N., 2001. Intestinal Epithelial Cell Differentiation Involves Activation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase That Regulates the Homeobox Transcription Factor CDX2 \*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 21885–21894. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100236200>
- Houttu, N., Mokkala, K., Laitinen, K., 2018. Overweight and obesity status in pregnant women are related to intestinal microbiota and serum metabolic and inflammatory profiles. *Clinical Nutrition* 37, 1955–1966. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.12.013>
- Hung, Y.-H., Carreiro, A.L., Buhman, K.K., 2017. Dgat1 and Dgat2 regulate enterocyte triacylglycerol distribution and alter proteins associated with cytoplasmic lipid droplets in response to dietary fat. *Biochim Biophys Acta* 1862, 600–614. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2017.02.014>
- Hussain, M.M., Bakillah, A., Nayak, N., Shelness, G.S., 1998. Amino Acids 430–570 in Apolipoprotein B Are Critical for Its Binding to Microsomal Triglyceride Transfer Protein\*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 25612–25615. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.25612>
- Ipsen, D.H., Lykkesfeldt, J., Tveden-Nyborg, P., 2018. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 3313–3327. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6>
- Itabe, H., Yamaguchi, T., Nimura, S., Sasabe, N., 2017. Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins. *Lipids in Health and Disease* 16, 83. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0473-y>

- Jackson, D.N., Theiss, A.L., 2019. Gut bacteria signaling to mitochondria in intestinal inflammation and cancer. *Gut Microbes* 1–20. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1592421>
- Jamdar, S.C., Cao, W.F., Samaniego, E., 1996. Relationship between adipose polyamine concentrations and triacylglycerol synthetic enzymes in lean and obese Zucker rats. *Enzyme Protein* 49, 222–230. <https://doi.org/10.1159/000468632>
- JanssenDuijghuijsen, L.M., Grefte, S., de Boer, V.C.J., Zeper, L., van Dartel, D.A.M., van der Stelt, I., Bekkenkamp-Grovenstein, M., van Norren, K., Wichers, H.J., Keijer, J., 2017. Mitochondrial ATP Depletion Disrupts Caco-2 Monolayer Integrity and Internalizes Claudin 7. *Front. Physiol.* 8, 794. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00794>
- Jenny, M., Uhl, C., Roche, C., Duluc, I., Guillermin, V., Guillemot, F., Jensen, J., Kedinger, M., Gradwohl, G., 2002. Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *The EMBO Journal* 21, 6338–6347. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf649>
- Jeon, S.-M., Kim, H.-J., Woo, M.-N., Lee, M.-K., Shin, Y.C., Park, Y.B., Choi, M.-S., 2010. Fucoxanthin-rich seaweed extract suppresses body weight gain and improves lipid metabolism in high-fat-fed C57BL/6J mice. *Biotechnology Journal* 5, 961–969. <https://doi.org/10.1002/biot.201000215>
- Jeynes, B.J., Altmann, G.G., 1975. A region of mitochondrial division in the epithelium of the small intestine of the rat. *The Anatomical Record* 182, 289–296. <https://doi.org/10.1002/ar.1091820303>
- Ježek, J., Cooper, K.F., Strich, R., 2018. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxidants (Basel)* 7, 13. <https://doi.org/10.3390/antiox7010013>
- Johansson, M.E.V., Larsson, J.M.H., Hansson, G.C., 2011. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host–microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4659–4665. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006451107>
- Johnson, A.M.F., Costanzo, A., Gareau, M.G., Armando, A.M., Quehenberger, O., Jameson, J.M., Olefsky, J.M., 2015. High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability. *PLoS One* 10, e0122195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122195>
- Jornayvaz, F.R., Shulman, G.I., 2010. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem* 47. <https://doi.org/10.1042/bse0470069>
- Joseph, B.K., Liu, H.-Y., Francisco, J., Pandya, D., Donigan, M., Gallo-Ebert, C., Giordano, C., Bata, A., Nickels, J.T., 2015. Inhibition of AMP Kinase by the Protein Phosphatase 2A Heterotrimer, PP2A<sup>PPP2R2</sup>. *J Biol Chem* 290, 10588–10598. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.626259>
- Kaiko, G.E., Ryu, S.H., Koues, O.I., Collins, P.L., Solnica-Krezel, L., Pearce, E.J., Pearce, E.L., Oltz, E.M., Stappenbeck, T.S., 2016. The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites. *Cell* 165, 1708–1720. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.018>
- Kawano, Y., Nakae, J., Watanabe, N., Kikuchi, T., Tateya, S., Tamori, Y., Kaneko, M., Abe, T., Onodera, M., Itoh, H., 2016. Colonic Pro-inflammatory Macrophages Cause Insulin Resistance in an Intestinal Ccl2/Ccr2-Dependent Manner. *Cell Metab* 24, 295–310. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.07.009>
- Kellett, G.L., 2001. The facilitated component of intestinal glucose absorption. *J Physiol* 531, 585–595. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0585h.x>

- Kelly, C.J., Colgan, S.P., Frank, D.N., 2012. Of Microbes and Meals. *Nutrition in Clinical Practice* 27, 215–225. <https://doi.org/10.1177/0884533611434934>
- Kelly, C.J., Glover, L.E., Campbell, E.L., Kominsky, D.J., Ehrentraut, S.F., Bowers, B.E., Bayless, A.J., Saedi, B.J., Colgan, S.P., 2013. Fundamental role for HIF-1 $\alpha$  in constitutive expression of human  $\beta$  defensin-1. *Mucosal Immunology* 6, 1110–1118. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.6>
- Khaldoun, S.A., Emond-Boisjoly, M.-A., Chateau, D., Carrière, V., Lacasa, M., Rousset, M., Demignot, S., Morel, E., 2014. Autophagosomes contribute to intracellular lipid distribution in enterocytes. *Mol Biol Cell* 25, 118–132. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-06-0324>
- Khan, A.A., Schuler, M.M., Prior, M.G., Yong, S., Coppock, R.W., Florence, L.Z., Lillie, L.E., 1990. Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 103, 482–490. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(90\)90321-k](https://doi.org/10.1016/0041-008x(90)90321-k)
- Kim, K.N., Yao, Y., Ju, S.Y., 2019. Short Chain Fatty Acids and Fecal Microbiota Abundance in Humans with Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 11, 2512. <https://doi.org/10.3390/nu11102512>
- Kless, C., Müller, V.M., Schüppel, V.L., Lichtenegger, M., Rychlik, M., Daniel, H., Klingenspor, M., Haller, D., 2015. Diet-induced obesity causes metabolic impairment independent of alterations in gut barrier integrity. *Mol Nutr Food Res* 59, 968–978. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400840>
- Knoop, K.A., McDonald, K.G., McCrate, S., McDole, J.R., Newberry, R.D., 2015. Microbial sensing by goblet cells controls immune surveillance of luminal antigens in the colon. *Mucosal Immunol* 8, 198–210. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.58>
- Koliaki, C., Szendroedi, J., Kaul, K., Jelenik, T., Nowotny, P., Jankowiak, F., Herder, C., Carstensen, M., Krausch, M., Knoefel, W.T., Schlensak, M., Roden, M., 2015. Adaptation of Hepatic Mitochondrial Function in Humans with Non-Alcoholic Fatty Liver Is Lost in Steatohepatitis. *Cell Metabolism* 21, 739–746. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.04.004>
- Kolodziejczyk, A.A., Zheng, D., Elinav, E., 2019. Diet–microbiota interactions and personalized nutrition. *Nat Rev Microbiol* 17, 742–753. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0256-8>
- Kondapalli, C., Kazlauskaitė, A., Zhang, N., Woodroof, H.I., Campbell, D.G., Gourlay, R., Burchell, L., Walden, H., Macartney, T.J., Deak, M., Knebel, A., Alessi, D.R., Muqit, M.M.K., 2012. PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biol* 2. <https://doi.org/10.1098/rsob.120080>
- Kondo, H., Minegishi, Y., Komine, Y., Mori, T., Matsumoto, I., Abe, K., Tokimitsu, I., Hase, T., Murase, T., 2006. Differential regulation of intestinal lipid metabolism-related genes in obesity-resistant A/J vs. obesity-prone C57BL/6J mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E1092–1099. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00583.2005>
- Krähenbühl, S., Talos, C., Fischer, S., Reichen, J., 1994. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology* 19, 471–479. <https://doi.org/10.1002/hep.1840190228>
- Krause, G., Winkler, L., Piehl, C., Blasig, I., Piontek, J., Müller, S.L., 2009. Structure and Function of Extracellular Claudin Domains. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165, 34–43. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04057.x>
- Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., Appel, L.J., American Heart Association. Nutrition Committee, 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular

- disease. *Circulation* 106, 2747–2757.  
<https://doi.org/10.1161/01.cir.0000038493.65177.94>
- Kumar, A., Sperandio, V., 2019. Indole Signaling at the Host-Microbiota-Pathogen Interface. *mBio* 10, e01031-19, [/mbio/10/3/mBio.01031-19.atom](https://doi.org/10.1128/mBio.01031-19).  
<https://doi.org/10.1128/mBio.01031-19>
- Lagakos, W.S., Gajda, A.M., Agellon, L., Binas, B., Choi, V., Mandap, B., Russnak, T., Zhou, Y.X., Storch, J., 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–G814. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00229.2010>
- Lagakos, W.S., Guan, X., Ho, S.-Y., Sawicki, L.R., Corsico, B., Kodukula, S., Murota, K., Stark, R.E., Storch, J., 2013. Liver Fatty Acid-binding Protein Binds Monoacylglycerol in Vitro and in Mouse Liver Cytosol. *J Biol Chem* 288, 19805–19815. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.473579>
- Laue, H., Denger, K., Cook, A.M., 1997a. Taurine reduction in anaerobic respiration of *Bilophila wadsworthia* RZATAU. *Appl Environ Microbiol* 63, 2016–2021.
- Laue, H., Friedrich, M., Ruff, J., Cook, A.M., 2001. Dissimilatory sulfite reductase (desulfoviridin) of the taurine-degrading, non-sulfate-reducing bacterium *Bilophila wadsworthia* RZATAU contains a fused DsrB-DsrD subunit. *J Bacteriol* 183, 1727–1733. <https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1727-1733.2001>
- Laugerette, F., Vors, C., Géoën, A., Chauvin, M.-A., Soulage, C., Lambert-Porcheron, S., Peretti, N., Alligier, M., Burcelin, R.G., Laville, M., Vidal, H., Michalski, M.-C., 2011. Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation. *Journal of Nutritional Biochemistry* 22, 53–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.11.011>
- Lebrun, L.J., Moreira Milheiro, S., Tavernier, A., Niot, I., 2022. Postprandial consequences of lipid absorption in the onset of obesity: Role of intestinal CD36. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1867, 159154.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2022.159154>
- LeDoux, S.P., Druzhyna, N.M., Hollensworth, S.B., Harrison, J.F., Wilson, G.L., 2007. Mitochondrial DNA repair: A critical player in the response of cells of the CNS to genotoxic insults. *Neuroscience, Genome Dynamics and DNA Repair in the CNS* 145, 1249–1259. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.10.002>
- Lee, C.M.Y., Huxley, R.R., Wildman, R.P., Woodward, M., 2008. Indices of abdominal obesity are better discriminators of cardiovascular risk factors than BMI: a meta-analysis. *J Clin Epidemiol* 61, 646–653. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2007.08.012>
- Lee, J.-Y., Cevallos, S.A., Byndloss, M.X., Tiffany, C.R., Olsan, E.E., Butler, B.P., Young, B.M., 2020a. High-Fat Diet and Antibiotics Cooperatively Impair Mitochondrial Bioenergetics to Trigger Dysbiosis That Exacerbates Pre-Inflammatory Bowel Disease ». *Cell Host & Microbe* 28, 273-284 6.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.001>
- Lee, W.J., Kim, M., Park, H.-S., Kim, H.S., Jeon, M.J., Oh, K.S., Koh, E.H., Won, J.C., Kim, M.-S., Oh, G.T., Yoon, M., Lee, K.-U., Park, J.-Y., 2006. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPAR $\alpha$  and PGC-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340, 291–295.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.011>
- Lefebvre, M., Paulweber, B., Fajas, L., Woods, J., McCrary, C., Colombel, J.F., Najib, J., Fruchart, J.C., Datz, C., Vidal, H., Desreumaux, P., Auwerx, J., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *Journal of Endocrinology* 162, 331–340.  
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1620331>



- Lefort, G., Liaubet, L., Canlet, C., Tardivel, P., Pèrè, M.-C., Quesnel, H., Paris, A., Iannuccelli, N., Vialaneix, N., Servien, R., 2019. ASICS: an R package for a whole analysis workflow of 1D 1H NMR spectra. *Bioinformatics* 35, 4356–4363. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz248>
- Leschelle, X., Gubern, M., Andriamihaja, M., Blottière, H.M., Couplan, E., Gonzalez-Barroso, M.-M., Petit, C., Pagniez, A., Chaumontet, C., Mignotte, B., Bouillaud, F., Blachier, F., 2005. Adaptive metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1725, 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.06.002>
- Lessard, M., Boudry, G., Sève, B., Oswald, I.P., Lallès, J.-P., 2009. Intestinal physiology and peptidase activity in male pigs are modulated by consumption of corn culture extracts containing fumonisins. *J Nutr* 139, 1303–1307. <https://doi.org/10.3945/jn.109.105023>
- Lewis, K., Caldwell, J., Phan, V., Prescott, D., Nazli, A., Wang, A., Soderholm, J.D., Perdue, M.H., Sherman, P.M., McKay, D.M., 2008. Decreased epithelial barrier function evoked by exposure to metabolic stress and nonpathogenic *E. coli* is enhanced by TNF- $\alpha$ . *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 294, G669–G678. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00382.2007>
- Lewis, K., Lutgendorff, F., Phan, V., Söderholm, J.D., Sherman, P.M., McKay, D.M., 2009. Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate†. *Inflammatory Bowel Diseases* 16, 1138–1148. <https://doi.org/10.1002/ibd.21177>
- Li, Xue, Li, Xin, 2020. Obesity Promotes Experimental Colitis by Increasing Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in the Colon. *Inflammation*. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01261-6>
- Li J, Dawson PA. Animal Models to Study Bile Acid Metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 1 mai 2019;1865(5):895-911.
- Libiad, M., Vitvitsky, V., Bostelaar, T., Bak, D.W., Lee, H.-J., Sakamoto, N., Fearon, E., Lyssiotis, C.A., Weerapana, E., Banerjee, R., 2019. Hydrogen sulfide perturbs mitochondrial bioenergetics and triggers metabolic reprogramming in colon cells. *J Biol Chem* 294, 12077–12090. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009442>
- Lin, K., Zhu, L., Yang, L., 2022. Gut and obesity/metabolic disease: Focus on microbiota metabolites. *MedComm* 3, e171. <https://doi.org/10.1002/mco2.171>
- Litvak, Y., Byndloss, M.X., Bäumlér, A.J., 2018. Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota. *Science* 362. <https://doi.org/10.1126/science.aat9076>
- Liu, C.-L., Chiu, Y.-T., Hu, M.-L., 2011. Fucoxanthin enhances HO-1 and NQO1 expression in murine hepatic BNL CL.2 cells through activation of the Nrf2/ARE system partially by its pro-oxidant activity. *J Agric Food Chem* 59, 11344–11351. <https://doi.org/10.1021/jf2029785>
- Liu, K.H., Owens, J.A., Saeedi, B., Cohen, C.E., Bellissimo, M.P., Naudin, C., Darby, T., Druzak, S., Maner-Smith, K., Orr, M., Hu, X., Fernandes, J., Camacho, M.C., Hunter-Chang, S., VanInsberghe, D., Ma, C., Ganesh, T., Yeligar, S.M., Uppal, K., Go, Y.-M., Alvarez, J.A., Vos, M.B., Ziegler, T.R., Woodworth, M.H., Kraft, C.S., Jones, R.M., Ortlund, E., Neish, A.S., Jones, D.P., 2021. Microbial metabolite delta-valerobetaine is a diet-dependent obesogen. *Nat Metab* 3, 1694–1705. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00502-8>
- Liu, R., Hong, J., Xu, Xiaoqiang, Feng, Q., Zhang, D., Gu, Y., Shi, J., Zhao, S., Liu, W., Wang, Xiaokai, Xia, H., Liu, Z., Cui, B., Liang, P., Xi, L., Jin, J., Ying, X., Wang, Xiaolin, Zhao, X., Li, W., Jia, H., Lan, Z., Li, F., Wang, R., Sun, Y., Yang, M., Shen, Y., Jie, Z., Li, J., Chen, X., Zhong, H., Xie, H., Zhang, Y., Gu, W., Deng, X., Shen,

- B., Xu, Xun, Yang, H., Xu, G., Bi, Y., Lai, S., Wang, Jian, Qi, L., Madsen, L., Wang, Jiqui, Ning, G., Kristiansen, K., Wang, W., 2017. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nat Med* 23, 859–868. <https://doi.org/10.1038/nm.4358>
- Liu, W.-X., Wang, T., Zhou, F., Wang, Y., Xing, J.-W., Zhang, S., Gu, S.-Z., Sang, L.-X., Dai, C., Wang, H.-L., 2015. Voluntary exercise prevents colonic inflammation in high-fat diet-induced obese mice by up-regulating PPAR- $\gamma$  activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 459, 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.047>
- Lone, J.B., Koh, W.Y., Parray, H.A., Paek, W.K., Lim, J., Rather, I.A., Jan, A.T., 2018. Gut microbiome: Microflora association with obesity and obesity-related comorbidities. *Microbial Pathogenesis* 124, 266–271. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.036>
- Loos, R.J.F., Yeo, G.S.H., 2022. The genetics of obesity: from discovery to biology. *Nat Rev Genet* 23, 120–133. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00414-z>
- Lopes, F., Keita, A.V., Saxena, A., Reyes, J.L., Mancini, N.L., Al Rajabi, A., Wang, A., Baggio, C.H., Dicay, M., van Dalen, R., Ahn, Y., Carneiro, M.B.H., Peters, N.C., Rho, J.M., MacNaughton, W.K., Girardin, S.E., Jijon, H., Philpott, D.J., Söderholm, J.D., McKay, D.M., 2018. ER-stress mobilization of death-associated protein kinase-1–dependent xenophagy counteracts mitochondria stress–induced epithelial barrier dysfunction. *J. Biol. Chem.* 293, 3073–3087. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000809>
- López-Contreras, B.E., Morán-Ramos, S., Villarruel-Vázquez, R., Macías-Kauffer, L., Villamil-Ramírez, H., León-Mimila, P., Vega-Badillo, J., Sánchez-Muñoz, F., Llanos-Moreno, L.E., Canizalez-Román, A., Del Río-Navarro, B., Ibarra-González, I., Vela-Amieva, M., Villarreal-Molina, T., Ochoa-Leyva, A., Aguilar-Salinas, C.A., Canizales-Quinteros, S., 2018. Composition of gut microbiota in obese and normal-weight Mexican school-age children and its association with metabolic traits. *Pediatr Obes* 13, 381–388. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12262>
- Louet, J.-F., Hayhurst, G., Gonzalez, F.J., Girard, J., Decaux, J.-F., 2002. The Coactivator PGC-1 Is Involved in the Regulation of the Liver Carnitine Palmitoyltransferase I Gene Expression by cAMP in Combination with HNF4 $\alpha$  and cAMP-response Element-binding Protein (CREB)\*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 37991–38000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205087200>
- Louis, N.A., Hamilton, K.E., Canny, G., Shekels, L.L., Ho, S.B., Colgan, S.P., 2006. Selective induction of mucin-3 by hypoxia in intestinal epithelia. *Journal of Cellular Biochemistry* 99, 1616–1627. <https://doi.org/10.1002/jcb.20947>
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., Ohashi, P.S., 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
- Lu, Yuanyuan, Fan, C., Li, P., Lu, Yanfei, Chang, X., Qi, K., 2016. Short Chain Fatty Acids Prevent High-fat-diet-induced Obesity in Mice by Regulating G Protein-coupled Receptors and Gut Microbiota. *Sci Rep* 6, 37589. <https://doi.org/10.1038/srep37589>
- Luck, H., Tsai, S., Chung, J., Clemente-Casares, X., Ghazarian, M., Revelo, X.S., Lei, H., Luk, C.T., Shi, S.Y., Surendra, A., Copeland, J.K., Ahn, J., Prescott, D., Rasmussen, B.A., Chng, M.H.Y., Engleman, E.G., Girardin, S.E., Lam, T.K.T., Croitoru, K., Dunn, S., Philpott, D.J., Guttman, D.S., Woo, M., Winer, S., Winer, D.A., 2015. Regulation of Obesity-Related Insulin Resistance with Gut Anti-inflammatory Agents. *Cell Metabolism* 21, 527–542. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.03.001>
- Luettig, J., Rosenthal, R., Barmeyer, C., Schulzke, J., 2015. Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. *Tissue Barriers* 3, e977176. <https://doi.org/10.4161/21688370.2014.977176>

- Lumeng, C.N., Saltiel, A.R., 2011. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 121, 2111–2117. <https://doi.org/10.1172/JCI57132>
- Lutz, A.K., Exner, N., Fett, M.E., Schlehe, J.S., Kloos, K., Lämmermann, K., Brunner, B., Kurz-Drexler, A., Vogel, F., Reichert, A.S., Bouman, L., Vogt-Weisenhorn, D., Wurst, W., Tatzelt, J., Haass, C., Winklhofer, K.F., 2009. Loss of Parkin or PINK1 Function Increases Drp1-dependent Mitochondrial Fragmentation. *J Biol Chem* 284, 22938–22951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.035774>
- Lynes, M., Narisawa, S., Millán, J.L., Widmaier, E.P., 2011. Interactions between CD36 and global intestinal alkaline phosphatase in mouse small intestine and effects of high-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301, R1738–R1747. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00235.2011>
- Macfarlane, G.T., Gibson, G.R., Cummings, J.H., 1992. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *J Appl Bacteriol* 72, 57–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb04882.x>
- Madsen, K.L., Brockway, P.D., Johnson, L.R., Hardin, J.A., Gall, D.G., 1996. Role of ornithine decarboxylase in enterocyte mitochondrial function and integrity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 270, G789–G797. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1996.270.5.G789>
- Magee, E.A., Richardson, C.J., Hughes, R., Cummings, J.H., 2000. Contribution of dietary protein to sulfide production in the large intestine: an in vitro and a controlled feeding study in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 72, 1488–1494. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.6.1488>
- Mah, A.T., Van Landeghem, L., Gavin, H.E., Magness, S.T., Lund, P.K., 2014. Impact of Diet-Induced Obesity on Intestinal Stem Cells: Hyperproliferation but Impaired Intrinsic Function That Requires Insulin/IGF1. *Endocrinology* 155, 3302–3314. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1112>
- Májer, F., Sharma, R., Mullins, C., Keogh, L., Phipps, S., Duggan, S., Kelleher, D., Keely, S., Long, A., Radics, G., Wang, J., Gilmer, J.F., 2014. New highly toxic bile acids derived from deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid and lithocholic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22, 256–268. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.11.029>
- Mana, M.D., Hussey, A.M., Tzouanas, C.N., Imada, S., Barrera Millan, Y., Bahceci, D., Saiz, D.R., Webb, A.T., Lewis, C.A., Carmeliet, P., Mihaylova, M.M., Shalek, A.K., Yilmaz, Ö.H., 2021. High-fat diet-activated fatty acid oxidation mediates intestinal stemness and tumorigenicity. *Cell Reports* 35, 109212. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109212>
- Mantis, N.J., Frey, A., Neutra, M.R., 2000. Accessibility of glycolipid and oligosaccharide epitopes on rabbit villus and follicle-associated epithelium. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 278, G915–G923. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.278.6.G915>
- Martin, S., Parton, R.G., 2006. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 373–378. <https://doi.org/10.1038/nrm1912>
- Martinez-Guryn, K., Hubert, N., Frazier, K., Urlass, S., Musch, M.W., Ojeda, P., Pierre, J.F., Miyoshi, J., Sontag, T.J., Cham, C.M., Reardon, C.A., Leone, V., Chang, E.B., 2018. Small Intestine Microbiota Regulate Host Digestive and Absorptive Adaptive Responses to Dietary Lipids. *Cell Host & Microbe* 23, 458–469.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.03.011>
- Martinou, J.-C., Youle, R.J., 2006. Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death & Differentiation* 13, 1291–1295. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401985>

- Matsuzawa, A., Ichijo, H., 2008. Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim Biophys Acta* 1780, 1325–1336. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.12.011>
- Mattson, F.H., Beck, L.W., 1956. THE SPECIFICITY OF PANCREATIC LIPASE FOR THE PRIMARY HYDROXYL GROUPS OF GLYCERIDES. *Journal of Biological Chemistry* 219, 735–740. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)65733-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65733-3)
- Mazat, J.-P., Ransac, S., 2018. The Fate of Glutamine in Human Metabolism. Comparison with Glucose. *bioRxiv* 477224. <https://doi.org/10.1101/477224>
- McCarthy, D.M., Nicholson, J.A., Kim, Y.S., 1980. Intestinal enzyme adaptation to normal diets of different composition. *Am J Physiol* 239, G445-451. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1980.239.6.G445>
- McKay, D.M., Mancini, N.L., Shearer, J., Shutt, T., 2020. Perturbed mitochondrial dynamics, an emerging aspect of epithelial-microbe interactions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 318, G748–G762. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00031.2020>
- Melis, N., Rubera, I., Cougnon, M., Giraud, S., Mograbi, B., Belaid, A., Pisani, D.F., Huber, S.M., Lacas-Gervais, S., Fragaki, K., Blondeau, N., Vigne, P., Frelin, C., Hauet, T., Durantou, C., Tauc, M., 2017. Targeting eIF5A Hypusination Prevents Anoxic Cell Death through Mitochondrial Silencing and Improves Kidney Transplant Outcome. *J Am Soc Nephrol* 28, 811–822. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016010012>
- Ménard, S., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M., 2010. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol* 3, 247–259. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.5>
- Mensink, R.P., Zock, P.L., Kester, A.D., Katan, M.B., 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition* 77, 1146–1155. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.5.1146>
- Merenda, A., Fenderico, N., Maurice, M.M., 2020. Wnt Signaling in 3D: Recent Advances in the Applications of Intestinal Organoids. *Trends in Cell Biology* 30, 60–73. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.10.003>
- Mihaylova, M.M., Cheng, C.-W., Cao, A.Q., Tripathi, S., Mana, M.D., Bauer-Rowe, K.E., Abu-Remaileh, M., Clavain, L., Erdemir, A., Lewis, C.A., Freinkman, E., Dickey, A.S., La Spada, A.R., Huang, Y., Bell, G.W., Deshpande, V., Carmeliet, P., Katajisto, P., Sabatini, D.M., Yilmaz, Ö.H., 2018. Fasting Activates Fatty Acid Oxidation to Enhance Intestinal Stem Cell Function during Homeostasis and Aging. *Cell Stem Cell* 22, 769-778.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.001>
- Milger, K., Herrmann, T., Becker, C., Gotthardt, D., Zickwolf, J., Ehehalt, R., Watkins, P.A., Stremmel, W., Füllekrug, J., 2006. Cellular uptake of fatty acids driven by the ER-localized acyl-CoA synthetase FATP4. *Journal of Cell Science* 119, 4678–4688. <https://doi.org/10.1242/jcs.03280>
- Mimoun, S., Andriamihaja, M., Chaumontet, C., Atanasiu, C., Benamouzig, R., Blouin, J.M., Tomé, D., Bouillaud, F., Blachier, F., 2012. Detoxification of H<sub>2</sub>S by Differentiated Colonic Epithelial Cells: Implication of the Sulfide Oxidizing Unit and of the Cell Respiratory Capacity. *Antioxidants & Redox Signaling* 17, 1–10. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4186>
- Minihane, A.M., Vinoy, S., Russell, W.R., Baka, A., Roche, H.M., Tuohy, K.M., Teeling, J.L., Blaak, E.E., Fenech, M., Vauzour, D., McArdle, H.J., Kremer, B.H.A., Sterkman, L., Vafeiadou, K., Benedetti, M.M., Williams, C.M., Calder, P.C., 2015. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *Br J Nutr* 114, 999–1012. <https://doi.org/10.1017/S0007114515002093>

- Módis, K., Coletta, C., Erdélyi, K., Papapetropoulos, A., Szabo, C., 2013. Intramitochondrial hydrogen sulfide production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase maintains mitochondrial electron flow and supports cellular bioenergetics. *The FASEB Journal* 27, 601–611. <https://doi.org/10.1096/fj.12-216507>
- Mohrin, M., Shin, J., Liu, Y., Brown, K., Luo, H., Xi, Y., Haynes, C.M., Chen, D., 2015. STEM CELL AGING. A mitochondrial UPR-mediated metabolic checkpoint regulates hematopoietic stem cell aging. *Science* 347, 1374–1377. <https://doi.org/10.1126/science.aaa2361>
- Moor, A.E., Harnik, Y., Ben-Moshe, S., Massasa, E.E., Rozenberg, M., Eilam, R., Bahar Halpern, K., Itzkovitz, S., 2018. Spatial Reconstruction of Single Enterocytes Uncovers Broad Zonation along the Intestinal Villus Axis. *Cell* 175, 1156–1167.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.063>
- Müller, F.H., Bandejas, T.M., Ulrich, T., Teixeira, M., Gomes, C.M., Kletzin, A., 2004. Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Mol Microbiol* 53, 1147–1160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04193.x>
- Murakami, Y., Tanabe, S., Suzuki, T., 2016. High-fat Diet-induced Intestinal Hyperpermeability is Associated with Increased Bile Acids in the Large Intestine of Mice. *J Food Sci* 81, H216–222. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13166>
- Murota, K., Storch, J., 2005. Uptake of Micellar Long-Chain Fatty Acid and sn-2-Monoacylglycerol into Human Intestinal Caco-2 Cells Exhibits Characteristics of Protein-Mediated Transport. *The Journal of Nutrition* 135, 1626–1630. <https://doi.org/10.1093/jn/135.7.1626>
- Naghdi, S., Slovinsky, W.S., Madesh, M., Rubin, E., Hajnóczky, G., 2018. Mitochondrial fusion and Bid-mediated mitochondrial apoptosis are perturbed by alcohol with distinct dependence on its metabolism. *Cell Death & Disease* 9, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1070-3>
- Nascimento, J.C., Matheus, V.A., Oliveira, R.B., Tada, S.F.S., Collares-Buzato, C.B., 2021. High-Fat Diet Induces Disruption of the Tight Junction-Mediated Paracellular Barrier in the Proximal Small Intestine Before the Onset of Type 2 Diabetes and Endotoxemia. *Dig Dis Sci* 66, 3359–3374. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06664-x>
- Nassir, F., Wilson, B., Han, X., Gross, R.W., Abumrad, N.A., 2007. CD36 Is Important for Fatty Acid and Cholesterol Uptake by the Proximal but Not Distal Intestine\*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 19493–19501. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703330200>
- Natividad, J.M., Lamas, B., Pham, H.P., Michel, M.-L., Rainteau, D., Bridonneau, C., da Costa, G., van Hylckama Vlieg, J., Sovran, B., Chamignon, C., Planchais, J., Richard, M.L., Langella, P., Veiga, P., Sokol, H., 2018. *Bilophila wadsworthia* aggravates high fat diet induced metabolic dysfunctions in mice. *Nat Commun* 9, 2802. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05249-7>
- Nauck, M.A., Bartels, E., Orskov, C., Ebert, R., Creutzfeldt, W., 1993. Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide infused at near-physiological insulinotropic hormone and glucose concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 76, 912–917. <https://doi.org/10.1210/jcem.76.4.8473405>
- Nauli, A.M., Nassir, F., Zheng, S., Yang, Q., Lo, C.-M., Vonlehmden, S.B., Lee, D., Jandacek, R.J., Abumrad, N.A., Tso, P., 2006. CD36 Is Important for Chylomicron Formation and Secretion and May Mediate Cholesterol Uptake in the Proximal Intestine. *Gastroenterology* 131, 1197–1207. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.08.012>

- Nazli, A., Yang, P.-C., Jury, J., Howe, K., Watson, J.L., Söderholm, J.D., Sherman, P.M., Perdue, M.H., McKay, D.M., 2004. Epithelia Under Metabolic Stress Perceive Commensal Bacteria as a Threat. *The American Journal of Pathology* 164, 947–957. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63182-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63182-3)
- Neeli, I., Siddiqi, S.A., Siddiqi, S., Mahan, J., Lagakos, W.S., Binas, B., Gheyi, T., Storch, J., Mansbach, C.M., 2007. Liver Fatty Acid-binding Protein Initiates Budding of Prechylomicron Transport Vesicles from Intestinal Endoplasmic Reticulum\*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 17974–17984. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610765200>
- Nicholson, A., Reifsnyder, P.C., Malcolm, R.D., Lucas, C.A., MacGregor, G.R., Zhang, W., Leiter, E.H., 2010. Diet-induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) gene. *Obesity (Silver Spring)* 18, 1902–1905. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.477>
- Night, M., Al-Sadi, R., Guo, S., Rawat, M., Night, P., Watterson, M.D., Ma, T.Y., 2017. Lipopolysaccharide-Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Permeability Is Mediated by Toll-Like Receptor 4/Myeloid Differentiation Primary Response 88 (MyD88) Activation of Myosin Light Chain Kinase Expression. *Am J Pathol* 187, 2698–2710. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.08.005>
- Niot, I., Poirier, H., Tran, T.T.T., Besnard, P., 2009. Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Prog Lipid Res* 48, 101–115. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.01.001>
- Noeman, S.A., Hamooda, H.E., Baalash, A.A., 2011. Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats. *Diabetol Metab Syndr* 3, 17. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-3-17>
- Nunnari, J., Suomalainen, A., 2012. Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell* 148, 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>
- Obésité et surpoids [WWW Document], 2022. URL <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed 8.4.22).
- Obesity [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/obesity> (accessed 2.16.22).
- Obrowsky, S., Chandak, P.G., Patankar, J.V., Povoden, S., Schlager, S., Kershaw, E.E., Bogner-Strauss, J.G., Hoefler, G., Levak-Frank, S., Kratky, D., 2013. Adipose triglyceride lipase is a TG hydrolase of the small intestine and regulates intestinal PPAR $\alpha$  signaling. *J Lipid Res* 54, 425–435. <https://doi.org/10.1194/jlr.M031716>
- O'Hara, R., Tedone, E., Ludlow, A., Huang, E., Arosio, B., Mari, D., Shay, J.W., 2019. Quantitative mitochondrial DNA copy number determination using droplet digital PCR with single-cell resolution. *Genome Res* 29, 1878–1888. <https://doi.org/10.1101/gr.250480.119>
- Olivier, S., Leclerc, J., Grenier, A., Foretz, M., Tamburini, J., Viollet, B., 2019. AMPK Activation Promotes Tight Junction Assembly in Intestinal Epithelial Caco-2 Cells. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20205171>
- Olivier, S., Pochard, C., Diounou, H., Castillo, V., Divoux, J., Alcantara, J., Leclerc, J., Guilmeau, S., Huet, C., Charifi, W., Varin, T.V., Daniel, N., Foretz, M., Neunlist, M., Salomon, B.L., Ghosh, P., Marette, A., Rolli-Derkinderen, M., Viollet, B., 2021. Deletion of intestinal epithelial AMP-activated protein kinase alters distal colon permeability but not glucose homeostasis. *Mol Metab* 47, 101183. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101183>
- OMS, 2000. OMS. World Health Organization.
- Org, E., Blum, Y., Kasela, S., Mehrabian, M., Kuusisto, J., Kangas, A.J., Soininen, P., Wang, Z., Ala-Korpela, M., Hazen, S.L., Laakso, M., Lusi, A.J., 2017. Relationships

- between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort. *Genome Biol* 18, 70. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1194-2>
- O'Rourke, K.P., Ackerman, S., Dow, L.E., Lowe, S.W., 2016. Isolation, Culture, and Maintenance of Mouse Intestinal Stem Cells. *Bio Protoc* 6. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1733>
- Osellame, L.D., Blacker, T.S., Duchon, M.R., 2012. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26, 711–723. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.003>
- Osuga, J., Ishibashi, S., Oka, T., Yagyu, H., Tozawa, R., Fujimoto, A., Shionoiri, F., Yahagi, N., Kraemer, F.B., Tsutsumi, O., Yamada, N., 2000. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 787–792. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.787>
- Ou, J., Carbonero, F., Zoetendal, E.G., DeLany, J.P., Wang, M., Newton, K., Gaskins, H.R., O'Keefe, S.J., 2013. Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 98, 111–120. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.056689>
- Ou, J., DeLany, J.P., Zhang, M., Sharma, S., O'Keefe, S.J.D., 2012. Association Between Low Colonic Short-Chain Fatty Acids and High Bile Acids in High Colon Cancer Risk Populations. *Nutrition and cancer* 64, 34. <https://doi.org/10/fjftzt>
- Palacios, O.M., Carmona, J.J., Michan, S., Chen, K.Y., Manabe, Y., Iii, J.L.W., Goodyear, L.J., Tong, Q., 2009. Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1 $\alpha$  in skeletal muscle. *Aging* 1, 771–783. <https://doi.org/10.18632/aging.100075>
- Palmas, V., Pisanu, S., Madau, V., Casula, E., Deledda, A., Cusano, R., Uva, P., Vascellari, S., Loviselli, A., Manzin, A., Velluzzi, F., 2021. Gut microbiota markers associated with obesity and overweight in Italian adults. *Sci Rep* 11, 5532. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84928-w>
- Papa, L., Germain, D., 2014. SirT3 Regulates the Mitochondrial Unfolded Protein Response. *Mol Cell Biol* 34, 699–710. <https://doi.org/10.1128/MCB.01337-13>
- Payne, A.N., Chassard, C., Zimmermann, M., Müller, P., Stinca, S., Lacroix, C., 2011. The metabolic activity of gut microbiota in obese children is increased compared with normal-weight children and exhibits more exhaustive substrate utilization. *Nutr Diabetes* 1, e12. <https://doi.org/10.1038/nutd.2011.8>
- Pearce, S.C., Al-Jawadi, A., Kishida, K., Yu, S., Hu, M., Fritzky, L.F., Edelblum, K.L., Gao, N., Ferraris, R.P., 2018. Marked differences in tight junction composition and macromolecular permeability among different intestinal cell types. *BMC Biology* 16, 19. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0481-z>
- Pellegrino, M.W., Haynes, C.M., 2015. Mitophagy and the mitochondrial unfolded protein response in neurodegeneration and bacterial infection. *BMC Biol* 13. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0129-1>
- Peluso, I., Raguzzini, A., Villano, D.V., Cesqui, E., Toti, E., Catasta, G., Serafini, M., 2012. High fat meal increase of IL-17 is prevented by ingestion of fruit juice drink in healthy overweight subjects. *Curr Pharm Des* 18, 85–90. <https://doi.org/10.2174/138161212798919020>
- Pendyala, S., Walker, J.M., Holt, P.R., 2012. A High-Fat Diet Is Associated With Endotoxemia That Originates From the Gut. *Gastroenterology* 142, 1100-1101.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.01.034>
- Perekatt, A.O., Valdez, M.J., Davila, M., Hoffman, A., Bonder, E.M., Gao, N., Verzi, M.P., 2014. YY1 is indispensable for Lgr5+ intestinal stem cell renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 7695–7700. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400128111>

- Pezzato, E., Battaglia, V., Brunati, A.M., Agostinelli, E., Toninello, A., 2008. Ca<sup>2+</sup>-independent effects of spermine on pyruvate dehydrogenase complex activity in energized rat liver mitochondria incubated in the absence of exogenous Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. *Amino Acids* 36, 449. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0099-5>
- Pinkus, L.M., Windmueller, H.G., 1977. Phosphate-dependent glutaminase of small intestine: Localization and role in intestinal glutamine metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 182, 506–517. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90531-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90531-8)
- Pouliot, M.-C., Després, J.-P., Lemieux, S., Moorjani, S., Bouchard, C., Tremblay, A., Nadeau, A., Lupien, P.J., 1994. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: Best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *American Journal of Cardiology* 73, 460–468. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(94\)90676-9](https://doi.org/10.1016/0002-9149(94)90676-9)
- Qiao, Y., Sun, J., Ding, Y., Le, G., Shi, Y., 2013a. Alterations of the gut microbiota in high-fat diet mice is strongly linked to oxidative stress. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 1689–1697. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4323-6>
- Ramachandran, D., Clara, R., Fedele, S., Hu, J., Lackzo, E., Huang, J.-Y., Verdin, E., Langhans, W., Mansouri, A., 2017. Intestinal SIRT3 overexpression in mice improves whole body glucose homeostasis independent of body weight. *Mol Metab* 6, 1264–1273. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.07.009>
- Ramachandran, D., Clara, R., Fedele, S., Michel, L., Burkard, J., Kaufman, S., Diaz, A.A., Weissfeld, N., De Bock, K., Prip-Buus, C., Langhans, W., Mansouri, A., 2018b. Enhancing enterocyte fatty acid oxidation in mice affects glycemic control depending on dietary fat. *Sci Rep* 8, 10818. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29139-6>
- Rao, R., 2008. Oxidative Stress-Induced Disruption of Epithelial and Endothelial Tight Junctions. *Front Biosci* 13, 7210–7226.
- Reddy, B.S., 1981. Diet and Excretion of Bile Acids. *Cancer Res* 41, 3766–3768.
- Reilly, S.M., Saltiel, A.R., 2017. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol* 13, 633–643. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.90>
- Richardson, D.K., Kashyap, S., Bajaj, M., Cusi, K., Mandarino, S.J., Finlayson, J., DeFronzo, R.A., Jenkinson, C.P., Mandarino, L.J., 2005. Lipid Infusion Decreases the Expression of Nuclear Encoded Mitochondrial Genes and Increases the Expression of Extracellular Matrix Genes in Human Skeletal Muscle\*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 10290–10297. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408985200>
- Ricquier, D., Bouillaud, F., 2000. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochemical Journal* 345, 161.
- Ridlon, J.M., Harris, S.C., Bhowmik, S., Kang, D.-J., Hylemon, P.B., 2016. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes* 7, 22–39. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1127483>
- Ridlon, J.M., Kang, D.-J., Hylemon, P.B., 2006. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* 47, 241–259. <https://doi.org/10.1194/jlr.R500013-JLR200>
- Riedel, S., Pfeiffer, C., Johnson, R., Louw, J., Muller, C.J.F., 2022. Intestinal Barrier Function and Immune Homeostasis Are Missing Links in Obesity and Type 2 Diabetes Development. *Front. Endocrinol.* 12, 833544. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.833544>
- Robertson, M.D., Parkes, M., Warren, B.F., Ferguson, D.J.P., Jackson, K.G., Jewell, D.P., Frayn, K.N., 2003. Mobilisation of enterocyte fat stores by oral glucose in humans. *Gut* 52, 834–839.
- Robles E., F., Vázquez V., P., Emiliano J., R., Amaro R., G., Briones S., L., 2017. High fat diet induces alterations to intraepithelial lymphocyte and cytokine mRNA in the small



- intestine of C57BL/6 mice. *RSC Adv.* 7, 5322–5330.  
<https://doi.org/10.1039/C6RA24689C>
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., Puigserver, P., 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1. *Nature* 434, 113–118. <https://doi.org/10.1038/nature03354>
- Rodríguez-Colman, M.J., Schewe, M., Meerlo, M., Stigter, E., Gerrits, J., Pras-Raves, M., Sacchetti, A., Hornsveld, M., Oost, K.C., Snippert, H.J., Verhoeven-Duif, N., Fodde, R., Burgering, B.M.T., 2017. Interplay between metabolic identities in the intestinal crypt supports stem cell function. *Nature* 543, 424–427.  
<https://doi.org/10.1038/nature21673>
- Roediger, W.E., 1982. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology* 83, 424–429.
- Roediger, W.E., 1980. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* 21, 793–798. <https://doi.org/10.1136/gut.21.9.793>
- Rohr, M.W., Narasimhulu, C.A., Rudeski-Rohr, T.A., Parthasarathy, S., 2020. Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Adv Nutr* 11, 77–91.  
<https://doi.org/10.1093/advances/nmz061>
- Ronchi, J.A., Figueira, T.R., Ravagnani, F.G., Oliveira, H.C.F., Vercesi, A.E., Castilho, R.F., 2013. A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. *Free Radic Biol Med* 63, 446–456. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.049>
- Sampson, L.L., Davis, A.K., Grogg, M.W., Zheng, Y., 2016. mTOR disruption causes intestinal epithelial cell defects and intestinal atrophy postinjury in mice. *FASEB J* 30, 1263–1275. <https://doi.org/10.1096/fj.15-278606>
- Sasaki, N., Sachs, N., Wiebrands, K., Ellenbroek, S.I.J., Fumagalli, A., Lyubimova, A., Begthel, H., van den Born, M., van Es, J.H., Karthaus, W.R., Li, V.S.W., López-Iglesias, C., Peters, P.J., van Rheenen, J., van Oudenaarden, A., Clevers, H., 2016. Reg4<sup>+</sup> deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5<sup>+</sup> stem cells in colon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E5399–E5407.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1607327113>
- Schell, J.C., Wisidagama, D.R., Bensard, C., Zhao, H., Wei, P., Tanner, J., Flores, A., Mohlman, J., Sorensen, L.K., Earl, C.S., Olson, K.A., Miao, R., Waller, T.C., Delker, D., Kanth, P., Jiang, L., DeBerardinis, R.J., Bronner, M.P., Li, D.Y., Cox, J.E., Christofk, H.R., Lowry, W.E., Thummel, C.S., Rutter, J., 2017. Control of intestinal stem cell function and proliferation by mitochondrial pyruvate metabolism. *Nature Cell Biology* 19, 1027–1036. <https://doi.org/10.1038/ncb3593>
- Scheller, A.S., Philipp, T.M., Klotz, L.-O., Steinbrenner, H., 2022. Altered Capacity for H2S Production during the Spontaneous Differentiation of Caco-2 Cells to Colonocytes Due to Reciprocal Regulation of CBS and SELENBP1. *Antioxidants* 11, 1957.  
<https://doi.org/10.3390/antiox11101957>
- Schrader, M., Fahimi, H.D., 2004. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* 122, 383–393. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0673-1>
- Seifert, E.L., Estey, C., Xuan, J.Y., Harper, M.-E., 2010. Electron Transport Chain-dependent and -independent Mechanisms of Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Emission during Long-chain Fatty Acid Oxidation. *Journal of Biological Chemistry* 285, 5748–5758.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.026203>
- Serino, M., Luche, E., Gres, S., Baylac, A., Bergé, M., Cenac, C., Waget, A., Klopp, P., Iacovoni, J., Klopp, C., Mariette, J., Bouchez, O., Lluch, J., Ouarné, F., Monsan, P., Valet, P., Roques, C., Amar, J., Bouloumié, A., Théodorou, V., Burcelin, R., 2012.

- Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut* 61, 543–553. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301012>
- Shen, L., Ao, L., Xu, H., Shi, J., You, D., Yu, X., Xu, W., Sun, J., Wang, F., 2019. Poor short-term glycemic control in patients with type 2 diabetes impairs the intestinal mucosal barrier: a prospective, single-center, observational study. *BMC Endocr Disord* 19, 29. <https://doi.org/10.1186/s12902-019-0354-7>
- Siddiqi, S., Saleem, U., Abumrad, N.A., Davidson, N.O., Storch, J., Siddiqi, S.A., Mansbach, C.M., 2010. A novel multiprotein complex is required to generate the prechylomicron transport vesicle from intestinal ER. *J Lipid Res* 51, 1918–1928. <https://doi.org/10.1194/jlr.M005611>
- Siddiqi, S., Sheth, A., Patel, F., Barnes, M., Mansbach, C.M., 2013. Intestinal Caveolin-1 Is Important for Dietary Fatty Acid Absorption. *Biochim Biophys Acta* 1831, 1311–1321. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.05.001>
- Siddiqi, S.A., Gorelick, F.S., Mahan, J.T., Mansbach, C.M., II, 2003. COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the prechylomicron transport vesicle. *Journal of Cell Science* 116, 415–427. <https://doi.org/10.1242/jcs.00215>
- Simons, K., Toomre, D., 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31–39. <https://doi.org/10.1038/35036052>
- Simonson, S.G., Zhang, J., Canada, A.T., Su, Y.-F., Benveniste, H., Piantadosi, C.A., 1993. Hydrogen Peroxide Production by Monoamine Oxidase during Ischemia-Reperfusion in the Rat Brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 13, 125–134. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.15>
- Simopoulos, A.P., 2002. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 21, 495–505. <https://doi.org/10.1080/07315724.2002.10719248>
- Singh, A., Balint, J.A., Edmonds, R.H., Rodgers, J.B., 1972. Adaptive changes of the rat small intestine in response to a high fat diet. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 260, 708–715. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(72\)90019-7](https://doi.org/10.1016/0005-2760(72)90019-7)
- Singhal, R., Shah, Y.M., 2020. Oxygen battle in the gut: Hypoxia and hypoxia-inducible factors in metabolic and inflammatory responses in the intestine. *Journal of Biological Chemistry* 295, 10493–10505. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.011188>
- Sinha, N., Suarez-Diez, M., Hooiveld, G.J.E.J., Keijer, J., Martin dos Santos, V., van Schothorst, E.M., 2018. A Constraint-Based Model Analysis of Enterocyte Mitochondrial Adaptation to Dietary Interventions of Lipid Type and Lipid Load. *Front Physiol* 9, 749. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00749>
- Skulachev, V.P., 1999. Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling. *J Bioenerg Biomembr* 31, 431–445. <https://doi.org/10.1023/a:1005492205984>
- Snodgrass, R.G., Huang, S., Choi, I.-W., Rutledge, J.C., Hwang, D.H., 2013. Inflammasome-Mediated Secretion of IL-1 $\beta$  in Human Monocytes through TLR2 Activation; Modulation by Dietary Fatty Acids. *The Journal of Immunology* 191, 4337–4347. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300298>
- Somasundaram, S., Rafi, S., Hayllar, J., Sigthorsson, G., Jacob, M., Price, A.B., Macpherson, A., Mahmood, T., Scott, D., Wrigglesworth, J.M., Bjarnason, I., 1997. Mitochondrial damage: a possible mechanism of the “topical” phase of NSAID induced injury to the rat intestine. *Gut* 41, 344–353. <https://doi.org/10.1136/gut.41.3.344>
- Sommer, et F.Bäckhed., F., 2015. The Gut Microbiota Engages Different Signaling Pathways to Induce Duox2 Expression in the Ileum and Colon Epithelium ». *Mucosal Immunology* 8, 372–79. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.74>

- Starkov, A.A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B.J., Browne, S.E., Patel, M.S., Beal, M.F., 2004a. Mitochondrial  $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Generates Reactive Oxygen Species ». *The Journal of Neuroscience* 24, 7779–88. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1899-04.2004>.
- Stenman, L.K., Holma, R., Korpela, R., 2012. High-fat-induced intestinal permeability dysfunction associated with altered fecal bile acids. *World J Gastroenterol* 18, 923–929. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i9.923>
- Stine, R.R., Sakers, A.P., TeSlaa, T., Kissig, M., Stine, Z.E., Kwon, C.W., Cheng, L., Lim, H.-W., Kaestner, K.H., Rabinowitz, J.D., Seale, P., 2019. PRDM16 maintains homeostasis of the intestinal epithelium by controlling region-specific metabolism. *Cell Stem Cell* 25, 830-845.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.08.017>
- Stoll, B., Burrin, D.G., Henry, J., Yu, H., Jahoor, F., Reeds, P.J., 1999. Substrate oxidation by the portal drained viscera of fed piglets. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 277, E168–E175. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.277.1.E168>
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jäger, S., Handschin, C., 2006. Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators ». *Cell* 127, 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.024>.
- Stremmel, W., 1988. Uptake of fatty acids by jejunal mucosal cells is mediated by a fatty acid binding membrane protein. *J Clin Invest* 82, 2001–2010.
- Stringari, C., Edwards, R.A., Pate, K.T., Waterman, M.L., Donovan, P.J., Gratton, E., 2012. Metabolic trajectory of cellular differentiation in small intestine by Phasor Fluorescence Lifetime Microscopy of NADH. *Scientific Reports* 2, 568. <https://doi.org/10.1038/srep00568>
- Strocchi, A., Furne, J.K., Levitt, M.D., 1992. A modification of the methylene blue method to measure bacterial sulfide production in feces. *Journal of Microbiological Methods* 15, 75–82. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(92\)90071-B](https://doi.org/10.1016/0167-7012(92)90071-B)
- Suárez-Álvarez, K., Solís-Lozano, L., Leon-Cabrera, S., González-Chávez, A., Gómez-Hernández, G., Quiñones-Álvarez, M.S., Serralde-Zúñiga, A.E., Hernández-Ruiz, J., Ramírez-Velásquez, J., Galindo-González, F.J., Zavala-Castillo, J.C., De León-Nava, M.A., Robles-Díaz, G., Escobedo, G., 2013. Serum IL-12 Is Increased in Mexican Obese Subjects and Associated with Low-Grade Inflammation and Obesity-Related Parameters. *Mediators Inflamm* 2013, 967067. <https://doi.org/10.1155/2013/967067>
- Sulkshane, P., Ram, J., Thakur, A., Reis, N., Kleifeld, O., Glickman, M.H., 2021. Ubiquitination and receptor-mediated mitophagy converge to eliminate oxidation-damaged mitochondria during hypoxia. *Redox Biol* 45, 102047. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102047>
- Sun, L., Yu, Z., Ye, X., Zou, S., Li, H., Yu, D., Wu, H., Chen, Y., Dore, J., Clément, K., Hu, F.B., Lin, X., 2010. A marker of endotoxemia is associated with obesity and related metabolic disorders in apparently healthy Chinese. *Diabetes Care* 33, 1925–1932. <https://doi.org/10.2337/dc10-0340>
- Sun, X., Yang, Q., Rogers, C.J., Du, M., Zhu, M.-J., 2017. AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating Cdx2 expression. *Cell Death Differ* 24, 819–831. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.14>
- Sun, Y., Jin, C., Zhang, X., Jia, W., Le, J., Ye, J., 2018a. Restoration of GLP-1 secretion by Berberine is associated with protection of colon enterocytes from mitochondrial overheating in diet-induced obese mice ». *Nutrition & Diabetes* 8. <https://doi.org/10.1038/s41387-018-0061-x>.

- Tatsuta, T., Langer, T., 2008. Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *The EMBO Journal* 27, 306–314. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601972>
- Tazi, A., Araujo, J.R., Mulet, C., Arena, E.T., Nigro, G., Pédrón, T., Sansonetti, P.J., 2018. Disentangling Host-Microbiota Regulation of Lipid Secretion by Enterocytes: Insights from Commensals *Lactobacillus paracasei* and *Escherichia coli*. *mBio* 9, e01493-18, /mbio/9/5/mBio.01493-18.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.01493-18>
- Tazoe, H., Otomo, Y., Kaji, I., Tanaka, R., Karaki, S.-I., Kuwahara, A., 2008. Roles of Short-Chain Fatty Acids Receptors, GPR41 and GPR43 on Colonic Functions ». *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 2, 251–62.
- Teixeira, L.G., Leonel, A.J., Aguilar, E.C., Batista, N.V., Alves, A.C., Coimbra, C.C., Ferreira, A.V., de Faria, A.M.C., Cara, D.C., Alvarez Leite, J.I., 2011. The combination of high-fat diet-induced obesity and chronic ulcerative colitis reciprocally exacerbates adipose tissue and colon inflammation. *Lipids Health Dis* 10, 204. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-204>
- Teixeira, T.F.S., Souza, N.C.S., Chiarello, P.G., Franceschini, S.C.C., Bressan, J., Ferreira, C.L.L.F., Peluzio, M. do C.G., 2012. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. *Clinical Nutrition* 31, 735–740. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2012.02.009>
- Tetteh, P.W., Farin, H.F., Clevers, H., 2015. Plasticity within stem cell hierarchies in mammalian epithelia. *Trends in Cell Biology* 25, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.09.003>
- Thiele, C., Spandl, J., 2008. Cell biology of lipid droplets. *Curr Opin Cell Biol* 20, 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.05.009>
- Tholstrup, T., Sandström, B., Bysted, A., Hølmer, G., 2001. Effect of 6 dietary fatty acids on the postprandial lipid profile, plasma fatty acids, lipoprotein lipase, and cholesterol ester transfer activities in healthy young men. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73, 198–208. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.198>
- Thumser, A.E.A., Wilton, D.C., 1996. The binding of cholesterol and bile salts to recombinant rat liver fatty acid-binding protein. *Biochemical Journal* 320, 729–733. <https://doi.org/10.1042/bj3200729>
- Tiihonen, K., Ouwehand, A.C., Rautonen, N., 2010. Effect of overweight on gastrointestinal microbiology and immunology: correlation with blood biomarkers. *Br J Nutr* 103, 1070–1078. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992807>
- Tiihonen, K., Rautonen, N., Alhoniemi, E., Ahotupa, M., Stowell, J., Vasankari, T., 2015. Postprandial triglyceride response in normolipidemic, hyperlipidemic and obese subjects – the influence of polydextrose, a non-digestible carbohydrate. *Nutr J* 14, 23. <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0009-0>
- Tiranti, V., Viscomi, C., Hildebrandt, T., Di Meo, I., Mineri, R., Tiveron, C., D Levitt, M., Prella, A., Fagiolari, G., Rimoldi, M., Zeviani, M., 2009. Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nat Med* 15, 200–205. <https://doi.org/10.1038/nm.1907>
- Tofalo, R., Cocchi, S., Suzzi, G., 2019. Polyamines and Gut Microbiota. *Front Nutr* 6. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00016>
- Tran, T.T.T., Poirier, H., Clément, L., Nassir, F., Pelsers, M.M.A.L., Petit, V., Degrace, P., Monnot, M.-C., Glatz, J.F.C., Abumrad, N.A., Besnard, P., Niot, I., 2011. Luminal Lipid Regulates CD36 Levels and Downstream Signaling to Stimulate Chylomicron Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 286, 25201–25210. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.233551>

- Tremaroli, V., Bäckhed, F., 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489, 242–249. <https://doi.org/10.1038/nature11552>
- Tremblay, A.J., Lamarche, B., Guay, V., Charest, A., Lemelin, V., Couture, P., 2013. Short-term, high-fat diet increases the expression of key intestinal genes involved in lipoprotein metabolism in healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition* 98, 32–41. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.060251>
- Tsao, C.W., Aday, A.W., Almarzooq, Z.I., Alonso, A., Beaton, A.Z., Bittencourt, M.S., Boehme, A.K., Buxton, A.E., Carson, A.P., Commodore-Mensah, Y., Elkind, M.S.V., Evenson, K.R., Eze-Nliam, C., Ferguson, J.F., Generoso, G., Ho, J.E., Kalani, R., Khan, S.S., Kissela, B.M., Knutson, K.L., Levine, D.A., Lewis, T.T., Liu, J., Loop, M.S., Ma, J., Mussolino, M.E., Navaneethan, S.D., Perak, A.M., Poudel, R., Rezk-Hanna, M., Roth, G.A., Schroeder, E.B., Shah, S.H., Thacker, E.L., VanWagner, L.B., Virani, S.S., Voecks, J.H., Wang, N.-Y., Yaffe, K., Martin, S.S., on behalf of the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, 2022. Heart Disease and Stroke Statistics—2022 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 145. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000001052>
- Tsuzuki, W., 2007. Absorption Properties of Micellar Lipid Metabolites into Caco2 Cells. *Lipids* 42, 613–619. <https://doi.org/10.1007/s11745-007-3076-y>
- Turan, A., Mahmood, A., Alpers, D.H., 2009. Dietary Fat Feeding Alters Lipid Peroxidation in Surfactant-like Particles Secreted by Rat Small Intestine. *Gastroenterology Res* 2, 91–99. <https://doi.org/10.4021/gr2009.03.1280>
- Turner, J.D., Le, N.A., Brown, W.V., 1981. Effect of changing dietary fat saturation on low-density lipoprotein metabolism in man. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 241, E57–E63. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1981.241.1.E57>
- Twig, G., Liu, X., Liesa, M., Wikstrom, J.D., Molina, A.J.A., Las, G., Yaniv, G., Hajnóczky, G., Shirihai, O.S., 2010. Biophysical properties of mitochondrial fusion events in pancreatic  $\beta$ -cells and cardiac cells unravel potential control mechanisms of its selectivity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 299, C477–C487. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00427.2009>
- Uchida, A., Whitsitt, M., Eustaquio, T., Slipchenko, M., Leary, J., Cheng, J.-X., Buhman, K., 2012. Reduced Triglyceride Secretion in Response to an Acute Dietary Fat Challenge in Obese Compared to Lean Mice. *Frontiers in Physiology* 3, 26. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00026>
- Uda, K., Tsujikawa, T., Fujiyama, Y., Bamba, T., 2003. Rapid absorption of luminal polyamines in a rat small intestine ex vivo model. *J Gastroenterol Hepatol* 18, 554–559. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2003.03020.x>
- van der Flier, L.G., Clevers, H., 2009. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 241–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163145>
- Venugopal, S., Anwer, S., Szász, K., 2019. Claudin-2: Roles beyond Permeability Functions. *IJMS* 20, 5655. <https://doi.org/10.3390/ijms20225655>
- Vergauwen, H., 2015. The IPEC-J2 Cell Line, in: Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H. (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*. Springer, Cham (CH).
- Vissing, J., 2019. Paternal comeback in mitochondrial DNA inheritance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 1475–1476. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821192116>

- Volpe, C.M.O., Nogueira-Machado, J.A., 2013. The dual role of free fatty acid signaling in inflammation and therapeutics. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 7, 189–197. <https://doi.org/10.2174/18715303113139990041>
- von Moltke, J., Ji, M., Liang, H.-E., Locksley, R.M., 2016. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. *Nature* 529, 221–225. <https://doi.org/10.1038/nature16161>
- Vors, C., Pineau, G., Draï, J., Meugnier, E., Pesenti, S., Laville, M., Laugerette, F., Malpuech-Brugère, C., Vidal, H., Michalski, M.-C., 2015. Postprandial Endotoxemia Linked With Chylomicrons and Lipopolysaccharides Handling in Obese Versus Lean Men: A Lipid Dose-Effect Trial. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 100, 3427–3435. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2518>
- Walther, T.C., Farese, R.V., 2009. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* 1791, 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2008.10.009>
- Wang, A., Keita, A.V., Phan, V., McKay, C.M., Schoultz, I., Lee, J., Murphy, M.P., Fernando, M., Ronaghan, N., Balce, D., Yates, R., Dickey, M., Beck, P.L., MacNaughton, W.K., Söderholm, J.D., McKay, D.M., 2014. Targeting Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species to Reduce Epithelial Barrier Dysfunction and Colitis. *The American Journal of Pathology* 184, 2516–2527. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.05.019>
- Wang, X., Cui, Y., Qi, J., Zhu, M., Zhang, T., Cheng, M., Liu, S., Wang, G., 2018. Fucoxanthin Exerts Cytoprotective Effects against Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Damage in L02 Cells. *Biomed Res Int* 2018, 1085073. <https://doi.org/10.1155/2018/1085073>
- Wang, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y.L., Selkoe, D., Rice, S., Steen, J., LaVoie, M.J., Schwarz, T.L., 2011. PINK1 and Parkin Target Miro for Phosphorylation and Degradation to Arrest Mitochondrial Motility. *Cell* 147, 893–906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.018>
- Warburg, O., 1956. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 123, 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Washo-Stultz, D., Crowley-Weber, C.L., Dvorakova, K., Bernstein, C., Bernstein, H., Kunke, K., Waltmire, C.N., Garewal, H., Payne, C.M., 2002. Role of mitochondrial complexes I and II, reactive oxygen species and arachidonic acid metabolism in deoxycholate-induced apoptosis. *Cancer Letters* 177, 129–144. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00786-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00786-8)
- Watson, M.A., Pattavina, B., Hilsabeck, T.A.U., Lopez-Dominguez, J., Kapahi, P., Brand, M.D., 2021. S3QELs protect against diet-induced intestinal barrier dysfunction. *Aging Cell* n/a, e13476. <https://doi.org/10.1111/acer.13476>
- Windey, K., Preter, V.D., Verbeke, K., 2012. Relevance of protein fermentation to gut health. *Molecular Nutrition & Food Research* 56, 184–196. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100542>
- Windmueller, H.G., Spaeth, A.E., 1976. Metabolism of absorbed aspartate, asparagine, and arginine by rat small intestine in vivo. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 175, 670–676. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(76\)90558-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(76)90558-0)
- Wojtczak, L., Schönfeld, P., 1993. Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1183, 41–57. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90004-Y](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90004-Y)
- Wong, V.W.-S., Tse, C.-H., Lam, T.T.-Y., Wong, G.L.-H., Chim, A.M.-L., Chu, W.C.-W., Yeung, D.K.-W., Law, P.T.-W., Kwan, H.-S., Yu, J., Sung, J.J.-Y., Chan, H.L.-Y., 2013. Molecular Characterization of the Fecal Microbiota in Patients with

- Nonalcoholic Steatohepatitis – A Longitudinal Study. *PLOS ONE* 8, e62885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062885>
- Wu, M.-T., Chou, H.-N., Huang, C., 2014. Dietary Fucoxanthin Increases Metabolic Rate and Upregulated mRNA Expressions of the PGC-1alpha Network, Mitochondrial Biogenesis and Fusion Genes in White Adipose Tissues of Mice. *Mar Drugs* 12, 964–982. <https://doi.org/10.3390/md12020964>
- Xiao, C., Dash, S., Morgantini, C., Lewis, G.F., 2016. Intravenous Glucose Acutely Stimulates Intestinal Lipoprotein Secretion in Healthy Humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 36, 1457–1463. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.307044>
- Xiao, C., Stahel, P., Carreiro, A.L., Buhman, K.K., Lewis, G.F., 2018. Recent Advances in Triacylglycerol Mobilization by the Gut. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 29, 151–163. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.12.001>
- Xiao, C., Stahel, P., Carreiro, A.L., Hung, Y.-H., Dash, S., Bookman, I., Buhman, K.K., Lewis, G.F., 2019. Oral Glucose Mobilizes Triglyceride Stores From the Human Intestine. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 7, 313–337. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.10.002>
- Xin, T., Lu, C., 2020. SirT3 activates AMPK-related mitochondrial biogenesis and ameliorates sepsis-induced myocardial injury. *Aging* 12, 16224–16237. <https://doi.org/10.18632/aging.103644>
- Yang, H., Xiong, X., Wang, X., Yin, Y., 2016. Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway Changes with Intestinal Epithelial Cells Renewal Along Crypt-Villus Axis. *CPB* 39, 751–759. <https://doi.org/10.1159/000445665>
- Yang, Q., Bermingham, N.A., Finegold, M.J., Zoghbi, H.Y., 2001. Requirement of Math1 for Secretory Cell Lineage Commitment in the Mouse Intestine. *Science* 294, 2155–2158. <https://doi.org/10.1126/science.1065718>
- Yang, Y., Huang, J., Li, J., Yang, H., Yin, Y., 2020. The Effects of Lauric Acid on IPEC-J2 Cell Differentiation, Proliferation, and Death. *Curr Mol Med* 20, 572–581. <https://doi.org/10.2174/1566524020666200128155115>
- Yeganeh, P.R., Leahy, J., Spahis, S., Patey, N., Desjardins, Y., Roy, D., Delvin, E., Garofalo, C., Leduc-Gaudet, J.-P., St-Pierre, D., Beaulieu, J.-F., Marette, A., Gouspillou, G., Levy, E., 2018. Apple peel polyphenols reduce mitochondrial dysfunction in mice with DSS-induced ulcerative colitis. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 57, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.03.008>
- Yen, C.-L.E., Farese, R.V., 2003. MGAT2, a monoacylglycerol acyltransferase expressed in the small intestine. *J Biol Chem* 278, 18532–18537. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301633200>
- Yokoo, K., Yamamoto, Y., Suzuki, T., 2021. Ammonia impairs tight junction barriers by inducing mitochondrial dysfunction in Caco-2 cells. *The FASEB Journal* 35, e21854. <https://doi.org/10.1096/fj.202100758R>
- Yoo, W., Zieba, J.K., Foegeding, N.J., Torres, T.P., Shelton, C.D., Shealy, N.G., Byndloss, A.J., Cevallos, S.A., Gertz, E., Tiffany, C.R., Thomas, J.D., Litvak, Y., Nguyen, H., Olsan, E.E., Bennett, B.J., Rathmell, J.C., Major, A.S., Bäuml, A.J., Byndloss, M.X., 2021. High-fat diet-induced colonocyte dysfunction escalates microbiota-derived trimethylamine N-oxide. *Science* 7.
- Youle, R.J., Blik, A.M. van der, 2012. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science* 337, 1062–1065. <https://doi.org/10.1126/science.1219855>
- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Bautista, L., Franzosi, M.G., Commerford, P., Lang, C.C., Rumboldt, Z., Onen, C.L., Lisheng, L., Tanomsup, S., Wangai, P., Razak, F., Sharma, A.M., Anand, S.S., INTERHEART Study Investigators, 2005. Obesity and the risk of

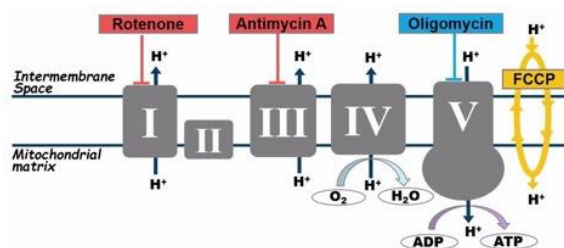
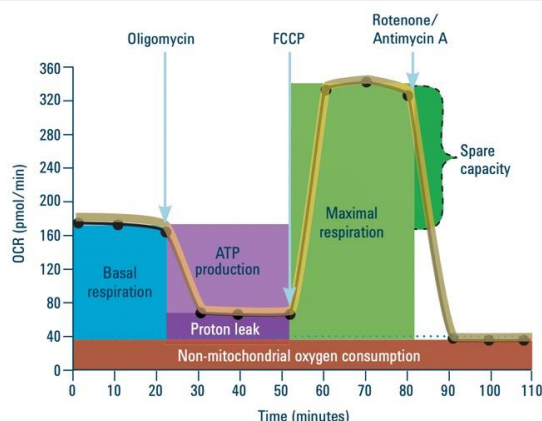
- myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet* 366, 1640–1649. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67663-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67663-5)
- Zembroski, A.S., D'Aquila, T., Buhman, K.K., 2021. Characterization of cytoplasmic lipid droplets in each region of the small intestine of lean and diet-induced obese mice in response to dietary fat. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 321, G75–G86. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00084.2021>
- Zhang, C., Zhang, M., Wang, S., Han, R., Cao, Y., Hua, W., Mao, Y., Zhang, X., Pang, X., Wei, C., Zhao, G., Chen, Y., Zhao, L., 2010. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J* 4, 232–241. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.112>
- Zhang, Y., Bharathi, S.S., Beck, M.E., Goetzman, E.S., 2019. The fatty acid oxidation enzyme long-chain acyl-CoA dehydrogenase can be a source of mitochondrial hydrogen peroxide. *Redox Biology* 26, 101253. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101253>
- Zhao, M., Tang, S., Xin, J., Wei, Y., Liu, D., 2017. Reactive oxygen species induce injury of the intestinal epithelium during hyperoxia. *Int J Mol Med*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3247>
- Zhao, P., Saltiel, A.R., 2020. From overnutrition to liver injury: AMP-activated protein kinase in nonalcoholic fatty liver diseases. *Journal of Biological Chemistry* 295, 12279–12289. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.011356>
- Zhao, R.-Z., Jiang, S., Zhang, L., Yu, Z.-B., 2019. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 44, 3–15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>
- Zhu, J., Lee, B., Buhman, K.K., Cheng, J.-X., 2009. A dynamic, cytoplasmic triacylglycerol pool in enterocytes revealed by ex vivo and in vivo coherent anti-Stokes Raman scattering imaging[S]. *Journal of Lipid Research* 50, 1080–1089. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800555-JLR200>
- Zou, J., Chassaing, B., Singh, V., Pellizzon, M., Ricci, M., Fythe, M., Kumar, M.V., Gewirtz, A.T., 2018. Fiber-mediated nourishment of gut microbiota protects against diet-induced obesity by restoring IL-22-mediated colonic health. *Cell Host Microbe* 23, 41-53.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.11.003>



# ANNEXE

---

## Mesure de la respiration mitochondriale au Seahorse



### Calcul des paramètres de bioénergétique

<b>Respiration non mitochondriale</b>	OCR minimale après l'injection de rotenone et d'antimycine A		
<b>Respiration basale</b>	OCR avant l'injection d'oligomycine	-	Respiration non-mitochondriale
<b>Respiration maximale</b>	OCR maximale après l'injection de FCCP	-	Respiration non-mitochondriale
<b>Fuite de protons</b>	OCR minimale après l'injection oligomycine	-	Respiration non-mitochondriale
<b>Respiration liée à la production ATP</b>	OCR avant l'injection d'oligomycine	-	Mesure mini après oligomycine
<b>Capacité respiratoire de réserve</b>	Respiration maximale	-	Respiration basale
<b>Efficacité de couplage</b>	Respiration liée à la production d'ATP x 100	/	Respiration basale

Paramètre	Définition	Régulation
<b>Respiration basale</b>	Consommation d'oxygène utilisée pour répondre à la demande énergétique de la cellule par phosphorylation oxydative.	Le taux de base de la respiration peut être fixé par la disponibilité et l'oxydation du substrat, et/ou par la fuite de protons.
<b>Respiration liée à la production d'ATP</b>	La diminution du taux de consommation d'oxygène lors de l'injection d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase, représente la fraction de la respiration basale qui est utilisée pour produire de l'ATP.	Le taux de consommation d'oxygène pour produire de l'ATP est dépendant de la demande en ATP de la cellule ainsi que de l'apport en substrats et de leur oxydation.
<b>Fuite de protons</b>	La phosphorylation oxydative est incomplètement couplée, car les protons peuvent migrer dans la matrice mitochondriale sans produire de de l'ATP en passant par l'ATP synthase.	La fuite de protons peut réguler plusieurs processus physiologiques parmi lesquels la production d'ATP mitochondriale. Elle peut aussi être un signe de dommage mitochondrial et de modification de la composition de la membrane mitochondriale interne.
<b>Respiration maximale</b>	En réponse à l'ajout du protonophore FCCP, l'oxydation des substrats et l'activité de la chaîne de respiration augmente afin de maintenir le potentiel de membrane mitochondrial. Le FCCP simule une importante demande énergétique physiologique en stimulant la chaîne respiratoire pour qu'elle fonctionne à sa capacité maximale. Cela entraîne une oxydation rapide des substrats (sucres, lipides et acides aminés) pour répondre à ce défi métabolique.	La respiration maximale dépend de la provision en substrats dans la cellule et de leur oxydation. Cela inclut le transport des substrats à travers les membranes plasmique et mitochondriales ainsi que de l'activité des enzymes impliquées dans les voies métaboliques. Des changements de la respiration maximale peuvent aussi refléter une altération de la biogénèse mitochondriale et/ou de la densité des crêtes et/ou de l'intégrité de la chaîne de respiration mitochondriale.
<b>Capacité respiratoire de réserve</b>	Il s'agit de la différence entre la respiration maximale et la basale et indique la capacité de la cellule à répondre à une forte demande énergétique.	Chacun des facteurs qui détermine les respirations basale et maximale influent sur la capacité respiratoire de réserve.
<b>Respiration non mitochondriale</b>	L'activité mitochondriale étant bloquée par l'ajout des inhibiteurs des complexes I et III, l'OCR mesurée correspond à des processus d'oxydations indépendants de la chaîne de respiration mitochondriale.	La respiration non-mitochondriale correspond à un sous-ensemble d'enzymes cellulaires qui continuent à consommer de l'oxygène indépendamment de la chaîne de respiration mitochondriale. Une augmentation de la respiration non-mitochondriale peut être le signe d'une consommation importante d'oxygène par des oxydases cytoplasmiques (notamment celles de la machinerie antioxydante dans un contexte de production élevée d'espèces actives de l'oxygène).

Sources : Agilent et Divakaruni et al., 2014

## **COMMUNICATIONS AFFICHÉES**

---

# Effect of western diet on mitochondrial function of intestinal epithelial cells in mice

Thomas Guerbette<sup>1</sup>, Manon Brien<sup>1</sup>, Vincent Ciesielski<sup>1</sup>, Régis Janvier<sup>1</sup>, Annaïg Lan<sup>1,2\*</sup>, Gaëlle Boudry<sup>1\*</sup>

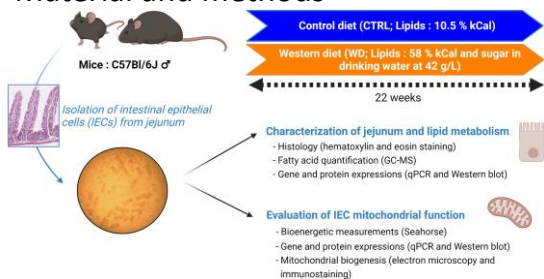
<sup>1</sup>Institut Numecan, INRAE, INSERM, Univ Rennes, <sup>2</sup>UMR PNCA, AgroParisTech, INRAE, Université Paris-Saclay, Paris, France, \* Equal contributions  
Corresponding authors : [thomas.guerbette@inrae.fr](mailto:thomas.guerbette@inrae.fr) ; [annaig.lan@agroparitech.fr](mailto:annaig.lan@agroparitech.fr) ; [gaelle.boudry@inrae.fr](mailto:gaelle.boudry@inrae.fr)

## Introduction and objectives

**Obesity and overweight** are associated with **low-grade inflammation**<sup>1</sup> linked to **alterations of intestinal barrier** and **dysbiosis**<sup>2</sup>. Intestinal homeostasis is supported by the **mitochondrial function of intestinal epithelial cells (IEC)**, as mitochondria are the powerhouse of the cells. They indeed provide the **energy**, in the form of **ATP**, needed for nutrient absorption<sup>3</sup>, epithelial renewal<sup>4</sup>, and maintaining of intestinal barrier<sup>5</sup>. However, consumption of **western diet (WD)**, characterized by high fat and sugar levels, is likely to **impair mitochondrial function**, as shown in hepatocytes<sup>6</sup>.

The aim of this study was to assess whether western diet consumption alters mitochondrial function of mouse jejunal IECs.

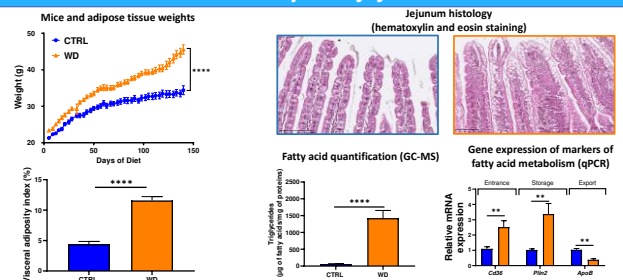
## Material and methods



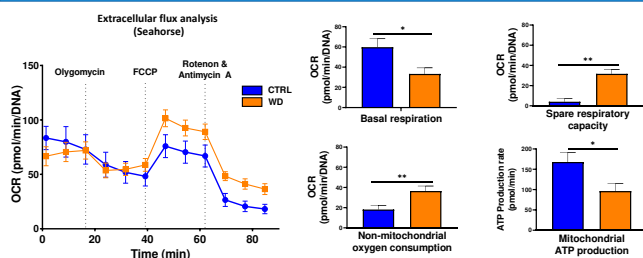
Mann-Whitney test for all data. Data are represented as mean ± SEM. WD vs CTRL: \*: p-value <0.05 \*\*: p-value <0.01; \*\*\*: p-value <0.001; \*\*\*\*: p-value <0.0001

## Results

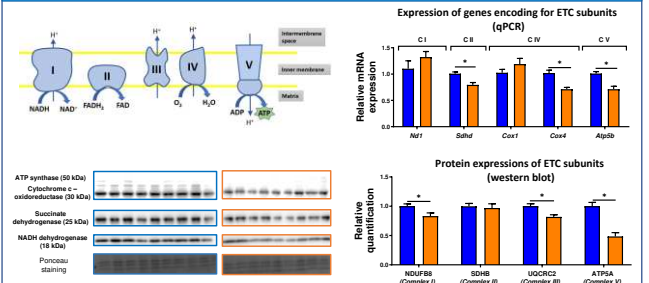
### Diet induced obesity and jejunal steatosis



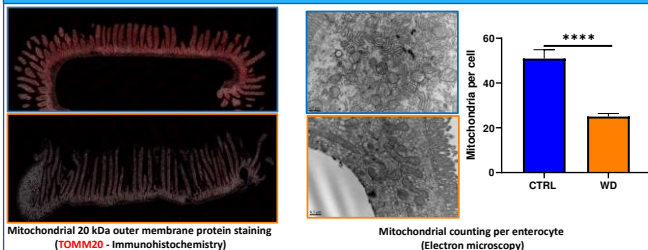
### Mitochondrial function



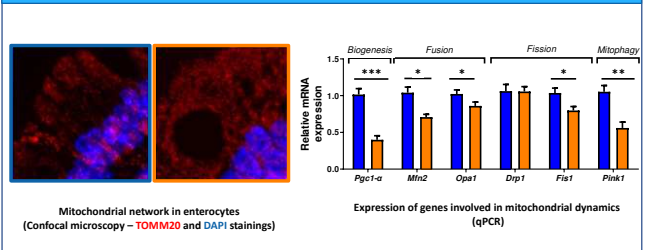
### Electron transport chain (ETC)



### Evaluation of mitochondrial density



### Mitochondrial dynamics



## Conclusion

WD consumption induced a decrease in the number of mitochondria per cell, in the expression of ETC complexes and an alteration of the mitochondrial dynamics. Those defects likely contributed to the important reduction of basal respiration of IECs. Those alterations could finally contribute to the loss of intestinal homeostasis and to the low-grade and systemic inflammation causing metabolic disorders in obese people. Restoring mitochondrial function of IEC in obese individuals could thus restore intestinal homeostasis, thereby limiting the emergence of obesity-associated pathologies.

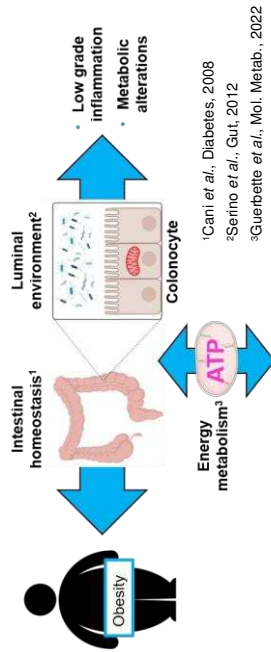
# Title | Changes in colon luminal environment induced mitochondrial dysfunction of epithelial cells in obese mice

**Authors |** T. Guerbet<sup>1</sup>, M. Beaumont<sup>2</sup>, M. Andriamihaja<sup>3</sup>, G. Randuineau<sup>1</sup>, R. Janvier<sup>1</sup>, P. Leroyer<sup>1</sup>, O. Loréal<sup>1</sup>, G. Boudry<sup>1\*</sup>, A. Lan<sup>1,3\*</sup>

**Affiliation |** <sup>1</sup>Institut NuMeCan, Rennes, France; <sup>2</sup>GenPhySE, Castanet-Tolosan, France; <sup>3</sup>UMR PNCA, Palaiseau, France

\*Equal contributions

## Background and Objectives



Loss of intestinal permeability and sensitivity to intestinal inflammation

Does consumption of an obesogenic diet alter mitochondrial function in colonic epithelial cells? If so, by what mechanism(s)?

## Methods



**Male C57Bl/6J**  
**22 weeks**

**Control diet (CTRL, 10% kcal from fat) Or**  
**Diet-Induced Obesity (DIO, 58% fat)**  
**+ drink water with fructose/sucrose**

- Isolation of colon epithelial cells: mitochondrial function (Seahorse), gene expression (qPCR)
- Characterization of colon luminal content: microbiota (16S rRNA) and metabolites (NMR, sulfide quantification)

## Keywords

Obesity ; colon ; mitochondria ; microbiota ; metabolism

## Conflict of Interest

None

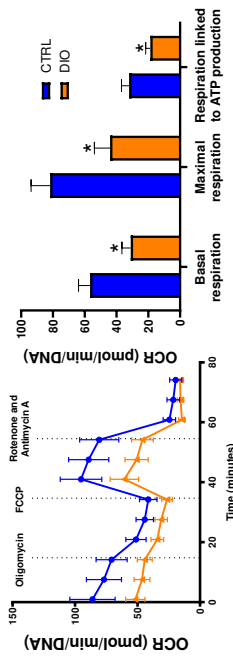


22ND IUNS-ICN INTERNATIONAL CONGRESS OF NUTRITION IN TOKYO, JAPAN  
 DECEMBER 6-11, 2022

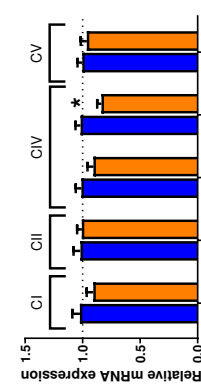
Poster No. PAB(T4)-205

## Results

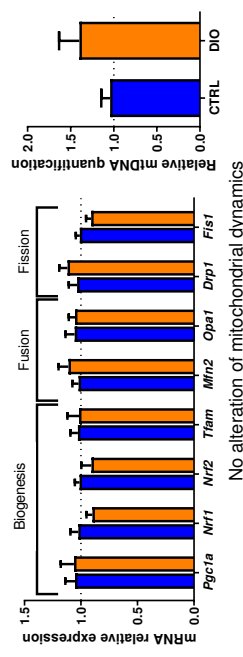
### Mitochondrial function



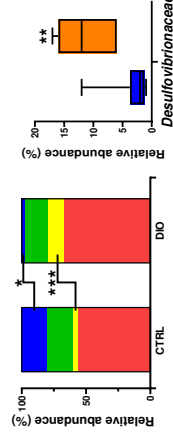
### Electron Transport Chain



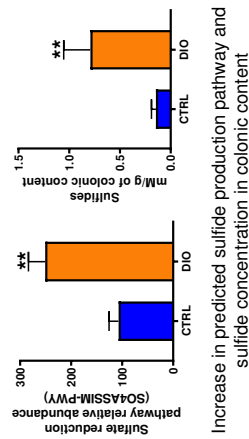
### Mitochondrial dynamics



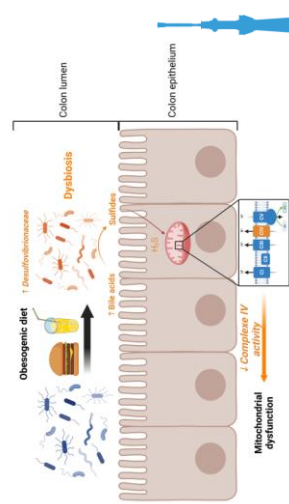
### Microbiota analysis



### Metabolite pathway enrichment and sulfide production



## Conclusions



**Titre :** Fonction mitochondriale des cellules épithéliales intestinales et homéostasie intestinale chez l'obèse

**Mots clés :** Intestin, mitochondrie, métabolisme, lipides, microbiote,

**Résumé :** L'obésité et le surpoids provoquent la mort de 4 millions de personnes chaque année des suites des complications associées. L'inflammation systémique de bas-grade à l'origine des troubles métaboliques observés dans l'obésité a été associée à une dysbiose et des perturbations de l'homéostasie intestinale. Cette dernière est notamment soutenue par la fonction mitochondriale des cellules épithéliales intestinales (CEI) qui pourrait être altérée par la consommation d'un régime riche en lipides, par le biais d'une modification de leur métabolisme lipidique et/ou par la production de métabolites bactériens délétères. L'objectif de cette thèse était de déterminer si la consommation d'un régime obésogène modifie la fonction mitochondriale des CEI. Ce travail montre que la consommation d'un tel régime chez la souris modifie la fonction mitochondriale des cellules épithéliales jéjunales et coliques et augmente la perméabilité intestinale, via des mécanismes différents selon le segment intestinal et l'environnement auquel les CEI sont exposées. Dans le jéjunum, les données *in vivo* montrent que l'accumulation lipidique entérocytaire induite par la consommation d'un régime obésogène perturbe la dynamique mitochondriale, marquée par une diminution du nombre de mitochondries et de l'expression du régulateur de la biogénèse mitochondriale *Pgc1a*, ainsi que la capacité oxydative. Cette altération de la bioénergétique des CEI est associée à une augmentation de la prolifération, à une diminution du phénotype mature des CEI et à une expression plus élevée de *Cldn2*, claudine permissive pouvant contribuer

à l'augmentation de la perméabilité jéjunale. Les données *in vitro* sur la lignée d'entérocytes IPEC-J2 montrent que les altérations de bioénergétique des CEI sont provoquées par le mélange des acides gras du régime à forte concentration, acides gras qui présentent cependant des effets différents selon leur nature. Les acides gras palmitique et stéarique provoquent ainsi une dysfonction mitochondriale et une augmentation de la perméabilité intestinale contrairement aux acides gras laurique et myristique. Dans le côlon, les acides gras du régime ne sont pas absorbés par les cellules épithéliales coliques (CEC), qui par ailleurs ne présentent pas de modification du métabolisme lipidique. En revanche, la consommation d'un régime obésogène augmente l'abondance des Desulfovibrionaceae et les concentrations en sulfides dans l'environnement luminal colique, de façon associée à une augmentation de la perméabilité colique. Le traitement d'organoïdes coliques murins avec des sulfides a permis de valider l'hypothèse de leur impact direct sur la fonction mitochondriale des CEC. De plus, l'exposition aigue de mitochondries isolées de CEC murines à des sulfides provoque une diminution de l'activité du complexe IV de la chaîne de respiration mitochondriale et contribue à expliquer la dysfonction mitochondriale induite par le régime obésogène au niveau colique. L'ensemble de ces travaux indique que la restauration de la fonction mitochondriale des CEI et des CEC, par le biais de composés nutraceutiques innovants, permettrait de rétablir l'homéostasie intestinale et ainsi limiter le développement des complications liées à l'obésité.

**Title :** Mitochondrial function of intestinal epithelial cells and intestinal homeostasis in obesity

**Keywords :** Intestine, mitochondria, metabolism, lipids, microbiota

**Abstract:** Obesity and overweight cause the death of 4 million people each year from associated complications. The low-grade systemic inflammation that causes the metabolic disorders observed in obesity has been associated with dysbiosis and disturbances of intestinal homeostasis. The latter is notably supported by the mitochondrial function of intestinal epithelial cells (IEC) which could be altered by the consumption of a high-fat diet, through altered lipid metabolism of IEC and/or production of deleterious bacterial metabolites. The objective of this work was to determine whether obesogenic diet consumption alters the mitochondrial function of IEC. In mice, we showed that obesogenic diet consumption modifies the mitochondrial function of jejunal and colonic epithelial cells and increases intestinal permeability, through different mechanisms depending upon the intestinal segment and the luminal environment the IEC are exposed to. In the jejunum, the *in vivo* model showed that enterocyte lipid accumulation following diet consumption induces a disruption of mitochondrial dynamics, marked by a decrease in mitochondrial number and in the expression of the mitochondrial biogenesis regulator *Pgc1a*, as well as of mitochondrial oxidative capacity. This alteration in IEC bioenergetics is associated with increased proliferation, decreased mature phenotype of IEC and higher expression of

*Cldn2*, a permissive claudin that may contribute to increase jejunal permeability. Furthermore, *in vitro* data on the IPEC-J2 cell line showed that alterations of IEC bioenergetics are provoked by a mix of dietary fatty acids at high concentration. Yet, fatty acids displayed different effects according to their nature. Palmitic and stearic acids caused mitochondrial dysfunction and increased intestinal permeability contrary to the lauric and myristic acids. In the colon, dietary fatty acids were not stored in colonic epithelial cells (CEC), which did not show any changes in lipid metabolism. In contrast, consumption of an obesogenic diet increased the abundance of Desulfovibrionaceae and concentrations in sulfides in the colonic luminal environment associated with increased colonic permeability. Treatment of murine colonic organoids with sulfides validated the hypothesis of their direct impact on mitochondrial function. Furthermore, acute exposure of isolated mitochondria from murine CEC to sulfides decreased complex IV activity, contributing to explain the mitochondrial dysfunction of CEC induced by obesogenic diet consumption. Taken together, these results indicate that restoring the mitochondrial function of IEC and CEC, through innovative nutraceutical compounds, would allow to recover intestinal homeostasis and limit the development of obesity-related complications.