

Université de Montréal

Mise en évidence du rôle de Sar1b et PLD1 dans le transport et le métabolisme des lipides dans
l'intestin : impact sur la formation et la sécrétion des chylomicrons

Par

Nickolas Auclair

Département de pharmacologie et physiologie, faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur
en pharmacologie

Décembre 2022

© Nickolas Auclair, 2022

Université de Montréal

Unité académique : Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de médecine

Cette thèse intitulée

**Mise en évidence du rôle de Sar1b et PLD1 dans le transport et le métabolisme des lipides
dans l'intestin : impact sur la formation et la sécrétion des chylomicrons**

Présenté par

Nickolas Auclair

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Catherine Martel

Président-rapporteur

Emile Levy

Directeur de recherche

Marc Prentki

Membre du jury

Catherine Mounier

Examineur externe

Résumé

Les chylomicrons (CM) sont des vésicules produites et sécrétées par les entérocytes de l'intestin grêle pour permettre le transport des lipides et des vitamines liposolubles de l'alimentation vers la circulation sanguine. Les mécanismes de transport, de formation et de sécrétion des CM sont très complexes et des défauts dans ces mécanismes peuvent affecter de manière significative la qualité de vie d'un individu. Il est clair qu'il existe des lacunes dans notre compréhension des protéines qui régulent ces processus puisque certains patients atteints de malabsorptions intestinales ne présentent pas de mutations pour des protéines connues et d'autres patients présentant des mutations connues ont des caractéristiques cliniques incompréhensibles. La phospholipase D(PLD) 1 et la Sar1b GTPase sont deux protéines dont le rôle dans l'homéostasie lipidique intestinale reste à mieux préciser. La PLD1 est une enzyme dont le rôle principal est de catalyser la formation d'acide phosphatidique à partir de la phosphatidylcholine. Son produit permet de réguler de nombreux processus cellulaires tels que l'endocytose, l'exocytose et le trafic vésiculaire. Cependant, sa fonction dans l'homéostasie lipidique intestinale était jusqu'à présent inconnue. La Sar1b GTPase, quant à elle, régule la formation des vésicules COPII du réticulum endoplasmique (RE) et sa mutation a été associée à la maladie de rétention du CM (MRC), l'une des trois principales maladies qui provoquent une malabsorption des lipides intestinaux. Cependant, nos connaissances scientifiques sur cette enzyme sont assez limitées et même sa relation de cause à effet reste à définir dans un organisme complexe tel qu'un mammifère.

Par conséquent, l'objectif général de cette thèse est de mettre en évidence le rôle de la PLD1 et de la Sar1b GTPase dans le transport et le métabolisme des lipides intestinaux. Pour atteindre ces objectifs, nous avons soit administré des inhibiteurs de l'activité des différents isoformes de PLD à des cellules entérocytaires Caco2/15, ou utilisé des cellules présentant une diminution de l'expression du gène de PLD1. En outre, pour la Sar1b GTPase, nous avons utilisé des souris présentant soit une mutation ponctuelle, soit une délétion de *Sar1b*.

Nos résultats ont montré que la diminution de l'expression protéique de PLD1 réduit la sécrétion de CM et modifie l'expression protéique de facteurs importants impliqués dans la β -oxydation et

la lipogenèse. En ce qui concerne la Sar1b GTPase, nous avons pu observer que les souris homozygotes avec une mutation ou une délétion de Sar1b ne sont pas viables et sembleraient mourir juste après la naissance étant donné le développement embryonnaire normal de ces souris. Avec les souris hétérozygotes, nous avons quand même pu confirmer la relation de cause à effet entre le gène et la MRC puisque ces souris récapitulaient plusieurs anomalies gastro-intestinales retrouvées chez les patients. En outre, nous avons observé que la gravité des caractéristiques observées chez les souris peut dépendre du régime alimentaire et du génotype. De plus, nous avons observé que les mâles présentant une mutation ponctuelle reflétaient d'avantage la maladie. Par ailleurs, les lipoprotéines de ces animaux avaient une composition chimique et protéique altérée avec une diminution de la quantité d'ApoB-100 dans les fractions de VLDL et LDL, ainsi qu'une augmentation des ratios cholestérol ester/phospholipides et des ratios lipides estérifiés/lipides non-estérifiés. Enfin, nous avons observé que l'altération du gène *Sar1b* dans l'intestin affecte son homéostasie lipidique et modifie l'expression génique et protéique de plusieurs facteurs importants dans le stress du RE, la β -oxydation, la lipogenèse et le métabolisme du cholestérol.

En conclusion, même si cette thèse comporte plusieurs limites, nous avons pu établir le rôle de la PLD1 et de la Sar1b GTPase dans l'homéostasie lipidique. En effet, nous sommes les premiers à avoir démontré que l'altération du gène PLD1 affecte la sécrétion de CM et le métabolisme des lipides dans les cellules intestinales. De plus, nous avons pu confirmer *in vivo* la relation de cause à effet entre la MRC et la protéine Sar1b, tout en ayant une meilleure compréhension de son impact sur le métabolisme des lipides qui peut varier en fonction de différents facteurs tels que le génotype et la diète. Une meilleure compréhension de ces protéines permettrait d'augmenter les cibles possibles pour le développement de traitements ciblant la sécrétion de CM et de mieux comprendre les conséquences que la mutation de ces gènes peut avoir chez les patients.

Mots-clés : Souris transgéniques, Caco-2/15, Intestin, Foie, Lipoprotéines, Syndrome métabolique, Maladie de rétention des chylomicrons, Phospholipase D, Sar1b GTPase, malabsorption intestinale, Dyslipidémies, Métabolisme lipidique, Métabolisme du cholestérol

Abstract

Chylomicrons (CMs) are vesicles produced and secreted by enterocytes in the small intestine to transport lipids and fat-soluble vitamins from the diet into the bloodstream. The mechanisms of CM transport, formation and secretion are very complex and defects in these mechanisms can significantly affect the quality of life of an individual. It is clear that there are gaps in our understanding of the proteins that regulate these processes since some patients with intestinal malabsorptions do not have mutations for known proteins and other patients with known mutations have incomprehensible clinical features. Phospholipase D (PLD) 1 and Sar1b GTPase are two proteins whose role in intestinal lipid homeostasis remains to be better defined. PLD1 is an enzyme whose main role is to catalyze the formation of phosphatidic acid from phosphatidylcholine. Its product regulates many cellular processes such as endocytosis, exocytosis and vesicular trafficking. However, its function in intestinal lipid homeostasis was unknown until now. Sar1b GTPase, on the other hand, regulates COPII vesicle formation in the endoplasmic reticulum (ER) and its mutation has previously been associated with CM retention disease (CRD), one of the three major diseases that cause intestinal lipid malabsorption. However, our scientific knowledge about this enzyme is quite limited and even its cause and effect relationship remains to be defined in a complex organism such as a mammal.

Therefore, the overall goal of this thesis is to highlight the role of PLD1 and the Sar1b GTPase in intestinal lipid transport and metabolism. To achieve these objectives, we either administered inhibitors of the activity of different PLD isoforms to Caco2/15 enterocyte cells or used cells with protein depletion of PLD1. In addition, for the Sar1b GTPase, we used mice with either a point mutation or a deletion of Sar1b.

Our results showed that decreased protein expression of PLD1 reduces CM secretion and alters the protein expression of important factors involved in β -oxidation and lipogenesis. With regard to the Sar1b GTPase, we could observe that homozygous mice with a mutation or deletion of Sar1b are not viable and would appear to die just after birth given the normal embryonic development of these mice. With the heterozygous mice, we were still able to confirm the causal relationship between the gene and CRD since these mice recapitulated several gastrointestinal

abnormalities found in patients. In addition, we observed that the severity of the features observed in the mice may depend on diet and genotype. In addition, we observed that males with a point mutation reflected the most the disease. Also, the lipoproteins of these animals had an altered chemical and protein composition, with a decrease in the amount of ApoB-100 in the VLDL and LDL fractions, as well as an increase in cholesteryl ester/phospholipids ratios and esterified/nonesterified lipid ratios. Finally, we observed that alteration of the Sar1b gene in the gut affects its lipid homeostasis and alters the gene and protein expression of several factors important in ER stress, β -oxidation, lipogenesis, and cholesterol metabolism.

In conclusion, although this thesis has several limitations, we were able to establish the role of PLD1 and the Sar1b GTPase in lipid homeostasis. Indeed, we are the first to have demonstrated that alteration of the PLD1 gene affects CM secretion and lipid metabolism in intestinal cells. Furthermore, we were able to confirm *in vivo* the causal relationship between MRC and the Sar1b protein, while having a better understanding of its impact on lipid metabolism which can vary according to different factors such as genotype and diet. A better understanding of these proteins would increase the possible targets for the development of treatments targeting CM secretion and better understand the consequences that mutation of these genes may have in patients.

Keywords : Transgenic mice, Caco-2/15, Intestine, Liver, Lipoproteins, Metabolic syndrome, Chylomicron retention disease, Phospholipase D, Sar1b GTPase, intestinal malabsorption

Table des matières

Résumé	3
Abstract	5
Table des matières	7
Liste des tableaux	13
Liste des figures	14
Liste des sigles et abréviations	17
Remerciements	23
Chapitre 1 – Introduction	24
Chapitre 2 – Recension des écrits	27
2.1 Description générale du tractus gastro-intestinal	27
2.1.1 Les différentes couches retrouvées dans le tractus gastro-intestinal	28
2.1.2 De la bouche à l'estomac	30
2.1.3 Le petit intestin	31
2.1.4 Le caecum et le gros intestin.....	32
2.2 Importance des lipides au niveau physiologique	32
2.3 Les lipoprotéines et les apolipoprotéines	35
2.3.1 Le chylomicron	36
2.3.2 La lipoprotéine de très basse densité et de densité intermédiaire	38
2.3.3 La lipoprotéine de basse densité	39
2.3.4 La lipoprotéine de haute densité	39
2.3.5 La lipoprotéine (a)	40
2.4 Transport du cholestérol et des acides gras dans les entérocytes du petit intestin	42

2.4.1	Entrée des lipides par diffusion ou par transport actif	42
2.4.1.1	Transport par diffusion	43
2.4.1.2	<i>Cluster of differentiation 36</i>	43
2.4.1.3	<i>Fatty acid transport protein 4</i>	44
2.4.1.4	<i>Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1)</i>	44
2.4.1.5	<i>Scavenger receptor class B type I</i>	45
2.4.1.6	<i>ATP-binding cassette subfamily member 5 and 8</i>	45
2.4.2	Transport des acides gras vers les compartiments cellulaires.....	46
2.4.2.1	<i>Intestinal et liver fatty acid binding proteins</i>	46
2.4.3	Re-estérification des acides gras, du cholestérol et des phospholipides	48
2.4.3.1	Estérification des acides gras	48
2.4.3.2	Estérification du CHOL libre	48
2.4.3.3	Estérification des lysophospholipides.....	49
2.4.4	Formation et hydrolyse des gouttelettes lipidiques.....	50
2.4.4.1	Informations générales sur les gouttelettes lipidiques	50
2.4.4.2	Grossissement des gouttelettes lipidiques	50
2.4.4.3	Hydrolyse des gouttelettes lipidiques.....	51
2.4.5	Formation du pré-chylomicron	52
2.4.5.1	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>	53
2.4.5.2	Apolipoprotéine B-48	53
2.4.5.3	Apolipoprotéine A-4.....	54
2.4.6	Mobilité du pré-chylomicron à partir du RE vers le Golgi.....	55
2.4.6.1	Le <i>Coat protein complexe II</i> et le Sar1b GTPase.....	56

2.4.6.2	Autres protéines nécessaires à la sortie du pré-chylomicron hors du réticulum endoplasmique.....	58
2.4.7	Entrée du pré-chylomicron dans le Golgi et sa maturation en chylomicron.....	59
2.4.7.1	Le complexe <i>N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>	60
2.4.7.2	Maturation du chylomicron dans le Golgi.....	60
2.4.8	Exocytose des chylomicrons du Golgi pour être dirigés vers la circulation sanguine ..	61
2.4.9	Autres entrées et sorties du CHOL dans la cellule intestinale	64
2.4.9.1	Formation du HDL	64
2.4.9.2	<i>Excrétion transintestinale du cholestérol</i>	65
2.5	Le chylomicron dans la circulation sanguine	67
2.6	Facteurs régulant la sécrétion des chylomicrons.....	68
2.6.1	Les facteurs nutritionnels.....	68
2.6.2	L'insuline, la résistance à l'insuline et les acides gras libres.....	69
2.6.3	Les peptides gastro-intestinaux	70
2.6.4	Le sexe	72
2.6.5	Le microbiote intestinal.....	73
2.7	Comparaison de la formation et la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides par le foie et l'intestin	75
2.8	Les lipoprotéines plasmatiques et leur importance dans la régulation des risques cardiovasculaires.....	77
2.8.1	Le chylomicron et les maladies cardiovasculaires	77
2.8.2	La lipoprotéine de très basse densité et de densité intermédiaire, avec les maladies cardiovasculaires.....	79
2.8.3	La lipoprotéine de basse densité et les maladies cardiovasculaires.....	80
2.8.4	La lipoprotéine de haute densité et les maladies cardiovasculaires	81

2.8.5 La lipoprotéine (a) et les maladies cardiovasculaires	82
2.9 Catabolisme et biosynthèse des lipides du petit intestin	82
2.9.1 La lipogenèse <i>de novo</i>	83
2.9.2 La β -oxydation des acides gras.....	84
2.9.3 Formation <i>de novo</i> du cholestérol	86
2.10 Aspects cliniques des principales mutations causant des malabsorptions intestinales des lipides : causes, conséquences et traitements.....	89
2.10.1 L'hypobetalipoprotéinémie familiale.....	89
2.10.2 L'abétalipoprotéinémie.....	91
2.10.3 La maladie de rétention des chylomicrons	92
2.11 La phospholipase D (PLD).....	97
2.11.1 Informations générales sur la phospholipase D.....	98
2.10.1.1 Propriétés physicochimiques et biologiques de la phospholipase D.....	98
2.10.1.2 Régulation de l'activité des deux isoformes de PLD	99
2.10.1.3 Rôle de la phospholipase D dans le trafic vésiculaire	102
2.11.2 Rôles de la phospholipase D dans le développement des maladies cardiovasculaires	105
2.11.2.1 La résistance à l'insuline et le diabète de type II	105
2.11.2.2 Les dyslipidémies.....	106
2.11.2.3 L'hypertension.....	107
Chapitre 3 – Problématique, hypothèses et objectifs	110
3.1 Problématique.....	110
3.1.1 L'enzyme Phospholipase D.....	110
3.1.2 Le Sar1b GTPase et la maladie de rétention des chylomicrons	111

3.2 Hypothèses.....	111
3.2.1 La phospholipase D est impliquée dans l'homéostasie lipidique du petit intestin. ...	112
3.2.2 L'altération du gène <i>SARA2</i> dans un modèle de souris récapitule les caractéristiques retrouvées chez les patients atteints de la maladie de rétention des chylomicrons	113
3.2.3 Une altération du gène <i>SARA2</i> altère la composition des lipoprotéines ainsi que les mécanismes impliqués dans l'homéostasie lipidique du petit intestin	114
3.3 Objectifs	114
3.3.1 Objectifs 1 : La phospholipase D	114
3.3.2 Objectifs 2 : Le Sar1b GTPase et la maladie de rétention des chylomicrons.....	115
Chapitre 4 – Méthodologie générale	116
4.1 La phospholipase D	116
4.1.1 Culture cellulaire	116
4.1.2 Études de transestérification et de sécrétion des CM.....	117
4.1.3 Études du métabolisme lipidique.....	117
4.2 Le Sar1b GTPase et la maladie de rétention des chylomicrons	118
4.2.1 Le développement embryonnaire des souris avec une altération de Sar1b	119
4.2.2 Caractérisation des animaux avec une altération de Sar1b et détermination de la relation cause-effet.....	120
4.2.3 Le métabolisme du cholestérol et la composition des lipoprotéines chez des souris avec une altération de Sar1b.....	121
Chapitre 5 – Résultats	123
5.1 Article 1	123
5.1.1 MAIN TEXT OF THE ARTICLE	124
5.1.2 FIGURES	153
5.2 Article 2	161

5.2.1 MAIN TEXT OF THE ARTICLE	162
5.2.2 TABLES	185
5.2.3 FIGURES	186
5.2.4 SUPPLEMENTARY DATA	193
5.5 Article 3	197
5.3.1 MAIN TEXT OF THE ARTICLE	198
5.3.2 TABLES	220
5.3.3 FIGURES	223
5.3.4 SUPPLEMENTARY DATA	232
Chapitre 6 – Discussion	239
6.1 La phospholipase D1	240
6.2 Le Sar1b GTPase	244
Chapitre 7 – Conclusion et perspectives	252
Références bibliographiques	255
Annexes	312
Article 1 de l’annexe	312
5.1.1 MAIN TEXT OF THE ARTICLE	313
5.1.2 TABLES	366
5.1.3 FIGURES	395
Article 2 de l’annexe	401
5.3.1 MAIN TEXT OF THE ARTICLE	402
5.3.2 FIGURES	430
5.3.3 SUPPLEMENTARY DATA	434

Liste des tableaux

Tableau 1. –	Similarités et différences entre l'hypobétalipoprotéinémie, l'abétalipoprotéinémie et la maladie de rétention des chylomicrons	94
---------------------	---	-----------

Liste des figures

Figure 1. – Anatomie du tractus gastro-intestinal chez l'humain.....	28
Figure 2. – Les différentes couches du tractus gastro-intestinal.	29
Figure 3. – Exemple de structures chimiques des différents groupes de lipides	35
Figure 4. – Taille et composition en protéines des différentes lipoprotéines retrouvées dans la circulation sanguine.....	36
Figure 5. – Destin des différentes lipoprotéines dans la circulation sanguine.....	41
Figure 6. – Entrée des lipides dans l'entérocyte et transport vers le réticulum endoplasmique	47
Figure 7. – Estérification des lipides au niveau du réticulum endoplasmique	49
Figure 8. – Cycle de vie de la gouttelette lipidique	52
Figure 9. – Formation du pré-chylomicron dans le réticulum endoplasmique	55
Figure 10. – Formation du <i>pre-chylomicron transport vesicle</i>	59
Figure 11. – Transport du chylomicron provenant réticulum endoplasmique vers les vaisseaux lymphatiques	63
Figure 12. – L'excrétion transintestinale du cholestérol et le processus de formation des HDL	66
Figure 13. – Facteurs externes pouvant réguler la formation et la sécrétion des chylomicrons	74
Figure 14. – Catabolisme et biosynthèse des lipides dans les entérocytes de l'intestin	88
Figure 15. – Rôles des domaines qui composent la structure de la phospholipase D1 et de la phospholipase D2	100
Figure 16. – Caractéristiques des partenaires de liaison des phospholipases D1 et D2, ainsi que de l'acide phosphatidique.....	102
Figure 17. – Rôles de la phospholipase D1 dans la formation de vésicules du réticulum endoplasmique et du Golgi, ainsi que ces rôles possibles dans le transport des chylomicrons	104
Figure 18. – Rôle de PLD1 et PLD2 dans le développement de maladies cardiaques	108

Figure 19. – Schéma du processus expérimental avec les Caco-2/15 pour étudier la phospholipase D	118
Figure 20. – Schéma du processus expérimental pour étudier le développement embryonnaire	119
Figure 21. – Schéma du processus expérimental permettant de caractériser les souris présentant une altération du gène <i>Sar1b</i>	121
Figure 22. – Schéma expérimentale permettant d’analyser la composition des lipoprotéines et le métabolisme du cholestérol chez les souris avec une altération de <i>Sar1b</i>	122

Liste des sigles et abréviations

ABCA1 : *ATP-binding cassette transporter A1*

ABCG5/G8 : *ATP-binding cassette subfamily member 5 and 8*

ABL : Abétalipoprotéinémie

ACAD : acyl-CoA désydrégénases

ACADL : acyl-CoA désydrégénases à longue chaîne

ACADVL : acyl-CoA désydrégénases à très grande chaîne

ACAT2 : Acyl-CoA cholestérol acyltransférase 2

ACC : Acétyl-CoA carboxylase

ACSL : Acyl-CoA synthétase à longue chaîne

ACVLS : Acyl-CoA synthétase à très longue chaîne

AG : Acides gras

AMPK : *AMP activated protein kinase*

ARFRP1 : *GTPase ADP-ribosylation factor-related protein-1*

ATGL : *Adipose triglyceride lipase*

Apo : Apolipoprotéine

ARF : *ADP-ribosylation factor*

ATF6 : *Activating transcription factor 6*

CD36 : *Cluster of differentiation 36*

CETP : *Cholesterol ester transfer protein*

CGI-58 : *Comparative gene identification-58*

CHOL : Cholestérol

COPII : *Coat protein complex II*

DG : Diglycérides

DGAT : Diacylglycérol acyltransférase

CM : Chylomicron

DENND5B : *Protéine DENN domain containing 5B*

DPP4 : *dipeptidyl peptidase IV*

FAS : *Fatty acid synthase*

FATP4 : *Fatty acid transport protein 4*

Flt1 : Vascular endothelial growth factor receptor 1

GAP : *GTPase-accelerating protein*

GEF : *Guanine nucleotide exchange factors*

GDP : Guanine diphosphate

GLP : *Glucagon-like peptide*

GPR78 : *G Protein-Coupled Receptor 78*

GTL : Gouttelette lipidique

GTP : Guanine triphosphate

HBLF : Hypobétalipoprotéinémie familiale

HDL : Lipoprotéines de haute densité

HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A

HMG-CoAr : HMG-CoA réductase

HSL : Lipase hormonosensible

IDL : Lipoprotéines de densité intermédiaires

IRE1 : *Inositol-requiring enzyme 1*

I-FABP : *Intestinal fatty acid-binding protein*

KD : Knockdown

LCFA : Acides gras à chaînes longues

LDL : Lipoprotéine de basse densité

LDLr : Récepteur de la lipoprotéine de basse densité

L-FABP : *Liver fatty acid-binding protein*

LP(a) : Lipoprotéine (a)

LPCAT : Lysophosphatidylcholine acyltransférase

LPL : Lipoprotéine lipase

LysoPC : Lysophosphatidylcholine

MCFA : Acides gras à chaînes moyennes

MG : Monoacylglycérol

MGAT : Monoacylglycérol acyltransférase

MGL : monoacylglycérol lipase

MRC : Maladie de rétention des chylomicrons

mTOR : *Mechanistic target of rapamicin*

MTTP : *Microsomal triglyceride transfer protein*

NPC1L1 : *Niemann-Pick C1-like 1*

Nrp1 : Neuropiline 1

OxS : Stress oxydatif

PA : Acide phosphatidique

PC : Phosphatidylcholine

PCSK9 : Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PERK : Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase

PCTV : Pre-chylomicron transport vesicle

PGC1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha

PLIN : Périlipine

PPAR α : Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α)

RCT : Reverse cholesterol transport

RE : Réticulum endoplasmique

Sar1b : SAR1-ADP ribosylation factor, type 2

SCD : Stéaroyl CoA désaturase

SR-B1 : Scavenger receptor class B type 1

PL : Phospholipides

PLD : Phospholipase D

RCT : Transport de cholestérol inverse

TANGO1 : Transport and Golgi organization protein 1

TG : Triglycérides

TICE : Transintestinal cholesterol excretion

SCFA : Acides gras à chaînes courtes

SNARE : N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor

SREBP : *Sterol regulatory element binding protein*

VAMP7 : *Vesicle-associated membrane protein 7*

VEGFR : Récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VLCFA : Acides gras à chaînes très longues

VLDL : Lipoprotéines de très basse densité

VTV : Vésicule de transport du VLDL

Aux étoiles qui m'éclairent dans les moments sombres

Remerciements

Avant toute chose, je voudrais remercier l'ensemble des parties prenantes qui ont aidé à l'accomplissement de cette thèse.

Premièrement, je voudrais évidemment remercier le Dr Émile Levy de m'avoir donné l'opportunité de faire mon doctorat dans son laboratoire. Grâce à lui, j'ai pu améliorer radicalement mon expertise en laboratoire, ma façon de faire des présentations scientifiques et mon raisonnement scientifique en général.

De plus, je voudrais remercier l'associé de recherche de notre laboratoire, Alain Sané. C'est principalement grâce à lui que j'ai pu compléter cette thèse puisqu'il m'a énormément soutenu tout le long de ce doctorat en m'apportant de nombreux coups de main. Par exemple, le développement des cellules phospholipase D1 et des souris Sar1b, aide à la prise de décisions dans la gestion des colonies de souris, aide lors des sacrifices des souris, génotypage de la majorité des souris qu'on a eues, aide pour certaines expériences, etc.

En outre, il ne faut pas oublier l'ensemble de mes collègues de laboratoire (Mathilde, Francis, Mireille et Léna) qui m'ont aussi grandement aidé à l'accomplissement de ce gros travail. Un gros merci de m'avoir aidé dans tous les sacrifices d'animaux que j'ai eu besoin de faire. Merci aussi à Nour d'avoir fait l'intégration de tous les tissus pour l'analyse des acides gras. J'espère que tu te plais à Québec !

Également merci à Natacha Patey et Catherine Fallet-Bianco d'avoir fait de nombreuses analyses microscopiques de mes tissus ainsi que Zola pour l'aide dans la publication des articles.

Finalement, je voudrais évidemment remercier ma famille ainsi que mes amis, qui m'ont été d'un soutien énorme tout le long de ce doctorat. Il est vrai que pendant cette période, il y a eu des hauts et des bas, mais vous étiez toujours là pour me soutenir. Merci !

Chapitre 1 – Introduction

Le tractus gastro-intestinal est un organe dont le rôle, autrefois considéré comme limité à la digestion et à l'absorption des aliments, s'avère aujourd'hui doté d'une multitude de peptides gastro-intestinaux, d'une robuste défense immunitaire et de la flore intestinale, tous contribuant à l'homéostasie à la fois locale et systémique. À lui seul, le microbiote intestinal est l'écosystème qui assure une protection contre les maladies métaboliques, y compris l'obésité, l'insulinorésistance, la stéatose hépatique non alcoolique, le diabète et l'athérosclérose (1). L'objectif central de cette thèse consiste à traiter les mécanismes de formation et de sécrétion des chylomicrons (CM) par les cellules absorbatives de l'intestin grêle, connues sous le nom d'entérocytes. Comme il est déjà établi, les CM assurent le transport des lipides alimentaires et les vitamines liposolubles à la circulation sanguine. On s'est vite rendu compte que les mécanismes gouvernant la biogenèse des CM sont très complexes, et que le défaut d'une seule de ses protéines clés conduit à des désordres graves avec des répercussions qui entravent la santé et la qualité de vie humaine. Comme exemple, mentionnons que les défauts génétiques de formation des CM conduisent à des syndromes de malabsorption, et leur production excessive aboutit à des maladies cardiovasculaires (2, 3). Les projets de recherche qui composent cette thèse sont principalement reliés aux mécanismes défectueux de formation et de sécrétion des CM en réponse à des défauts de facteurs critiques : le *SAR1-ADP ribosylation factor, type 2* (*Sar1b*) GTPase et la phospholipase D (PLD) 1.

La *Sar1b* GTPase est une protéine essentielle à la formation des vésicules du *coat protein complexe II* (COPII) pour le transport des lipides et des protéines du réticulum endoplasmique (RE) vers le Golgi (4). La mutation du gène *Sar1b* est associée à une maladie génétique extrêmement rare appelée maladie de rétention des chylomicrons (MRC) (5). Les patients atteints de cette maladie ne peuvent sécréter aucun CM dans la circulation sanguine, ce qui entraîne de nombreux problèmes tels que des carences en acides gras (AG) essentiels et en vitamines liposolubles. Nos connaissances scientifiques sur cette maladie doivent encore être approfondies et plusieurs aspects, tels que la relation de "cause à effet" entre la présence d'une malabsorption intestinale et la présence d'un dysfonctionnement du *Sar1b* GTPase, doivent encore être clarifiés.

C'est pourquoi, en utilisant des animaux et des cellules transgéniques, nous avons voulu confirmer cette relation "cause-effet" et élucider bon nombre de questions.

La deuxième protéine d'intérêt est appelée phospholipase D (PLD). Cette enzyme, composée de deux isoformes principales, PLD1 et PLD2, joue un rôle important dans de nombreuses voies de signalisation (6). En effet, l'acide phosphatidique (PA) obtenu suite à l'hydrolyse de la phosphatidylcholine (PC) par la PLD est un lipide de signalisation qui peut se lier à de nombreux récepteurs et protéines pour leur activation. En particulier, il a été montré que ce lipide peut agir dans l'exocytose, l'endocytose et le trafic des vésicules, des étapes très importantes dans la formation des lipoprotéines (7-9). De plus, il a été publié que l'inhibition de l'activité enzymatique de la PLD diminue la sécrétion des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) par le foie (10). Cependant, cet article n'a pas fait de distinction entre les 2 isoformes puisqu'il a utilisé du butanol comme inhibiteur. La PLD1 est fortement présente dans le Golgi et peut réguler la sortie des vésicules de cet organite, ce qui suggère qu'elle pourrait favoriser la sortie des lipoprotéines après maturation (7, 11-13). Pour ces différentes raisons, nous suggérons que la PLD, et plus particulièrement la PLD1, pourrait jouer un rôle dans la sécrétion et la formation de CM, ce qui n'est pas connu à ce jour. À cette fin, nous avons effectué des essais *in vitro* pour stimuler la sécrétion de CM par des cellules intestinales Caco-2/15 avec une altération de PLD1 ou en présence d'inhibiteurs de l'activité de ces 2 isoformes.

Le contenu de cette thèse sera divisé comme suit :

1. Une recension des écrits décrivant, entre autres, le tractus gastro-intestinal, les mécanismes de formation et de sécrétion des CM, le métabolisme lipidique intestinale, la composition des lipoprotéines, l'impact des CM et des autres lipoprotéines dans les maladies cardiovasculaires ainsi que les principales maladies engendrant des malabsorptions intestinales.
2. Une description détaillée de la problématique, des hypothèses et des objectifs de cette thèse.
3. Une méthodologie générale des expériences qui ont été faites
4. L'ensemble des données qui ont été obtenus dans les projets composant cette thèse. Ces résultats sont présentés sous forme de plusieurs articles scientifiques.
5. Une discussion générale de l'ensemble des résultats présentés.
6. Finalement, une conclusion des résultats comportant des perspectives à cette thèse.

Chapitre 2 – Recension des écrits

2.1 Description générale du tractus gastro-intestinal

Le tractus gastro-intestinal comprend les organes nécessaires à l'assimilation des aliments. C'est en fait ce système qui permet aux différents micro et macronutriments de passer dans la circulation sanguine. Ses principales activités sont : la mastication, la déglutition, la digestion, l'absorption, le péristaltisme et la défécation. L'absorption normale de ces différents composés représente évidemment une étape cruciale pour éviter toute déficience à notre organisme et assurer ainsi une qualité de vie optimale. Une bonne compréhension des mécanismes d'absorption ainsi que des facteurs qui les régissent est essentielle pour approcher les avenues thérapeutiques en cas de dysfonctions. Dans cette section, je vais tout d'abord présenter et décrire brièvement la structure du tractus gastro-intestinal tout en précisant le rôle de ses principaux composants, à savoir la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (petit intestin), le cæcum et le gros intestin (côlon). La distribution de ces derniers est illustrée dans la [Figure 1](#).

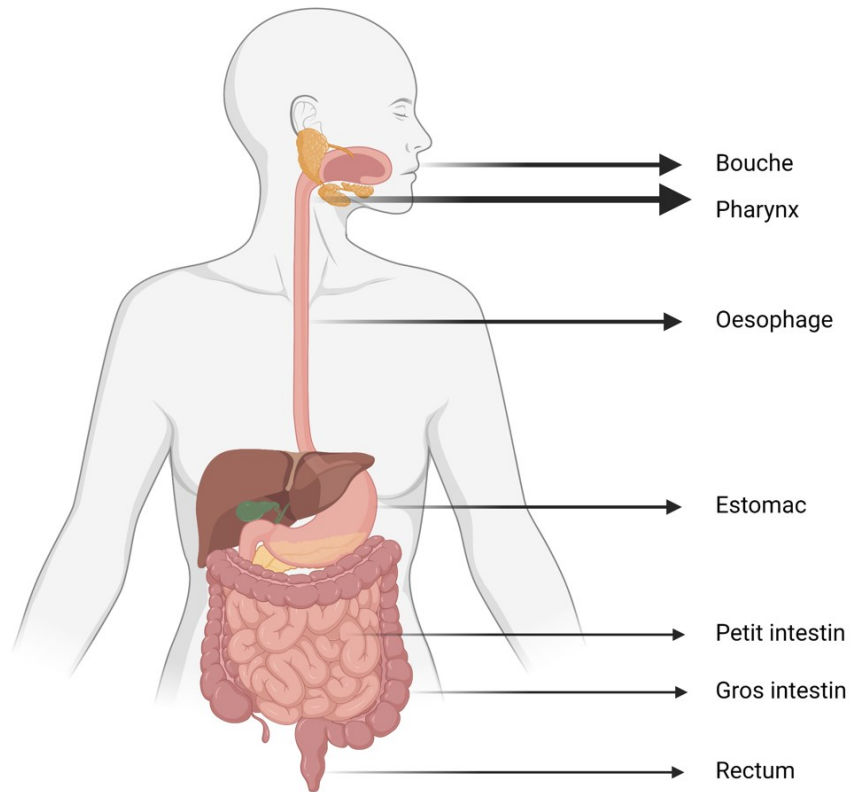


Figure 1. – Anatomie du tractus gastro-intestinal chez l’humain.

Voici une illustration des différents organes qui se retrouvent dans le tractus gastro-intestinal, de la bouche jusqu’à l’anus. Cette illustration a été créé avec BioRender.com.

2.1.1 Les différentes couches retrouvées dans le tractus gastro-intestinal

L’intestin est composé de 4 couches différentes : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse externe et l’adventice ou la séreuse. En outre, dans la muqueuse, on trouve trois autres couches: l’épithélium, la *lamina propria* et la *lamina muscuralis mucosae*. Ces couches sont illustrées à la [Figure 2](#).

La muqueuse est la couche la plus proche de la lumière intestinale, jouant différents rôles. Elle est formée de cellules de Goblet sécrétant du mucus, des cellules de Paneth libérant ses enzymes ou d’autres protéines pour combattre les infections et protéger l’épithélium, les cellules entéroendocrines qui forment les peptides gastro-intestinaux, et les entérocytes pour les besoins d’absorption des aliments. Juste après l’épithélium, on trouve la *lamia propria*, composée de tissu conjonctif, en plus de vaisseaux sanguins et chylifères qui transportent les produits de la digestion

vers la circulation. La couche la plus éloignée de la lumière intestinale est la *lamina muscralis mucosae*, formée de muscles lisses (14).

La sous-muqueuse est une couche de tissu conjonctif située à l'extérieur de la muqueuse qui la soutient et contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des glandes sous-muqueuses et le plexus sous-muqueux. La musculature externe, qui suit immédiatement, est constituée de muscles qui jouent des rôles différents selon la région du tractus (14).

La région la plus éloignée de la lumière intestinale est le tissu conjonctif adventice ou séreuse. Si les tissus sont reliés aux autres tissus environnants, il s'agit de l'adventice, et si les tissus sont adjacents à la région péritonéale, il s'agit de la séreuse. Tous deux ont principalement un rôle de soutien (14).

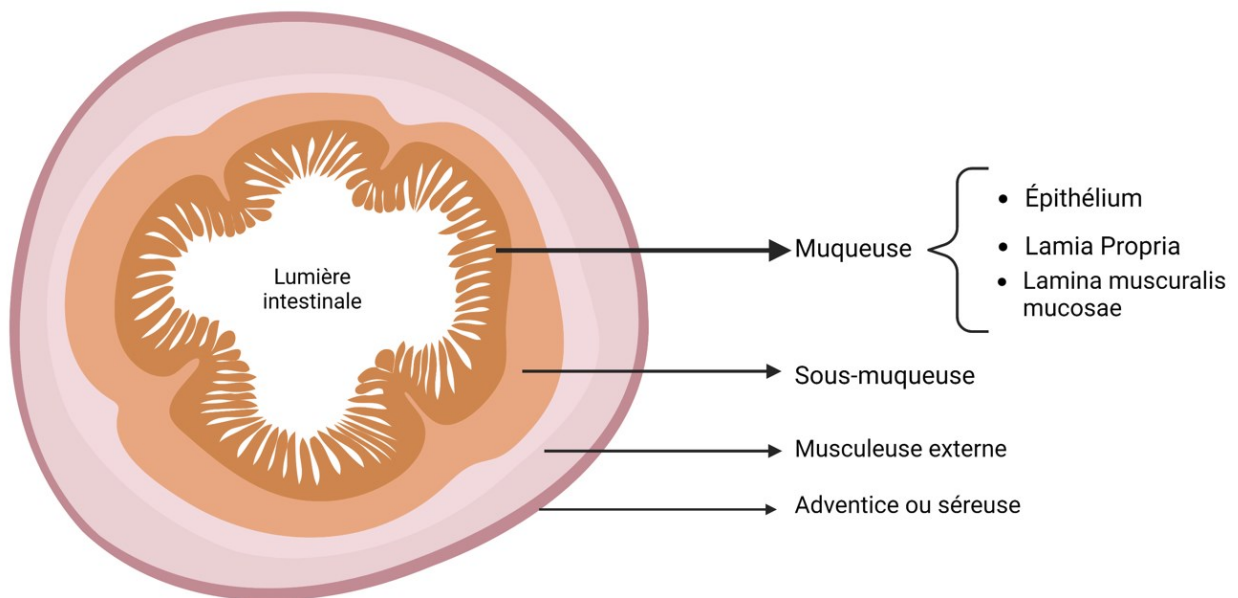


Figure 2. – Les différentes couches du tractus gastro-intestinal.

Les éléments du tractus gastro-intestinal sont composés de 4 couches distinctes. On y retrouve de la lumière intestinale vers l'extérieur : la muqueuse, la sous-muqueuse la musculature externe et l'adventice ou séreuse. Cette illustration a été créé avec BioRender.com.

2.1.2 De la bouche à l'estomac

Le premier composant est la bouche qui permet l'ingestion des aliments tout en étant le principal responsable de la mastication. Les aliments sont mélangés à la salive produite par les glandes salivaires. La salive contient des enzymes qui permettent la dégradation des lipides et des glucides (15). Parmi ces enzymes se trouve l'amylase salivaire qui décompose les glucides, la mucine et d'autres protéines du mucus qui agit comme un lubrifiant, mais également comme une ligne de défense contre les agressions biologiques et chimiques. La langue, quant à elle, sécrète des enzymes appelées lipases linguales, qui fonctionnent à un pH très bas (3,5 à 6) et décomposent principalement les triglycérides (TG) (16). Une fois que les aliments ont une texture appropriée, leur déglutition se fait dans le pharynx. Le pharynx est simplement un conduit qui est relié à un muscle extensible appelé œsophage. Il est important de noter que le pharynx joue également un rôle dans le système respiratoire. En effet, sa partie supérieure est reliée à la bouche et au nez, tandis que sa partie inférieure est reliée au larynx et à l'œsophage. Le rôle du pharynx et de l'œsophage est de transférer les aliments de la bouche vers l'estomac. En fait, il n'y a pas de réelle absorption ou digestion qui a lieu dans ces deux compartiments (15). Afin de pouvoir déplacer les aliments dans l'estomac, les muscles de l'œsophage vont effectuer des contractions appelées péristaltisme (16).

L'estomac est un organe composé de 3 couches musculaires qui permet de commencer la digestion des aliments, de les stocker et de les faire macérer. Lors du développement de médicaments, il est important de bien choisir le type d'animal car les enzymes et le temps d'exposition peuvent varier d'un animal à l'autre (17). Chez l'homme, l'estomac est composé d'un compartiment sécrétoire avec plusieurs types de cellules qui sécrètent de l'acide, du mucus et des enzymes. Il peut sécréter en une journée jusqu'à 1,5 à 2L de sécrétion gastrique, principalement composée d'acide chlorhydrique pour maintenir un pH entre 1,5 et 2. Ses sécrétions vont se mélanger pendant plusieurs heures avec les aliments, dégradant physiquement et chimiquement les aliments, et dénaturant ainsi les protéines. Le composé final de l'intestin est appelé chyme qui passe par le sphincter pylorique dans l'intestin grêle. Le sphincter contrôle l'entrée du chyme dans le petit intestin (15).

2.1.3 Le petit intestin

Après la réception du chyme par l'estomac, l'intestin grêle composé de 3 segments (le duodénum, le jéjunum et l'iléon) poursuit la digestion des aliments. D'ailleurs, l'absorption des nutriments est maximale dans ces régions intestinales comparativement aux compartiments précédents. Il est important de mentionner que l'élément facilitateur de cette absorption intense au niveau de l'intestin grêle est la présence d'innombrables villosités, elles-mêmes munies de microvillosités, amplifiant ainsi la surface d'absorption (16). Chaque villosité possède une artère, une veine et un canal lymphatique qui favorisent l'absorption. Quant aux microvillosités, elles forment la bordure en brosse, composée d'une multitude d'enzymes qui aident dans la digestion des aliments (14). Il en résulte un impressionnant réseau de capillaires qui transportent les nutriments vers le système porte hépatique et un réseau de capillaires lymphatiques qui transportent les CM vers la circulation veineuse (16). Le duodénum est le segment qui reçoit le chyme de l'estomac. Il accueille également les sécrétions provenant du pancréas et du foie. Si les glandes exocrines du pancréas sécrètent divers types d'enzymes permettant de digérer les aliments, le foie de son côté produit la bile qui est stockée dans la vésicule biliaire. La présence de certains AG au niveau du pylore provoque la contraction de la vésicule biliaire qui relâche conséquemment la bile vers l'intestin. La fonction de la bile est d'émulsionner les lipides hydrophobes, incluant les AG libres et le cholestérol (CHOL) libre pour aboutir à la formation de micelles (16).

Le 2e segment est le jéjunum qui est séparé du duodénum par le ligament de Trietz. Il poursuit la digestion, surtout des aliments lipidiques, grâce à sa haute capacité de formation des CM. L'iléon est le dernier segment favorisant le retour des acides biliaires. Il possède une valve qui régule l'entrée des aliments dans le cæcum qui est situé juste avant le gros intestin (16).

Comme il est mentionné auparavant, l'intestin grêle est composé de plusieurs types de cellules. La présence des cellules souches permet la différenciation et le renouvellement de la population entérocytaire tous les 4 à 7 jours. Il y a également renouvellement des cellules de Paneth et des cellules de Goblet (18).

2.1.4 Le caecum et le gros intestin

Le caecum transporte les sels et autres produits liquides qui n'ont pas été absorbés suite à la digestion complète des aliments. Dans le caecum ainsi que dans le reste du gros intestin, le chyme est mélangé à la flore bactérienne. Dans ces compartiments, c'est la flore bactérienne qui continue à décomposer les aliments digérés produisant plusieurs composés qui seront absorbés. De plus, le gros intestin absorbe de l'eau et des électrolytes, contribuant ainsi à la production de selles solides (15). Grâce à des mouvements péristaltiques, les fèces sont finalement dirigées vers le rectum pour être stockées avant la défécation (16).

2.2 Importance des lipides au niveau physiologique

Avant de commencer le cœur de cette revue de littérature, il est important de comprendre l'importance des lipides au niveau physiologique. En effet, outre leurs rôles physiologiques bien connus et néfastes dans les situations pathophysiologiques telles que le développement de l'athérosclérose, ils ont d'autres fonctions. Dans l'alimentation, plus de 90% des lipides alimentaires sont constitués de TG, suivis des autres classes minoritaires, les phospholipides (PL) et le CHOL. Dans cette thèse, je me concentrerai principalement sur les lipides qui proviennent du régime alimentaire, ce que l'on appelle la voie exogène (19). Cependant, certaines voies endogènes telles que la lipogenèse *de novo* et la formation *de novo* du CHOL seront légèrement discutées.

Les TG et les PL sont formés du glycérol et des AG qui sont simplement des chaînes de carbone avec un groupe carboxyle (COOH) à leur extrémité. La taille des chaînes de carbone et le nombre de désaturations (double liaison entre les carbones) varient d'un AG à l'autre. Au niveau du nombre de saturation, on y retrouve des AG saturés (sans double liaison), des AG monoinsaturés (avec une double liaison) et des AG polyinsaturés (plusieurs doubles liaisons). Quant à la taille des chaînes de carbones, on y retrouve des AG à chaîne courte (SCFA) (2 à 4 carbones), à chaîne moyenne (MCFA) (5 à 11 carbones), à chaîne longue (LCFA) (12 à 21 carbones) et à chaîne très longue (VLCFA) (plus de 22 carbones). Les TG sont composés de trois AG qui se lient à une molécule de glycérol. Les AG qui composent les TG dépendent de leur source. En effet, les AG de source végétale souvent utilisés dans notre alimentation sont majoritairement composés de LCFA

monoinsaturés (20, 21). Par exemple, l'huile d'olive est composée à 70% d'acide oléique. Les AG des animaux sont plus variés et dépendent de leur régime alimentaire. Les AG des animaux terrestres sont principalement composés d'AG monoinsaturés et polyinsaturés d'une longueur de 18 carbones (22-26). Quant aux PL, ils sont composés d'un groupe phosphate (extrémité polaire) et de deux AG (extrémité non polaire) liés entre eux par du glycérol. Le PL le plus courant est la phosphatidylcholine (PC) qui possède une choline à son extrémité polaire. Enfin, le CHOL est simplement une molécule d'atomes de carbone liés à 4 cycles carbonés, qui peut être sous forme libre ou estérifiée (ajout d'un groupe hydroxyle) (27). Des exemples de ces différents lipides sont retrouvés à la [Figure 3](#).

L'un des rôles les plus connus des lipides est leur utilisation comme haute source d'énergie. Au repos, environ 30-40% de l'énergie nécessaire au bon fonctionnement du corps humain provient des TG et ce pourcentage augmente drastiquement pendant l'effort lorsque les glucides stockés ont tous été utilisés. Cela est dû au fait que les AG ont de nombreuses liaisons C-H qui facilitent leur stockage dans les tissus adipeux (27). En plus d'être une source élevée d'énergie, le tissu adipeux viscéral et sous-cutané protège et sert d'isolation à plusieurs organes, contrôlant ainsi la température interne du corps (28).

De plus, les lipides ont un rôle très important dans le transport des vitamines liposolubles (A, D, E et K) issues de l'alimentation. En effet, puisqu'elles sont liposolubles, elles doivent nécessairement se lier aux lipides pour être absorbées par les entérocytes de l'intestin grêle et ensuite être transportées sous forme de CM dans la circulation sanguine. Les CM seront décrits en profondeur dans les prochaines sections (29). De plus, les lipides peuvent augmenter la biodisponibilité de plusieurs molécules telles que le bêta-carotène (30).

Les fonctions et les propriétés des membranes cellulaires sont en partie déterminées par leur composition lipidique, le niveau de désaturation des AG, l'orientation de ces lipides dans la membrane et leur association avec différentes protéines (31). De plus, les lipides ont un rôle important dans la formation de radeaux lipidiques, un assemblage complexe de lipides et de protéines ayant des fonctions importantes dans la signalisation membranaire et le trafic vésiculaire (32).

Les lipides et leurs dérivés constituent la majorité des molécules permettant les mécanismes de contrôle de la transduction des signaux régulant les fonctions cellulaires (31). Parmi eux, on retrouve par exemple le phosphatidylinositol qui agit sur plusieurs événements intracellulaires comme la signalisation de l'insuline (31). L'activation des phosphatidylinositols produit également des messagers secondaires comme le diacylglycérol (DG), qui se lie à plusieurs protéines pour les activer et joue des rôles importants dans plusieurs maladies comme l'hypertension (35). Il ne faut pas oublier l'acide phosphatidique (PA), un autre messager secondaire qui sera discuté en détail dans une [section](#) ultérieure. Le PA se lie également à plusieurs protéines pour les activer, s'impliquant ainsi dans différentes voies de signalisation comme le *mechanistic target of rapamycin* (mTOR), qui est très important dans la prolifération cellulaire et le développement du cancer (36). De plus, il existe des médiateurs lipidiques qui favorisent la communication entre les cellules. Ils sont synthétisés localement par des stimuli et vont se lier à des récepteurs sur la cellule ciblée. Ils comprennent plusieurs dérivés de l'acide arachidonique, comme les prostaglandines et les leucotriènes, ainsi que d'autres composés comme les endocannabinoïdes (31).

Les AG essentiels, plus précisément des classes des oméga-3 et des oméga-6 telles que l'acide linoléique, l'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque, proviennent de l'alimentation et sont peu ou pas synthétisés par notre organisme. En effet, ils forment des médiateurs lipidiques impliqués dans de nombreuses voies de signalisation. En particulier, des produits d'oméga-6 appelés acides arachidoniques sont bien connus pour leur rôle inflammatoire alors que les produits oméga-3 ont des propriétés anti-inflammatoires. Bien que cette relation soit plus complexe, elle met en évidence l'importance du rapport oméga-6/oméga-3 qui, lorsqu'il est très élevé, s'avère néfaste (37).

Enfin, en ce qui concerne spécifiquement le CHOL, en plus d'être un composant majeur de la membrane plasmique et des lipoprotéines, il est également un précurseur de nombreux composés tels que les acides biliaires, les hormones adrénocorticales et sexuelles, la vitamine D et les glycosides cardiaques (38).

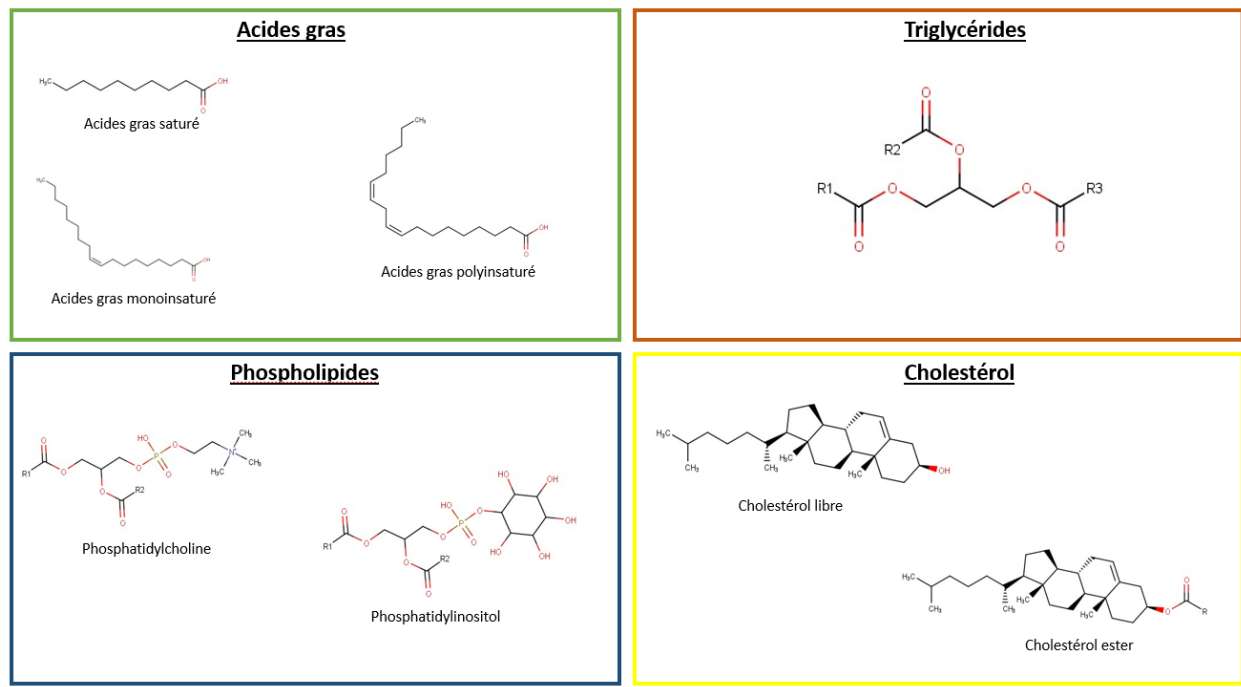


Figure 3. – Exemple de structures chimiques des différents groupes de lipides

On y retrouve 4 différents types de lipides. Les AG dont la grandeur de leur chaîne de carbone ainsi que le nombre d'insaturations peut varier, les triglycérides dans lesquels on y retrouve 3 AG, des phospholipides composés de deux AG de chaînes variables et d'une extrémité polaire qui peut varier (choline, inositol ou autre), et finalement du cholestérol qui peut se retrouver sous forme libre ou estérifiée. La figure a été créée par moi-même grâce au logiciel gratuit MarvinSketch.

2.3 Les lipoprotéines et les apolipoprotéines

Les lipides provenant de sources exogènes ou même endogènes peuvent être transportés dans la circulation sanguine d'un organe à l'autre par les lipoprotéines. Les lipoprotéines sont en fait des vésicules avec un noyau de TG et/ou d'ester de CHOL, entouré d'une monocouche de PL, de CHOL libre et d'apolipoprotéines (Apo) (39). Il existe plusieurs types de lipoprotéines dont le rôle, les principales caractéristiques et la composition diffèrent les uns des autres. La composition chimique ou protéique de ces vésicules est très importante, car sa variation altère le métabolisme de la lipoprotéine (40). La composition en protéines des différentes lipoprotéines, ainsi que leur taille, sont illustrées à la [Figure 4](#), pendant que leur rôle dans la circulation est illustré à la [Figure 5](#).

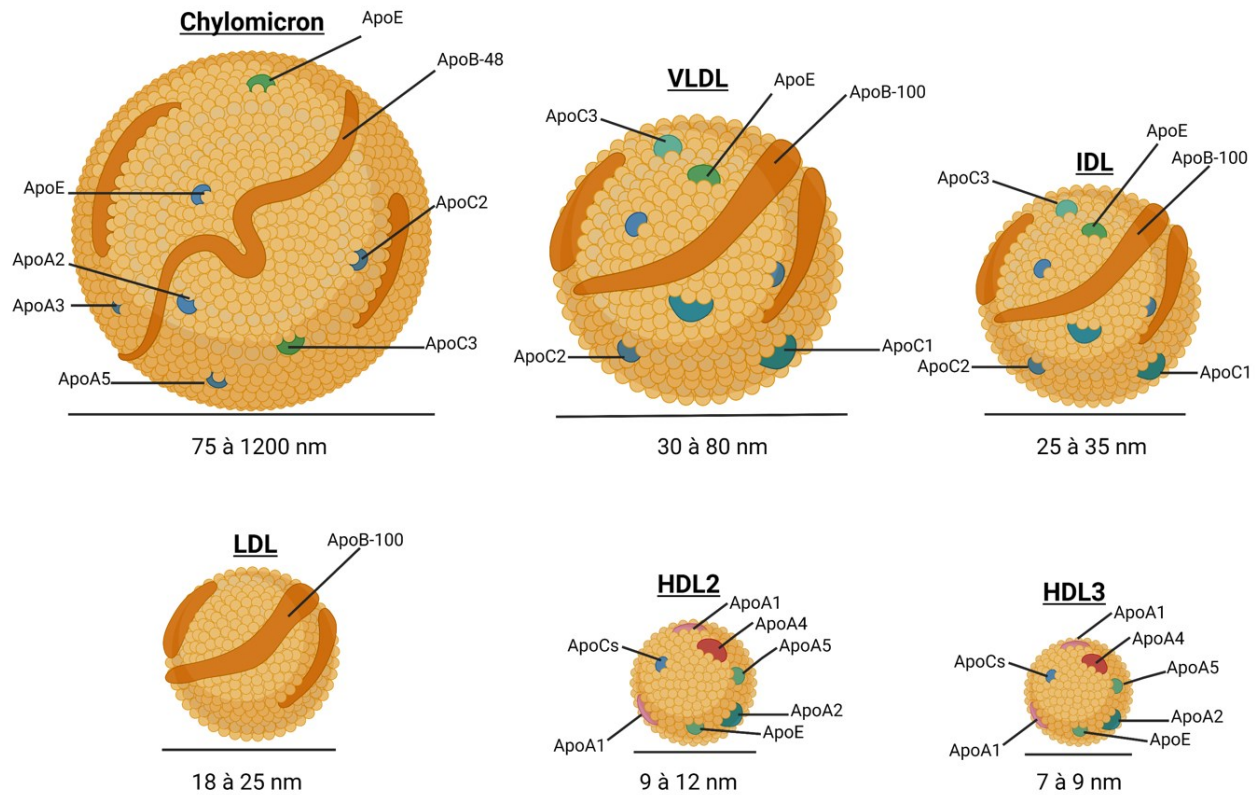


Figure 4. – Taille et composition en protéines des différentes lipoprotéines retrouvées dans la circulation sanguine

Les lipoprotéines sanguines possèdent des diamètres différents ainsi que des compositions différentes en apolipoprotéines. Cette illustration a été créée avec BioRender.com.

2.3.1 Le chylomicron

Les mécanismes de formation et de sécrétion du CM vont être largement décrits ultérieurement. Très simplement, le rôle principal du CM est de transporter les lipides et les vitamines liposolubles dans la circulation sanguine. Une fois dans le sang, les lipides seront mobilisés vers les différents organes périphériques afin d'assurer la présence d'une quantité suffisante d'énergie pour leur bon fonctionnement. Les vitamines, quant à elles, vont également assurer le bon fonctionnement des différents organes. Si ce processus n'est pas bien régulé et qu'il y a un arrêt de la formation des CM, et donc une diminution drastique de l'apport en vitamines liposolubles et en AG essentiels, les patients peuvent développer de nombreux symptômes tels que la rétinite pigmentaire, la dégénérescence spinocérébelleuse et un retard de croissance (41-43).

Le CM humain est majoritairement composé de TG ($\approx 80-90\%$), de PL ($\approx 10\%$), de CHOL libre ($\approx 1\%$), d'ester de CHOL ($\approx 2\%$) et de protéines ($\approx 3\%$) (44). De toutes les lipoprotéines plasmatiques, c'est le CM qui présente le plus faible pourcentage de protéines. En ce qui concerne sa composition protéique, le CM circulant contient l'ApoB-48, l'ApoA-1, l'ApoA-4, l'ApoC2, l'ApoC3 et l'ApoE, (39).

L'ApoB-48 est une protéine structurelle essentielle à la formation du CM. L'une des particularités de l'ApoB est qu'elle n'est pas nécessairement retrouvée sous la même forme dans différents organes. Si l'ApoB-48 est la forme dominante retrouvée dans l'intestin humain, l'ApoB-100 est exclusive au foie. La différence est due à la présence dans l'intestin de l'Apobec-1 qui introduit un codon stop dans le transcrit ARN du gène de l'*ApoB* lors de sa traduction, formant ainsi l'*ApoB-48* qui a 48% de la longueur de l'*ApoB-100* (45). Plus exactement, il désamine la cytidine⁶⁶⁶ dans le transcrit humain de l'*ApoB* à de l'acide aminé uridine, ce qui forme un codon stop (UAA) à la place du codon CAA initialement présent (46). Dans le foie de l'humain, on ne trouve pas d'Apobec-1, donnant ainsi naissance à de l'ApoB-100. L'expression de l'Apobec-1 indique la distribution de l'ApoB dans les tissus et celle-ci peut varier d'une espèce à une autre. En effet, contrairement à l'humain, on trouve un peu d'Apobec-1, et donc de l'ApoB-48 et de l'ApoB-100 dans le foie de rats et de souris (45, 47).

L'ApoA-1 est une protéine structurelle de la lipoprotéine de haute densité (HDL) et est synthétisée par le foie et l'intestin (48). Dans l'intestin, elle est intégrée au CM dans le Golgi et lorsque le CM est sécrété dans la circulation, il le transfère au HDL. Cette apolipoprotéine active la lécithine : cholestérol acyltransférase qui estérifie le CHOL libre des HDL naissants en CHOL ester. Cette estérification facilite la formation du noyau des HDL (49)

L'ApoA-4 favorise et régule le grossissement des pré-CM dans le RE (50). Cette apolipoprotéine sera décrite plus en détail dans une [section](#) ultérieure.

L'ApoC2 est un cofacteur qui active la lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme qui hydrolyse les CM et les VLDL dans la circulation sanguine. Les patients ayant une mutation empêchant la fonction de cette Apo développent une hypertriglycéridémie élevée (taux de TG plasmatique augmenté) et ont plus de chance de développer une pancréatite aiguë (51). L'ApoC3 a un rôle exactement opposé à celui de l'ApoC2 et inhibe plutôt l'activité de la LPL. Les personnes présentant une

mutation qui rend l'ApoC3 inactive auront très peu de TG dans leur circulation sanguine et sont fortement protégées contre les maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose (52).

L'ApoE, quant à elle, a un rôle bien différent des deux dernières Apo, et permet, après hydrolyse, aux résidus de CM de pénétrer dans le foie (53).

Le CM contient également de l'ApoA-2, de l'ApoA-3 et de l'ApoA-5, dont les rôles ne sont pas bien compris à ce jour, à l'exception de l'ApoA-5 qui pourrait activer la LPL (54). Plusieurs de ces apolipoprotéines sont transférées au CM par les HDL dans la circulation sanguine.

2.3.2 La lipoprotéine de très basse densité et de densité intermédiaire

Les VLDL sont des lipoprotéines sécrétées par le foie qui ont des rôles très similaires aux CM. Comme les CM, ils transportent les AG dans la circulation sanguine vers le tissu adipeux pour l'accumulation ou vers les muscles pour l'oxydation. Une fois les TG hydrolysés dans la circulation, le VLDL devient une lipoprotéine appelée lipoprotéine de densité intermédiaire (IDL) (55). L'altération de la sécrétion des VLDL empêche les lipides de quitter le foie, ce qui entraîne une accumulation importante de lipides dans cet organe, favorisant le développement de la stéatose hépatique (56). Les IDL sont beaucoup moins étudiées que les autres types de lipoprotéines plasmatiques. Une partie des IDL pénètre dans le foie ou d'autres tissus périphériques grâce à l'ApoE et au LDLr, tandis que l'autre partie perd son ApoE et la quasi-totalité de ses TG pour former des LDL. Les IDL auront donc un rôle dans la livraison des lipides et des vitamines liposolubles aux tissus périphériques (55).

Les VLDL sont de taille beaucoup plus petite que les CM (30-80nm vs 75-1200nm de diamètre) et ont une composition lipidique quelque peu différente de ces derniers (39). Les VLDL vont avoir moins de TG que les CM ($\approx 50\%$) et plus d'autres composantes à savoir : PL ($\approx 20\%$), ester de CHOL ($\approx 10\%$), CHOL libre ($\approx 4\%$), et protéines ($\approx 16\%$) (57). Concernant la composition en Apo, les VLDL contiennent l'ApoB-100 ainsi que l'ApoC2, l'ApoC3 et l'ApoE (39). Les VLDL renferment également l'ApoC1 qui n'est pas présente dans le CM. L'ApoC1 inhibe l'activité des LPL et empêche la recapture des VLDL par le foie (58, 59). Une forte expression de cette protéine conduit au développement d'une hypertriglycéridémie.

Les IDL, comme résidus des VLDL, ont une taille plus petite (25 à 35 nm de diamètre) et une composition en TG plus faible étant donné leur forte hydrolyse par la LPL (39). On trouve environ 25% de TG, 7% de CHOL libre, 15% d'ester de CHOL, 30% de PL et 22% de protéines (40). Quant aux protéines, on voit que la composition est similaire à celle des VLDL puisque les particules d'IDL contiennent l'ApoB-100, l'ApoE et les ApoCs (39).

2.3.3 La lipoprotéine de basse densité

Comme nous l'avons mentionné, l'hydrolyse des IDL donne naissance aux LDL. Ces lipoprotéines riches en CHOL vont transporter la majorité du CHOL de tout l'organisme pour réparer certains dommages cellulaires, et pour déposer le CHOL au foie pour la formation des acides biliaires (60). En raison de leur forte concentration en CHOL, les LDL sont très athérogènes. Elles pénètrent dans différents organes par endocytose grâce au LDLr qui reconnaît l'ApoB-100. La recapture des LDL par le LDLr est extrêmement critique. C'est principalement le LDLr qui dicte la quantité de CHOL se retrouvant dans la circulation sanguine puisqu'une quantité élevée de LDLr à la surface du foie est associée à une faible concentration sanguine de CHOL, alors qu'une faible concentration de LDLr est plutôt associée à une augmentation des risques de maladies cardiovasculaires (61).

La composition des LDL est différente des autres lipoprotéines avec une taille plus petite qui varie entre 18-25nm de diamètre (39). Les LDL sont composées de 22% d'ApoB-100, 22% de PL, 8% de CHOL libre, 42% d'ester de CHOL, et 6% de TG. Comme indiqué, elle est composée uniquement d'ApoB-100, qui servira de structure (62).

2.3.4 La lipoprotéine de haute densité

Par rapport aux autres lipoprotéines, le HDL a pour rôle de transporter le CHOL des tissus périphériques vers le foie, un processus appelé transport inverse du CHOL (RCT) (63). Le HDL est formé par l'intestin et le foie, ainsi que par l'hydrolyse des CM et VLDL par la lipoprotéine lipase (LPL). Comme la majorité des cellules ne peuvent pas cataboliser le CHOL, le HDL devient une nécessité absolue pour empêcher l'accumulation de CHOL dans les cellules (64). Dans les organes périphériques, le CHOL est transféré au HDL circulant par l'intermédiaire de l'ABCG1, et sera transmis au foie de trois manières différentes. Premièrement, en échange des TG, le CHOL du HDL peut être transféré à une lipoprotéine circulante contenant de l'ApoB-100 (VLDL, LDL, IDL) par

l'intermédiaire de la *cholesterol ester transfer protein* (CETP). Une fois transféré, le CHOL de ces lipoprotéines peut être capté par le foie par le biais du LDLr (65). De même, comme les HDL possèdent l'ApoE, elles peuvent elles-mêmes pénétrer dans le foie par le LDLr (64). Enfin, il est également possible de transférer la CHOL des HDL sans internalisation par SR-B1. SR-B1 prend donc le CHOL du HDL, et le HDL décharge substantiellement son CHOL avant de retourner dans la circulation (66).

Le HDL est la plus petite lipoprotéine ayant 7-12 nm de diamètre (39). Par rapport aux autres lipoprotéines, elle est subdivisée en 2 sous-classes : HDL2 et HDL3, qui ont des compositions différentes de lipides et d'Apo. La HDL3 aura moins de lipides avec environ 2% de TG, 2% de CHOL libre, 15% d'ester de CHOL, 31% de PL et 50% de protéines. Quant au HDL2, il a plutôt environ 3% de TG, 5% de CHOL libre, 20% d'ester de CHOL, 35% de PL et 36% de protéines (40). Il est considéré comme préférable d'avoir plus de HDL2 dans la circulation car il est plus fonctionnel que le HDL3 du fait qu'il extrait plus de CHOL des tissus périphériques (67). Les HDL possèdent une bonne variété d'Apo telles que l'ApoA-1, l'ApoA-2, l'ApoA-4, l'ApoA-5, les différentes ApoC et l'ApoE. L'ApoA-2, agit comme une protéine structurelle pour le HDL et peut également inhiber la lipase hépatique (68).

2.3.5 La lipoprotéine (a)

La lipoprotéine (a) (LP(a)) est une petite lipoprotéine beaucoup moins connue que les autres mentionnées ci-dessus et de nombreuses recherches sont actuellement menées pour mieux la comprendre. Son rôle physiologique n'est pas bien connu, mais on pense qu'elle joue un rôle dans la cicatrisation des plaies, la réparation des tissus et la formation des vaisseaux (69-71). Cependant, cette petite lipoprotéine est plutôt connue pour sa forte association avec le développement des maladies cardiovasculaires, un sujet qui sera légèrement abordé dans une [section](#) ultérieure. Il est proposé que sa synthèse se fasse dans les hépatocytes et qu'elle soit potentiellement éliminée de la circulation par le foie et, dans une faible mesure, par les reins, par l'intermédiaire de récepteurs qui doivent encore être clarifiés. (72-74).

La LP(a) est une lipoprotéine de 25 nm qui a une structure similaire à celle de la LDL, tant pour sa composition lipidique que protéique. En effet, elle possède également une ApoB-100, mais celle-

ci est liée de manière non covalente par un pont dissulfure à une seconde protéine nommée apolipoprotéine (a) (75, 76). La présence de cette glycoprotéine seule permet la séparation électrophorétique des LDL et des LP(a) puisque l'Apo(a) a un poids moléculaire assez élevé entre 400 et 700 kDa (77). Une autre particularité de cette lipoprotéine est la présence de PL oxydés qui sont transportés par l'ApoB-100 ou par l'Apo(a) (78, 79).

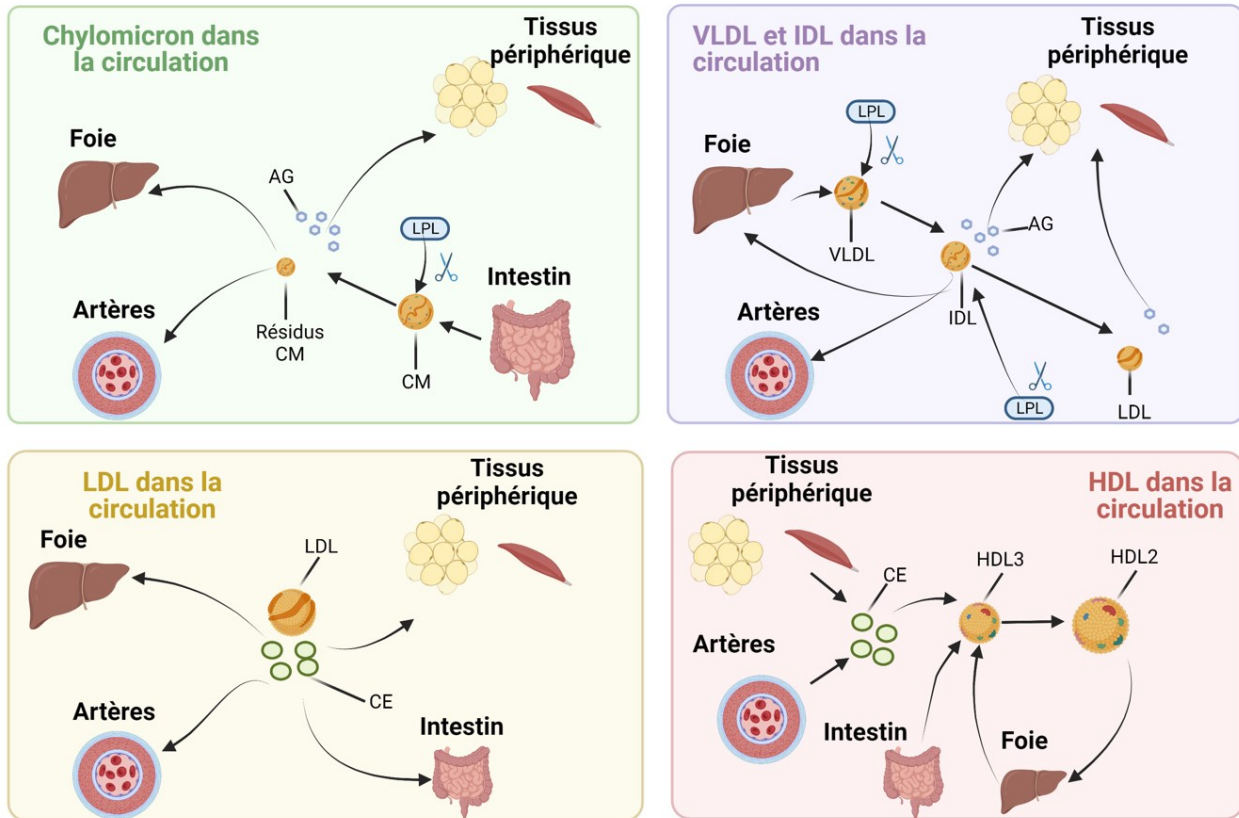


Figure 5. – Destin des différentes lipoprotéines dans la circulation sanguine

Le CM dans la circulation est hydrolysé par la LPL pour devenir des résidus de CM et des AG libres. Les AG sont dirigés vers les tissus périphériques pendant que les résidus sont dirigés vers le foie ou les artères. Quant au VLDL, il est lui aussi hydrolysé par la LPL pour former un IDL et des AG libres. Les AG vont aussi aller aux tissus périphériques pendant que le IDL peut retourner dans le foie ou aller s'accumuler dans les artères. Le IDL peut pareillement être hydrolysé par la LPL pour former un LDL avec des AG. Quant au LDL qui est composé majoritairement de CE, il porte ce CE dans les tissus périphériques ainsi que dans le foie, l'intestin et les artères. Finalement, le HDL qui est formé par l'intestin et le foie prend le CE des tissus

périphériques et des artères pour les rediriger dans le foie. Cette illustration a été créée avec BioRender.com.

2.4 Transport du cholestérol et des acides gras dans les entérocytes du petit intestin

Le mécanisme de digestion des aliments dans le tractus gastro-intestinal a été décrit précédemment. Plus spécifiquement pour les lipides, la digestion commence par les enzymes salivaires puis par la lipase gastrique dans l'estomac. Cependant, la grande majorité des lipides sera digérée dans le duodénum avec l'aide d'enzymes pancréatiques (80). L'hydrolyse d'une molécule de TG par la lipase pancréatique donnera 2 AG non estérifiés et 1 molécule de 2-monoacylglycérol (MG). Quant aux PL, elles donnent des AG et de la lysophosphatidylcholine (LysoPC) grâce à la phospholipase A₂, tandis que le cholestérol ester (CE) forme des AG libres et du CHOL libre (81) par le biais de la cholestérol estérase. Cette hydrolyse rend ces lipides moins hydrophobes, favorisant leur assemblage avec les acides biliaires pour former des micelles (82). Une fois sous forme de micelles, les lipides peuvent alors pénétrer sans les acides biliaires dans la cellule intestinale. Il est important de considérer que ce processus est spécifique LCFA, 2-MG et CHOL. En effet, les MCFA et SCFA sont solubles dans l'eau et ne nécessitent pas de micelles pour être absorbés par les entérocytes (83). De plus, les aliments d'origine végétale et animale contiennent très peu de MCFA et de SCFA par rapport aux LCFA (84).

Dans la section suivante, l'incorporation des produits lipidiques dans l'entérocyte sera traitée.

2.4.1 Entrée des lipides par diffusion ou par transport actif

Si le CHOL en petite quantité peut diffuser dans la cellule entérocytaire, les autres produits lipolytiques tels que les LCFA, 2-MG et lysophospholipides font appel à des transporteurs actifs comme le *Cluster of differentiation 36* (CD36) et le *Fatty acid transport protein 4* (FATP4). Durant les deux dernières décades, des transporteurs de CHOL ont été découverts tels que le *Niemann-Pick C1-like 1* (NPC1L1) et le *Scavenger receptor class B type 1* (SR-B1). De façon intéressante, d'autres transporteurs localisés dans la membrane plasmique de l'entérocyte peuvent relarguer le CHOL entérocytaires dans la lumière de l'intestin, et c'est le cas de l'*ATP-binding cassette*

subfamily member 5 and 8 (ABCG5/G8). Ces différentes protéines sont illustrées dans un entérocyte à la [Figure 6](#).

2.4.1.1 Transport par diffusion

Même si le transport des LCFA, du 2-MG et du LysoPC peut s'effectuer en petite concentration par diffusion simple ou facilitée (36, 37), leur incorporation cellulaire fait majoritairement appel à des transporteurs protéiques. Ce processus ne peut malheureusement pas permettre l'entrée de suffisamment d'AG pour les besoins de la cellule, ce qui démontre l'importance du rôle des transporteurs actifs (85). Par rapport à la diffusion, l'utilisation des protéines pour le transport est saturable, indiquant qu'elle ne peut transporter qu'une quantité limitée de ligands à la fois et se produit lorsque la concentration d'AG dans la cellule est plus élevée que dans la lumière (43).

Comparativement aux LCFA, les MCFA ainsi que les SCFA ne pénètrent dans la cellule que par diffusion passive (86). Comme ils sont hydrosolubles, ils n'ont pas besoin de protéines de liaison pour passer dans la cellule et pourront passer directement de la lumière de l'intestin à la circulation sanguine (87, 88).

2.4.1.2 *Cluster of differentiation 36*

CD36 est un des transporteurs très importants pour la captation des AG dans l'entérocyte. Il s'agit d'une protéine transmembranaire glycosylée qui se lie à plusieurs ligands, dont les LCFA (89). Le CD36 est exprimé dans de nombreux types cellulaires, mais en particulier dans l'entérocyte, les adipocytes, les cardiomyocytes et le muscle squelettique (90). Dans l'intestin, il est particulièrement bien exprimé dans le premier tiers de l'intestin grêle, spécialement dans les villosités du jéjunum et du duodénum (91). Plusieurs études utilisant des animaux avec une délétion totale de CD36 ainsi que des études chez l'humain ont observé un défaut d'absorption et du métabolisme des AG (92, 93). Les patients présentant une déficience en CD36 montraient principalement des altérations des concentrations en lipides plasmatiques (94, 95). De plus, non seulement ils éprouvaient une diminution de l'absorption des AG, mais les souris avec une déficience totale en CD36 soumises à un régime riche en graisses présentaient des défauts dans la formation et la sécrétion de CM (96, 97). Les mécanismes par lesquels les AG sont véhiculés par le CD36 ne sont pas encore bien compris. Cependant, dans des cultures primaires d'entérocytes

de souris, on a observé une entrée accrue de lipides lorsqu'il y a déphosphorylation de CD36 par la phosphatase alcaline intestinale qui se colocalise avec le CD36. De plus, lorsque ces souris sont soumises à un régime riche en graisses, l'expression de ces deux facteurs est augmentée de façon marquée (98). Cependant, étant donné la présence du CD36 dans de nombreux types de cellules, il pourrait jouer différents rôles et pourrait être régulé différemment.

2.4.1.3 *Fatty acid transport protein 4*

La protéine FATP4 stimule l'absorption intestinale des AG. En effet, en plus d'être fortement exprimée dans les villosités intestinales, sa délétion dans les entérocytes primaires de souris diminue l'absorption des AG (99). Par rapport au CD36, il semble que le FATP4 possède plutôt une activité enzymatique qui favorise l'estérification des AG avec le coenzyme A pour former les PL et les TG intestinaux. En vue des discordances notées dans les études, des études plus approfondies sont nécessaires, surtout que des souris avec une expression protéique diminuée de FATP4 n'affichaient pas de changements dans l'absorption des lipides. Même des souris avec une délétion totale de FATP4 dans l'intestin semblaient absorber les lipides normalement, alors qu'elles ne présentaient aucun phénotype d'obésité en présence d'un régime riche en graisses (100, 101). Ces résultats pourraient s'expliquer par des mécanismes de compensation, mais cette hypothèse reste à confirmer.

2.4.1.4 *Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1)*

Il est maintenant bien établi que NPC1L1 permet la captation du CHOL dans la cellule intestinale. En effet, le médicament ézétimide inhibe la NPC1L1 pour réduire la capture du CHOL alimentaire et réduire ainsi l'hypercholestérolémie familiale. La NPC1L1 est une protéine glycosylée présente dans la membrane des entérocytes qui contribue significativement à l'entrée du CHOL (70%) selon les observations faites chez les souris avec délétion totale de la NPC1L1 ou traitées avec de l'ézétimide comme inhibiteur (102). Chez l'homme, l'expression génique de NPC1L1 est élevée aussi bien dans l'intestin que dans le foie (102). La glycosylation de cette protéine est très importante puisqu'elle empêche la dégradation rapide de NPC1L1, ce que confirment les observations de patients présentant des modifications du profil de glycosylation de cette protéine. En effet, NPC1L1 possède différents sites de glycosylation et lorsque la protéine est fortement glycosylée, elle est plus difficile à être dégradée par les endoglycosidases H (103). Les mécanismes

d'entrée du CHOL par NPC1L1 sont beaucoup mieux connus comparativement au CD36. Des études rapportent que le CHOL se lie au domaine N-terminal de NPC1L1, libérant un peptide de signalisation qui contribue à l'interaction de NPC1L1 avec une protéine nommée Numb, et enfin son internalisation dans la cellule pour internaliser le CHOL dans la cellule (104). Numb est un adaptateur de clathrines et lorsqu'elle est liée à NPC1L1, elle recrute des clathrines pour permettre l'internalisation de NPC1L1 dans la cellule. Autre que Numb, l'entrée du CHOL dans la cellule par NPC1L1 est aussi supporté par des radeaux lipidiques et des gangliosides (105, 106).

Les mécanismes qui favorisent le transport du CHOL par NPC1L1 vers différents compartiments intracellulaires, comme le RE, ne sont pas encore bien compris. Il est proposé qu'après internalisation, la NPC1L1 et les protéines/lipides associés sont dirigés vers un compartiment de recyclage endocytaire qui délivrera le CHOL à la membrane du RE (107, 108).

2.4.1.5 Scavenger receptor class B type I

SR-B1 est plutôt connu pour faire entrer le CHOL de la circulation sanguine au niveau du foie. Néanmoins, bien que l'expression de SR-B1 soit très élevée dans la membrane des entérocytes (du côté apical), son rôle dans l'entrée du CHOL depuis la lumière intestinale est plutôt controversé. Par exemple, un article a observé qu'une expression protéique accrue de SR-B1 chez les souris augmente l'absorption intestinale de CHOL (109). Cependant, lorsque l'expression de SR-B1 est abolie totalement, il n'y a pas de changement dans l'absorption du CHOL, soulignant la controverse (110, 111). La fonction de SR-B1 dans l'absorption du CHOL reste à être mieux définie. Par ailleurs, le SR-B1 a été suggéré comme un médiateur dans le trafic intracellulaire du CHOL. Dans ce contexte, le contact direct du domaine C-terminal de SR-B1 avec des micelles de CHOL active le trafic de ApoB-48, influençant la formation et la sécrétion de CM, ainsi que l'accumulation de CHOL dans des gouttelettes lipidiques (112-114).

2.4.1.6 ATP-binding cassette subfamily member 5 and 8

Par rapport aux autres protéines qui ont été mentionnées dans cette dernière section, l'ATP cassette ABCG5/G8 influence considérablement le métabolisme du CHOL en limitant l'entrée de ce dernier dans la cellule. L'ABCG5/G8 est un complexe hétéromérique (1 :1) dont la conformation est régulée par un promoteur que l'ABCG5 et l'ABCG8 partagent. Le complexe est

fortement exprimé dans la bordure en brosse des entérocytes (115). Il est clair aujourd'hui que cette ATP cassette évacue le CHOL de l'entérocyte en direction de la lumière intestinale et empêche l'absorption des stérols végétaux (phytostérols) (116). Les personnes présentant une mutation de l'un ou l'autre de ces hétérodimères développent une hypercholestérolémie, ce qui entraîne des maladies cardiaques dès l'âge adulte (117, 118). Les souris présentant une délétion totale de l'ABCG5/G8 absorbent 3 fois plus de phytostérols, exhibent 30 fois plus de sitostérols sanguins et présentent une diminution significative de la sécrétion biliaire de la vésicule biliaire vers l'intestin (119). De plus, les souris avec une expression accrue de la protéine absorbent moins de CHOL (120). Néanmoins, d'autres études rapportent que les animaux avec une délétion totale d'ABCG5/G8 montrent une absorption normale de CHOL, suggérant que ce n'est qu'après l'entrée du CHOL dans l'entérocyte par l'intermédiaire de NPC1L1 que l'ABCG5/G8 exporte le CHOL vers la lumière intestinale (121).

2.4.2 Transport des acides gras vers les compartiments cellulaires

Il a été dit précédemment que le CHOL est transporté à l'intérieur de la cellule par NPC1L1 vers le RE. Cependant, selon certaines études, les AG ne sont pas transportés par le CD36, mais plutôt par d'autres protéines du nom d'*intestinal* et *liver fatty acid-binding protein* (I-FABP et L-FABP). Comme les précédents transporteurs, ces deux protéines peuvent même directement favoriser l'entrée des AG dans la cellule. Elles sont toutes les deux illustrées à la [Figure 6](#).

2.4.2.1 Intestinal et liver fatty acid binding proteins

En raison de leur hydrophobie, les LCFA et le 2-MG doivent nécessairement être liés à des protéines pour pouvoir être transportés dans la cellule. C'est ce que font les I-FABP et L-FABP, des protéines représentant 4 à 6 % des protéines cytosoliques de l'entérocyte, dirigeant rapidement les AG vers les sites intracellulaires appropriés, empêchant ainsi le développement de la toxicité causée par l'accumulation d'AG non estérifiés dans l'entérocyte (43, 122). Leur rôle physiologique n'est pas encore bien connu et il est proposé que ces deux types de protéines ont des rôles distincts dans la détermination du sort des AG. En effet, il a été suggéré que la L-FABP dans l'intestin dirige les AG vers les voies oxydatives telles que les mitochondries, alors que la I-FABP les dirige vers le RE pour une conversion rapide en acyl-CoA, et finalement en TG (123).

De plus, des résultats ont proposé que les AG de la membrane plasmique soient dirigés différemment vers les deux FABP. Pour la L-FABP, les AG diffuseraient de la membrane plasmique vers la phase aqueuse du cytoplasme avant d'être captés par cette protéine. Pour la I-FABP, elle interagirait directement avec la membrane cellulaire pour obtenir ses AG (124, 125).

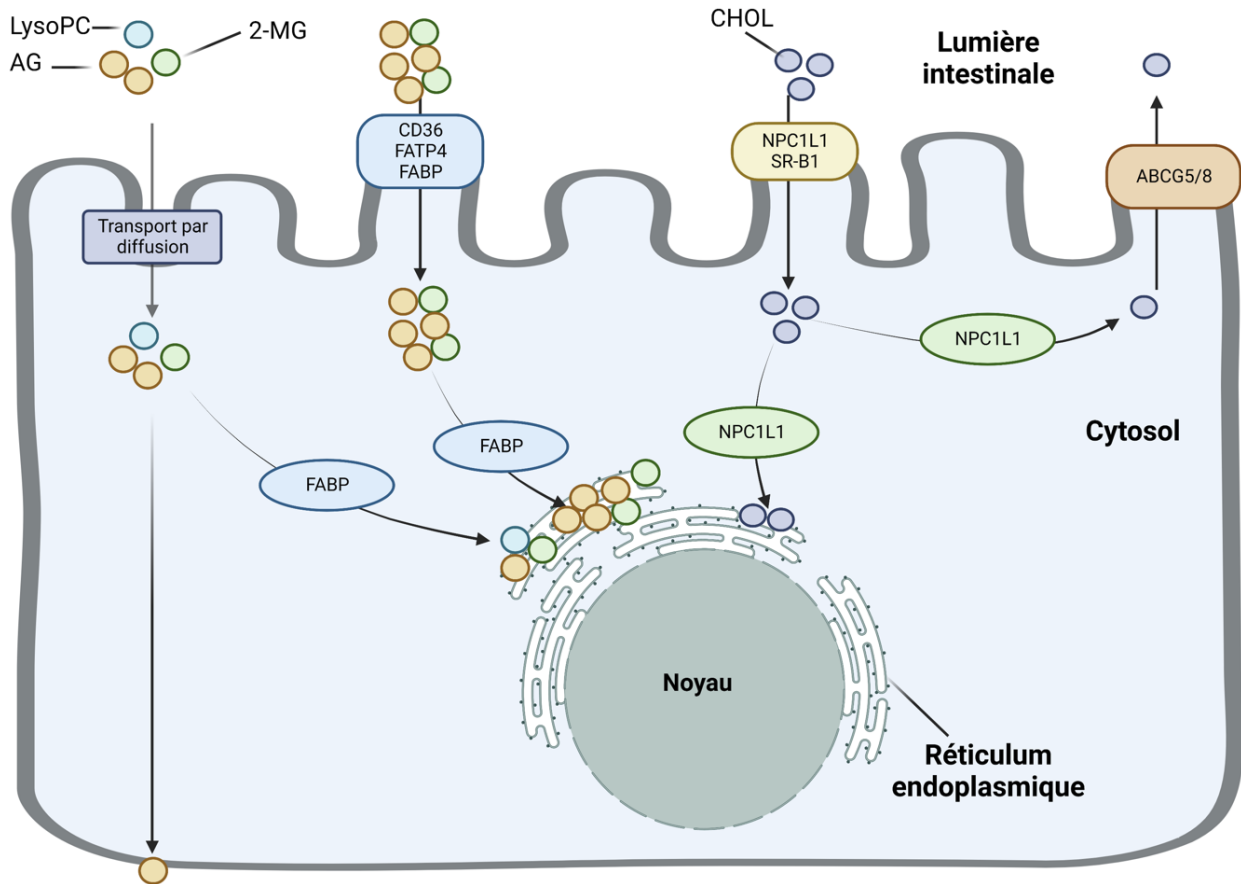


Figure 6. – Entrée des lipides dans l'entérocyte et transport vers le réticulum endoplasmique

Les lipides pénètrent de différentes façons dans les entérocytes. Les LysoPC, AG et 2-MG pénètrent dans la cellule en partie par diffusion et sont ensuite dirigés par les FABP vers le réticulum endoplasmique (RE). Certains AG comme ceux à chaînes courtes et moyennes passent directement dans la circulation sans aller au RE. Sinon, les AGs et 2-MG rentrent majoritairement par les transporteurs CD36 et FATP4. Quant au CHOL, il rentre grâce à NPC1L1 et SR-B1, et est transporté grâce au NPC1L1 vers le RE. Il est aussi possible que le CHOL soit plutôt dirigé vers ABCG5/8 pour retourner dans la lumière intestinale. Cette illustration a été créée avec BioRender.com.

2.4.3 Re-estérification des acides gras, du cholestérol et des phospholipides

Pour la formation des CM, les lipides non estérifiés ont besoin en premier lieu d'être dirigés vers la membrane du RE pour être re-estérifiés. Les enzymes qui estérifient les AG, le CHOL libre et les lysophospholipides sont toutes différentes et sont illustrées à la [Figure 7](#).

2.4.3.1 Estérification des acides gras

Les premières enzymes qui initient l'estérification des AG sont les acyl-CoA synthétases à longue chaîne (ACSL) ou à très longue chaîne (ACSVL) (126). Dans l'intestin, les ACSL3 et ACSL5 sont les plus présentes (127). Leur activité génère des dérivés de CoA (AG-CoA) à partir d'AG. Certaines études dans le foie proposent que l'ACSL3 produit des dérivés pour la formation des PL alors que l'ACSL5 les produit pour la formation des TG (126, 128).

Ce dérivé d'AG-CoA sera utilisé avec des 2-MG pour former le DG par la MG acyltransférase (MGAT). Dans l'intestin, on trouve principalement la MGAT2 qui est fortement exprimée. Chez la souris, la délétion totale de la MGAT2 diminue le taux de sécrétion des CM sans affecter l'absorption des AG par la cellule. Évidemment, cette délétion diminue également l'estérification des MG, ce qui montre bien la fonction de cette enzyme (129, 130).

Enfin, les TG sont formés à partir des DG par des diacylglycérol acyltransférases 1 et 2 (DGAT 1 et 2), toutes deux fortement exprimées dans l'intestin (131). Il est démontré que l'élimination totale de DGAT1 diminue la sécrétion de CM et prévient le développement de l'obésité (132). Par contre, pour DGAT2, il est plus difficile de l'étudier, car les animaux meurent dès la naissance à cause de problèmes de peau et de malnutrition, ce qui met en relief son essentialité (133).

2.4.3.2 Estérification du CHOL libre

Quant au CHOL libre, il est estérifié par l'enzyme acyl-CoA cholestérol acyltransférase 2 (ACAT2). Les souris présentant une délétion totale de l'ACAT2 ont un grand défaut d'absorption du CHOL et sont résistantes au développement de l'hypercholestérolémie (134, 135). Tous les sitostérols et phytostérols sont de mauvais ligands pour cette enzyme et sont dirigés vers ABCG5/G8 pour retourner dans la lumière intestinale (136). En plus de l'ACAT2, qui est bien exprimée dans l'intestin de l'homme et de la souris, l'ACAT1 est présente dans l'intestin, mais est beaucoup moins exprimée que l'ACAT2 (137, 138). Par rapport à l'ACAT2, la délétion totale de l'ACAT1

n'affecte pas l'absorption du CHOL et les niveaux plasmatiques de CHOL, ce qui indique que son rôle n'est pas aussi important que celui de l'ACAT2 (134).

2.4.3.3 Estérification des lysophospholipides

La dernière enzyme d'estérification est la lysophosphatidylcholine acyltransférase 3 (LPCAT3) qui estérifie la LysoPC en PC. Les souris présentant une ablation totale de cette enzyme accumulent les lipides dans les entérocytes en raison d'une mauvaise fluidité membranaire générée par une diminution de sa composition en PC et une mauvaise absorption des lipides par l'ApoB-48. De plus, ils démontrent une diminution de leur concentration en lipides plasmatiques (environ 50%), générée par une réduction significative de la sécrétion du CM (139-141).

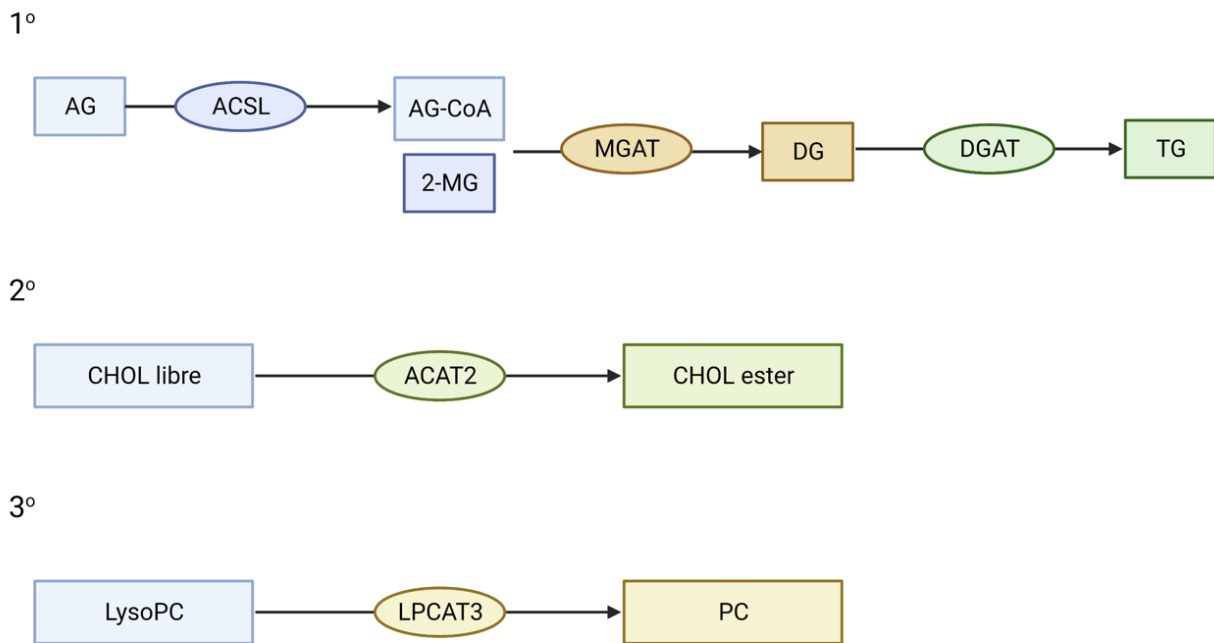


Figure 7. – Estérification des lipides au niveau du réticulum endoplasmique

On retrouve 3 principales estérifications des lipides au niveau du réticulum endoplasmique. Dans un premier temps, il y a estérification de l'AG pour qu'il devienne du TG grâce à plusieurs enzymes. Ensuite, il y a estérification du CHOL libre en CHOL ester. Finalement, on y retrouve l'estérification de la LysoPC en PC. Cette illustration a été créée avec BioRender.com.

2.4.4 Formation et hydrolyse des gouttelettes lipidiques intestinales

Les lipides estérifiés qui se retrouvent au niveau de la membrane plasmique du RE vont principalement avoir deux destins métaboliques : être dirigés vers le cytosol sous forme de gouttelettes lipidiques (GTL) pour entreposage et utilisation ultérieure, ou être dirigés vers la lumière du RE pour la formation du pré-CM. Dans cette section, la formation et l'utilisation de ces GTL intestinales seront traitées, à l'instar de plusieurs études synthétisées dans une de nos revues publiée il y a quelques années (142). Ces processus sont illustrés à la [Figure 8](#).

2.4.4.1 Informations générales sur les gouttelettes lipidiques

Les GTL sont des vésicules composées d'un noyau de TG et d'ester de CHOL, entouré d'une monocouche de PL, dans laquelle on trouve peu de protéines et de CHOL libre (143). Dans l'intestin, on les trouve principalement dans le jéjunum et leur composition en AG est presque identique à celle du régime alimentaire de l'hôte (144, 145). Des analyses protéomiques ont permis d'identifier 180 types de protéines différentes qui peuvent être trouvées dans ces GTL (146). Parmi celles-ci, les protéines appelées périlipines (PLIN), fortement impliquées dans la régulation de la synthèse et de l'hydrolyse des GTL, sont les plus abondantes (147). Dans l'intestin, la PLIN-2 est plus exprimée lorsqu'il y a un apport important de lipides et la PLIN-3 est plus exprimée lorsque les entérocytes sont en présence de peu de lipides alimentaires (144).

Les lipides neutres synthétisés par les différentes enzymes mentionnées ci-dessus (DGAT, ACAT, LPCAT) s'agrègent dans la région hydrophobe entre les deux feuillettes de la membrane du RE (148). Lorsque l'accumulation atteint un certain stade, les lipides bourgeonnent dans le cytosol pour former des GTL naissantes (149). Les GTL peuvent également se déplacer dans la lumière du RE pour stabiliser la formation des pré-CM (150).

2.4.4.2 Grossissement des gouttelettes lipidiques

Les GTL peuvent s'agrandir dans le cytosol de l'entérocyte par hypertrophie. Cette hypertrophie, ou plutôt élargissement des GTL, se produit lorsqu'il y a une augmentation de la concentration d'AG dans la cellule pour la protéger contre une lipotoxicité, et plus cette augmentation est importante, plus les gouttelettes grossissent jusqu'à une taille maximale qui peut varier d'une cellule à l'autre (151). La régulation de sa taille, de sa capacité à accumuler des lipides et de sa

capacité à être hydrolysée est très importante et une mauvaise régulation de ces mécanismes peut entraîner plusieurs problèmes métaboliques tels que l'obésité, le diabète et la stéatose hépatique (152-154). Cette hypertrophie peut être réalisée par la synthèse directe de TG à la surface de ces vésicules. En effet, les enzymes qui synthétisent les dérivés d'AG tels que MGAT2, ACSL3 et ACSL5 se trouvent sur cette surface. Une fois les DG formés, ils deviennent des TG grâce à DGAT2 et sont ensuite dirigés vers la GTL (155). Bien que la DGAT2 se trouve principalement à la surface du RE, elle peut s'associer aux GTL en raison de l'interaction importante entre les GTL et le RE, assurant ainsi la synthèse des lipides à leur surface. De plus, en dehors de DGAT2, la protéine I-FABP joue également un rôle important. En effet, il a été montré qu'une mauvaise relocalisation de DGAT2 et de I-FABP dans la GTL empêche l'élargissement de la GTL, conduisant à la production de petites GTL seulement (155). Le même phénomène est constaté en l'absence totale d'une protéine appelée Seipin, nécessaire au transport des lipides et des protéines du RE vers la GTL (156).

Les goutelettes subissent aussi un processus de fusion. Ce processus est contrôlé par des protéines *Cell death-inducing DNA fragmentation factor 45-like effector* qui vont former des pores là où il y a une interaction entre deux GTL, favorisant le transport des lipides d'un GTL à l'autre pour en former une plus grosse (155).

2.4.4.3 Hydrolyse des gouttelettes lipidiques

L'hydrolyse des GTL sera effectuée par l'*Adipose triglyceride lipase* (ATGL) lorsqu'elle est activée par la *Comparative gene identification-58* (CGI-58). L'hydrolyse de la GTL par l'ATGL contribuera principalement à la formation de DG et d'AG non estérifiés (157). Ensuite, les DG sont hydrolysés par la lipase hormonosensible (HSL) en monoacylglycérols et en AG. Enfin, les monoacylglycérols sont hydrolysés en glycérol et en AG par la monoacylglycérol lipase (MGL) (158). La mutation de CGI-58 provoque le syndrome de Chanarin-Dorfman, amenant les patients à accumuler d'énormes GTL dans leur intestin grêle proximal (159). Ces différentes espèces de lipides provenant des GTL peuvent être dirigées vers différents compartiments pour être utilisées. En particulier, ils peuvent être redirigés vers le RE pour la formation de pré-CM, vers la mitochondrie

pour la production d'énergie par β -oxydation, vers les autophagosomes pour la lipophagie, ou simplement être exploités pour la synthèse d'autres lipides tels que les PL (160-162).

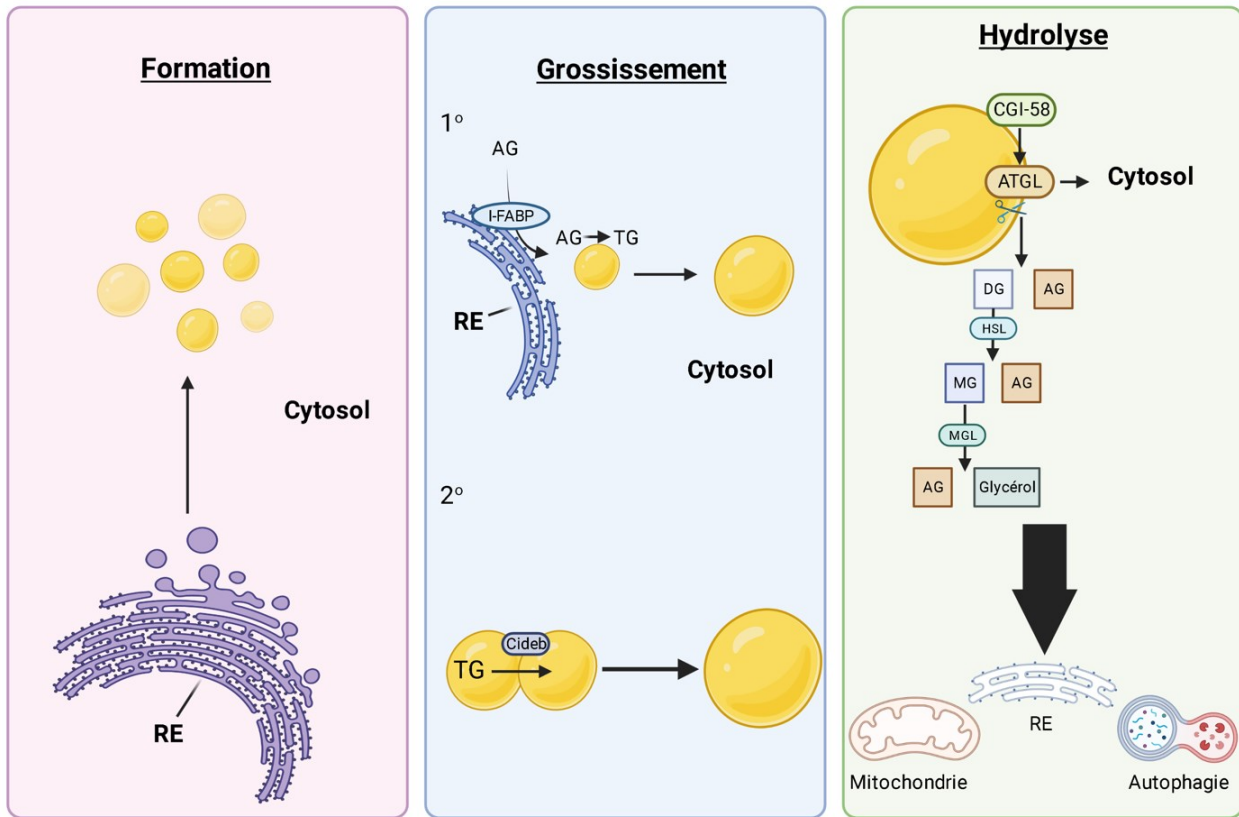


Figure 8. – Cycle de vie de la gouttelette lipidique

La gouttelette lipidique est dans un premier temps formée suite à un bourgeonnement de lipides hors du RE dans le cytosol. Par la suite, elle grossit de deux façons : par un apport direct de lipides à la gouttelette ou par fusion de deux vésicules grâce à Cideb qui permet de transférer les lipides d'une gouttelette à l'autre. Enfin, la gouttelette lipidique sera hydrolysée dans le cytosol par l'ATGL après son activation par le CGI-58, pour libérer des AG et des DG. Les DG sont hydrolysés par la HSL en MG et AG, et les MG sont ensuite hydrolysés en AG plus glycérol. Les différents composants vont aller vers différentes structures comme la mitochondrie, le RE ou même des autophagosomes pour autophagie. Cette illustration a été créée avec BioRender.com.

2.4.5 Formation du pré-chylomicron

Les lipides postprandiaux (85-90%) qui ne sont pas utilisés pour faire des GTL sont principalement dirigés au RE pour favoriser la formation du pré-CM (163). On y retrouve deux protéines

essentielles pour que ce processus puisse se faire : la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTTP) ainsi que l'ApoB-48. La mutation de ces deux protéines cause respectivement l'abétalipoprotéinémie (ABL) et l'hypobétalipoprotéinémie familiale (HBLF), deux des trois principales maladies congénitales qui causent une malabsorption intestinale très sévère à la fois des lipides et vitamines liposolubles. Vu l'importance de ces deux maladies, elles seront décrites en détail dans une [section](#) distincte traitant des principales maladies héréditaires causant des malabsorptions intestinales. On y retrouve aussi l'ApoA-4 qui favorise le grossissement du pré-CM. Ce mécanisme de formation est démontré à la [Figure 9](#).

2.4.5.1 *Microsomal triglyceride transfer protein*

La MTTP est une protéine hétérodimère de 97 KDa se trouvant dans le RE et qui est largement exprimée dans le foie et l'intestin (164, 165). Comme son nom l'indique, son rôle principal est de transférer les lipides (CHOL, PL et TG) de la membrane du RE au CM naissant (165). Non seulement la MTTP est indispensable dans ce transfert, mais elle régule indirectement la synthèse de l'ApoB-48. En effet, l'ApoB-48 possède une région à son extrémité N-terminale qui peut se lier directement au MTTP (167). Par cette liaison et donc par son rôle de chaperon, MTTP facilite la formation et empêche la dégradation de l'ApoB-48 (168). Son expression, ainsi que celle de l'ApoB-48 dans des cellules de E.coli BL21 qui ne sécrètent techniquement pas de lipides, est suffisante pour leur permettre de former et de sécréter des lipoprotéines riches en TG (168). De plus, l'inhibition pharmacologique ou génétique de la MTTP bloque complètement la biogenèse des VLDL dans les hépatocytes et des CM dans les entérocytes (169-171). Aussi, comme mentionné précédemment, la mutation de son gène cause l'ABL, ce qui empêche complètement le transport et la sécrétion des CM et des VLDL (172).

2.4.5.2 Apolipoprotéine B-48

L'ApoB-48 est une protéine structurelle essentielle à la formation du CM. L'assemblage du pré-CM s'initie par la translocation de l'ApoB-48 naissante dans la lumière du RE (173). Par la suite, l'ApoB-48 subit une lipidation partielle, conduisant à la formation d'une petite vésicule qui croît grâce à l'apport de lipides par la MTTP pour composer une lipoprotéine (174). Si l'apport en lipides est insuffisant ou si la MTTP est simplement tronquée, l'ApoB-48 naissante sera rapidement

ubiquitinée pour être dégradée (175). La dégradation peut se faire par autophagie ou par le protéasome. La délétion de MTTP ainsi que l'inhibition de son activité enzymatique contribuent à la dégradation de l'ApoB-48 (176). À noter que ce taux de dégradation dépend de la forme de l'ApoB. Une étude a démontré que l'ApoB-48 nécessite moins d'apports lipidiques que l'ApoB-100 pour être sécrétée comme composante des lipoprotéines (177).

Ainsi, on peut dire que l'ApoB-48 a un rôle important dans la formation de la structure initiale de la lipoprotéine, dans le maintien de sa structure et dans la régulation de son métabolisme (178). En effet, le niveau d'expression de l'ApoB-48, son taux de synthèse et son efficacité à être sécrétée contrôlent le nombre de lipoprotéines formées (136). Comme pour la MTTP, les altérations du gène de l'*ApoB* dans l'intestin de la souris empêchent la sécrétion des lipoprotéines (179). De plus, la mutation de son gène provoque une HBLF, entraînant une malabsorption intestinale importante des lipides (180).

2.4.5.3 Apolipoprotéine A-4

ApoB-48 et MTTP sont deux protéines dont les rôles dans la formation des pré-CM ont été largement étudiés. Néanmoins, il existe une protéine beaucoup moins connue appelée ApoA-4 qui favorise et régule le grossissement des pré-CM dans le RE. L'ApoA-4 est ajoutée au début de la formation du pré-CM et se retrouve à sa surface (50). En utilisant des cellules épithéliales porcines et des souris présentant une délétion génétique totale de l'ApoA-4, il a été possible de constater que l'ApoA-4 facilite le stockage des lipides dans le pré-CM, augmentant ainsi sa taille (181). Ce rôle serait généré par le fait que cette protéine stabilise la croissance de la vésicule en maintenant une élasticité constante, favorisant l'expansion de sa surface qui peut alors stocker plus de lipides (166, 181). Cependant, l'ApoA-4 n'affecte pas le nombre de CM sécrétés, mais uniquement leur taille. La majoration de son expression augmente l'expression de MTTP sans nécessairement affecter la sécrétion de CM (182). Inversement, la délétion totale de son expression affecte l'expression de la MTTP, entraînant une sécrétion moindre de CM (183, 184). Toutefois, d'autres études sont nécessaires pour mieux élucider le rôle de cette protéine dans l'intestin, son interaction avec la MTTP et pour déterminer si elle peut affecter l'entrée des lipides dans la cellule.

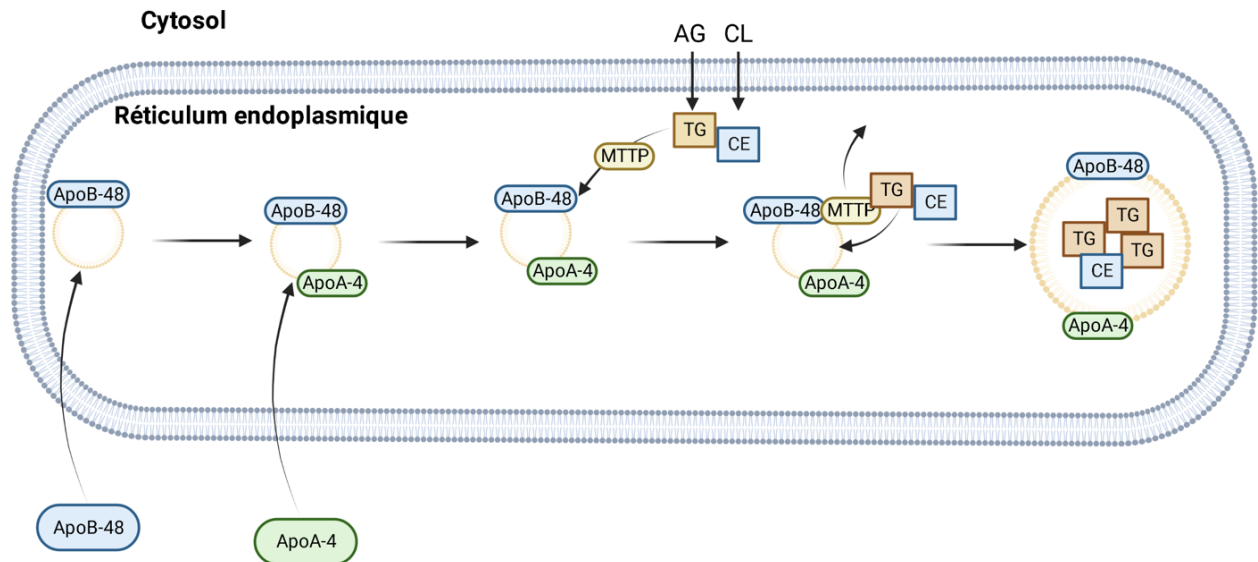


Figure 9. – Formation du pré-chylomicron dans le réticulum endoplasmique

Une ApoB-48 est dirigée dans la lumière du réticulum endoplasmique pour former une petite vésicule qui est rapidement ajoutée d'ApoA-4. Par la suite, le MTP dirige les lipides estérifiés vers la vésicule formée. Suite à la liaison du MTP à l'ApoB-48, les lipides sont dirigés dans la vésicule et le MTP se dégage de l'ApoB-48. L'ApoA-4 favorise aussi l'entrée des lipides dans la vésicule en permettant le grossissement de celle-ci. Cette vésicule, une fois assez grosse (environ 100 à 500nm), forme le pré-CM. Cette illustration a été créée avec BioRender.com.

2.4.6 Mobilité du pré-chylomicron à partir du RE vers le Golgi

Une fois que le pré-CM a reçu un apport nécessaire de lipides, il quitte le RE grâce au *pre-chylomicron transport vesicle* (PCTV) et est dirigé vers le Golgi. Puisque la grosseur d'un CM est entre 100 à 500nm (dépendamment de l'ampleur du repas gras), il ne peut donc pas utiliser les vésicules qui sont normalement utilisées pour le transport intracellulaire des protéines (60-70nm) pour aller au Golgi. Il doit donc recourir au PCTV qui est d'une grosseur entre 350-500nm (185). Ce complexe est composé des protéines du COPII ainsi que d'autres protéines qui vont faciliter le bourgeonnement du pré-CM hors du RE, comme le CD36, le L-FABP et la *vesicle-associated membrane protein 7* (VAMP7). Ce processus est illustré à la [Figure 10](#).

2.4.6.1 Le *Coat protein complexe II* et le Sar1b GTPase

Généralement, la formation de vésicules par les protéines COPII favorise le bourgeonnement de vésicules d'un diamètre compris entre 60 et 90 nm (186). Cependant, il a été découvert par microscopie électronique et par des essais *in vitro* que le complexe COPII est également requis pour la formation de grandes vésicules telles que ceux qui permettent le transport du pré-CM et du collagène (187-189). Ce mécanisme et les protéines qui sont nécessaires au bourgeonnement des grandes vésicules sont encore mal compris. Plusieurs de ces protéines de COPII sont expliquées dans cette section.

La première protéine de COPII impliquée dans la formation des vésicules est l'enzyme Sar1 GTPase. Il est clair que cette dernière est étroitement impliquée dans la formation des vésicules, mais son rôle exact est encore débattu. Sar1b joue clairement un rôle en tant que GTPase. Les GTPases se lient à la guanine triphosphate (GTP), une molécule importante pour le transfert d'énergie. Cette liaison entraîne l'activation de la GTPase et pour Sar1b, cela permet le recrutement des complexes Sec23 et Sec13 à la membrane du RE pour former le COPII, dont les étapes seront discutées dans les paragraphes suivants. Après la liaison du GTP, Sar1b commence également à hydrolyser le GTP en guanine diphosphate (GDP). L'hydrolyse du GTP en GDP inactive Sar1b et entraîne son détachement de la membrane du RE, ce qui provoque l'instabilité du complexe COPII qui, en raison de cette instabilité, se détache de la membrane (190, 191). Vu ce rôle de GTPase, plusieurs articles proposent ainsi que l'activité GTPase de Sar1, et donc l'accumulation de guanine triphosphate (GTP), permet à la vésicule COPII qui transporte le pré-CM d'être détachée du RE et dirigée dans le cytosol cellulaire suite au recrutement des protéines Secs (190, 191). Cependant, d'autres recherches proposent aussi que le Sar1b, une fois activé par le GTP, forme directement une courbure de la membrane du RE en déformant la bicouche lipidique. (192, 193). En effet, l'hélice N-terminale de Sar1b est très amphipatique et il a été observé qu'elle peut s'enfouir dans l'un des deux côtés de la bicouche lipidique de la membrane du RE. Cette entrée déplacerait la bicouche lipidique, en particulier les têtes de phospholipides, ce qui entraînerait une expansion asymétrique et donc une flexion de la membrane pour favoriser la formation de COPII. Il a été observé que la présence d'une courbure de la membrane augmenterait l'affinité de Sar1 envers cette membrane. Ceci favoriserait l'hydrolyse du GTP, ce

qui contribuerait à la déstabilisation de la bicouche lipidique afin de faciliter la fission de la membrane pour libérer le COPII (194).

La Sar1 GTPase a deux isoformes : la Sar1a GTPase et la Sar1b GTPase (146). La mutation du gène *Sar1b* a été associée au développement d'une maladie appelée maladie de rétention des CM (MRC), la troisième maladie héréditaire qui provoque une malabsorption intestinale importante des lipides (qui sera décrite dans une prochaine [section](#)) (5). Cette association démontre l'importance de Sar1b dans la formation des CM puisque les patients sont incapables de les sécréter dans la circulation sanguine. Dans les cellules entérocytaires Caco-2/15, il a été démontré dans notre laboratoire que l'absence de Sar1b GTPase diminue la sécrétion de CM (195). Néanmoins, cette sécrétion n'était abolie que lorsque la Sar1b GTPase ainsi que son isoforme, la Sar1a GTPase, étaient supprimées en même temps. Cet article a pu mettre en évidence le rôle de la Sar1b GTPase dans la formation du CM, mais aussi celui de Sar1a. Bien qu'aucune évidence n'ait encore bien confirmé chez un mammifère vivant les effets d'une délétion totale ou d'une mutation de Sar1b, l'augmentation de son expression génique chez la souris augmente la sécrétion de CM telle que décrite par notre laboratoire, démontrant une fois de plus sa fonction obligatoire dans le processus sécrétoire (196).

La deuxième protéine du complexe COPII est Sec12. Cette protéine se trouve à la sortie du RE et sa présence est requise pour la localisation de la Sar1 GTPase à la membrane (197). Son rôle principal dans la formation des vésicules est d'agir comme un *guanine nucleotide exchange factors* (GEF) pour la Sar1 GTPase. Par conséquent, elle se lie à la Sar1 GTPase pour favoriser la dissociation de la guanine diphosphate (GDP), laissant la possibilité à cette protéine de se lier au GTP. La liaison du GTP au Sar1 GTPase déclenche son activation (198).

L'activation de la Sar1 GTPase provoque le recrutement de plusieurs protéines qui vont entourer la vésicule comme un manteau. Tout d'abord, un hétérodimère composé de deux sous-unités Sec23 et Sec24 et formant un complexe stable, est recruté. Cet hétérodimère forme le complexe de pré-bourgeonnement de la vésicule et joue un rôle de complexe de revêtement interne. Par la suite, un autre hétérodimère comprenant Sec13 et Sec31 se fixe au-dessus de Sec23/24 pour former un complexe de revêtement externe. Sec23 est également une *GTPase-accelerating*

protein (GAP) qui stimule l'activité GTPase de Sar1. Cette activité GAP est encore augmentée lorsque Sec23 interagit avec Sec13/Sec31 (198).

Enfin, il existe également la Sec16 qui est attirée à la sortie du RE. Cette Sec16, par rapport aux autres, régule plutôt l'activité GTPase de Sar1 en interagissant avec Sec24 ou en empêchant le recrutement de Sec31 (199, 200).

Lorsque toutes les protéines sont présentes, le complexe COPII est complet et la vésicule bourgeonne hors du RE.

2.4.6.2 Autres protéines nécessaires à la sortie du pré-chylomicron hors du réticulum endoplasmique

Le bourgeonnement des CM hors du RE nécessite des protéines autres que celles du complexe COPII. Parmi ces protéines, il en existe plusieurs qui sont toutes associées au COPII, formant ainsi le PCTV. L'une d'entre elles est la L-FABP qui favorise le bourgeonnement du pré-CM. En effet, sa délétion totale chez la souris diminue ce bourgeonnement de 79% (185). CD36 et VAMP7 sont également présents et leur délétion totale ou inhibition empêche complètement la sortie du PCTV du RE. Comparé aux vésicules COPII normales, il est proposé pour les CM que CD36 et VAMP7 initient le bourgeonnement et pas les protéines COPII (185, 201). De plus, il est suggéré que la formation du PCTV est initiée par la présence d'une partie de l'ApoB-48 dans le cytosol, ce qui amènerait les protéines responsables du transport des lipides à entourer le pré-CM pour empêcher sa dégradation (185).

À l'exception des protéines du PCTV, il a été découvert d'autres protéines qui seraient impliquées dans la formation du pré-CM. Ce serait le cas de la *transport and Golgi organization protein 1* Golgi (TANGO1) et de Mia2/cTAGE5 (TALI). TANGO1 se trouve dans la membrane du RE et est nécessaire à la sécrétion du collagène (202). Comme les CM, le collagène nécessite également de très grandes vésicules pour sortir du RE. TANGO1 interagit directement avec le collagène et se lie aux protéines COPII telles que Sec16 pour faciliter la sortie des vésicules vers le cytosol (203). De plus, TANGO1 se lie à cTAGE5, qui à son tour collabore avec TANGO1 pour aider à la sortie du collagène, mais aussi aider au recrutement de Sec12 à la membrane du RE (204). Dans les cellules entérocytaires Caco-2, une variante de cTAGE5 a été trouvée qui est nommée TALI (205). Dans

ces mêmes cellules, il a pu être observé que la délétion totale de TANGO1 réduisait la sécrétion de CM de 44% alors que la délétion de TALI réduisait cette sécrétion de 82% (206). Ces résultats suggèrent que ces deux protéines sont nécessaires au bourgeonnement des pré-CM hors du RE, comme elles le sont pour le collagène.

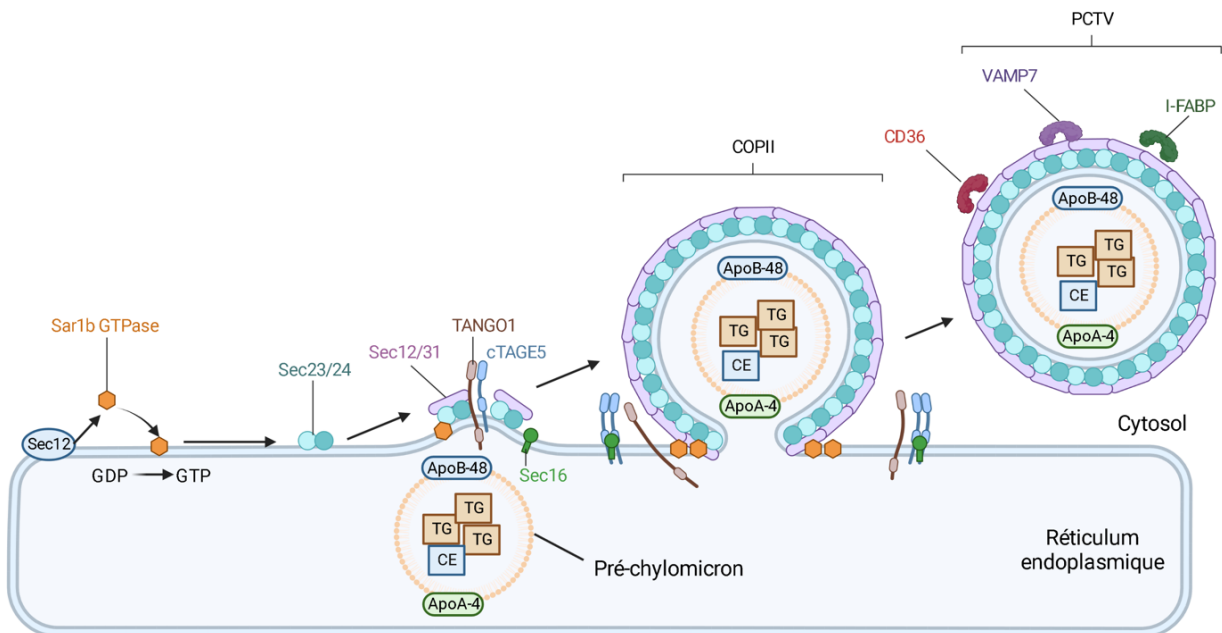


Figure 10. – Formation du *pre-chylomicron transport vesicle*

Le processus de formation du PCTV est complexe. Suite au recrutement du Sar1b GTPase par la Sec12, il favorise, lorsque lié au GTP, le bourgeonnement et la formation de la vésicule COPII. Cette vésicule entoure le pré-chylomicron suite au recrutement des Sec23/24 et 12/31 qui eux vont entourer cette vésicule comme un manteau. Le bourgeonnement du COPII dans le cytosol est favorisé par les protéines Sec12, Tango1 et cTAGE5. Sur ce COPII, il y a aussi recrutement de diverses protéines comme CD36, VAMP7 et I-FABP qui, tous ensemble, vont former le PCTV, permettant ainsi de transporter le pré-chylomicron vers le Golgi. Cette illustration a été créé avec BioRender.com.

2.4.7 Entrée du pré-chylomicron dans le Golgi et sa maturation en chylomicron

Une fois le pré-CM hors du RE, il est dirigé vers le *cis*-Golgi grâce au *complexe N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor* (SNARE). À l'intérieur du Golgi, il y a modification du

pré-CM, le rendant ainsi mature et prêt pour être sécrété dans le réseau lymphatique. Ce processus est démontré à la [Figure 11](#).

2.4.7.1 Le complexe *N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*

Le complexe SNARE est un complexe de plusieurs protéines qui permettent la liaison ainsi que la fusion du pré-CM au Golgi, un processus nécessaire pour faire entrer le CM dans cet organite. Chaque SNARE possède un motif SNARE d'environ 70 acides aminés qui permet la formation du complexe (207). Sur une vésicule, il existe un v-SNARE appelé aussi R-SNARE étant donné la présence d'une arginine (R). Au niveau de la membrane cible, ici au Golgi, il existe un t-SNARE aussi appelé Q-SNARE du fait de la présence de glutamate (Q), composé de 3 sous-types : Qa, Qb et Qc (208). Un R-SNARE présent sur la vésicule se lie à chacun des trois sous-types Q-SNARE de la membrane cible pour former un complexe appelé SNARE-pin (209). C'est ce complexe qui entraîne la fusion du CM au cis-Golgi. Plus spécifiquement pour le CM, une étude a pu démontrer que le R-SNARE du PCTV se trouve être la protéine VAMP7 dont la fonction au niveau du PCTV a été mentionné précédemment (201). Les trois sous-types de Q-SNARE présents à la membrane du Golgi sont la syntaxine 5, la rbet1 et la vti1a (201).

2.4.7.2 Maturation du chylomicron dans le Golgi

La maturation du CM et son transport dans le Golgi sont des mécanismes qui ne sont pas entièrement compris. Cependant, deux modifications majeures du CM se produisent dans le Golgi et sont assez bien connues. Premièrement, il y a l'ajout d'ApoA-1 au pré-CM. Certaines études ont pu démontrer que l'ApoA-1 n'est présente dans le CM qu'après la fusion et l'entrée dans le Golgi (201, 210). La deuxième modification est la glycosylation de l'Apo-48 par des endoglycosidases, principalement par l'ajout de N- et O-glycans (211). Il a été proposé pour l'ApoB-48 que les glycanes soient essentiels dans la sécrétion post-Golgi du CM. Par conséquent, cette glycosylation pourrait être un marqueur pour déterminer un défaut d'assemblage des lipoprotéines et de leur sécrétion dans la circulation (211).

Une autre protéine qui est proposée de jouer un rôle essentiel dans la maturation du CM et le trafic de cette vésicule dans le Golgi est appelée *GTPase ADP-ribosylation factor-related protein-1* (ARFRP1). L'ARFRP1 fait partie de la cascade ARFRP1-ARL1-Golgin-Rab, qui est nécessaire au

transport des cargaisons vers le trans-Golgi (212). Il a été observé il y a quelques années que la délétion de chacune des protéines de cette cascade dans les cellules entérocytaires Caco-2 diminue la sécrétion de lipides (213). Ce résultat a été confirmé *in vivo* pour ARFRP1 chez la souris. En effet, une délétion totale de l'ARFRP1 chez ce mammifère a réduit de façon drastique la quantité de lipides dans les CM (213). Comme l'activité de MTTP, la sortie de l'ApoB-48 dans le cytosol et la localisation de la PCTV dans le Golgi étaient toutes normales, les auteurs ont émis l'hypothèse que l'ARFRP1 régule la lipidation des CM dans le Golgi. Ils ont également indiqué qu'il y a un dernier transfert de TG vers le CM pour une maturation finale dans le Golgi. De plus, ils ont également observé une accumulation d'ApoA-1 dans le Golgi, soutenant l'importance de l'ARFRP1 (213).

2.4.8 Exocytose des chylomicrons du Golgi pour être dirigés vers la circulation sanguine

Dans un premier temps, les CM du Golgi vont être dirigés vers la membrane cellulaire basolatérale de l'entérocyte pour sortir dans la *lamina propria*. Cependant, les mécanismes qui permettent au CM de se fusionner à cette membrane et de sortir par exocytose ne sont pas très bien connus. Il a été suggéré que la sortie du CM à travers la membrane basolatérale serait causée par une rupture de cette membrane lors de l'absorption des lipides, permettant ainsi au CM de passer dans la circulation sanguine (43, 214). Cette hypothèse proposerait également que cette rupture soit responsable de l'augmentation de la perméabilité de la muqueuse lors de l'absorption des lipides (215). De même, il a été proposé très récemment qu'un membre de la famille DENN, la protéine *DENN domain containing 5B* (DENND5B), joue un rôle dans la sécrétion post-Golgi de CM. Cette protéine de 145 kDa n'avait initialement aucune fonction caractérisée. Compte tenu de la présence d'un domaine GEF dans sa structure pour activer la GTPase RAB, il a été proposé qu'elle ait un rôle potentiel dans le trafic vésiculaire (216). De façon intéressante, la délétion totale de DENND5B chez la souris a fortement diminué la sécrétion de lipides intestinaux et a entraîné une stéatose intestinale. De plus, par microscopie électronique, il a été observé que par rapport aux souris normales, les CM des souris avec un KO total se liaient très peu à la membrane basolatérale de l'entérocyte, diminuant fortement la quantité de CM quittant la cellule (217).

Par la suite, une fois dans la *lamina propria*, les CM sont dirigés vers les chylifères, qui sont des vaisseaux lymphatiques. Les chylifères sont des structures très importantes dans le transport des lipides alimentaires et il est connu que le flux de la lymphe augmente dans l'état postprandial pour diriger les AG des CM vers les différents tissus (218). La formation dans l'intestin de vaisseaux lymphatiques, appelée lymphangiogenèse, est également primordiale et il a été montré que le dysfonctionnement du récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR) 3, un récepteur qui active la lymphangiogenèse, entraîne une rétention des lipides dans l'intestin grêle (219).

La couche endothéliale des chylifères est composée de jonctions entre les cellules qui peut être ouvertes ou fermées (220, 221). Il est maintenant proposé que les CM sont transportés dans les chylifères par les jonctions ouvertes entre les cellules endothéliales (222). En effet, la délétion spécifique dans l'endothélium de la neuropiline 1 (Nrp1) et *vascular endothelial growth factor receptor 1* (Flt1) suite à une induction de tamoxifen, a généré une fermeture des jonctions des chylifères, ce qui a entraîné une malabsorption des CM dans le chylifère. Cette malabsorption a protégé les souris contre le développement de l'obésité. Restaurer l'ouverture de ces jonctions par l'inhibition de la signalisation du VEGFR2 et des cadhérines de l'endothélium vasculaire a permis l'ouverture de ces jonctions et ainsi, le transport des CM dans le chylifère (222).

En outre, d'autres protéines semblent importantes dans ce processus. Par exemple, la délétion totale chez des souris du *transcription factor pleomorphic adenoma gene like-2* ont empêché les CM d'entrer dans le chylifère alors qu'elles étaient capables de sortir de l'entérocyte, ce qui a entraîné une accumulation de CM dans la *lamina propria* (170). La délétion spécifique dans l'endothélium du *Notch ligand delta-like 4* par la technologie Cre-Lox dans des souris a aussi diminuer la prise de lipides alimentaires (221).

Une fois dans le chyle, les CM lymphatiques sont pompés vers les canaux lymphatiques mésentériques par des mouvements de contraction (223). Le chyle, constitué de la lymphe riche en CM, sera dirigé vers la citerne du chyle grâce également à des mouvements de contraction puis vers le canal thoracique. Enfin, le canal thoracique conduit le chyle à travers le hiatus arotique dans le diaphragme ainsi que dans l'aorte pour atteindre la jonction de la veine jugulaire interne

et de la veine sous-clavière. C'est à ce moment que le chyle est rejeté dans le système veineux (224, 225).

Le processus de transport vers la lymphe est décrit à la [Figure 11](#).

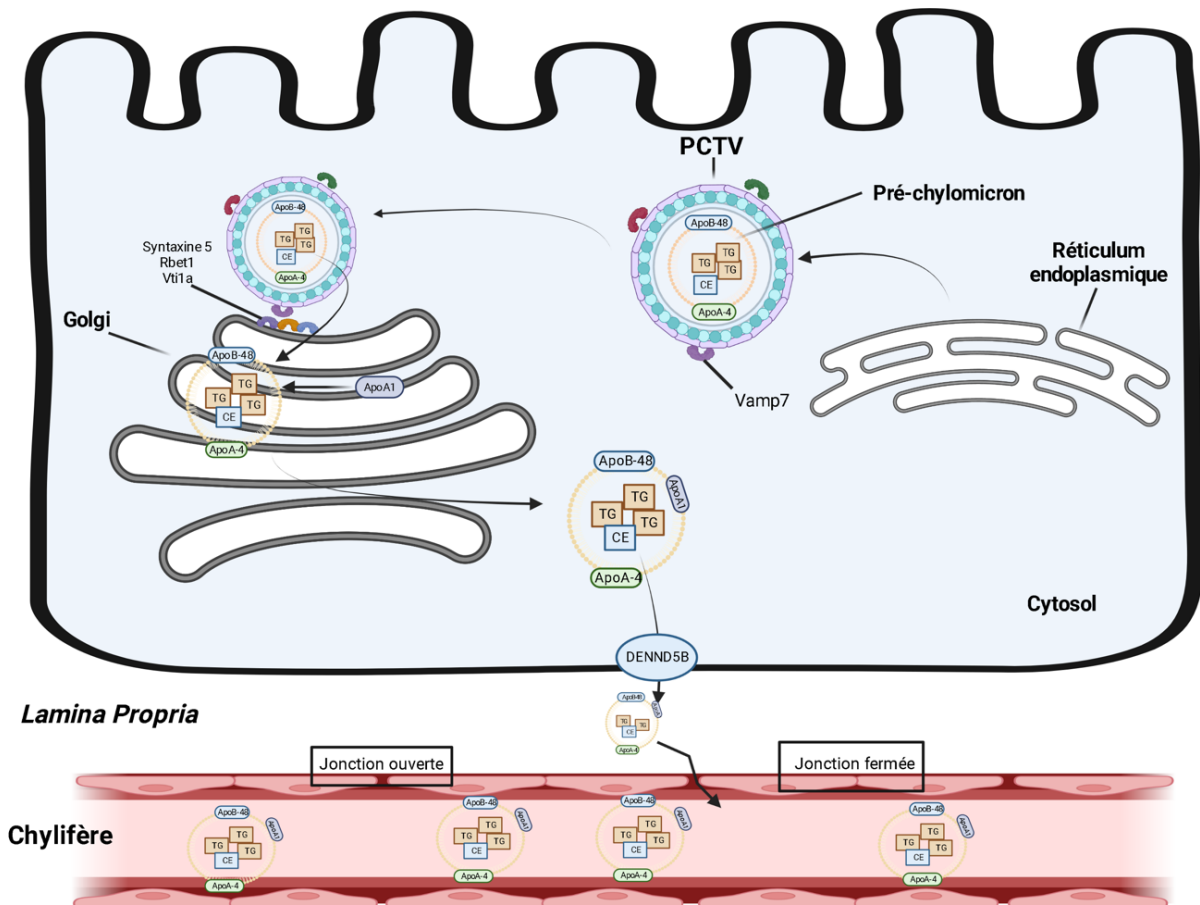


Figure 11. – Transport du chylomicron provenant réticulum endoplasmique vers les vaisseaux lymphatiques

Le pré-chylomicron sort du réticulum endoplasmique grâce au PCTV pour être dirigé vers le Golgi. La liaison de VAMP7, retrouvé sur le PCTV, avec les protéines Syntaxine 5, Rbet1 et VTI1a, retrouvés sur le Golgi, font rentrer le pré-chylomicron dans le Golgi. Une fois dans cette organelle, il y a glycosylation de l'Apo48 et ajout de l'ApoA1 sur le pré-chylomicron pour former un CM mature. Une fois mature, cette vésicule sort du Golgi pour aller dans la Lamina Propria , et ceci serait permis grâce à DENND5B. Par la suite, le CM

est dirigé dans le chylifère et rentrerait par des jonctions ouvertes entre les cellules endothéliales. Cette illustration a été créée avec BioRender.com.

2.4.9 Autres entrées et sorties du CHOL dans la cellule intestinale

La plupart des AG qui entrent dans la cellule proviennent de l'alimentation. De plus, ils sont majoritairement sécrétés dans la circulation sanguine sous forme de CM pour les LCFA. Cependant, le CHOL peut être transporté dans la circulation sanguine et peut entrer dans l'intestin par d'autres stratégies qui ne sont pas empruntées par les AG. En effet, comme pour le foie, le CHOL peut être transporté et sécrété dans la circulation sanguine sous la forme d'une petite lipoprotéine appelée lipoprotéine de haute densité (HDL). En fait, chez les souris, 30 % des HDL et 50 % de l'ApoA-1 dans le sang proviendraient de l'intestin (230). De plus, des études proposent que le CHOL de la circulation sanguine puisse être absorbé dans l'intestin et sortir de l'entérocyte vers la lumière intestinale par l'excrétion transintestinale du CHOL (TICE). Ces deux processus sont représentés à la [Figure 12](#).

2.4.9.1 Formation du HDL

Comme le foie, l'intestin peut également former des vésicules de HDL, permettant ainsi au CHOL intestinal d'être transporté dans la circulation sanguine d'une autre manière. Comparativement aux CM, les HDL nouvellement formées sont plutôt associées à l'ApoA-1 et sont composées principalement de CHOL libre (230). Le CHOL libre de ces HDL naissants devient du CHOL ester dans la circulation sanguine grâce à la lécithine : cholestérol acyltransférase dont la fonction est d'estérifier le CHOL libre. Elle est activée par l'ApoA-1 et facilite la formation du noyau des HDL par le CHOL ester (49). La protéine la plus importante dans la formation intestinale des HDL est la pompe d'efflux nommée *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1). Cette ATP cassette est essentielle à la formation des HDL en facilitant le transfert de CHOL et de PL de la membrane vers la particule d'ApoA-1 (231). Il est bien démontré que la délétion intestinale spécifique d'ABCA1 obtenue grâce au système Cre-LoxP, réduit significativement la sécrétion de HDL sans affecter l'absorption de CHOL (230). De plus, la mutation d'ABCA1 provoque la maladie de Tangier et empêche complètement la sécrétion de HDL chez ces patients (232). Ces patients, vont donc avoir aucun HDL dans la circulation sanguine, ce qui peut apporter au développement

d'hépatosplénomégalie et de lymphadénopathie, ainsi qu'une accumulation importante de cellules spumeuses dans les amygdales et les ganglions lymphatiques (232).

2.4.9.2 Excrétion transintestinale du cholestérol

Il existe un paradigme dans lequel on pense que le CHOL de tous les tissus périphériques pris en charge par les HDL (pour un but d'excrétion) est dirigé vers le foie (233). Ce dernier forme ensuite des acides biliaires à partir du CHOL qui sera dirigé vers la lumière de l'intestin pour être sécrété dans les fèces, favorisant ainsi l'élimination de l'excès de CHOL de l'organisme. Cependant, des études suggèrent de plus en plus que le CHOL n'est pas seulement excrété du corps sous forme d'acides biliaires. En fait, une partie du CHOL du plasma peut être excrétée dans les fèces directement par les cellules intestinales par le processus TICE. Le processus moléculaire qui permet ce transport n'est pas encore bien compris, mais il est proposé que chez la souris, 33 % du CHOL excrété dans les fèces proviendrait du TICE alors que seulement 25 % du CHOL proviendrait de la bile (234). De plus, chez les humains, il est proposé que seulement 44 % du CHOL excrété provienne de la bile. Cette hypothèse est étayée par le fait que les patients qui ne peuvent pas sécréter de bile ont quand même beaucoup de CHOL dans leurs fèces (235, 236).

Par conséquent, quelle lipoprotéine serait responsable de l'acheminement du CHOL vers l'intestin dans le processus du TICE ? Il a été observé que ce ne serait pas les HDL puisqu'une délétion totale d'ABCA1 ou de SR-B1 empêche significativement la clairance du CHOL par les HDL, tout en n'ayant aucun impact sur le TICE (237, 238). Il pourrait alors s'agir des lipoprotéines de basse densité (LDL) ou des VLDL. L'entrée de ces lipoprotéines dans une cellule se fait par le récepteur des LDL (LDLr) qui est bien exprimé dans l'intestin (239). Ce LDLr est principalement régulé par la *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9* (PCSK9) dont l'expression contribue à la dégradation du LDLr, empêchant ainsi l'entrée du CHOL de la lipoprotéine dans la cellule (240). Des recherches ont montré que la délétion totale de LDLr n'affecte pas le TICE, alors qu'une expression accrue l'augmente (239, 241). De plus, la délétion totale de PCSK9 augmente le TICE (241). Ainsi, on peut faire l'hypothèse ici qu'il peut y avoir une compensation par d'autres voies lorsqu'il y a une délétion de LDLr (242). Cependant, il a été récemment démontré en 2019 que la présence de la CETP humaine chez la souris favorisait la sécrétion de CHOL dans la bile au détriment du TICE

(243). En outre, ils ont observé que le CHOL provenant des HDL favorisait habituellement la voie biliaire, mais qu'en présence de CETP, il était plutôt dirigé vers l'intestin. Au contraire, la présence de CETP augmente le transport du CHOL des LDL vers la bile et ce CHOL est très peu présent dans l'intestin. Ces résultats favoriseraient donc le rôle des HDL dans le TICE et mettent en évidence le rôle du CETP (243).

Quoi qu'il en soit, il est bien connu que l'ABCG5/G8, dont le rôle a été décrit précédemment, joue un rôle dans le TICE puisque l'altération de son activité affecte directement le transport de CHOL de l'entérocyte vers la lumière intestinale (234, 244).

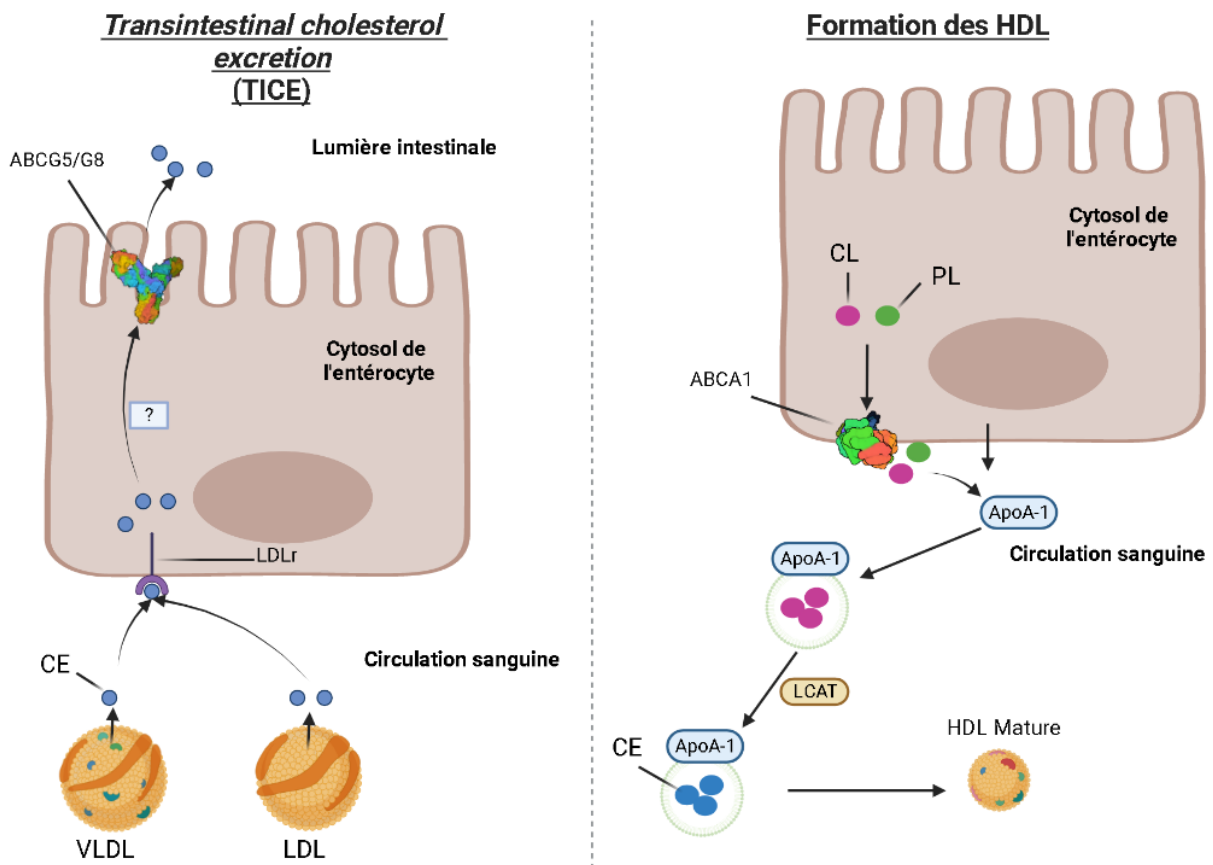


Figure 12. – L'excrétion transintestinale du cholestérol et le processus de formation des HDL

Pour le TICE, le CE des VLDL et LDL dans la circulation sanguine serait pris par le LDLr retrouvé à la surface de l'entérocyte à son côté basolatéral. Le LDLr fait rentrer le CE dans la cellule et celui-ci sera dirigé par un mécanisme inconnu vers ABCG5/G8. Cet hétérodimère transporte simplement ce CE vers la lumière

intestinale pour son excrétion dans les fèces. Quant à la formation des HDL, l'entérocyte forme de l'ApoA-1 qui lui reçoit grâce à l'ABCA1 du CL et des PL provenant de l'intérieur de l'entérocyte. Ceci forme une vésicule dans la circulation enrichie en CL et entourée de PL. Par la suite, LCAT estérifie le CL en en CE, permettant ainsi de former un HDL naissant. Cet HDL acquière dans la circulation d'autres protéines ainsi que du CE provenant de tissus périphériques, lui permettant de devenir un HDL mature. Cette illustration a été créé avec BioRender.com.

2.5 Le chylomicron dans la circulation sanguine

Une fois dans la circulation sanguine, le CM subit plusieurs modifications avant d'être hydrolysé par la LPL pour libérer les AG libres dans la circulation sanguine. Dans cette circulation, 3 Apo se rajoutent sur le CM : ApoC2, ApoC3 et ApoE (245). Les rôles de ces différentes lipoprotéines ont été mentionnés dans une [section](#) précédente.

Après l'addition de ces différentes Apo, la LPL, une enzyme extracellulaire, entre en jeu. Cette protéine, synthétisée par le tissu adipeux et les myocytes des muscles cardiaques et squelettiques, est transportée à travers la barrière endothéliale pour se nicher à la surface de l'endothélium vasculaire, enchâssée dans les parois capillaires. Son rôle consiste à hydrolyser les TG présentes dans la circulation sanguine pour produire des AG et du glycérol (246). Les TG dans la circulation proviennent des CM et aussi des lipoprotéines sécrétées par le foie, c'est-à-dire les VLDL. Sa régulation est extrêmement importante et, comme mentionné précédemment, la mutation des protéines qui régulent son activité peut augmenter considérablement les chances de développer des maladies cardiovasculaires (246).

Outre les trois Apo mentionnées ci-dessus, il existe 3 autres protéines dont les mutations chez les patients nous ont permis de savoir qu'elles jouent un rôle important dans la régulation de la LPL. Il s'agit de la *lipase maturation factor 1*, qui active la LPL après traduction, de la *glycophosphatidylinositol HDL-binding protein-1*, qui permet de diriger la LPL dans la circulation et de la fixer à la surface endothéliale, et de l'ApoA5, qui interagit également avec la LPL pour favoriser l'hydrolyse du CM (247, 248).

L'hydrolyse du CM libère des AG dans la circulation sanguine. Ces AG vont se lier à l'albumine pour être dirigés vers différents tissus périphériques comme le tissu adipeux pour le stockage ou

le muscle squelettique pour être une source d'énergie. Dans les tissus périphériques, les AG vont pouvoir entrer dans la cellule grâce à plusieurs protéines telles que les protéines de liaison à l'albumine, les FATP et les FABP (249). Le résidu de CM, qui contient des lipides, des protéines et des vitamines liposolubles, sera principalement dirigé vers le foie. Comme mentionné, l'ApoE aide à l'entrée du résidu de CM dans le foie en favorisant la liaison du résidu aux protéoglycanes de sulfate d'héparane à la surface des hépatocytes. Après la liaison, le résidu pénètre dans l'hépatocyte par l'intermédiaire de LDLr (53).

2.6 Facteurs régulant la sécrétion des chylomicrons

Les modifications génétiques sont évidemment des facteurs qui ont un très grand impact sur la sécrétion du CM. En effet, la délétion ou la mutation de plusieurs protéines peut moduler de manière drastique la sécrétion des CM, affectant ainsi positivement ou négativement l'individu. Cependant, en dehors des facteurs génétiques, d'autres éléments externes peuvent réguler la formation et la sécrétion du CM. Il s'agit des nutriments, de l'insuline, des AG libres, des peptides gastro-intestinaux, du genre et du microbiote. L'effet de ces facteurs sur la sécrétion des CM est illustré de façon simplifiée à la [Figure 13](#).

2.6.1 Les facteurs nutritionnels

Les nutriments provenant du régime alimentaire peuvent en partie réguler la quantité de CM qui sera sécrétée. Il est évident qu'une augmentation de la quantité de graisses ingérées augmente également la quantité de CM, mais il existe des preuves que la composition en AG peut également affecter cette sécrétion. En effet, des études ont pu observer que les individus ayant pris un repas riche en AG polyinsaturés tels que les oméga-6 et les oméga-3 avaient des concentrations de CM plus faibles que ceux ayant pris des AG saturés (250, 251). De plus, leurs CM étaient plus sensibles à la lipolyse *in vitro*, ce qui pourrait expliquer ces résultats (251). De même, les patients obèses qui ont pris des oméga-3 en supplémentation pendant 12 semaines avaient des concentrations postprandiales de TG et d'ApoB-48 plus faibles (252).

Les glucides constituent un autre facteur qui peut moduler cette sécrétion. Certaines associations ont été faites entre la consommation de glucides tels que le fructose et la concentration de TG dans le plasma (253). Cependant, peu de personnes ont cherché à savoir si l'apport en glucides

augmentait la sécrétion lipidique postprandiale et pour ceux qui l'ont fait, les résultats ne sont pas convaincants. Au niveau chronique, un régime riche en glucides aura un effet sur la résistance à l'insuline, ce qui module la sécrétion de CM (254). Pour une consommation aiguë, de nombreux résultats obtenus sont dichotomiques en raison de différents facteurs tels que le type de glucides (255-257). Plus récemment, une étude a examiné l'effet aigu du glucose et du fructose sur la production de CM en utilisant de la radioactivité et un environnement hautement contrôlé qui empêche l'insuline d'avoir un impact sur les résultats obtenus. Ils ont effectivement constaté une augmentation de la sécrétion de CM et ont émis l'hypothèse que cela pourrait être dû à une augmentation de la lipogenèse *de novo* dans l'entérocyte, comme c'est le cas dans le foie, un processus qui sera expliqué en détail dans une [section](#) ultérieure (258).

Certaines études ont examiné l'effet des protéines sur la sécrétion postprandiale de lipides. On a observé que les personnes ayant un régime riche en protéines (viande rouge) présentaient des concentrations d'ApoB-48 beaucoup plus faibles après l'administration de lipides que les personnes ayant un régime pauvre en protéines. Cependant, les personnes suivant un régime pauvre en protéines consommaient plus d'hydrates de carbone, ce qui peut avoir affecté les résultats (259). De façon aiguë, la prise de caséine, une protéine du lait, avec l'alimentation lipidique réduit la sécrétion lipidique postprandiale, probablement par une augmentation de la sécrétion d'insuline et une diminution des AG libres circulants (260). En outre, il semble que la composition des protéines ait également un impact puisque les individus atteints de diabète de type II sécrètent moins de CM après l'ingestion de protéines de lait par rapport à la caséine, la morue ou le gluten (261).

Enfin, une seule étude a examiné l'effet des fibres dans un régime mixte. Elle a constaté une diminution de la sécrétion de TG sans effet sur la quantité d'ApoB-48 (262).

2.6.2 L'insuline, la résistance à l'insuline et les acides gras libres.

L'insuline et les AG libres sont deux facteurs interdépendants qui affectent fortement la sécrétion de CM. Les AG libres sanguins vont augmenter la sécrétion de VLDL et de CM tandis que l'insuline inhibe la libération des AG dans la circulation. En effet, il a été observé que l'injection intraveineuse d'AG avec de l'héparine, qui inhibe la liaison de l'insuline avec son récepteur,

augmente la sécrétion de CM de 69% par rapport au placebo (sans lipides), et ces résultats ont été soutenus par des expériences *in vivo* sur des hamsters et *ex vivo* sur leurs entérocytes primaires isolés (263, 264). Ainsi, il a été émis l'hypothèse que l'efflux plus important d'AG libres trouvé chez les individus avec un diabète de type II ou une résistance à l'insuline est la cause de leur plus grande sécrétion de CM par rapport aux individus sains (50). Effectivement, les gens en surpoids ont un flux plus élevé d'AG libres dans leur circulation sanguine à cause d'une augmentation de la lipolyse des GTL provenant des tissus adipeux. Ceci engendre une résistance à l'insuline des tissus périphériques, en particulier les muscles, en inhibant l'entrée du glucose par l'insuline, ainsi que la synthèse de glycogène (265).

Il a été démontré que l'insuline diminue la sécrétion de VLDL et de CM chez les individus sains (266, 267). Une étude a montré que l'hyperinsulinémie diminue la libération d'AG libres dans la circulation sanguine et que lorsque cette diminution des AG est empêchée par une injection intraveineuse d'AG, la sécrétion de CM revient un peu plus à la normale (267). Cependant, comme la sécrétion ne revient pas tout à fait à la normale, on pense qu'il existe également un mécanisme indépendant des AG. Cela pourrait être dû au fait que l'insuline peut diminuer la traduction de l'*ApoB* par le biais de la signalisation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et le *mechanistic target of rapamicin* (mTOR), comme cela a été observé chez les HepG2. En effet, l'ARNm de l'*ApoB* possède un élément *cis*-actif dans une région 5' non traduite qui est nécessaire à la traduction, et il a été démontré que l'insuline empêche cet élément *cis*-actif de se lier au facteur protéique *trans*-actif de 110 kDa pour permettre sa traduction. Lors d'une insulino-résistance, l'insuline aurait moins d'effets, entraînant une augmentation de la traduction de l'*ApoB*, expliquant en partie l'augmentation de la sécrétion postprandiale de CM (268).

2.6.3 Les peptides gastro-intestinaux

Les cellules entéroendocrines de l'intestin permettent la sécrétion de plus de 100 types de peptides actifs qui peuvent réguler la prise alimentaire et l'équilibre énergétique grâce à leur large éventail de fonctions (269). La plupart des peptides sont sécrétés par ces cellules pendant la prise alimentaire ou à l'état de jeûne vers le cerveau et/ou les tissus périphériques. Quelques études ont regardé le rôle de certains de ces peptides sur la sécrétion lipidique postprandiale (270).

Il existe deux peptides gastro-intestinaux participant à la sécrétion lipidique postprandiale. Ces deux peptides sont appelés *glucagon-like peptide* (GLP) 1 et 2. Ils sont sécrétés par les cellules entéroendocrines L présentes dans l'intestin grêle après l'ingestion de nutriments, et dégradés très rapidement dans le sang par la *dipeptidyl peptidase IV* (DPP4) (272). Dans un premier temps, le GLP-1 a de nombreux effets métaboliques, notamment sur la sécrétion d'insuline et l'appétit. Au niveau des lipides postprandiaux, l'utilisation d'un inhibiteur de DPP4 chez le hamster diminue la quantité de TG postprandiaux alors qu'un analogue du GLP-1 réduit cette sécrétion dans des cellules entérocytaires primaires. Cet effet a été également retrouvé chez les souris présentant une délétion totale pour le récepteur du GLP-1 (273). Chez les patients, il est difficile de savoir si l'utilisation chronique de médicaments ciblant le GLP-1 et son récepteur peut avoir des effets directs sur la sécrétion de CM puisque l'utilisation de ces médicaments améliore la résistance à l'insuline et le diabète de type II, deux conditions qui influencent la sécrétion de CM (50). Néanmoins, l'injection d'une dose d'un agoniste du récepteur du GLP-1 a réduit la production de lipoprotéines riches en ApoB-48 de 38% alors que l'injection d'un inhibiteur de la DPP4 a réduit cette sécrétion de 50%. Pour s'assurer que ces résultats ne sont pas influencés par d'autres effets du GLP-1, l'auteur s'est assuré de l'absence à la fois de fluctuations de la sécrétion d'insuline par un clampage pancréatique et d'effet sur la vidange gastrique par une alimentation nasoduodénale (274).

Le GLP-2 n'a pas les effets bénéfiques du GLP-1 sur la résistance à l'insuline, mais a tout de même un impact sur l'absorption des nutriments et la vidange gastrique (275). Chez les hamsters, la prise d'un analogue du GLP-2 augmente l'absorption des lipides par le CD36 et élève également la sécrétion des CM (276). Chez l'homme, il a également été observé que l'administration de GLP-2 par voie intraveineuse augmente la sécrétion postprandiale de TG (277). De plus, pour s'assurer qu'aucun facteur n'affecte les résultats du GLP-2, on a procédé de la même façon que pour le GLP-1 (clamp et tube nasoduodénal). Il a également été noté que le GLP-2 augmente les taux sanguins d'Apo-48 (278). Les résultats ont pu démontrer que le GLP-2 fait sécréter les lipides déjà accumulés dans l'intestin ainsi que l'ApoB-48 présynthétisée par des mécanismes encore mal compris (278). Chez l'homme, il a été observé très récemment que l'administration sous-cutanée de GLP-2 augmente la concentration de TG après un bolus de graisse. Cependant, contrairement

à ce que l'on pensait, cette injection n'a pas réduit le nombre et la taille des GTL duodénaux. Ils ont proposé que le GLP-2 mobiliserait les CM qui se trouveraient dans la *lamina propria* et le réseau lymphatique, mais les protéines qui joueraient un rôle dans ce mécanisme restent à être identifiées (279). Compte tenu de la dichotomie entre le GLP1 et le GLP-2, d'autres études seraient nécessaires pour déterminer les actions et la concentration idéale de chaque peptide.

2.6.4 Le sexe

Ces dernières années, il est de plus en plus recommandé de scruter à la fois les mâles et les femelles dans les différentes expériences, car leur métabolisme est différent et ils ne réagissent pas nécessairement de la même manière. C'est également le cas pour l'homéostasie des lipides, tant chez l'homme que chez la souris (280). En effet, chez la souris, la délétion totale de DENND5B mentionnée précédemment entraîne un changement beaucoup plus important de la concentration plasmatique de CHOL chez les souris femelles par rapport aux mâles (217). Cette diminution de CHOL serait potentiellement expliquée par une diminution de la sécrétion de CM dans la circulation sanguine, mais d'autres études restent à être faites pour déterminer son rôle dans le métabolisme du CHOL. De plus, les rats femelles ont une activité de la LPL beaucoup plus élevée que les mâles, ce qui augmente la vitesse à laquelle les CM sont métabolisés dans la circulation sanguine. Il a été observé que ceci est dû à la testostérone qui diminue l'activité de cette enzyme (281).

Chez l'humain, il est bien connu que les femmes développent des maladies coronariennes 10 à 20 ans plus tard que les hommes (282, 283). En effet, jusqu'à la ménopause, les femmes auront des niveaux plus faibles de LDL-CHOL et des LDL de plus grande taille que les hommes (284, 285). Au niveau de la sécrétion lipidique postprandiale, quelques articles confirment les résultats trouvés chez le rat. Il a été observé que les TG alimentaires passent plus lentement dans la circulation sanguine et sont éliminés plus lentement chez les hommes que chez les femmes (286, 287), que l'intensité du pic postprandial était plus élevée chez les hommes et qu'ils avaient un plus grand taux de TG plasmatique suite au gavage (288-290). Malheureusement, nos connaissances à ce niveau sont assez limitées chez l'humain et d'autres recherches seraient nécessaires pour mieux comprendre ce qui génère les différences.

2.6.5 Le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est un ensemble de bactéries et d'autres micro-organismes présents dans l'intestin. Il a été proposé qu'il existe environ 500 à 1000 espèces différentes de bactéries (291). La diversité et l'abondance microbiennes sont beaucoup plus faibles dans l'intestin grêle (10^3 - 10^7 cellules bactériennes par gramme de tissu) que dans le gros intestin (10^{12} cellules bactériennes par gramme de tissu), mais il a tout de même été démontré que les bactéries peuvent modifier le métabolisme des lipides de l'hôte, bien que les mécanismes ne soient pas encore bien compris (292, 293). On a découvert assez récemment que les souris exemptes de germes étaient résistantes à l'obésité, mangeaient moins de calories, sécrétaient plus de lipides dans leurs fèces et utilisaient davantage leurs lipides intestinaux via l'oxydation des AG (294, 295). De plus, les rats prenant des antibiotiques avaient une diminution de la sécrétion de CM, soutenue par une diminution plasmatique de l'ApoB, de l'ApoA-1 et de l'ApoA-4 après un gavage de lipides (296). Aussi, ces rats avaient des mastocytes moins actifs, qui, lorsqu'ils sont actifs, augmentent le flux lymphatique et la perméabilité intestinale, deux facteurs qui peuvent affecter la sécrétion de CM (296-298). Enfin, les souris sans germes recevant le microbiote provenant d'animaux soumis à un régime riche en graisses absorbent davantage d'AG par l'intestin que les souris recevant le microbiote provenant de souris soumises à un régime pauvre en graisses (295).

À l'heure actuelle, le mécanisme connu du microbiote qui pourrait affecter la sécrétion de CM serait la formation de SCFA. En effet, les glucides non digérés par l'intestin sont fermentés par des enzymes du microbiote qui décomposent les glucides pour produire des SCFA (299). On trouve notamment de l'acétate, du propionate et du butyrate, qui forment 95% de ces SCFA (300). Ces AG sont absorbés par l'intestin, entrent dans la circulation par la veine porte et se dirigent vers différents tissus. Comme revu par Yu et al (2019), ces SCFA peuvent réguler de nombreux mécanismes tels que l'apport énergétique, le métabolisme du glucose, le métabolisme des lipides, l'adipogenèse, les réponses immunitaires ainsi que l'obésité (301). En particulier, il est démontré que les SCFA peuvent réguler la sécrétion de peptides gastro-intestinaux tels que le GLP-1, dont il a été bien démontré précédemment qu'il affecte la sécrétion de CM. Les SCFA se lient aux récepteurs couplés aux protéines G tels que GPR41, GPR43 et le récepteur 2 des AG libres, puis les activent, ce qui augmente la libération de GLP-1 dans la circulation (302-305).

Comme indiqué précédemment, les PC jouent un rôle important dans la synthèse du CM. Ces PC peuvent également être dégradés par la flore microbienne pour donner de la choline ainsi que de la bétaine. Ces deux métabolites peuvent ensuite être métabolisés par les bactéries en triméthylamine qui sera convertie en triméthylamine N-oxyde par une monooxygénase (306). Un lien étroit a été établi entre une augmentation de la consommation de PC, qui augmente la formation de TMAO, et une augmentation du développement de maladies cardiovasculaires chez les patients souffrant de maladies rénales. Par conséquent, si les PC sont trop métabolisés en TMAO, cela affectera probablement aussi la sécrétion de CMs puisqu'il aura accès à moins de PC pour sa formation (307).

L'importance du microbiote ne doit donc pas être sous-estimée et des recherches supplémentaires doivent être menées pour mieux comprendre les mécanismes déployés par la flore intestinale et susceptibles d'altérer le métabolisme lipidique intestinal.

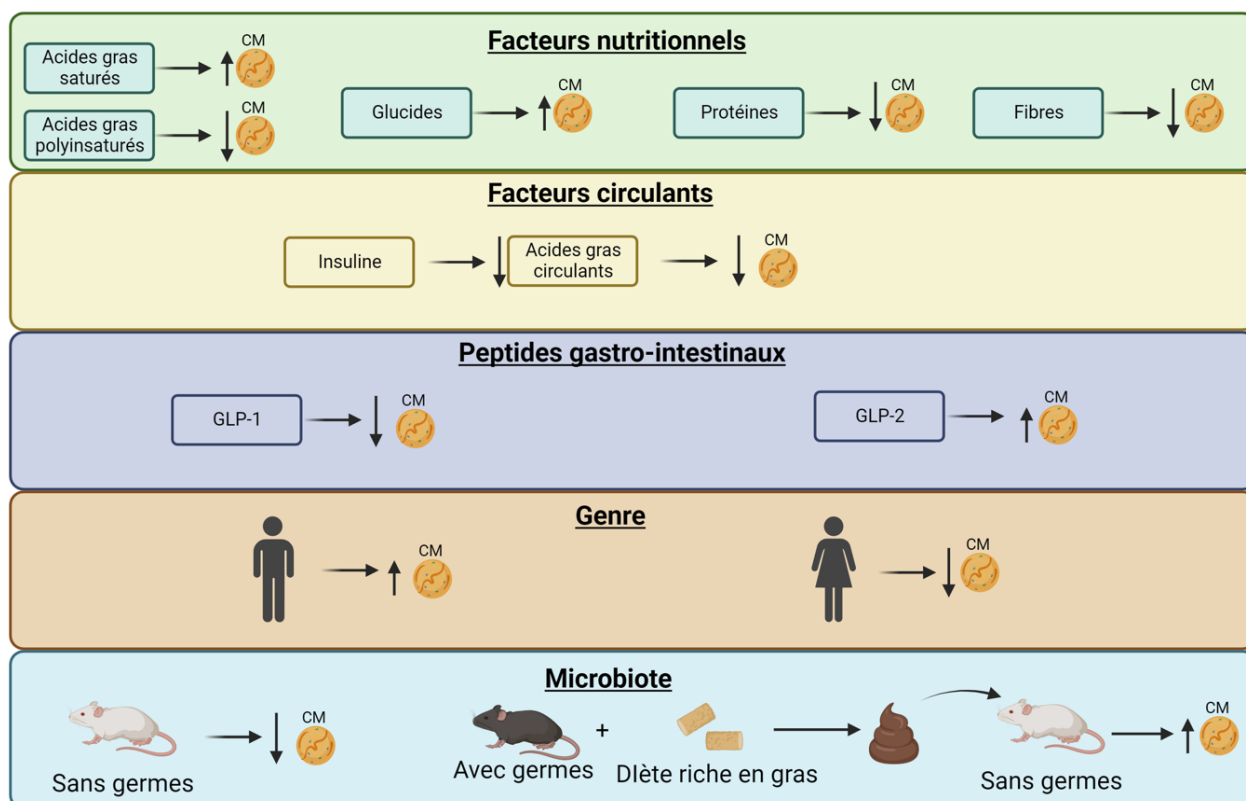


Figure 13. – Facteurs externes pouvant réguler la formation et la sécrétion des chylomicrons

Plusieurs facteurs peuvent faire augmenter ou diminuer la sécrétion de CM dans la circulation sanguine. On y retrouve des facteurs nutritionnels, des facteurs circulants, des peptides gastro-intestinaux, le genre de l'individu ainsi que la composition en bactéries du microbiote intestinal. Cette illustration a été créée avec BioRender.com.

2.7 Comparaison de la formation et la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides par le foie et l'intestin

Le foie et l'intestin sont deux organes majeurs qui régulent le métabolisme des lipides de l'organisme grâce à leur capacité à élaborer les lipoprotéines. Après avoir reçu les lipides des CM, le foie les accumule, les utilise comme source d'énergie, les excrète sous forme de bile (CHOL uniquement) ou les libère directement dans la circulation sanguine en formant les VLDL. Les protéines qui ont été largement énumérées ci-dessus et qui jouent un rôle dans le transport, l'estérification et l'accumulation des lipides dans l'intestin sont aussi présentes dans le foie et ont des rôles extrêmement similaires. De même, les mécanismes de transfert, de formation et de sécrétion des lipoprotéines dans ces deux organes sont considérés comme semblables. Néanmoins, de plus en plus de recherches mettent en évidence les différences entre ces deux organes et nous réalisons de plus en plus qu'il existe des divergences importantes. Certaines de ces différences sont décrites dans les paragraphes suivants.

Tout d'abord, les entérocytes produisent des CM qui sont dirigés vers le réseau lymphatique, tandis que les hépatocytes du foie produisent des VLDL qui sont relarguées directement dans la circulation sanguine (308). Les CM seront généralement formés et sécrétés après l'ingestion d'un repas gras, alors que les VLDL peuvent être formés dans plusieurs conditions physiologiques. Les lipides utilisés pour synthétiser les CM proviendront donc de l'alimentation tandis que ceux des VLDL proviendront des résidus de CM, des AG libres du tissu adipeux et des lipides formés par synthèse *de novo* (309).

Comme pour le CM, la synthèse des VLDL nécessite une molécule d'ApoB. Cependant, comme indiqué précédemment, chez l'homme la molécule d'ApoB dans l'intestin est l'ApoB-48 alors que celle du foie est l'ApoB-100 (308). L'une des principales différences entre ces deux lipoprotéines est la stabilité intracellulaire de cette Apo. La dégradation de l'ApoB-48 dans l'intestin est un

mécanisme beaucoup moins important que dans le foie. Les entérocytes sont capables de sécréter de petites lipoprotéines avec ApoB-48 même en présence de très peu de lipides, et peuvent sécréter de grands CM en présence d'énormes quantités de lipides (310). On a constaté dans les entérocytes Caco-2 que l'ApoB-48 s'accumule dans le milieu apical jusqu'à ce que le SR-B1 détecte des micelles lipidiques, ce qui les fait passer dans la voie sécrétoire (311). Dans le foie, ce n'est pas le cas et les mécanismes de dégradation régulent fortement l'ApoB-100. Lorsque l'hépatocyte est en présence de peu de lipides, l'ApoB-100 sera ubiquitinée puis dégradée (312, 313). Lorsque l'abondance des lipides est marquée, le stress du RE se développe, entraînant la dégradation de l'ApoB-100 par le protéasome ou l'autophagie (149, 314). En présence de stress du RE, des protéines de la voie de signalisation de l'UPR (*unfolded protein response*) vont augmenter la dégradation de protéines tels que l'ApoB-100 (315).

La régulation de la taille des lipoprotéines est également différente dans le foie et dans l'intestin. Dans l'intestin, c'est l'ApoA-4 qui contribue à faire grossir le CM alors que l'ApoC3 entraîne le recrutement des TG à l'ApoB-100 dans le foie (181, 316). La sortie de la vésicule du RE et son transport vers le Golgi sont également différents. Dans l'intestin, cela se fait par le PCTV, mais le processus est différent pour les VLDL puisqu'il se fait plutôt par une vésicule de transport des VLDL (VTV) (317). Les protéines qui composent cette VTV semblent être différentes de celles du PCTV et sont un peu moins bien connues. Pour l'instant, il est proposé que les protéines qui permettent la formation du COPII sont bien présentes comme la Sar1, même si étrangement le foie semble être capable de sécréter des VLDLs chez les patients avec une mutation du Sar1b (318). Les autres protéines seraient CideB, qui interagit avec la Sar1 GTPase et Sec24, et Sec22b, qui jouerait un rôle de v-SNARE (319, 320).

Enfin, une fois dans la circulation, le devenir des CM et des VLDL est similaire. Ces lipoprotéines vont acquérir les mêmes protéines et seront hydrolysées par la LPL. Cependant, alors que le CM forme un résidu de CM une fois hydrolysé, les VLDL vont plutôt former des IDL et des LDL (308).

2.8 Les lipoprotéines plasmatiques et leur importance dans la régulation des risques cardiovasculaires

Les lipoprotéines ont un rôle primordial dans le développement des risques cardiovasculaires, en particulier l'athérosclérose. L'athérosclérose est causée par une accumulation de CHOL et de macrophages dans l'intima, la couche inférieure des artères (321). En particulier, une concentration élevée de LDL dans le sang et une faible concentration de HDL sont fortement associées à un risque accru de développer une maladie coronarienne (322).

2.8.1 Le chylomicron et les maladies cardiovasculaires

Lors de l'analyse de la quantité de TG sanguin chez les patients, il est toujours important de savoir si un individu a consommé un repas gras. Dans ce cas, les TG dans la circulation proviennent principalement des CM, un état appelé postprandial. En revanche, 90 % des TG présentes dans le sang lorsqu'un individu est à jeun (pendant plus de 12 heures) proviennent des VLDL du foie (323). Au niveau clinique, pour faire des analyses de l'association entre VLDL ou CM et maladies cardiovasculaires, on mentionnera s'il s'agit d'une hypertriglycémie postprandiale ou d'une hypertriglycémie à jeun. Comme on s'intéresse ici au CM, on se réfère à l'hypertriglycémie postprandiale.

Une augmentation de la production de CM et une diminution de son élimination du sang conduisent au développement d'une hypertriglycémie postprandiale, qui est un facteur de risque important d'athérosclérose (324, 325). Par exemple, une étude portant sur 26 330 femmes a révélé que ces dernières présentant des taux de CM très élevés entre deux et quatre heures après l'ingestion de graisses, par rapport aux autres membres de la cohorte, développaient quatre fois plus de risques de maladies cardiovasculaires (326). Une autre étude norvégienne avec un suivi de 27 ans sur environ 40 000 hommes et femmes âgés de 20 à 50 ans a également trouvé une association significative dans les deux sexes, mais principalement chez les femmes, entre les niveaux de TG postprandiaux et le risque de développer une maladie cardiovasculaire (327). De plus, une étude de Copenhague avec un suivi de 31 ans à partir de 1971 sur 7591 femmes et 6391 hommes a pu observer une augmentation des incidences de maladies cardiaques en association

avec les taux de TG postprandiaux. De plus, les taux élevés de TG postprandiaux étaient un meilleur prédicteur de maladies coronariennes chez les femmes que les taux sanguins de CHOL, alors que chez les hommes, les taux de CHOL provenant des LDL étaient toujours un meilleur prédicteur (328). Enfin, une étude japonaise portant sur 4988 participants diabétiques sous statines a trouvé une forte association entre les taux de TG postprandiaux et à jeun, et les maladies cardiovasculaires. Cependant, les taux de TG postprandiaux étaient un meilleur prédicteur (329).

Comment le CM pourrait-il augmenter les chances de développer les maladies cardiovasculaires ? Il a initialement été proposé que des vésicules de plus de 75 nm étaient trop grandes pour pénétrer les vaisseaux sanguins et affecter leurs fonctions (330)(331, 332). Plusieurs études ont proposé que les résidus de CM, avec une composition plus riche en ester de CHOL et de plus petite taille que les CM normaux, en soient la cause (39). Ces résidus de CM, obtenus après hydrolyse par la LPL, peuvent augmenter la formation de cellules spumeuses constituées par les macrophages, une étape cruciale dans le développement de l'athérosclérose (333). Ces résidus peuvent également augmenter l'inflammation et le stress oxydatif (OxS) des cellules endothéliales, altérant les fonctions de l'endothélium et favorisant ainsi l'apoptose et la sénescence cellulaire (334, 335). De plus, les lapins hyperlipidémiques dont le sang est riche en résidus de CM ont plus de CHOL dans leur intima, la couche interne des artères, en raison d'une accumulation de lipoprotéines composées d'ApoB-48 (336).

Il est proposé que ce n'est pas directement l'augmentation des TG dans la circulation qui causerait une plus grande chance de développer une maladie cardiaque, mais plutôt le fait que ces TG seraient des marqueurs d'une augmentation des résidus de CM. Une élévation des TG indiquerait donc un accroissement des résidus de CM et de ce fait, une plus grande chance que ces derniers s'agglomèrent dans l'intima et affectent ainsi les fonctions endothéliales (330).

Enfin, il ne faut pas oublier le rôle de la lymphe dans le transport des CM. En effet, les changements dans le flux lymphatique sont importants pour déterminer le transport des AG vers les tissus périhépatiques (337). En outre, il est proposé que les plaques d'athérosclérose nécessitent un flux continu de lipoprotéines contenant de l'ApoB pour progresser (338). Par

conséquent, si l'ApoB dans l'artère devait être réduite en augmentant plus rapidement la clairance des lipoprotéines avec ApoB riche en CHOL à travers les vaisseaux lymphatiques, cela pourrait potentiellement réduire la présence de plaques d'athérosclérose (339). Cependant, ceci n'est qu'hypothétique pour la CM et reste à être prouvé.

2.8.2 La lipoprotéine de très basse densité et de densité intermédiaire, avec les maladies cardiovasculaires

De nombreuses analyses épidémiologiques et génétiques soulignent les relations entre l'hypertriglycéridémie à jeun et un risque accru de développer une maladie cardiovasculaire (340). Au niveau épidémiologique, il existe, entre autres, une méta-analyse qui a observé que les niveaux de risque de développer des maladies cardiovasculaires augmentent de 1,32 pour les hommes et de 1,76 pour les femmes par 1 mmol/L de TG dans le sang (341). Cette association a été faite indépendamment des niveaux de CHOL des HDL. Une autre méta-analyse qui a analysé les données de 26 études dans la population asiatique et pacifique a également constaté une augmentation de ce taux de risque de 1,8 (342). Ce type de résultats a été retrouvé dans de nombreuses autres méta-analyses (343, 344). Au niveau génétique, plusieurs mutations qui augmentent le taux de TG dans le sang augmentent également les chances de développer une maladie cardiovasculaire. C'est le cas des aberrations génétiques des gènes de la LPL, de l'ApoC3, du LDLr et de l'*angiopoïétine-like 3* (52, 345-347).

Comme pour le CM, les VLDL et les IDL, avec leur teneur en TG, peuvent augmenter le risque cardiovasculaire par la formation de résidus après lipolyse par le LPL, qui ne sont pas des LDL. Puisque les TG sont en corrélation directe et très significative avec la quantité de restes de VLDL, on considère que la concentration de TG serait davantage un biomarqueur de la quantité de résidus (348, 349). Cependant, les VLDL plus petites ainsi que les IDL peuvent aussi traverser la barrière artérielle, favorisant l'accumulation de CHOL et donc le développement de plaques d'athérome (350). De plus, ces résidus de VLDL peuvent grandement affecter les fonctions endothéliales. Par exemple, ils peuvent augmenter les réponses inflammatoires (351), accroître la formation de thrombus (352), intensifier la sécrétion de facteurs tissulaires (353), etc. Sur le plan clinique, ces résidus de VLDL ont récemment fait l'objet d'une grande attention et ils sont

désormais considérés comme un facteur individuel important dans la prédiction des maladies cardiovasculaires (354-356).

2.8.3 La lipoprotéine de basse densité et les maladies cardiovasculaires

Il est bien documenté qu'une augmentation de la concentration plasmatique de LDL augmente le risque de développer une maladie cardiovasculaire (357-359). En particulier, les LDL petites et denses qui ont une concentration plus élevée de CHOL sont très dommageables. En outre, les mutations dans les gènes du LDLr qui augmentent la quantité de CHOL dans le sang sont également très bien associées à un risque accru de développer les maladies cardiovasculaires (360, 361).

Comment les LDL causent-elles les dommages artériels ? En fait, c'est principalement par la formation de plaques d'athérome. En général, l'apparition de l'athérosclérose est associée à un dysfonctionnement endothélial. Ce dysfonctionnement peut être généré par un changement dans la morphologie vasculaire, mais aussi par d'autres altérations dans les jonctions intracellulaires et le transport des lipoprotéines (362, 363) (364). Ce dysfonctionnement sera aggravé par l'accumulation de LDL dans l'intima vasculaire suite à l'endocytose. Cette accumulation entraîne l'oxydation de ces LDL, modifiant ainsi les lipides et l'ApoB-100 des LDL pour produire des aldéhydes et des cétones. L'accumulation de LDL oxydées active les cellules endothéliales entraînant la sécrétion de cytokines qui vont recruter dans l'intima des monocytes et des lymphocytes T. Une fois dans l'intima, les monocytes et les lymphocytes T vont se déplacer vers l'intérieur de l'intima. Une fois dans l'intima, les monocytes vont se différencier en macrophages qui vont internaliser les LDL oxydées grâce à plusieurs transporteurs tels que SR-B1 et CD36. La capture de ces LDL transforme les macrophages en cellules spumeuses. Cette accumulation de cellules spumeuses favorise le recrutement de cellules musculaires lisses et la sécrétion d'une matrice riche en collagène. Ce processus se poursuit et conduit à l'athérome, qui est l'accumulation de tous ces composants. L'accumulation provoque une plaque d'athérome qui peut s'étendre au canal sanguin, diminuant ainsi le débit sanguin et augmentant les risques d'infarctus (321). Des caillots de cette plaque d'athérome peuvent aussi se détacher pour aller bloquer des vaisseaux plus petits, ce qui augmenterait les chances de faire un infarctus (365).

2.8.4 La lipoprotéine de haute densité et les maladies cardiovasculaires

Les HDL jouent un rôle très important dans la diminution du développement de maladies cardiovasculaires grâce à de nombreux rôles tels que des rôles d'antioxydants, anti-inflammatoires, antithrombotiques et anti-apoptotiques (39). Cependant, c'est son rôle dans le RCT qui est le plus prédominant et est particulièrement important dans la réduction du risque cardiovasculaire (366). Succintement, le HDL extrait le CHOL des cellules spumeuses des plaques d'athérome grâce aux transporteurs ABCA1, SR-B1 et ABCG1. Cette extraction de CHOL permet de réduire la taille de la plaque ainsi que de diminuer son inflammation (367). Après l'absorption tissulaire du CHOL, le HDL, une fois rempli de CHOL, passe par le système lymphatique avant de retourner dans la circulation sanguine pour le RCT (368-370). Il a été proposé que les HDL puissent passer dans la lymphe par transcytose générée par des récepteurs ou par diffusion passive à travers des pores intracellulaires (371, 372). C'est en 2013 que l'on a commencé à mieux comprendre l'importance de la lymphe dans le retour du CHOL vers le compartiment sanguin ainsi que son rôle dans le RCT. En effet, il a été montré que l'arrêt du système lymphatique d'une queue de souris diminue le RCT sans affecter l'efflux des macrophages et le profil lipoprotéique (373, 374). Ces résultats ont été confirmés chez des souris présentant une déficience du récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire C et dans un modèle chirurgical de transplantation d'aorte (374). La lymphe est donc un aussi grand joueur clé dans le système de RCT que les HDL.

Compte tenu de ce rôle, de nombreuses études cliniques ont établi des associations entre des taux élevés de HDL et une diminution du risque cardiovasculaire, devenant ainsi un facteur indépendant dans le développement de ces maladies (375). Des études ont également montré que chaque augmentation de 1 mg/dL de HDL-CHOL dans la circulation diminue les risques de développer les maladies cardiovasculaires de 2 à 3 % (376). Par ailleurs, la mutation des gènes codant pour des protéines importantes dans la formation des HDL, principalement ABCA1 et ApoA-1, augmente aussi considérablement les risques de développement prématuré de maladies cardiovasculaires (377).

2.8.5 La lipoprotéine (a) et les maladies cardiovasculaires

Bien que les mécanismes restent à être mieux compris, la Lp(a) est désormais considérée comme un facteur génétique important associé au développement des maladies cardiovasculaires (378). Entre autre, elle a été associée aux maladies coronariennes (379), à la valvulopathie aortique calcifiante (380), aux accidents vasculaires cérébraux ischémiques (381), à l'insuffisance cardiaque (382), à une fibrillation auriculaire (383) et aux maladies artérielles périphériques (384). En effet, une très large méta-analyse de 36 cohortes pour un total de 126 634 participants a rapporté des associations significatives entre les concentrations de LP(a) (supérieures à 30-50 mg/dL) dans le sang et le risque d'avoir un accident vasculaire cérébral ou de développer une maladie coronarienne. (378). Une autre étude a également établi des liens entre des taux de Lp(a) supérieurs à 20 mg/dL et les risques d'événements coronariens (385). La concentration d'apo(a) dans la circulation peut varier jusqu'à 1000 fois entre les individus d'une même population et il est proposé que le gène de la LP(a) soit responsable de 91% de la variation de la concentration sanguin de la Lp(a) (386, 387).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer les effets néfastes de la Lp(a). En particulier, étant donné sa structure similaire à celle des LDL, elle pourrait jouer un rôle similaire à celui des LDL lorsqu'elle est retenue dans la paroi artérielle. En outre, elle a une plus grande tendance à l'oxydation que les LDL, ce qui faciliterait le recrutement des macrophages (388). Cependant, c'est plutôt la présence de PL oxydés liés à l'ApoB-100 qui serait la cause principale du développement de l'athérosclérose et de la maladie calcifiante de la valve aortique. En effet, ces PL oxydés augmentent l'adhésion endothéliale des molécules, l'expression des cytokines, l'activation des macrophages et facilitent la migration des monocytes dans les cultures cellulaires. (389-391). Au niveau de la calcification, les PL oxydés liés à l'ApoB-100 se colocalisent sur les sites de calcification vasculaire et augmentent l'activité et la progression de la calcification (392-394). Les PLs oxydés ont des rôles importants dans le développement de l'inflammation et la calcification.

2.9 Catabolisme et biosynthèse des lipides du petit intestin

Dans les sections précédentes, nous nous sommes concentrés sur le transfert des lipides dans l'organisme, mais très peu sur leur synthèse et leur dégradation cellulaire. Dans l'intestin, il existe

3 processus principaux. Il y a la lipogénèse qui est la formation d'AG *de novo* par la cellule, la β -oxydation qui est la combustion des AG par les mitochondries pour générer l'ATP, et la synthèse *de novo* de CHOL. La régulation adéquate de ces processus dans l'intestin est très importante, car elle peut affecter l'entrée des lipides dans l'entérocyte et leur sécrétion dans les vaisseaux lymphatiques. Ces processus sont synthétisés dans la [Figure 14](#) avec les flèches jaunes représentant la lipogénèse, les flèches vertes la β -oxydation et les flèches mauves la formation de CHOL *de novo*.

2.9.1 La lipogénèse *de novo*

Le processus de la lipogénèse permet la formation d'AG, principalement du palmitate, à partir d'un excès de glucides, favorisant ainsi la formation d'AG pour subvenir aux besoins de la cellule. Il s'agit d'un processus qui se produit principalement dans le foie ainsi que dans le tissu adipeux, mais qui s'effectue également dans d'autres organes périphériques tels que l'intestin (395). Le glucose présent dans la cellule subit une glycolyse formant le pyruvate qui est converti en acétyl-CoA. Ce dernier est utilisé principalement par le cycle de Krebs, produisant du citrate, qui sortira de la mitochondrie. Le citrate sera alors transformé en acétyl-CoA grâce à l'ATP-citrate lyase. L'acétyl-CoA obtenu est carboxylé en malonyl-CoA grâce à l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). Enfin, l'enzyme *fatty acid synthase* (FAS) convertit le malonyl-CoA en AG, principalement en palmitate, mais éventuellement en d'autres AG saturés tels que l'acide stéarate. Dans cette réaction, la FAS est très importante et est considérée comme l'enzyme clé qui limite la réaction (396). Par la suite, les AG saturés peuvent devenir des AG monoinsaturés tels que l'acide oléique et le palmitoléate, grâce à la stéaroyl CoA désaturase (SCD) (397). La SCD, en particulier la SCD1 qui est la plus exprimée dans les tissus métaboliques tels que le foie, introduit une double chaîne entre les carbones 9 et 10 de l'AG saturé. La réaction de cette enzyme nécessite plusieurs éléments tels que la NA(D)PH, l'enzyme cytochrome b5 réductase et évidemment le cytochrome b5 dans lequel les électrons se rendent à la SCD pour la formation subséquente de H₂O (397).

La lipogénèse hépatique est considérée comme étant beaucoup plus efficace que dans les autres tissus (398). Lorsqu'un individu consomme des glucides en excès, la lipogénèse hépatique est activée et favorise la sécrétion et la formation de VLDL en raison de l'augmentation des TG dans

la cellule (399). Les TG sanguins provenant de la lipogenèse peuvent contribuer de manière significative à la quantité totale de TG circulants (399). La lipogenèse est régulée par deux facteurs de transcription importants : la *carbohydrate responsive element binding protein* (chREBP) et la *sterol regulatory element binding protein* (SREBP) -1. La chREBP, lorsqu'elle est activée, se lie aux *carbohydrate sterol elements* tandis que la SREBP-1 se lie aux *sterol regulatory elements*, tous deux se trouvant dans le promoteur de plusieurs gènes qui codent pour les enzymes impliquées dans la lipogenèse (400, 401). Ces facteurs de transcription sont modulés par plusieurs éléments tels que la présence de glucose ou d'insuline (396). Un autre facteur important qui régule la balance énergétique est l'*AMP activated protein kinase* (AMPK), une enzyme qui inhibe la phosphorylation de l'ACC, diminuant ainsi la quantité de malonyl-CoA formé (402).

Qu'en est-il de la lipogenèse intestinale ? En fait, plusieurs études ont souligné l'importance de ce processus dans la formation et la sécrétion des CM. De nombreuses observations ont été faites dans la [section](#) précédente qui traitait des facteurs externes qui modulent la sécrétion des CM. Effectivement, de multiples associations ont été faites entre une consommation élevée de glucides et une augmentation de la sécrétion postprandiale de TG (403, 404). Ces associations ont été confirmées par l'utilisation de fructose radioactif puisque ces personnes consommant ce fructose ont une quantité accrue de palmitate radioactif dans leur CM (405). De plus, les cellules entérocytes Caco-2 ont également montré un potentiel lipogénique intéressant lorsqu'elles ont été placées en présence de fructose et/ou de glucose radioactif pendant 96 heures (406). Enfin, l'augmentation de la sécrétion d'ApoB-48 et de TG induite par le fructose chez le hamster était associée à un niveau élevé de lipogenèse (407).

2.9.2 La β -oxydation des acides gras

La β -oxydation des AG est un mécanisme qui a lieu dans les mitochondries et qui est particulièrement important pour la formation d'énergie à partir d'AG. Une grande partie de l'énergie nécessaire au fonctionnement du cœur et des muscles squelettiques provient de la β -oxydation et lors d'un jeûne prolongé, ce processus semble être essentiel à la survie des cellules. Pour l'intestin, les AG de l'alimentation vont surtout être dirigés vers la formation de CM, mais peuvent aussi être utilisés pour la β -oxydation. Il a été proposé que l'acheminement des AG est dicté par les protéines de transport I-FABP et L-FABP. En effet, en utilisant des souris avec une

délétion totale de I ou L-FABP, il a été observé que L-FABP dirige plutôt les AG vers la β -oxydation alors que I-FABP les achemine vers la formation de TG au niveau du RE (123).

Le processus d'oxydation des AG est complexe et nécessite plusieurs étapes et l'implication de plusieurs protéines. Dans une première étape, les AG sont transformés en acyl-CoA ester sur la partie externe de la mitochondrie grâce à l'acyl-CoA synthétase. Cette dernière a différentes spécificités dépendamment de la longueur de la chaîne carbonée de l'AG (LCFA, MCFA ou SCFA). Sous une alimentation normale, les LCFA entrent dans le cycle des carnitines. Comme l'acyl-CoA ne peut pas entrer dans la mitochondrie, il se transforme en acylcarnitine à longue chaîne grâce à l'enzyme carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1). Il existe plusieurs isoformes de cette enzyme, mais celle présente dans l'intestin est la CPT1a (408). Cette enzyme est extrêmement importante car elle est le régulateur clé de la β -oxydation intramitochondriale. En particulier, son activité est modifiée en fonction de la quantité de malonyl-CoA dans la cellule. Après un repas, le malonyl-CoA est produit suite à l'apport de glucose, ce qui inhibe l'activité de CPT1a. En revanche, lors d'un jeûne, il y a peu de malonyl-CoA, ce qui augmente l'activité de CPT1a, élevant ainsi l'apport d'AG aux mitochondries pour la β -oxydation. Il y a donc ici un lien très important entre la lipogénèse et la β -oxydation, puisque la présence de malonyl-CoA favorise la lipogénèse et inhibe la β -oxydation (409). L'AMPK joue alors un rôle critique dans cet équilibre étant donné son rôle dans l'inhibition de l'activité de l'ACC (402).

Les acylcarnitines à longue chaîne peuvent maintenant passer la membrane mitochondriale interne par la *carnitine-acylcarnitine translocase* pour atteindre la matrice mitochondriale. À l'intérieur de la matrice mitochondriale, près de la membrane interne, la CPT2 transforme la carnitine en ester d'acyl-CoA. Revenu à sa forme initiale, l'acyl-CoA peut entrer dans le cycle de β -oxydation pour s'intégrer dans la chaîne de transport d'électrons qui vont finalement culminer en la production des molécules d'ATP suite à la phosphorylation oxydative (409).

L'AMPK est fortement régulé par le niveau d'ATP dans la cellule et lorsque le niveau d'ATP est élevé et le niveau d'ADP est bas, AMPK est inhibé. Effectivement, l'ATP se lie à la sous-unité γ d'AMPK, ce qui apporte à la fermeture du trimère (puisque AMPK est composé des 3 sous-unités α , β et γ) et ainsi à inhiber son activité (410).

Dans la β -oxydation, chaque étape impliquant des enzymes amène au clivage de deux carbones de la LCFA, produisant des électrons pour la chaîne respiratoire ainsi que de l'acétyl-CoA qui sera dirigée vers la synthèse de cétones. Il y a 4 enzymes impliquées et spécifiques pour les AG de 4 à 24 carbones. Le métabolisme des AG de plus de 24 carbones commence plutôt dans les peroxysomes avant d'aller dans les mitochondries. L'enzyme limitante dans le processus de β -oxydation est un membre de la famille des acyl-CoA déshydrogénases (ACAD). Pour le clivage des LCFA, on y retrouve l'ACAD à très longue chaîne (ACADVL) et l'ACAD à longue chaîne (ACADL). Toutes deux sont liées à la membrane interne de la mitochondrie et ont les mêmes substrats, c'est-à-dire les AG entre 12 et 24 carbones. Les trois autres réactions de coupure par β -oxydation sont réalisées par la protéine trifonctionnelle qui contient les 3 autres enzymes, l'énoyl-CoA hydratase, la 3-hydroxy-CoA déshydrogénase à longue chaîne et la 3-cétoacyl-CoA thiolase à longue chaîne (409).

Au niveau intestinal, la β -oxydation est fortement augmentée lorsqu'une souris est soumise de façon constante à un régime riche en graisses. L'augmentation de l'expression génique de plusieurs gènes importants dans ce processus, comme la CPT1a, peut contribuer à diminuer la quantité de lipides circulant dans le sang (411-413). Effectivement, l'augmentation du gène CPT1a peut être provoquée par l'activation du facteur de transcription *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR α). Cette dernière augmente la transcription de plusieurs gènes qui codent pour des protéines participant dans la β -oxydation (414, 415). Aussi, cette élévation de l'oxydation des AG contribue également à diminuer la quantité de GTL dans l'intestin (416). Enfin, le *coactivateur peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-1alpha* (PGC1 α) interagit avec PPAR α pour augmenter la transcription des gènes de la β -oxydation (417).

2.9.3 Formation *de novo* du cholestérol

Le CHOL dans l'organisme provient de l'alimentation ($\approx 30\%$ du CHOL total) ou soit de sa synthèse *de novo* dans le cytosol à partir de l'acétyl-CoA présent dans la cellule ($\approx 70\%$ du CHOL total). Les deux sites où cette synthèse a lieu sont le foie et l'intestin, le foie en étant de loin l'organe majeur (418). Quant à l'acétyl-CoA, il peut provenir de la β -oxydation, ce qui a été expliqué précédemment, mais aussi de la cétogenèse et d'une réaction impliquant la pyruvate déshydrogénase (419). La cétogenèse est en fait la production de corps cétoniques résultant de

la dégradation des AG, tels que l'acétone, l'acétoacétate et le β -hydroxybutyrate. Ces corps cétoniques peuvent constituer une source d'énergie alternative en cas de jeûne. Lorsque la cellule contient peu d'hydrates de carbone et beaucoup d'AG, les enzymes convertissent les corps cétoniques en acétyl-CoA pour la production d'énergie (420).

Le processus de formation du CHOL est divisé en deux parties : la première est hautement régulée alors que la seconde ne l'est pas. Dans la première, deux molécules d'acétyl-CoA vont se condenser pour former de l'acétoacétyl-CoA, puis se recondenser à nouveau pour former du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA). Cette réaction s'effectue à l'aide de l'acétyl-CoA acétyltransférase et de l'HMG-CoA synthase. Ensuite, il y a l'étape primordiale qui correspond à la synthèse de l'HMG-CoA en mévalonate par l'HMG-CoA réductase (HMG-CoAr) (419). L'HMG-CoAr est l'enzyme clé du processus, car elle est fortement régulée par rétroaction inverse, en plus d'avoir un contrôle sur le taux de formation *de novo* de CHOL. En effet, l'accumulation de CHOL dans le RE favorise l'ubiquitination et la dégradation de HMG-CoAr (421). De plus, de faibles niveaux de CHOL dans la cellule vont activer la synthèse du facteur de transcription SREBP-2 qui conduit à l'activation de la transcription du gène codant pour HMG-CoAr (422). De surcroît, l'AMPK peut également phosphoryler et donc inactiver le HMG-CoAr, réduisant ainsi la synthèse de CHOL (423).

Après la formation du mévalonate, il existe plusieurs réactions biochimiques qui ne sont pas régulées et qui se produisent simplement en présence du mévalonate. Sans entrer dans les détails, le mévalonate favorise la synthèse des unités isoprénoïques qui génèrent le squalène. Ce dernier subit une réaction de cyclisation pour former du lanostérol qui produit finalement le CHOL libre (419).

De toute évidence, étant donné que la majeure partie du CHOL présent dans l'organisme est synthétisée *de novo* et qu'il est principalement éliminé par le foie, la régulation de ce processus est extrêmement importante pour une bonne homéostasie lipidique. Par conséquent, les personnes qui présentent une concentration très élevée de CHOL dans le sang en raison d'une maladie génétique (par exemple, une mutation du LDLr) ou d'une mauvaise alimentation sont soumises à des médicaments qui ciblent la synthèse *de novo* du CHOL. En particulier, on leur

prescrit très souvent des statines qui sont des inhibiteurs de l'HMG-CoAr. L'utilisation de cet inhibiteur diminue drastiquement la quantité de CHOL provenant des LDL dans la circulation, mais aussi la quantité de VLDL-CHOL, d'ApoB-100 et même de TG (424). Il a été démontré que l'utilisation des statines diminue la sécrétion des VLDL ainsi que leur élimination par le foie (425). Quant à l'intestin, bien qu'il ait beaucoup moins d'impact que le foie sur la synthèse du CHOL, il a été démontré que l'inhibition de l'HMG-CoAr peut réduire la sécrétion postprandiale de TG (426). Cependant, il y a une certaine dichotomie ici puisque l'inhibition de HMG-CoAr augmente également la réintroduction de CHOL provenant de la lumière de l'intestin (427).

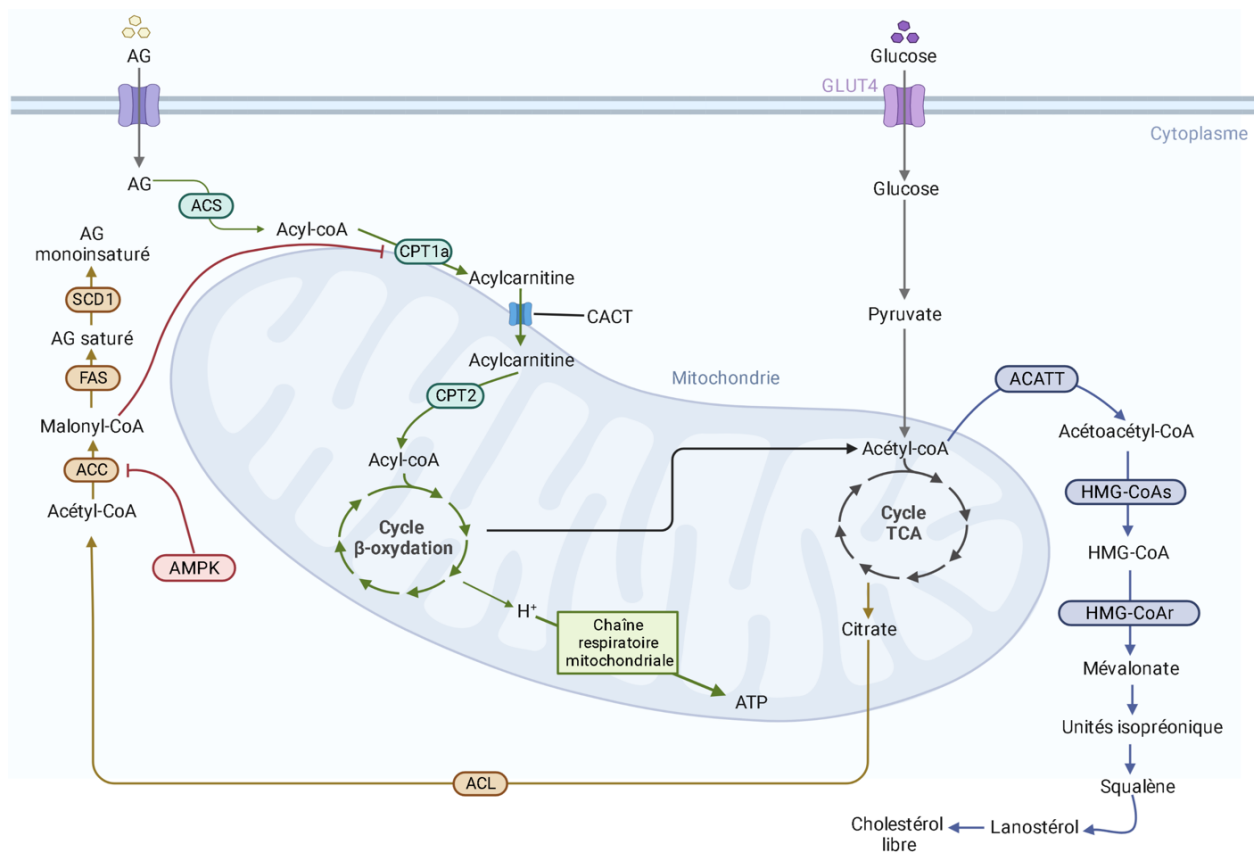


Figure 14. – Catabolisme et biosynthèse des lipides dans les entérocytes de l'intestin

Les processus qui composent le métabolisme lipidique sont tous interreliés. Le glucose qui rentre dans la cellule finit par former de l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA peut être utilisé par le cycle TCA ou pour la formation *de novo* de cholestérol libre (flèches mauves). Le cycle TCA produit aussi du citrate qui sert suite à plusieurs processus à faire de l'AG, particulièrement de l'AG monoinsaturé (Flèches jaunes). Les AG dans la cellule, une fois devenu de l'acyl-CoA, peuvent servir à former de l'ATP suite au processus de β -oxydation (flèches

vertes). Finalement, l'AMPK peut venir inhiber l'activité d'ACC pendant que la malonyl-CoA formé lors de la lipogenèse inhibe l'activité de CPT1a (flèches rouges). Cette illustration a été créé avec BioRender.com.

2.10 Aspects cliniques des principales mutations causant des malabsorptions intestinales des lipides : causes, conséquences et traitements

Suite à la découverte de mutations chez des patients et grâce à des modèles de souris présentant des délétions totales ou spécifiques, nous saisissons mieux le rôle de l'ApoB-48/100 et du MTTP, qui sont respectivement à l'origine de l'hypobétalipoprotéinémie (HBLF) et de l'abétalipoprotéinémie (ABL) familiales, deux maladies qui entraînent une malabsorption intestinale importante. Comme troisième maladie, la maladie de rétention du CM provoque également une malabsorption qui est associée à la mutation du gène *SAR1B*. Cependant, nous avons moins de connaissances du rôle de l'enzyme Sar1b GTPase par rapport aux deux précédentes protéines. La relation de cause à effet demeure de plus amples investigations. Dans cette section, ces trois grandes maladies seront décrites. Les trois maladies sont comparées dans le [Tableau 1](#).

2.10.1 L'hypobetalipoprotéinémie familiale

L'HBLF est une maladie héréditaire monogénique causée par une mutation autosomique co-dominante du gène *ApoB* sur le chromosome 2. Dans sa forme homozygote (deux allèles affectés du chromosome), cette maladie est extrêmement rare et a une incidence dans la population de 1 pour 1 000 000 (428, 429). Les différentes études menées sur le sujet ont montré que les femmes et les hommes semblent être touchés de manière égale et que la maladie est très souvent diagnostiquée au cours des 24 premiers mois de l'enfance, bien qu'à quelques occasions, elle ait été diagnostiquée à l'âge adulte (428, 430). Il existe plus de soixante mutations à l'origine de cette maladie, dans lesquelles il y a une troncature du gène de l'*ApoB* à différents endroits, formant de l'ApoB-2 à de l'ApoB-89 (428). Ces protéines tronquées sont plus petites que l'*ApoB* normale et sont dépourvues de la partie terminale carboxyle, ce qui interfère avec la translation de l'*ApoB* de taille normale (431).

Les patients homozygotes pour cette maladie ne peuvent pas sécréter les CM à partir de l'intestin et les VLDL à partir du foie. En absence de sécrétion de ces lipoprotéines, les patients auront des concentrations plasmatiques très basses de TG, et des concentrations plasmatiques presque nulles de LDL-CHOL, d'ApoB-100 et d'ApoB-48 (432). En raison de l'incapacité à transporter les lipides dans la circulation, les enfants vont développer de nombreux symptômes tels que l'intolérance aux graisses, la stéatorrhée, la diarrhée, l'acanthocytose, les malabsorptions intestinales, l'accumulation importante de lipides dans les entérocytes sous forme de " gelée blanche ", l'incapacité à grandir et à se développer, et des carences importantes en vitamines liposolubles, notamment en vitamines A et E. La carence de ces deux vitamines est très néfaste pour l'enfant, surtout la vitamine E, qui provoque de graves problèmes cliniques tels que d'importants troubles neurologiques pouvant conduire à la mort suite à une dégénérescence du système nerveux central, une rétine pigmentaire atypique causée par une dégénérescence maculaire, une dégénérescence spinocérébelleuse avec ataxie et une diathèse hémorragique secondaire (41). En raison de l'incapacité à sécréter des VLDL, les patients ont le potentiel de développer une stéatose hépatique importante avec l'âge, ce qui peut conduire au développement d'une cirrhose et/ou d'un carcinome hépatique (432-434).

Comme cette maladie est codominante, les patients peuvent également être hétérozygotes (un seul allèle du chromosome affecté). Ces patients hétérozygotes sont le plus souvent asymptomatiques et ne sont généralement diagnostiqués que par une analyse fortuite des lipides sanguins. Ils présentent des concentrations sanguines de LDL-CHOL beaucoup plus faibles et des concentrations d'ApoB-100 qui peuvent ne représenter que 24 % de la concentration normale (435). Bien qu'asymptomatiques, de nombreux patients développent une cirrhose et un carcinome hépatique, de sorte qu'une surveillance fréquente de l'état du foie est conseillée (436, 437).

Compte tenu de l'impact de cette maladie sur les jeunes patients, différents traitements et conseils doivent être livrés rapidement. Tout d'abord, il est recommandé que l'apport en graisses soit inférieur à 30% des calories et que l'apport en LCFA soit réduit ou arrêté. (438). La supplémentation en MCFA peut aider à corriger plus rapidement la malnutrition, mais elle n'est pas nécessaire et de nombreux patients sont revenus à la normale sans supplémentation (428).

En outre, étant donné la carence en AG essentiels, il est recommandé aux patients de prendre quotidiennement 1 à 2 cuillères à café d'huiles riches en AG polyinsaturés (438). Bien entendu, le plus important est de corriger les carences en vitamines liposolubles. Les vitamines A et E sont presque toutes deux transportées dans le sang par les CM, et il est donc important de prescrire des doses très élevées de ces deux vitamines chaque jour (100-300 UI/kg/jour de vitamine E et 100-400 UI/kg/jour de vitamine A) (439-441). Bien que moins fréquents, des défauts du développement osseux causés par une carence en vitamine D et des anomalies de la coagulation causées par une carence en vitamine K ont été observés (442). Il est donc conseillé de prendre également des suppléments de vitamines D et K (800-1200 UI/jour pour la vitamine D et 5-35mg/semaine pour la vitamine K) (438). Il est recommandé de donner ces suppléments simplement par voie orale, car une dose élevée de vitamines permettra à une petite partie d'entre elles d'être transférées dans la circulation sanguine de la même manière que les MCFA ou par incorporation dans les HDL (443). Les vitamines ou les AG essentiels administrés par voie intraveineuse ne sont pas du tout recommandés, car ce type de supplémentation peut augmenter les risques de développer des stéatose hépatiques (444, 445).

Finalement, si les suppléments ne sont pas pris, il peut y avoir une dégradation neurologique très importante qui raccourcira considérablement la durée de vie du patient (446). Cependant, lorsque les patients changent leur mode de vie et prennent les traitements recommandés, ils ont une durée de vie qui semble normale, ont une fonction sexuelle normale, et de nombreuses personnes ont réussi à avoir des enfants (447-449). Cependant, même en respectant la prise des vitamines, certains patients développent une dégénérescence rétinienne et, dans certains cas, continuent à avoir une fonction neuronale diminuée (441, 450).

2.10.2 L'abétalipoprotéinémie

L'ABL est une maladie génétique héréditaire causée par une mutation autosomique récessive du gène qui code pour le *MTTP* sur le chromosome 4. Comme la HBLF homozygote, il s'agit d'une maladie extrêmement rare dont l'incidence est de 1:1 000 000, qui est généralement diagnostiquée à un stade précoce de la vie et qui touche autant les hommes que les femmes (451). À l'heure actuelle, il existe 74 mutations différentes du *MTTP* qui peuvent se trouver à

différents endroits du gène et qui peuvent être une mutation faux-sens, une mutation non-sens, une mutation avec petite insertion, une mutation avec grosse insertion ou une mutation de variation d'épissage (451-453).

Comme pour la maladie précédente, les patients atteints d'ABL ne sécrètent pas du tout de VLDL et de CM dans le sang, ce qui entraîne le développement d'importantes carences en vitamines liposolubles et en AG essentiels. En fait, l'ABL et l'HBLF sont deux maladies très similaires et, par conséquent, les symptômes, les traitements et le suivi sont similaires. En fait, ce qui a été dit précédemment pour l'HBLF peut s'appliquer à l'ABL (2, 454). Cependant, il semble que la stéatose hépatique est plus fréquente dans l'HBLF que dans la ABL (428, 451). De plus, la principale différence entre les deux est le type de mutation. En effet, l'ABL est caractérisée par une mutation récessive, ce qui indique que les deux allèles doivent être affectés pour avoir un impact sur la sécrétion des lipoprotéines, alors qu'un seul allèle affecté suffit à diminuer fortement la sécrétion dans l'HBLF. Ainsi, les individus hétérozygotes pour ABL ont généralement des concentrations normales de lipides dans le sang (438).

2.10.3 La maladie de rétention des chylomicrons

La MRC ou maladie d'Anderson, comme les 2 autres maladies, est une maladie héréditaire congénitale extrêmement rare avec une centaine de cas recensés. Cette maladie est causée par une mutation autosomique récessive du gène *SARA2* sur le chromosome 5, appelé aussi *Sar1b*, qui code pour la protéine Sar1b GTPase (2). Cette protéine, comme mentionné précédemment, est importante dans la formation des vésicules COPII. Il y a quelques années, on a identifié environ 20 types de mutations qui pouvaient être de type faux sens ou non-sens (454). Cependant, ce nombre continue d'augmenter, car de nouvelles mutations sont fréquemment publiées (42, 455-457). À l'heure actuelle, nous ne savons pas vraiment s'il existe des différences entre les hommes et les femmes, mais il semble y avoir autant de cas répertoriés pour les deux sexes.

Cette maladie est beaucoup moins bien comprise que les deux précédentes. En effet, il a été observé à plusieurs reprises qu'il n'existe pas de relation génotype-phénotype entre la mutation et les phénotypes cliniques. Certains patients présentant des mutations considérées comme plus sévères puisqu'elles touchent directement le site catalytique, ne sont pas nécessairement plus

atteints que d'autres présentant des mutations moins austères (458). On a rapporté qu'un patient présentant une mutation homozygote pour le gène *SARA2* ne présentait aucun phénotype caractéristique de la maladie (459). En outre, bien que la majorité des parents hétérozygotes soient asymptomatiques, il existe quelques cas d'hétérozygotes qui présentent des concentrations plus faibles de lipides dans le sang (460).

La mutation homozygote de ce gène empêche complètement la sécrétion de CM, mais elle ne semble pas empêcher complètement la sécrétion de VLDL. En effet, dans l'ABL et le HBLF, les concentrations de TG dans le sang à jeun sont très basses, alors que dans la MRC, les patients ont des concentrations de TG normales. De plus, les concentrations de LDL-CHOL et d'ApoB-100 sont à 50% des valeurs normales alors que ces concentrations sont nulles dans les ABL et HBLF (461). Ceci est corroboré par une étude humaine dans laquelle seule une diminution de la sécrétion hépatique de VLDL chez les individus atteints de MRC après injection de ¹³C-leucine a été observée (462). Néanmoins, la Sar1b GTPase a été montrée à plusieurs reprises chez la souris comme étant essentielle à la sécrétion de VLDL, ce qui est dichotomique avec ce qui est observé chez l'homme (318, 463). De plus, pour les lipides sanguins, il y a toujours une bonne diminution de la concentration sanguine en HDL-CHOL, ce qui la différencie des deux autres maladies qui ont des concentrations en HDL-CHOL un peu moins affectées (461).

En raison de l'incapacité de ces patients à sécréter les CM comme les autres maladies, les jeunes enfants exhibent une diarrhée, une stéatorrhée, des vomissements, une grande accumulation de lipides dans les entérocytes, une incapacité à grandir et des carences importantes en vitamines liposolubles. Si les enfants ne sont pas traités rapidement, les carences en vitamines entraînent également l'apparition de problèmes neurologiques, rétinien, cardiaques et musculaires. Ces complications sont toutefois moins graves que pour l'ABL et la HBLF. Comme mentionné, le foie semble être affecté différemment de l'intestin, et seuls quelques cas ont été détectés avec une stéatose hépatique. Aucun patient présentant une cirrhose ou un carcinome hépatique, ce qui est plutôt fréquent dans l'ABL et le HLF, n'a été observé jusqu'à présent (461).

Les traitements administrés aux patients sont plus ou moins similaires à ceux de l'ABL et de l'HBLF. Une supplémentation orale en vitamines liposolubles sera recommandée : 50 UI/kg/jour de

vitamine E (α -tocophérol), 15 000 UI/jour de vitamine A, 800-1000 UI/kg/jour de vitamine D et 15 mg/semaine de vitamine K. Il sera également recommandé d'avoir un régime pauvre en graisses avec des concentrations adéquates d'oméga 3 et 6. En outre, la prise de MCFA peut contribuer à réduire la diarrhée et la malnutrition, mais n'est pas nécessaire. Les personnes traitées tardivement ont très souvent des problèmes neurologiques qui ne peuvent être guéris par la prise de suppléments vitaminiques. À l'heure actuelle, il ne semble pas y avoir d'études rapportées ayant suivi des patients pendant de très longues périodes, on ne sait donc pas si des complications peuvent survenir même lorsque les directives sont correctement suivies et lorsque le patient a été pris en charge rapidement (461).

Tableau 1. – Similarités et différences entre l'hypobétalipoprotéinémie, l'abétalipoprotéinémie et la maladie de rétention des chylomicrons

	Hypobétalipoprotéinémie familiale (homozygote)	Hypobétalipoprotéinémie familiale (hétérozygote)	Abétalipoprotéinémie	Maladie de rétention des chylomicrons
Type de transmission	Autosomal dominant	Autosomal dominant	Autosomal récessif	Autosomal récessif
Types de mutations	Tronquage de l'ApoB	Tronquage de l'ApoB	Mutation faux-sens Mutation non-sens Mutation avec petite insertion Mutation avec grosse insertion	Mutation faux-sens Mutation non-sens

			Mutation de variation d'épissage	
Nombre de mutations recensées	Plus de 60	Plus de 60	Plus de 70	Plus de 20
Chromosome	2	2	4	5
Défauts sous-jacents	ApoB tronquée	ApoB tronquée	Aucun ApoB	Aucun transport
Gène touché	ApoB	ApoB	MTTP	Sar1b
Incidence dans la société	Très rare	Fréquent	Très rare	Très rare
Symptômes cliniques	Diarrhées Vomissements Incapacité à se développer Acanthocytose Stéatose intestinale et hépatique	Peu de symptômes cliniques Possibilité de stéatose hépatique avec l'âge	Diarrhées Vomissements Incapacité à se développer Acanthocytose Stéatose intestinale et hépatique	Diarrhées Vomissements Incapacité à se développer Acanthocytose Stéatose intestinale
Concentrations des lipides sanguins	CT = ↓↓↓ LDL = Aucun HDL = ↓	CT = ↓ LDL = ↓ HDL = Normal	CT = ↓↓↓ LDL = Aucun HDL = ↓	CT = ↓↓ LDL = ↓↓

	<p>TG = ↓↓↓</p> <p>ApoB = Aucun</p> <p>ApoA1 = ↓↓</p>	<p>TG = ↓</p> <p>ApoB = ↓</p> <p>ApoA1 = ↓</p>	<p>TG = ↓↓↓</p> <p>ApoB = Aucun</p> <p>ApoA1 = ↓↓</p>	<p>HDL = ↓↓</p> <p>TG = Normal</p> <p>ApoB = ↓↓</p> <p>ApoA1 = ↓↓</p>
Conséquences de la déficience en vitamines	<p>Dégénérescence du système nerveux central</p> <p>Dégénérescence maculaire</p> <p>Dégénérescence spinocérébelleuse avec ataxi</p> <p>Diathèse hémorragique secondaire</p>	Pas de conséquences	<p>Dégénérescence du système nerveux central</p> <p>Dégénérescence maculaire</p> <p>Dégénérescence spinocérébelleuse avec ataxi</p> <p>Diathèse hémorragique secondaire</p>	<p>Dégénérescence du système nerveux central</p> <p>Dégénérescence maculaire</p> <p>Dégénérescence spinocérébelleuse avec ataxi</p> <p>Diathèse hémorragique secondaire</p>
Traitements	<p>Diminution apport en LCFA</p> <p>Supplémentation en MCFA</p>	<p>Aucun traitement nécessaire.</p> <p>Possibilité de donner des suppléments en vitamines E si nécessaire</p>	<p>Diminution apport en LCFA</p> <p>Supplémentation en MCFA</p>	<p>Diminution apport en LCFA</p> <p>Supplémentation en MCFA</p>

	Supplémentation en AG polyinsaturés =1-2 cuillères à café		Supplémentation en AG polyinsaturés =1-2 cuillère à café	Supplémentation en AG polyinsaturés
	Vitamines A= 100-400 UI/kg/jour		Vitamines A= 100- 400 UI/kg/jour	Vitamines A= 15 000 UI/jour
	Vitamines E= 100-300 UI/kg/jour		Vitamines E= 100- 300 UI/kg/jour	Vitamines E= 50 UI/kg/jour
	Vitamines K = 5- 35mg/semaine		Vitamines K = 5- 35mg/semaine	Vitamines K = 15 mg/semaine
	Vitamines D =800- 1200 UI/jour		Vitamines D =800- 1200 UI/jour	Vitamines D =800-1000 UI/kg/jour

Abréviations : Apo = apolipoprotéine; CT = cholestérol total ; HDL = lipoprotéine de haute densité ; LCFA = AG à chaîne longue ; LDL = lipoprotéine de basse densité ; MCFA = AG à chaîne moyenne ; TG = triglycérides. ↓ = diminution.
Tableau inspiré de Perreti, N et al. (461).

2.11 La phospholipase D (PLD)

Pour conclure cette revue de la littérature, il est essentiel de parler d'une de mes protéines d'intérêt, la PLD, qui possède deux isoformes : la PLD1 et la PLD2. Ces enzymes n'ont pas été mentionnées précédemment car trop peu d'études ont démontré leur implication dans les sujets qui ont été abordés tels que la formation et la sécrétion des lipoprotéines, la composition des lipoprotéines et le métabolisme des lipides. Son implication a été proposée dans certaines maladies, notamment le développement des maladies cardiovasculaires. Cette section traitera de

cette enzyme étonnante, en se référant en partie à notre revue publiée dans *Antioxidants and Redox Signaling* (6).

2.11.1 Informations générales sur la phospholipase D

Avant d'aborder le rôle de la PLD dans la formation et sécrétion des lipoprotéines, ainsi que dans les maladies cardiovasculaires, un aperçu sera donné sur ses propriétés physicochimiques et biologiques.

2.10.1.1 Propriétés physicochimiques et biologiques de la phospholipase D

La famille de PLD est composée principalement de deux isoformes : PLD1 et PLD2. La PLD est exprimée dans tous les tissus des plantes, des mammifères et des microorganismes tels que les virus et les bactéries. Ces deux isoformes catalysent la même réaction enzymatique ciblant la PC comme substrat (464). Grâce à son activité transphosphatidylase, la PLD hydrolyse la PC en PA et en choline (465). Le PA est un lipide de signalisation impliquée dans de nombreuses voies de signalisation. PLD1 et PLD2 n'ont que 56 % d'homologie dans leurs séquences d'acides aminés, mais elles possèdent toutes deux un domaine catalytique HKD avec PX, PH, et un domaine de liaison aux lipides (464). Tous ces domaines sont extrêmement importants puisqu'ils interagissent avec des protéines différentes et on y retrouve des variations entre les deux isoformes. Néanmoins, l'interaction de ces domaines avec de nombreuses protéines et/ou récepteurs est essentielle pour leur activation, comme il est illustré à la [Figure 15](#). Il est à noter le domaine de liaison aux lipides est essentiel à l'activation de leur activité par le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (466). L'élément qui génère une si grande différence d'homologie entre les isoformes est le fait que PLD2 ne possède pas une région en forme de boucle de 116 acides aminés qui permettrait la régulation négative de son activité (467). On ne sait pas comment cette boucle agit et son rôle est plutôt une spéculation puisqu'il a été observé que la suppression de cette boucle rend PLD1 beaucoup plus actif *in vitro* (468). Compte tenu de l'absence de cette zone, PLD2 a une activité intrinsèque très élevée, indiquant aussi qu'elle est plus active que la PLD1 (469, 470). De nombreux types d'inhibiteurs ont été développés pour inhiber l'activité des deux isoformes en ciblant principalement le domaine catalytique HKD (6).

La première PLD a été isolée et clonée dans des cellules provenant de plantes, et rapidement suivi par le clonage de la PLD de la levure et des mammifères (471-473). Par la suite, le gène *PLD* a été découvert chez d'autres espèces comme les bactéries et les virus (474, 475). Ces découvertes ont conduit à mieux comprendre la super famille PLD, dont les membres sont des enzymes différentes et avec peu d'homologies, mais qui ont pourtant un motif commun le HxK(x)4D(x)6GSxN (où le x représente une séquence d'acides aminés) (476). La structure cristalline de la PLD1 humaine a été définie, mais pas celle de la PLD2 qui semble plus complexe à réaliser en raison de l'absence de la région en boucle (477). Une autre propriété à signaler est que la *PLD1* est localisée sur le chromosome 3 et la *PLD2* sur le chromosome 17 chez l'humain, alors que *PLD1* se trouve sur le chromosome 3 et *PLD2* sur le chromosome 11 chez la souris (478, 479).

La PLD joue un rôle très important dans le trafic vésiculaire ainsi que dans de nombreux autres processus cellulaires tels que la prolifération cellulaire (480), les métastases (481), le mouvement cellulaire (481), l'apoptose (482) et l'agrégation plaquettaire (483). Des défauts régulateurs de l'enzyme peuvent provoquer de nombreuses maladies, incluant le cancer, la maladie d'Alzheimer, les infections, la thrombose et de l'arthrite (6). En particulier, *PLD* est l'un des gènes les plus exprimés dans les cancers du cerveau (484), du sein (485), du colon (486), du poumon (487) et de la prostate (488). Cette association serait due à la production du PA qui interagit et active mTOR, une protéine essentielle à la prolifération cellulaire (489).

2.10.1.2 Régulation de l'activité des deux isoformes de PLD

La PLD1 et la PLD2 contribuent à la formation d'environ 1-4% des lipides présents dans la cellule et ont des localisations et des activités différentes (490). La PLD1 se trouve à l'état basal sur les lysosomes, les endosomes, le Golgi ou le RE (491, 492). De nombreuses protéines peuvent l'activer directement comme Rac, Rho, les agonistes des récepteurs tyrosine kinase et les récepteurs couplés aux protéines G (6). Ces différentes protéines activent la PLD1 par leur interaction directe avec des domaines de la PLD1, comme le montre la [Figure 15](#). Une fois active, elle est dirigée vers la membrane plasmique ou les endosomes pour exercer son activité. Lorsque son activité est achevée, elle est recyclée et redirigée vers d'autres membranes intracellulaires

situées à différents compartiments tels que le Golgi ou le RE (470). De son côté, la PLD2 se localise sur la membrane plasmique au niveau basal et doit être phosphorylée sur son domaine PX par différentes protéines tels que les récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs à tyrosine kinase pour être active (491). Compte tenu de l'importance de ces deux enzymes dans la formation du PA, on pourrait penser que les souris présentant une délétion totale de ces deux isoformes ne seraient pas viables (493, 494). Bien au contraire, ces souris sont non seulement viables, mais sans anomalies sévères. Cette observation s'explique par le fait qu'il peut exister des mécanismes compensatoires. En effet, le PA peut être produit par d'autres enzymes comme la diacylglycérol kinase et la lyso-PA acyltransférase (495, 496).

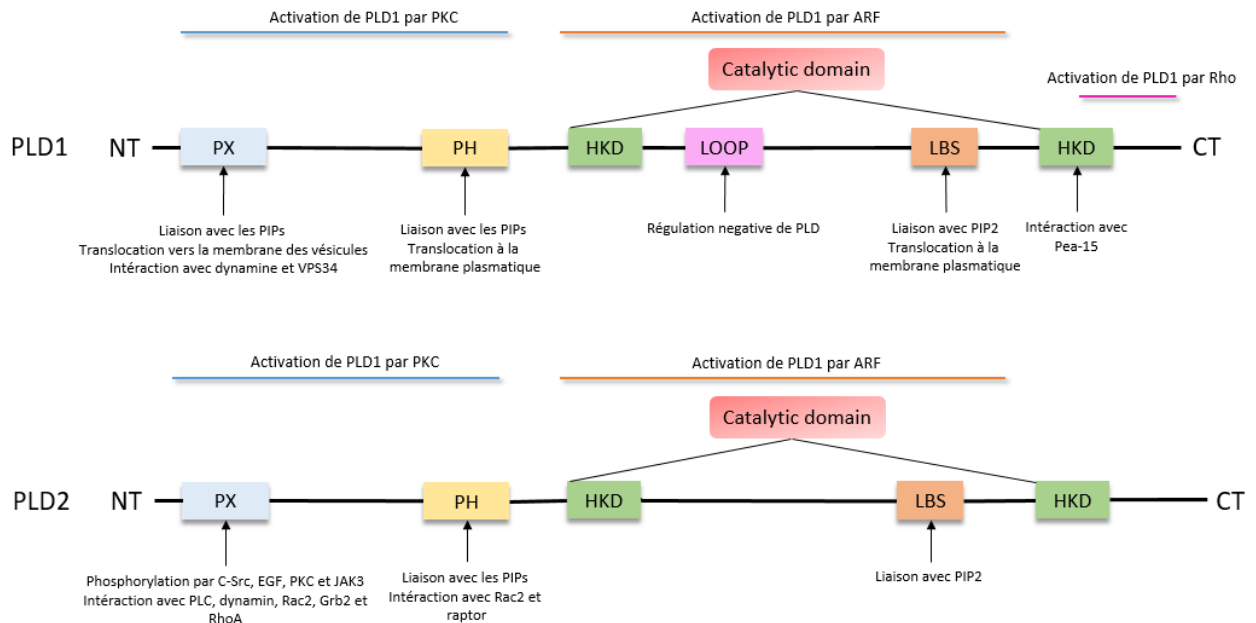


Figure 15. – Rôles des domaines qui composent la structure de la phospholipase D1 et de la phospholipase D2

La phospholipase D1 (PLD) 1 et la PLD2 possèdent plusieurs domaines ayant des rôles spécifiques qui peuvent changer en fonction de l'isoforme. PLD1 et PLD2 possèdent toutes deux des séquences catalytiques appelées HKD. Le domaine PX, le domaine PH et la LBS sont tous nécessaires à la translocation de PLD1 vers la membrane plasmique. De plus, PLD1, mais pas PLD2, possède un domaine en forme de boucle responsable de sa régulation négative. Pour PLD1 et PLD2, les domaines PX, PH et LBS sont tous capables de se lier à des PIP spécifiques. En outre, PLD2 interagit directement avec PLC, la dynamine, Rac2, Grb2 et RhoA au niveau de son domaine PX, et avec Rac2 et Raptor au niveau de son domaine PH. Quant

à PLD1, elle interagit avec la dynamine et VPS34 au niveau du domaine PX tandis que son domaine C-terminal HKD interagit avec PEA-15. PLD2, mais pas PLD1, est phosphorylée au niveau de son domaine PX par plusieurs protéines telles que C-Src, EGF, PKC et JAK3 pour son activation. Enfin, l'interaction de PKC et Arf au niveau de séquences spécifiques peut activer PLD1 et PLD2, alors que Rho ne peut activer PLD1 qu'au niveau de son extrémité C-terminale.

Comme il est montré à la [Figure 16](#), plus d'une quarantaine de protéines différentes se lient directement à la PLD1 et la PLD2, pendant que plus d'une cinquantaine se lient à le PA. Pour la PLD1 et la PLD2, la grande majorité des interactions protéine-protéine se font avec des kinases ou des GTPases qui inhibent ou simplement favorisent l'activité de ces deux enzymes, contrairement à PA, qui active ou inhibe surtout des kinases ou des GTPases par des interactions directes. Dans ces interactions, la PLD1 interagit principalement avec des protéines impliquées dans le transport des vésicules et la morphogénèse cellulaire, alors que les protéines interagissant avec la PLD2 se dédient plutôt à l'organisation du cytosquelette et à la migration cellulaire (497).

Même si la majorité des interactions protéines-protéines vont cibler l'activité des PLD, il a aussi été mis en évidence que les deux isoformes peuvent interagir directement avec des protéines dans le but de les activer ou de démarrer un processus cellulaire. Par exemple, il a été découvert que le domaine PX de la PLD interagit directement avec la dynamine pour activer son activité GTPase, une enzyme importante impliquée dans l'endocytose, comme le bourgeonnement des vésicules du trans-Golgi (498, 499). De même, la perturbation du complexe PED/PEA-15-PLD1 augmente la sensibilité à l'insuline dans le muscle squelettique (500). De plus, la PLD1 s'associe au transporteur de glucose de type 4 pour favoriser la translocation du transporteur par l'insuline (501). Enfin, la protéine PLD1, mais pas son activité enzymatique, régule le TNF α et la cicatrisation myocardique (502). Dans l'article de synthèse que nous avons rédigé, nous avons proposé plusieurs explications possibles du rôle de PLD1 dans la sécrétion accrue de cytokines inflammatoires (6).

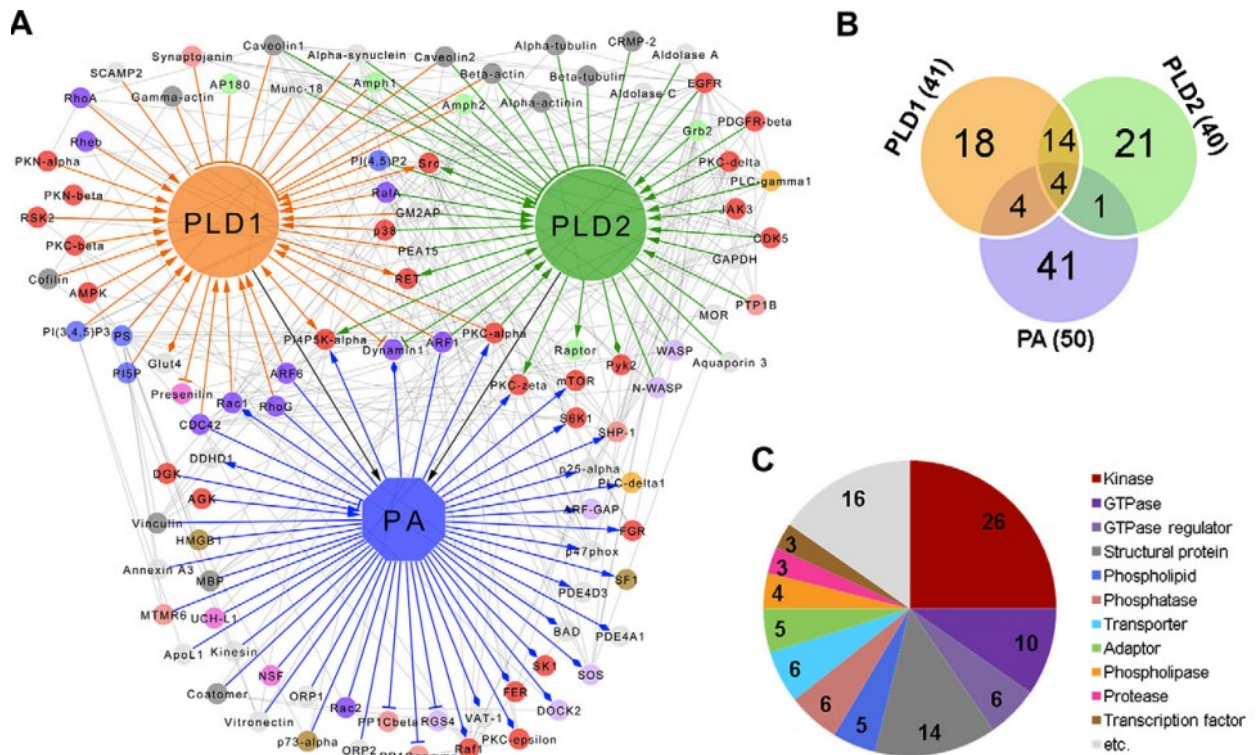


Figure 16. – Caractéristiques des partenaires de liaison des phospholipases D1 et D2, ainsi que de l'acide phosphatidique

(A) Réseau d'interaction de PLD et PA. Cercle = PLD, PA et leurs partenaires de liaison ; Couleur du cercle = fonctions moléculaires (voir panneau C) ; Lignes = interaction ; couleur des lignes = types d'interaction (orange, interactions PLD1 ; vert, interactions PLD2 ; bleu, interactions PA ; noir, réactions catalytiques avec PLD ; gris, interactions entre PLD et PA) ; forme de la ligne, relation (triangle ; activation, barre ; inhibition ; diamant, translocation). **(B)** Diagramme de Venn montrant le chevauchement entre les partenaires de liaison de PLD1, PLD2 et PA. **(C)** Fonctions moléculaires des partenaires de liaison de PLD et PA. Cette illustration provient de Jang JH, et al (497), et a été autorisée par Elsevier à être utilisée dans cette thèse.

2.10.1.3 Rôle de la phospholipase D dans le trafic vésiculaire

Le trafic vésiculaire, incluant l'endocytose et l'exocytose des vésicules, est un mécanisme central dans la formation des lipoprotéines. Il est également essentiel au bon fonctionnement de la cellule en permettant le transport de matériaux entre les organites. De nombreuses études suggèrent que la PLD ou plutôt son produit, le PA, est très important dans ces processus. Dans un premier temps, le PA est une molécule chargée négativement et son accumulation sur la

membrane favorise la courbure de la bicouche lipidique, une étape importante pour la formation de vésicules (503). Par la suite, le PA influence le transport des vésicules entre le RE et le Golgi. Dans ce contexte, le PA a le potentiel d'initier le bourgeonnement des vésicules COPII suite à l'activation de la Sar1b GTPase. L'hypothèse est que la Sar1b GTPase est capable de stimuler l'activité PLD à la surface du RE, ce qui augmente la quantité de PA, favorisant ainsi la tubulation de la membrane, et permettant le recrutement des Secs (504). D'autres articles ont également observé une augmentation du stress du RE généré par l'accumulation de protéines dans cet organe suite à l'inhibition de PLD1, ce qui soutiendrait cette hypothèse (505). De même, le PA augmente les taux de fusion de COPII avec le trans-Golgi (11). Le même principe s'applique pour la formation de COPI à partir de cis-Golgi (12). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de la PLD réduit la sécrétion des vésicules de COPI (7). Aussi, l'élimination de la PLD chez la drosophile a entraîné une désorganisation du Golgi et un trafic vésiculaire défectueux causé par la réduction du processus de fission dans le trans-Golgi (13). En regard de ces résultats, la [Figure 17](#) propose les sites où la PLD1 pourrait être nécessaire pour le transport du CM dans l'entérocyte.

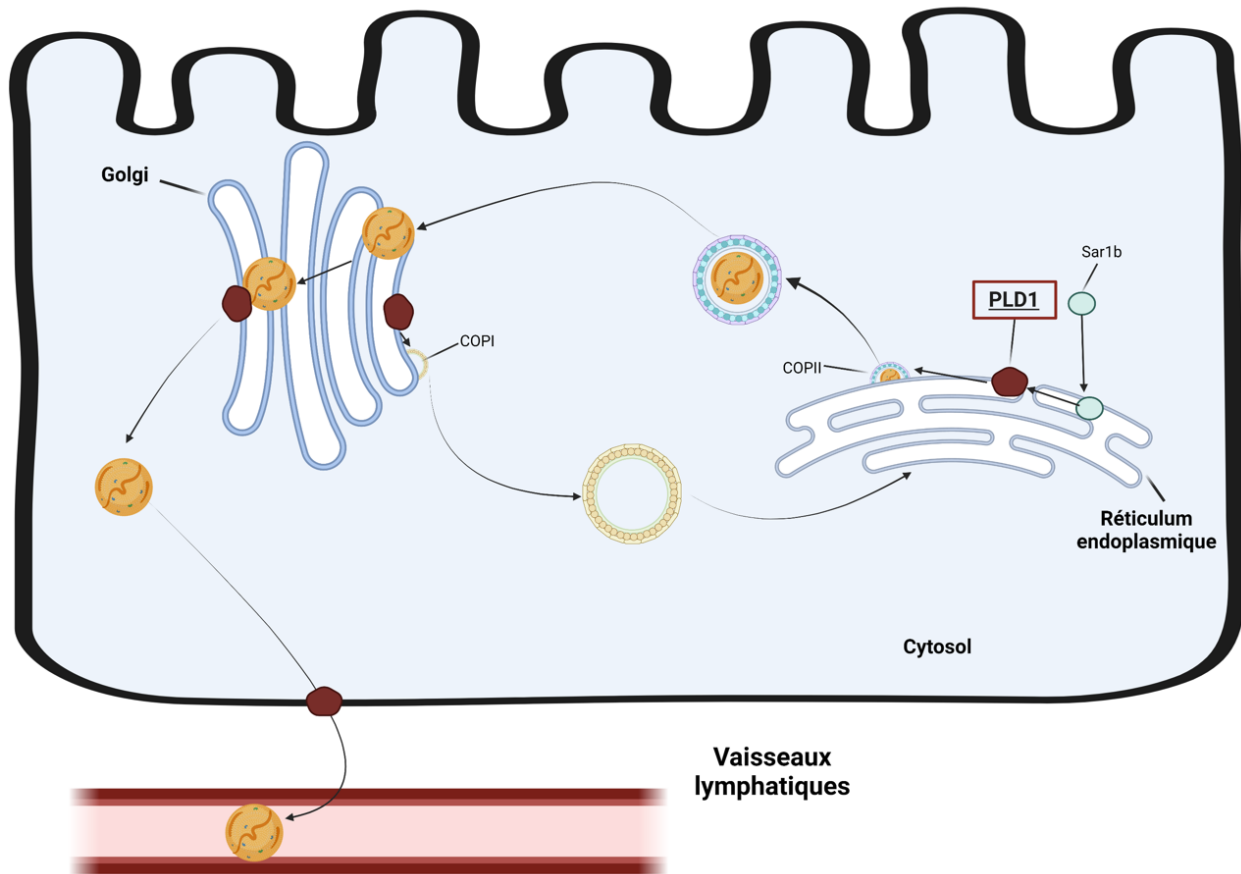


Figure 17. – Rôles de la phospholipase D1 dans la formation de vésicules du réticulum endoplasmique et du Golgi, ainsi que ces rôles possibles dans le transport des chylomicrons

Plusieurs recherches suggèrent que PLD1 pourrait jouer un rôle dans le transport du CM dans l'entérocyte. Dans un premier temps, suite au recrutement de Sar1b GTPase au RE, il active PLD1 qui produit du PA à la surface du RE. Ce PA favorise le bourgeonnement du COPII dans le cytosol. Après que le pré-CM soit rentré dans le Golgi et soit devenu mature, PLD1 pourrait favoriser son bourgeonnement à l'extérieur du Golgi, au niveau du côté basolatéral, vu sa présence dans le Trans-Golgi. Il pourrait aussi aider le CM à passer la membrane plasmique pour aller dans les réseaux lymphatiques vu sa capacité à former des vésicules. Finalement, il n'est pas à oublier que PLD1 favorise aussi la formation du COPI provenant du Cis-Golgi, appuyant son rôle indispensable dans cette organelle. Cette illustration a été créée avec BioRender.com.

2.11.2 Rôles de la phospholipase D dans le développement des maladies cardiovasculaires

Plusieurs conditions métaboliques favorisent le développement de maladies cardiovasculaires. En ce qui concerne notre enzyme d'intérêt, plusieurs études ont proposé qu'elle peut influencer l'évolution de la résistance à l'insuline, le diabète de type II, les dyslipidémies et l'hypertension, des conditions qui favorisent fortement les risques de maladies cardiovasculaires (6). L'influence de la PLD sur ces maladies est illustrée à la [Figure 18](#).

2.11.2.1 La résistance à l'insuline et le diabète de type II

La résistance à l'insuline favorise le développement de maladies cardiovasculaires de plusieurs façons. Tout d'abord, la présence d'une hyperglycémie chronique favorise l'inflammation et le stress oxydatif, entraînant des dommages cellulaires. De plus, l'insulinorésistance modifie le métabolisme des lipides en augmentant la sécrétion de VLDL et de CM, et en diminuant la formation de HDL. Aussi, l'insulinorésistance peut entraîner un dysfonctionnement endothélial. Enfin, la résistance à l'insuline peut affecter directement les cellules cardiaques en modifiant la transduction des signaux, la régulation du métabolisme des substrats et l'acheminement des substrats vers les cellules (506).

De nombreuses études ont examiné le rôle de la PLD dans la résistance à l'insuline, et les conclusions de ces recherches sont dichotomiques. Premièrement, plusieurs études ont observé que la présence de la PLD est nécessaire pour empêcher le développement d'une résistance à l'insuline. Effectivement, la délétion totale de la PLD1 et de la PLD2 chez les souris a augmenté les concentrations plasmatiques d'AG libres qui sont fortement liés, comme il a été expliqué précédemment, à la résistance à l'insuline. On a constaté que ces mêmes souris présentaient une résistance à l'insuline et une altération de la sécrétion d'insuline lors des tests de tolérance au glucose et à l'insuline (507). Dans les cellules musculaires humaines, l'augmentation de l'expression de PLD1 a facilité le transport et l'entrée du glucose dans la cellule par le transporteur de glucose 4, tandis que la délétion a fait le contraire et a entraîné une résistance à l'insuline (508). De même, dans les hépatocytes, l'inhibition de l'activité de PLD1 diminue l'entrée du glucose (509).

Cependant, d'autres chercheurs ont plutôt constaté des effets néfastes de la PLD. On a découvert que la surexpression de la PED/PEA-15 augmente la résistance à l'insuline et interagit directement avec la PLD pour l'activer et augmenter la formation de PA (500, 510). Il est proposé que le PA soit converti en d'autres molécules telles que le DG qui active PKC α , qui à son tour inhibe PKC ζ . En effet, l'activation de PKC ζ par l'insuline favorise l'entrée du glucose dans les cellules musculaires. Par conséquent, son inhibition conduira à limiter la captation du glucose dans la cellule, provoquant une résistance à l'insuline (511). Ces effets négatifs de la PLD ont également été observés dans des cellules primaires d'hépatocytes où la PLD engendre une résistance à l'insuline (512). Il ne faut pas oublier que PA peut activer mTORC1 en se liant directement à son domaine de liaison à la rapamycin FKBP12, qui à son tour peut inhiber la signalisation de l'insuline (489, 513).

Certaines études ont également observé des effets néfastes de l'expression accrue de la PLD dans les états diabétiques de type II. Par exemple, l'activation de la PLD par Arf6 dans les cellules mésangiales, dans des conditions de glucose très élevé, développent un phénotype associé à la néphropathie diabétique (514). Enfin, la PLD serait impliquée dans le développement de calcifications vasculaires sévères chez les patients atteints de diabète de type II. Dans cette situation, il a été démontré que les deux isoformes de la PLD sont activées dans les premiers stades de la minéralisation des ostéoblastes et des chondrocytes, et qu'elles augmentent également au cours de la calcification (515).

2.11.2.2 Les dyslipidémies

Il a été mentionné dans des [sections](#) précédentes les mécanismes par lesquels les lipoprotéines favorisent le développement de l'athérosclérose. Quant à la PLD, très peu d'études ont associé cette enzyme à la formation des lipoprotéines. Néanmoins, il a été démontré que l'activation de la PLD par ARF1 est essentielle pour la sécrétion des VLDL par les cellules hépatiques. En effet, l'inhibition de son activité par le butanol inhibe la formation de PA et diminue ainsi la sécrétion des VLDL (10).

2.11.2.3 L'hypertension

L'hypertension artérielle est considérée comme un facteur prédictif du développement des maladies cardiovasculaires. En effet, une pression artérielle trop élevée endommage les artères, réduisant leur élasticité, ce qui abaisse le flux de sang vers le cœur (516). Plusieurs études suggèrent que la PLD, en particulier la PLD2, est importante dans la synthèse de l'aldostérone, une hormone qui contrôle la pression sanguine. La surexpression de PLD2 augmente l'internalisation du récepteur de l'angiotensine II de type 1. Une fois internalisé, ce récepteur régule plusieurs voies de signalisation, notamment la synthèse de l'aldostérone (517). De plus, lorsque la PLD2 est activée par l'angiotensine II, il y a une augmentation de l'accumulation de PA (518, 519) qui peut se convertir en DG alors stimulant la PKC, une protéine qui a déjà été montrée comme régulant la synthèse d'aldostérone dans les cellules glomérulaires rénales (520). Enfin, des associations significatives ont été faites entre les polymorphismes de la PLD2 et le développement de l'hypertension (521, 522).

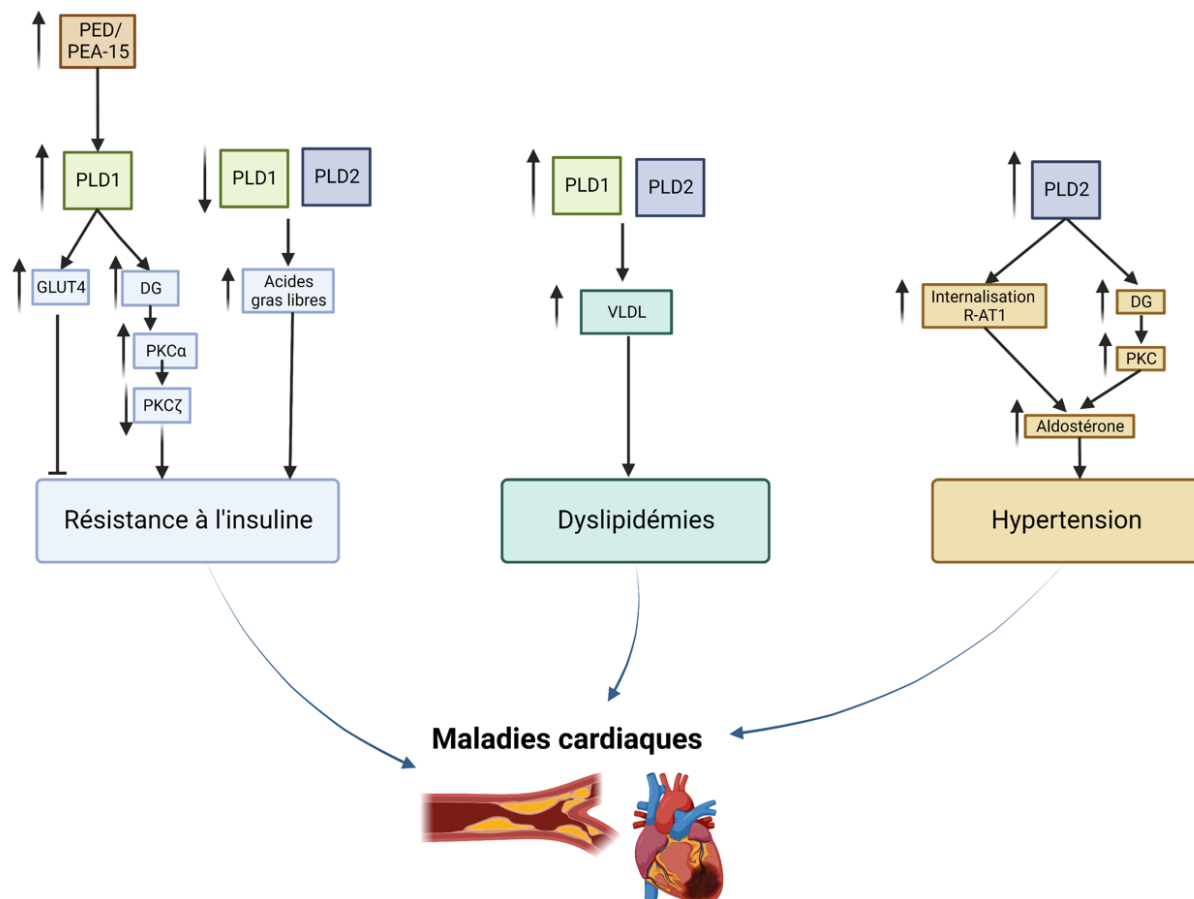


Figure 18. – Rôle de PLD1 et PLD2 dans le développement de maladies cardiaques

Il existe plusieurs maladies qui favorisent le développement des maladies cardiaques et PLD1 peut réguler plusieurs d'entre elles. En premier lieu, l'activation de PLD1 par son interaction directe avec PED/PEA-15 peut favoriser soit l'entrée du glucose par GLUT4, ce qui réduirait la résistance à l'insuline, ou augmenterait la formation de DG qui peut apporter à augmenter la résistance à l'insuline. De plus, diminuer l'expression de PLD1 et PLD2 augmente la quantité d'AG libres circulants, favorisant aussi la résistance à l'insuline. Quant aux dyslipidémies, elles seraient favorisées par PLD1 et PLD2 vu leur rôle dans la formation de VLDL. Finalement, pour l'hypertension, l'expression de PLD2 augmente l'hypertension suite à une surproduction d'aldostérone en favorisant l'internalisation de R-AT1 ou la formation de DG. Cette illustration a été créé avec BioRender.com.

Chapitre 3 – Problématique, hypothèses et objectifs

3.1 Problématique

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'intestin est un organe dont les fonctions sont diverses et complexes, et son plein fonctionnement est essentiel au maintien d'une bonne santé. Dans ce contexte, les entérocytes de l'intestin grêle peuvent, entre autres, former des CM qui sont nécessaires dans le transport des lipides alimentaires et des vitamines liposolubles vers la circulation sanguine. Compte tenu de l'importance pour la santé, la sécrétion de ces lipoprotéines riches en TG doit être minutieusement régulée, car une sécrétion trop importante peut entraîner une hypertriglycéridémie et des maladies cardiovasculaires, alors qu'une sécrétion trop faible génère une hypotriglycéridémie accompagnée de carences en vitamines liposolubles et en AG essentiels (523, 524).

Notre laboratoire travaille depuis plusieurs années pour comprendre et établir les processus de formation et de sécrétion des CM. En particulier, nous avons pu mettre en évidence le rôle des protéines clés impliquées dans l'assemblage intracellulaire des CM en nous concentrant sur les patients atteints de syndromes de malabsorption lipidique (5). Bien que des progrès significatifs aient été réalisés dans l'élucidation des mécanismes sous-jacents, des efforts sont encore nécessaires pour clarifier plusieurs énigmes concernant certaines des protéines connues impliquées dans l'assemblage des CM, et également pour découvrir de nouvelles protéines critiques à la biogenèse et exocytose des CM. Avec de telles informations, il serait plus facile de comprendre et de développer des traitements appropriés aux patients souffrant de malabsorptions intestinales ou d'hypersécrétion de CM favorisant le développement du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires. Dans ce programme de recherche, nous nous concentrons sur deux protéines distinctes : l'enzyme PLD1 et la Sar1b GTPase.

3.1.1 L'enzyme Phospholipase D1

Dans un premier temps, parmi plusieurs protéines qui pourraient potentiellement être nécessaires à la bonne régulation de la sécrétion de CM, nous nous sommes intéressés à la PLD1 en raison de son rôle dominant dans le trafic intracellulaire et de sa présence dans des organites

tels que le RE et le Golgi (6). En fait, le produit PA est étroitement impliqué dans la régulation de grand nombre de ces processus. Parmi ces événements, il participe à l'endocytose et à l'exocytose, qui sont des événements majeurs dans la formation des lipoprotéines, suggérant que PA est nécessaire au transfert des CM matures provenant des vésicules de Golgi vers la membrane basolatérale et les réseaux lymphatiques (525, 526). Actuellement, de nombreuses molécules inhibant les différentes isoformes de la PLD ont été développées pour éventuellement traiter des cancers solides, mais aucun projet clinique ne semble encore avoir été réalisé (527). Compte tenu de l'ensemble de ces raisons, il est crucial d'évaluer la modulation de l'assemblage et l'exocytose des CM par la PLD1.

3.1.2 Le Sar1b GTPase et la maladie de rétention des chylomicrons

D'autre part, parmi plusieurs troubles de l'absorption des lipides, notre laboratoire a identifié la maladie de rétention des CM et a découvert le gène défectueux *SARA2* qui code la protéine Sar1b GTPase (5, 454, 528). Les patients présentant l'une des mutations de la Sar1b GTPase sont caractérisés par une accumulation massive de CM au niveau du RE dans l'intestin sans la capacité de sécréter les CM dans la circulation sanguine, ce qui entraîne une malabsorption intestinale accompagnée d'une carence en vitamines liposolubles et en AG essentiels (5). Malgré ces avancées significatives et par rapport à d'autres maladies comme la HBLF et la ABL, plusieurs aspects nébuleux subsistent concernant la Sar1b GTPase : absence d'association " cause-effet ", mécanismes d'action, implication dans les voies métaboliques intracellulaires, régulation métabolique du CHOL, et impact sur les autres classes de lipoprotéines compte tenu des troubles notables observés chez les patients atteints de MRC. En outre, il existe de nettes différences entre les conséquences des mutations de Sar1b GTPase au niveau du foie et de l'intestin. Pour pouvoir mieux traiter les patients atteints de MRC, il est indispensable de clarifier tous ces aspects.

3.2 Hypothèses

Les patients atteints de maladies génétiques liées au transport des lipides et provoquant une hyper- ou une hypotriglycémie sont la principale preuve que notre compréhension des mécanismes régissant la sécrétion et la formation de CM n'est pas entièrement élucidée. Une analyse de l'ensemble du génome de patients sains après un repas riche en graisses a permis

d'identifier 126 gènes associés à la concentration plasmatique de TG ; toutefois, les 43 polymorphismes observés dans 23 gènes ne peuvent expliquer que 88 % de la variabilité de la réponse à la sécrétion postprandiale de CM (50). Une autre étude de patients présentant des caractéristiques cliniques et biochimiques compatibles avec une hypobétalipoprotéïnémie primaire n'a pu confirmer génétiquement que 23 de leurs 44 patients (529). Les mutations observées concernaient l'*ApoB*, le *MTTP*, le *Sar1b* et l'*ANGPTL3*. En vue de ces questionnements pathophysiologiques, compte tenu des connaissances limitées, et pour mieux répondre aux besoins des patients, nous émettons l'hypothèse générale que l'élucidation du rôle des protéines Sar1b et PLD1 conduira à une meilleure compréhension des processus régissant la formation et la sécrétion du CM, ce qui ultimement sera d'un grand support pour les patients.

Pour cette thèse, il existe des hypothèses distinctes pour les deux projets :

3.2.1 La phospholipase D1 est impliquée dans l'homéostasie lipidique du petit intestin.

Les fonctions des deux isoformes de la PLD, PLD1 et PLD2, ont été peu étudiées dans l'intestin et encore moins leur rôle dans le transport et le métabolisme des lipides. Il a été observé chez des jeunes patients présentant une mutation du gène *PLD1* un syndrome de malabsorption (inédit). Ceci suggère que PLD1 est nécessaire à la formation et à la sécrétion des CM. Ces observations seraient soutenues par le fait que PLD1 joue des rôles très importants dans la biogenèse et le trafic vésiculaire intracellulaire (505). Aussi, la PLD1 est également présente dans le Golgi et contrôle la sortie des vésicules de cette organelle (7, 11-13). Par ailleurs, deux études ont pu observer que la présence du 1-butanol comme inhibiteur de PLD, diminue la sécrétion de VLDL par les cellules hépatocytaires (10, 530). Cependant, cette dernière observation ne fait pas la différence entre PLD1 et PLD2, il est donc également probable que PLD2 puisse jouer un rôle dans la formation des lipoprotéines. En outre, il a été observé que la PLD2, et non la PLD1, est spécifiquement activée par l'oléate (531, 532). À ce jour, on ignore si la PLD peut réguler la synthèse *de novo* et la β -oxydation des AG, mais cela pourrait être le cas vu les rôles précédemment mentionnés des deux enzymes. Compte tenu de ces observations, ce projet s'est concentré sur PLD1 sans nécessairement oublier PLD2, et nous avons émis l'hypothèse que

l'inhibition de l'activité de PLD1 et/ou l'altération de l'expression du gène *PLD1* modifie la formation et la sécrétion de CM, ainsi que l'homéostasie lipidique de l'entérocyte.

3.2.2 L'altération du gène *SARA2* dans un modèle de souris récapitule les caractéristiques retrouvées chez les patients atteints de la maladie de rétention des chylomicrons

Une avancée majeure a été réalisée en identifiant le gène *SARA2* chez les patients atteints de la MRC, initialement appelée maladie d'Anderson (5). Cependant, même si une association a été faite entre la maladie et le *Sar1b*, il ne s'agit pas d'une relation de cause à effet. À cette fin, on devrait obtenir une preuve directe que les aberrations moléculaires du gène *SARA2* contribuent au développement des phénotypes ou caractéristiques cliniques des patients. Dans notre laboratoire, nous avons étudié de manière approfondie le gène *SARA2 in vitro* dans des cellules entérocytaires Caco-2/15 (195, 534, 535). Nous avons observé que la surexpression protéique de *Sar1b* augmente la sécrétion de CM (534), alors que son abolition la diminue (195). Cependant, pour empêcher complètement cette sécrétion comme chez les patients, il faut supprimer le gène qui code *Sar1b* et son isoforme *Sar1a*, dont le rôle était jusqu'à présent inconnu (195). Même si ces résultats ont constitué de grandes avancées pour confirmer la relation de cause à effet, il est encore nécessaire de répliquer ce phénomène dans un modèle de mammifère offrant la possibilité d'étudier les propriétés biochimiques et cliniques retrouvées chez les patients. En regard des résultats *in vitro* de notre laboratoire, nous émettons l'hypothèse que des souris présentant une délétion ou une mutation de *Sar1b* vont récapituler les phénotypes retrouvés chez les patients atteints de la MRC. De plus, vu l'importance de différents facteurs comme la nutrition et le genre sur la sécrétion des CM, nous nous attendons aussi à observer des différences entre les mâles et les femelles, ainsi qu'entre des souris sous des diètes pauvre et riche en lipides.

3.2.3 Une altération du gène *SARA2* altère la composition des lipoprotéines ainsi que les mécanismes impliqués dans l'homéostasie lipidique du petit intestin

La Sar1b GTPase est une protéine très importante dans la formation des vésicules du RE qui permettent le transport des lipides et des protéines vers le Golgi (536). Bien que nous sachions que les patients porteurs de mutations présentent une accumulation de lipides intestinaux ainsi que des modifications des vitamines et des lipides sanguins, nous ignorons les répercussions de sa mutation sur le foie et l'intestin, les deux organes majeurs pour la formation des lipoprotéines (528). Des études antérieures menées dans notre laboratoire ont montré que l'altération du gène *Sar1b* dans les cellules Caco-2/15 modifie l'expression protéique de marqueurs importants pour le transport et la formation de CHOL, ce qui est cohérent avec les taux très bas de LDL et de HDL-CHOL chez les patients (461, 535). Sur la base de ces résultats, on peut émettre l'hypothèse qu'une altération du gène *SARA2* diminue le transport vers la circulation et la production *de novo* de CHOL. De plus, puisque la mutation de *Sar1b* conduit à une grande accumulation de lipides dans l'intestin en raison de leur rétention dans le RE, nous proposons que l'accumulation lipidique conduise les cellules intestinales à développer (i) une élévation de l'utilisation des AG par β -oxydation tout en diminuant leur synthèse *de novo*; et (ii) des altérations de la composition en lipides et en apolipoprotéines des différentes lipoprotéines plasmatiques (VLDL, LDL, HDL).

3.3 Objectifs

Comme pour les sections précédentes, les objectifs sont séparés en 2 pour les deux types de projets.

3.3.1 Objectifs 1 : La phospholipase D

Pour répondre à l'hypothèse sur la PLD, nous proposons 3 objectifs de recherche :

1.1 Examiner via une revue de littérature exhaustive les rôles possibles que PLD pourrait avoir dans le syndrome métabolique qui, à son tour, peut engendrer des maladies cardiovasculaires ;

1.2 Déterminer si l'inhibition de l'activité de PLD1, PLD2 ou PLD1+PLD2, ou la modification du gène *PLD1* dans les cellules Caco-2/15 régulent le transport des lipides intestinaux et la production de CM ;

1.3 Définir le rôle de PLD dans différentes voies intra-entérocytaires comme la β -oxydation et la lipogenèse *de novo*.

3.3.2 Objectifs 2 : Le Sar1b GTPase et la maladie de rétention des chylomicrons

Pour répondre aux 2 hypothèses de recherche sur le projet Sar1b, nous proposons les objectifs de recherche :

2.1 Développer et caractériser des modèles animaux avec une délétion ou une mutation ponctuelle de *SARA2*, répliquant ainsi la MRC ;

2.2 Démontrer la relation "cause-effet" du gène *SARA2* en mettant l'accent sur l'absorption lipidique, la formation des CM et les phénotypes cliniques ;

2.3 Comparer le métabolisme lipidique/lipoprotéique de l'intestin et du foie en réponse aux aberrations du gène *Sar1b* ;

2.4 Définir les répercussions de défauts de la protéine Sar1b GTPase dans la synthèse *de novo* des AG et de leur combustion par β -oxydation dans le foie et l'intestin ;

2.5 Détecter les répercussions des aberrations génétiques de *Sar1b* sur le métabolisme du CHOL et sur la composition des différentes classes de lipoprotéines (CM, VLDL, LDL, HDL);

2.6 Comparer les effets de cette altération de *Sar1b* sur le sexe, l'alimentation et le génotype.

Chapitre 4 – Méthodologie générale

4.1 La phospholipase D1

Pour répondre aux objectifs sur la phospholipase D, en particulier D1, nous avons effectué des expériences avec des cellules Caco-2/15 pour reproduire *in vitro* le processus de formation et de sécrétion des CM qui se retrouvent dans les cellules entérocytaires du petit intestin. L'approche expérimentale est présentée schématiquement à la [Figure 19](#).

4.1.1 Culture cellulaire

Pour ces expériences, des cellules caco-2/15 ont été utilisées. Ces cellules proviennent d'une lignée dérivée d'un adénocarcinome du côlon humain et sont appropriées pour faire des études métaboliques. Ces cellules, une fois différenciées, ont des caractéristiques très similaires aux entérocytes de l'intestin grêle, avec la possibilité d'avoir une conformation 3D (482) qui permet d'étudier le transport de composés à travers les cellules, ainsi que d'étudier la sécrétion de lipoprotéines, comme cela a été fait à plusieurs reprises dans notre laboratoire (195, 537-539).

Ainsi, pour toutes les expériences, nous avons cultivé et différencié ces cellules pendant 3 semaines sur des *transwells*, ce qui favorise leur développement en 3D, tout en permettant le transfert des composés du milieu apical au milieu basolatéral. Pour cela, les puits ont deux compartiments bien séparés : un côté apical représentant la lumière de l'intestin contenant les lipides alimentaires et un côté basolatéral qui représente la circulation sanguine.

Plusieurs conditions cellulaires différentes ont été utilisées dans ce projet. Tout d'abord, nous avons soumis les cellules à un inhibiteur de l'activité PLD1, VU0155069, à un inhibiteur de l'activité PLD2, CAY10594, ou aux deux inhibiteurs en même temps. Ce sont deux agents efficaces qui ont été utilisés dans de nombreuses études (540-544). Ensuite, nous avons réduit l'expression du gène *PLD1* en utilisant la technologie Crispr-Cas9 dans les cellules Caco-2/15. Enfin, nous avons comparé ces deux conditions aux cellules Caco-2/15 sans modification du gène et sans inhibiteur.

Pour certains aspects, nous avons confirmé la validité de nos résultats en utilisant deux contrôles positifs. Comme premier contrôle, nous avons utilisé le lomitapide mésylate, un inhibiteur du

MTTP, dont nous savons qu'il inhibe très bien la sécrétion de CM. Pour le second contrôle, nous avons mis les cellules hépatocytaires HepG2 en présence des différents inhibiteurs, puisqu'il a déjà été démontré que l'inhibition de PLD réduit la sécrétion de VLDL (10).

4.1.2 Études de transestérification et de sécrétion des CM

Dans les différentes conditions, nous avons mis les cellules en présence d'acide oléique radioactif (^3H) pendant 24 heures du côté apical. Les inhibiteurs se retrouvent aussi du côté apical. Pour étudier la transestérification, nous avons extrait les lipides des cellules avec du chloroforme/méthanol (2:1) puis nous les avons séparés sur une chromatographie sur couche mince de silice avec un solvant (hexane, éther éthylique et acide acétique). Les différents groupes de lipides (TG, CHOL, PL et AG libres) ont été grattés sur la plaque, et la quantité de ^3H a été comptée dans chacun de ces groupes pour avoir une idée du taux d'incorporation du ^3H .

Pour étudier la sécrétion des lipides et des lipoprotéines, nous avons procédé de la même façon que précédemment, mais cette fois-ci, les lipides du milieu retrouvés dans le compartiment basolatéral ont été extraits.

Enfin, comme les cellules Caco-2/15 peuvent sécréter plusieurs types de lipoprotéines, nous avons isolé les CM du milieu basolatéral et extrait ces lipides pour déterminer la quantité de radioactivité présente dans les TG, les lipides qui composent en grande majorité les CM.

4.1.3 Études du métabolisme lipidique

Pour compléter l'étude, nous avons déterminé si nos différentes conditions pouvaient affecter l'expression protéique de différents marqueurs importants de la β -oxydation et de la lipogenèse intestinale. Pour ce faire, des Western blots ont été réalisés sur les homogénats cellulaires.

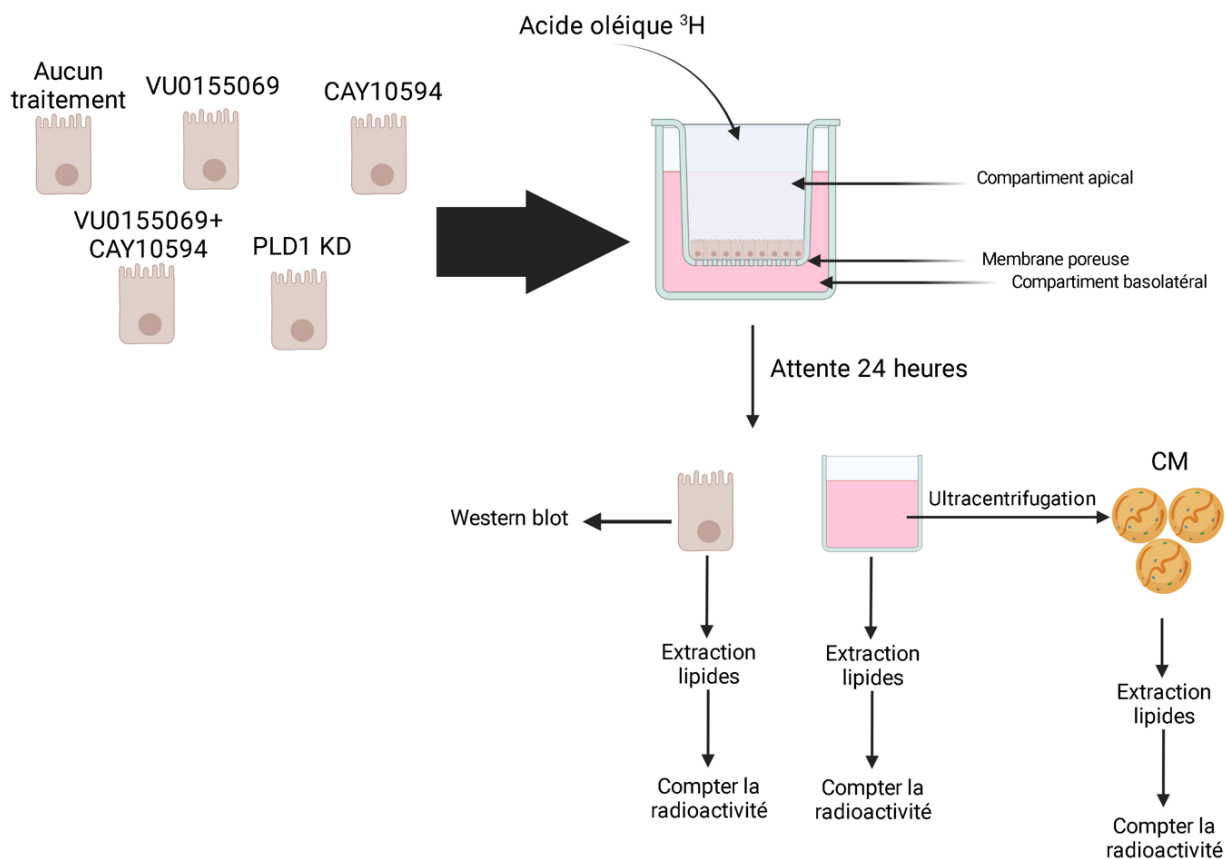


Figure 19. – Schéma du processus expérimental avec les Caco-2/15 pour étudier la phospholipase D

Crée avec Biorender.com

4.2 Le Sar1b GTPase et la maladie de rétention des chylomicrons

Pour répondre aux objectifs sur la MRC, des expériences *in vivo* ont été réalisées. 2 types de souris avec un fond C56BL/6N ont été développés en utilisant la technologie Crispr-Cas9. Pour le premier type de souris, une délétion de 545 paires de bases dans l'exon 2 de *Sar1b* sur le chromosome 11 a été générée. Pour le second type, une substitution de G en A a été effectuée dans l'exon 2 de *Sar1b* sur le chromosome 11 pour obtenir un acide aminé asparagine en position 137. Ces deux types de souris ont été utilisés pour toutes les expériences *in vivo*. Pour les expériences utilisant des souris adultes, seuls les hétérozygotes ont été utilisés en raison de la létalité des souris homozygotes. Dans ce projet, 4 plans expérimentaux différents ont été réalisés distinctement.

4.2.1 Le développement embryonnaire des souris avec une altération de Sar1b

Étant donné la létalité des souris homozygotes, nous avons voulu savoir si l'altération homozygote de *Sar1b* affecte le développement embryonnaire. Pour cela, nous avons apparié des souris mâles et femelles avec une délétion de *Sar1b* ($Sar1b^{del/+}$) ou une mutation de *Sar1b* ($Sar1b^{mut/+}$). Après l'apparition d'un bouchon vaginal, les embryons ont été récoltés à 3 stades embryonnaires différents : 9,5 jours, 13,5 jours et 18,5 jours. Cette expérience est illustrée dans la [Figure 20](#).

Pour le stade 9.5, un seul génotypage a été effectué. Au stade 13.5, une observation macroscopique de l'embryon, un génotypage et une récolte des sacs vitellins ont été effectués. Le sac vitellin a été coloré avec du Oil Red O pour regarder les lipides. Enfin, pour le stade 18.5, une observation macroscopique et un génotypage ont été effectués. Cependant, à 18,5, le foie, l'intestin et le cerveau ont également été prélevés. Tous ces tissus ont été évalués par des pathologistes après coloration à l'hématoxyline-éosine pour déterminer s'ils présentaient des anomalies.

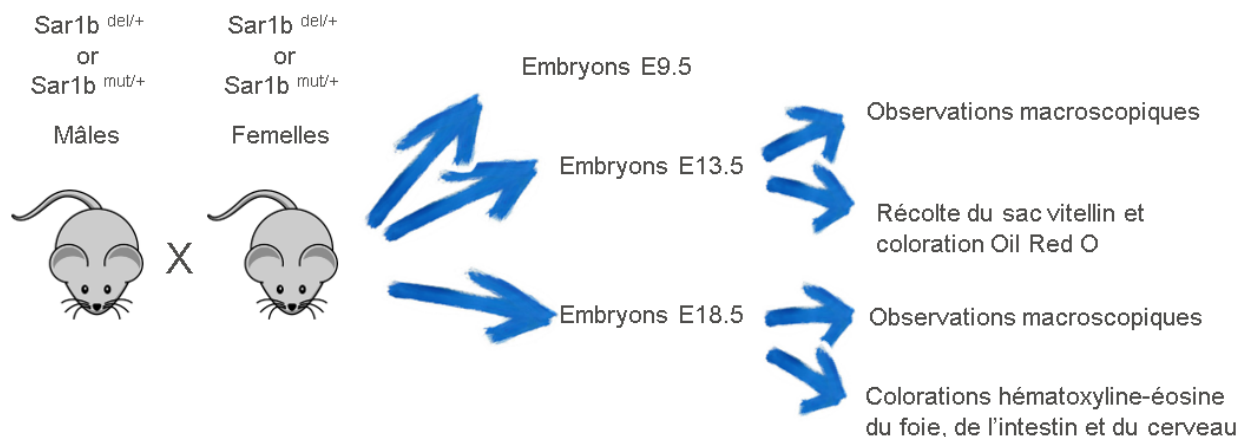


Figure 20. – Schéma du processus expérimental pour étudier le développement embryonnaire

4.2.2 Caractérisation des animaux avec une altération de Sar1b et détermination de la relation cause-effet

Pour répondre à une partie des objectifs, nous avons d'abord voulu caractériser les souris développées et déterminer si elles présentent certains phénotypes des patients atteints de la MRC. Le schéma de cette expérience est présenté dans la [Figure 21](#).

En résumé, nos deux types de souris hétérozygotes ainsi que des souris témoins mâles et femelles (C56BL/6) âgées de 9 à 11 semaines ont simplement été soumises à un régime alimentaire de type chow. Leur prise de poids ainsi que leur prise alimentaire ont été enregistrées pendant une semaine. Après une période de jeûne de 6 heures, les souris ont été gavées d'huile d'olive avec de la trioléine radioactive ^{14}C pour induire la formation et la sécrétion de CM. Afin d'empêcher le catabolisme du CM, le pluronic F-127, comme inhibiteur de la LPL, a également été injecté par voie intrapéritonéale 10 minutes après le gavage. Le sang a donc été prélevé par la queue à différents moments (temps 0, 60 et 90 minutes) et par ponction cardiaque lors du sacrifice (120 minutes). Le plasma de tous les échantillons sanguins a été isolé par centrifugation en utilisation du EDTA comme anticoagulant.

Avant le gavage des lipides, plusieurs analyses biochimiques dans le sang ont été effectuées à l'aide des trousse d'ELISA et de trousse enzymatiques commerciales (lipides, insuline et glucose). Après le gavage lipidique, les TG et la radioactivité ont été analysés à chaque point temporel dans le plasma. Quant au plasma issu de la ponction cardiaque, il a surtout été utilisé pour isoler les CM par ultracentrifugation. Les TG et la radioactivité ont également été déterminés dans cette fraction de CM.

Quant aux tissus, ils ont été pesés et récoltés après le sacrifice pour les expériences suivantes. Les lipides du foie et de l'intestin ont été extraits par chloroforme/méthanol (2:1) et analysés avec des kits colorimétriques. Ces résultats ont également été confirmés par la coloration à l'hématoxyline-éosine de ces deux tissus avec évaluation pathologique. Des fèces ont aussi été collectées et leurs lipides ont également été extraits et analysés de la même manière qui précède.

Enfin, nous avons analysé dans le foie et l'intestin l'expression protéique et génique de marqueurs importants du métabolisme des AG, de la formation de CM et de la biosynthèse de HDL par Western blot et qPCR.

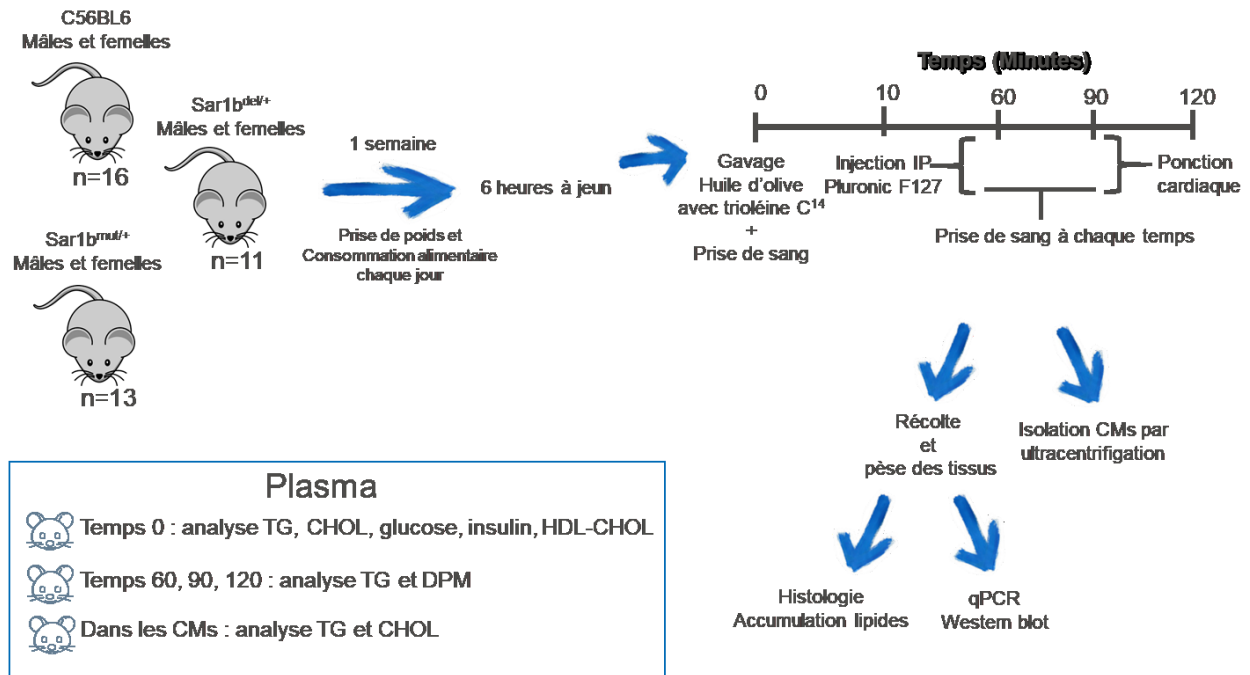


Figure 21. – Schéma du processus expérimental permettant de caractériser les souris présentant une altération du gène *Sar1b*

4.2.3 Le métabolisme du cholestérol et la composition des lipoprotéines chez des souris avec une altération de *Sar1b*

Pour compléter les derniers objectifs, nous avons fait une ultime expérience illustrée à la [Figure 22](#).

Nos deux types de souris et nos souris témoins, mâles et femelles âgés de 5 à 7 semaines, ont été soumises à un régime riche en graisses pendant 8 semaines. À la fin de cette période, les souris ont été mises à jeun pendant 6 heures et sacrifiées par ponction cardiaque. Le sang a été centrifugé.

Le plasma collecté a été utilisé pour des analyses biochimiques, principalement des lipides sanguins, à l'aide de kits enzymatiques. La composition en AG a également été réalisée dans le

plasma après transestérification et séparation par chromatographie en phase gazeuse. Le plasma restant a été utilisé pour la séparation des différentes lipoprotéines par ultracentrifugation à gradient séquentiel. La composition chimique de chaque fraction lipoprotéique (VLDL, LDL et HDL) à l'état de jeûne a été réalisée. Dans cette composition, les TG, le CHOL total, le CHOL libre, les PL et la concentration en protéines ont été analysés. Quant à la composition protéique, les fractions lipoprotéiques ont simplement migré sur un gel SDS-PAGE avec un gradient de 4 à 20% pour bien séparer leurs apolipoprotéines. Grâce à la technologie *Stain free* de Biorad, il a été possible d'observer directement ces protéines sans coloration. Avec ces gels, le pourcentage d'une apolipoprotéine spécifique a été calculé sur la base du contenu total en apolipoprotéines.

Enfin, nous avons à nouveau analysé la quantité de lipides avec des kits colorimétriques dans le foie et l'intestin des souris, en plus d'avoir analysé l'expression protéique et génique de marqueurs importants du métabolisme du cholestérol et du stress du ER par Western blot et qPCR.

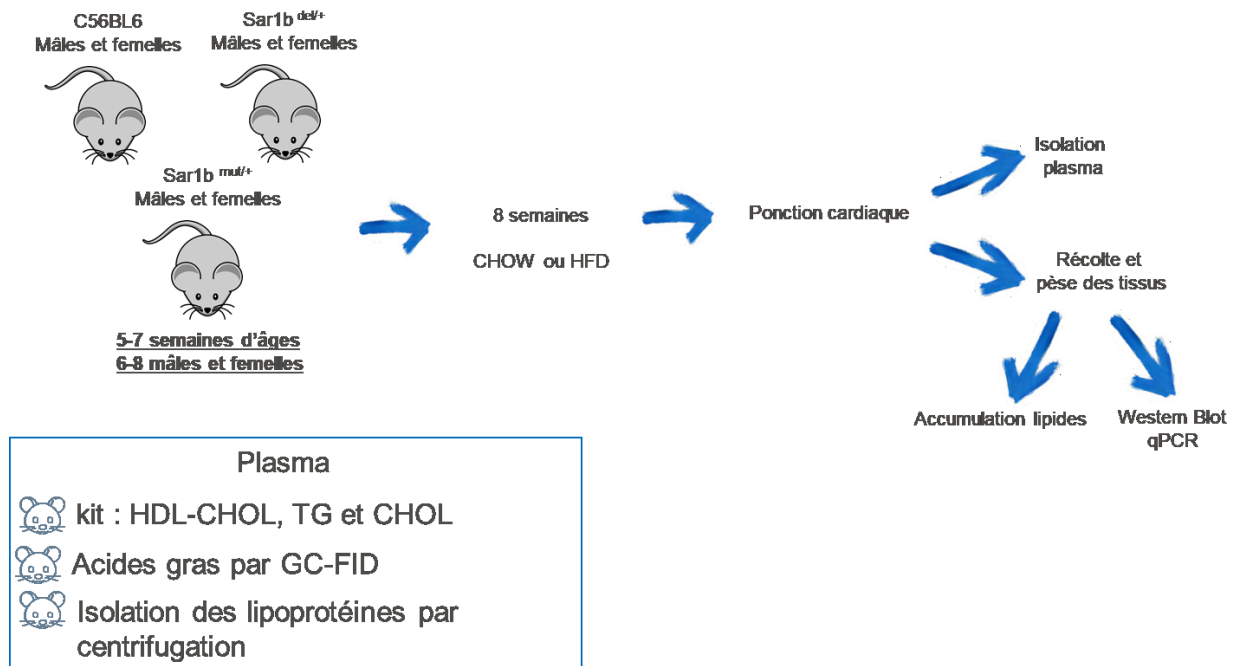


Figure 22. – Schéma expérimentale permettant d’analyser la composition des lipoprotéines et le métabolisme du cholestérol chez les souris avec une altération de Sar1b

Chapitre 5 – Résultats

5.1 Article 1

Involvement of Phospholipase D1 in intestinal chylomicron secretion and lipid metabolism

Nickolas Auclair, Alain Sané et Emile Levy

Article soumis à la revue *Journal of Lipid Research*

Cet article répond aux objectifs spécifiques 1.2 et 1.3

Contributions :

Nickolas Auclair : A réalisé et planifié les expériences, analysé les échantillons, compilé les résultats, interprété les résultats, effectué les analyses statistiques et rédigé l'article.

Alain Sané : A contribué à la réalisation des cellules transgéniques et a révisé l'article.

Emile Levy : A supervisé l'étudiant dans la réalisation et la planification des expériences et a revu et corrigé l'article avant sa soumission.

5.1.1 MAIN TEXT OF THE ARTICLE

Involvement of Phospholipase D1 in intestinal chylomicron secretion and lipid metabolism

Nickolas Auclair^{1,2}, Alain T. Sané¹ and Emile Levy^{1,2,3*}

¹Research Center, CHU Ste-Justine, Departments of ²Pharmacology & physiology and ³Nutrition, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada

Short Title: PLD1 regulates CM chylomicron secretion and intestinal lipid homeostasis

Funding Sources: This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research Grants (Grant number PJT 153113) and the J. A. DeSève Research Chair in Nutrition.

Address for correspondence:

*Dr. Emile Levy

GI-Nutrition Unit

CHU Sainte-Justine

3175 Ste-Catherine Road #4.17.005

Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5

Tel.: (514) 345-7783

Abbreviation list:

ACC: Acetyl CoA carboxylase, **AMPK:** AMP-activated protein kinase, **CE:** Cholesterol ester, **CM:** Chylomicron, **COPII:** Coat protein complex II, **CPT1:** Carnitine palmitoyl transferase, **DGK:** Diacylglycerol kinase, **KD:** Knockdown, **mTOR:** Mammalian target of rapamycin, **MTTP:** Microsomal triglyceride transfer protein, **PA:** Phosphatidic acid, **PL:** Phospholipids, **PLD:** Phospholipase D, **P-ACC:** Phospho ACC, **P-AMPK:** Phospho AMPK, **PGC1 α :** Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α , **PPAR:** Peroxisome proliferator-activated receptor, **PKC:** Protein Kinase C, **TG :** Triglycerides

ABSTRACT

Background: The enzyme phospholipase D (PLD), composed of 2 isoforms: PLD1 and 2, is responsible for the formation of phosphatidic acid from phosphatidylcholine, an activator of many signaling pathways such as vesicle exocytosis and endocytosis. PLD proteins can also activate several proteins by protein-protein interaction. It has already been observed in several studies that the inhibition of PLD activity in hepatic cells reduce lipoprotein secretion, but it is unknown if it's the case for intestinal chylomicrons (CM), an important lipoprotein that transport lipids from the diet to the blood circulation. **Objective/Methods:** To determine whether PLD1 and 2 activities and reduced PLD1 protein expression are involved in CM secretion and intestinal lipid metabolism. To this end, Caco-2/15 cells were transduced with CRISPR/Cas9 to reduce PLD1 (KD) expression or treated with specific inhibitors to inactivate its activity. **Results:** The presence of PLD1 inhibitor and KD, but not PLD2 inhibitor alone, reduced cholesterol ester (CE) and increased phospholipids (PL) in Caco-2/15 cells. However, only PLD1 KD was able to lessen the output of CE, triglycerides (TG) and phospholipids (PL), whereas PLD1 and PLD1/2 inhibitors led to stimulated release of PL. Accordingly, a marked decline characterized CM secretion in response to PLD1 KD while no effect was recorded for the PLD1, PLD2 and PLD1/2 inhibitors. Microsomal triglyceride transfer protein served as a positive control and its inhibition by lomitapide inhibited TG output similarly to PLD1 KD. Liver HepG2 cells also served as a second positive control, and as reported elsewhere, PLD1 and PLD2 inhibition resulted in inhibition of very-low-density lipoprotein secretion indicating that our experimental conditions and findings are valid. In addition, investigation of lipid homeostasis showed that PLD1 KD interferes more than PLD1 and PLD2 inhibitors since it raised *de novo* lipogenesis (evidenced by the protein expression of fatty acid synthase, acetyl-CoA carboxylase phosphorylation, and the AMP-activated protein kinase phosphorylation form), and abridged β -oxidation (supported by the expression of carnitine palmitoyltransferase, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α , and peroxisome proliferator-activated receptor α). **Conclusions:** In conclusion, our results suggest that PLD activity play different roles in lipoprotein secretion in the liver and intestine. In addition, PLD1 appears to be able to directly regulate CM secretion and lipid metabolism, most likely through a protein-protein interaction. However, further studies are needed to confirm this role

because the inhibitor of PLD1 activity may also inhibit inflammation, thereby masking its role in lipid metabolism.

Keywords: Phospholipase D, chylomicrons, lipoproteins, enterocytes, dyslipidemias, lipid metabolism.

1. INTRODUCTION

Chylomicrons (CM) are important lipoproteins secreted by the enterocytes, which allow the transport of lipids, the most alimentary energy-dense macronutrient, to the blood circulation. A well-balanced regulation of the mechanisms governing CM assembly and secretion is crucial for the preservation of lipid homeostasis (1). Indeed, an increase in postprandial lipoprotein secretion has been highly associated with the progression of cardiometabolic disorders (2). On the other hand, CM secretion failure causes severe malabsorption diseases culminating in deep deficiency of liposoluble vitamins and essential fatty acids (FA) (3). Therefore, understanding the molecular mechanisms behind the above-mentioned disorders could help design novel and effective therapeutic targets.

The complex processes for intestinal fat digestion and absorption were widely described (1, 4, 5). Under normal conditions, lipid breakdown by pancreatic enzymes and emulsification by biliary acids occur in the intestinal lumen, whereas the transport and assembly of CM, requiring several steps, take place in the intracellular phase of the enterocytes. More precisely, digested lipids are taken up by absorptive enterocytes to undergo re-esterification and packaging into CM in the endoplasmic reticulum (ER). Essential proteins play an active role in CM assembly, as reflected by the re-esterified lipids in the ER, which are transported by the microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) to apolipoprotein (Apo) B-48 for their assembly, while Sar1B GTPase is the limiting factor to transfer CM particles from the ER to the Golgi organelles via specialized cargo-containing vesicles in a coat protein complex II (COPII)-dependent pathway, to complete maturation.

The last few years have been marked by a remarkable advance in the understanding of CM formation in ER and its trafficking to the Golgi. Nevertheless, major issues persist regarding additional intracellular sites and steps, as well as the identity of additional critical proteins participating in CM translocation from the enterocyte to blood circulation. So far, at least, how CMs shuttle from the Golgi to the basolateral membrane for exocytosis to reach the blood circulation is unclear. Furthermore, the identity of the regulatory components orchestrating this process remains unsolved. Phospholipase D (PLD) may be one protein candidate for sorting, trafficking and fusion of CM-containing Golgi vesicles with the cell membrane. Indeed, his

enzyme, mostly composed of two isoforms: PLD1 and PLD2, hydrolyze phosphatidylcholine to generate membrane-bound phosphatidic acid (PA) and choline (6). Both of these enzymes were also found to influence the activity of the other proteins or trigger intracellular processes (7) Also, these enzymes have already been found to be central to VLDL assembly in liver McA-RH7777 cells, as blocking its activity by 1-butanol inhibits VLDL assembly (8). Additionally, subcellular fractionation experiments have demonstrated the presence of PLD1 in the Golgi apparatus and vesicular compartments (9, 10), and since PLD1 has an important function in signal transduction, membrane trafficking and cytoskeletal reorganization (11) through its ability to produce PA, we thus hypothesized that PLD1 may be involved in CM secretion and lipid metabolism in enterocytes. Let's not forget that the activity of PLD2 has also been found to be stimulated by oleate (12, 13). To test this assumption, two experimental options were applied in intestinal Caco-2/15 cells: (i) the use of specific inhibitors of PLD1 (iPLD1) and PLD2 (iPLD2) activities, and (ii) reduction of PLD1 expression.

This study concluded that the inhibition of PLD activity does not impact lipoprotein secretion in Caco-2/15 cells. However, both PLD1 and PLD2 inhibitors resulted in a reduction of very-low-density lipoprotein (VLDL) from HepG2 cells. This could indicate that PLD activity may not be as important in the gut as in the liver for lipoprotein secretion. In contrast, the reduction of PLD1 protein expression surprisingly reduced CM secretion, supported by a decrease of cell-secreted lipids and a decline of CM-triglyceride (TG) content. These dichotomies suggest that PLD1 may promote CM secretion through a protein-protein interaction or that the role of PLD1 activity is masked by the inhibition of other mechanisms such as inflammation. These roles need to be further elucidated. In addition, PLD1 knockdown (KD) also affected Caco-2/15 cell lipid homeostasis by increasing protein expression of important markers of *de novo* lipogenesis and affecting the expression of proteins essential for FA β -oxidation.

2. MATERIALS AND METHODS

Caco-2/15 cells (14) were cultured at 37 °C and 5% of CO₂ in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Wisent Inc., Canada) containing 10% fetal bovine serum (FBS; Wisent Inc.), 1% penicillin/streptomycin and 1% non-essential amino acids (GIBCO, USA). Cells were maintained in T-75 cm² flasks (Corning Inc., USA) and were trypsinized when they reached 80–90% confluence. For individual experiments, Caco-2/15 cells were seeded at a density of 1 x 10⁶ cells/well on polycarbonate 24.5-mm transwell filters with pores of 0.4 µm diameter (Corning Inc., USA), to mimic the 3D topology of the intestine with apical and basolateral compartments and grown for 15 days post-confluence. The Caco-2/15 cells will differentiate spontaneously when reaching confluence. Towards confluence they start to polarize acquiring a characteristic apical brush border with microvilli. Tight junctions form between adjacent cells, and they develop characteristic typical of enterocytes, especially for lipid absorption and transport (15). HepG2 cells were obtained from ATCC and once they reached 70-80% confluence, they were seeded at a density of 1 x 10⁶ cells/well on normal polycarbonate plates of 6 wells. Experiments were performed when cells reached 90% confluence.

Plasmids and Vector Construction

LentiCas9-Blast and pLentiGuide were provided by the Gene Editing Platform of the CHU Sainte-Justine Research Center. They are respectively plasmids with a lentiviral backbone (expressing human codon-optimized *S. pyogenes* Cas9 protein along with the blasticidin resistance gene) or CRISPR chimeric RNA element along with the puromycin resistance gene. A guide RNA (gRNA) targeting DNA sequence within the first exon of the *PLD1* gene was designed (AGTGCAGAGGTATTTACCCG) (IDT, IA, USA) and cloned into the BsmBI restriction site of the pLentiGuide vector to generate pLentiguide_sgRNA_PLD1. Plasmids pREV, pVSVG and pMDL were also provided by the Gene Editing Platform of the CHU Sainte-Justine Research Center.

Lentivirus Production

HEK293 cells were plated in a 6-well plate (9x10⁵ cells) coated with amines (Fisher Scientific USA) in DMEM containing 10% FBS without antibiotics. For transfection, two mixes were prepared: MIX

A: composed of 100 μ L OPTI-MEM, 300ng pREV, 390ng pVSVG, 750ng pMDL and 450ng LentiCas9-Blast or pLentiguide_sgRNA_PLD1; and MIX B: 100 μ L OPTI-MEM and 4 μ L lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 5-20 minutes of separate incubation at room temperature, the two mixes were combined and left at room temperature for one hour. The new solution (200 μ L) was then added to HEK293 cells for a total volume of 1.2 mL and incubated overnight at 37°C. The following day, the medium was replaced with 1.2 mL DMEM containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin for 30 hours at 37°C. After the incubation period, the culture medium was centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes to pellet debris and the Cas9-Blast or PLD1 sgRNA virus-containing supernatant was collected for subsequent use.

Knockdown of PLD1 in Caco-2/15 Cells

Stable KD of *PLD1* in Caco-2/15 was engineered by the Gene Editing Platform of the CHU Sainte-Justine Research Center. Briefly, 50 μ L of the LentiCas9-Blast virus-containing supernatant was added to 5×10^5 cells of Caco-2/15 and maintained in 1 mL of culture medium containing 8 mg/mL polybrene (Sigma-Aldrich, USA). The infected cells were allowed to grow for 24 hours before the addition of 5 ng/mL blasticidin to select positive clones, which were then confirmed by immunoblotting using Cas9 antibody.

To generate *PLD1* KD cells, 5×10^5 Caco-2/15-Cas9-expressing cells were plated in 1 mL of appropriate culture medium in a 6-well plate and infected with 50 μ L of pLentiguide_sgRNA_PLD1 virus-containing supernatant. The cells were incubated overnight at 37°C and the medium was changed to regular culture medium the following day. Infection with pLentiguide_sgRNA_PLD1 virus-containing supernatant was repeated 4 times to obtain a significant number of PLD1-impaired cell lines. KD efficiency was checked 48 hours after the fifth transfection by lysing 5×10^5 transfected cells that were compared to control Caco-2/15-Cas9 cells, with the QuickExtract Extraction solution (Lucigen, USA), according to the manufacturer's protocol. After amplification of cellular DNA by PCR and the purification of the products with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany), the PCR products were sequenced by Sanger method at the Genome Québec platform of the CHU Sainte-Justine. The KD of PLD1 expression was confirmed by Western blotting.

Caco-2/15 Cell Integrity

Cell integrity was confirmed by analysis of protein expression of differentiation and tight junction markers, as well as by measurement of transepithelial resistance (16, 17).

PLD1 and 2 Activity

PLD1 activity was assessed by the analysis of phosphatidylbutanol in intact cells, formed by transphosphatidylation of phosphatidylcholine (18-20). Cells were grown in 1.5 mL serum-free-medium in the presence of 1 μ Ci radiolabeled [3 H]-oleic acid conjugated to FA-free bovine serum albumin. At the same time, cells were challenged with 0.5 μ M, 2 μ M or 8 μ M PLD1 inhibitor (iPLD1) (VU0155069, Cayman Chemical, USA), 0.5 μ M, 2 μ M or 8 μ M PLD2 inhibitor (iPLD2) (CAY10594, Cayman Chemical, USA), or both of these inhibitors at the same time (PLD1/2). After 18-hour incubation, the medium was removed, the cells were washed twice with PBS, and then plated for 30 min in presence of serum-free-medium containing the PLD inhibitors, 400 nM of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate to prone PLD activity and 0.3% of butan-1-ol for transphosphatidylation. After a 30 min-incubation, cells were harvested and their lipids were extracted overnight in chloroform-methanol (2:1). Phosphatidylbutanol was then separated by thin layer chromatography (TLC, Millipore Sigma, USA) with a solvent made of ethyl acetate, isooctane, acetic acid and water (2:14:9:3). The phosphatidylbutanol band was scratched off the plates and disposed in scintillation vials with EcoLite counting fluid (MP Biomedicals, USA). Radioactivity was measured by scintillation counting (Hidex 300, Finland).

Chylomicron and VLDL Isolation by Ultracentrifugation

For Caco-2/15 cell studies, after 18 hours of incubation with serum-free medium and 600 μ M of unlabelled oleic acid, the medium was removed and replaced with fresh medium containing 1 μ Ci of radiolabeled [3 H]-oleic acid (Perkin Elmer, USA) and 600 μ M of unlabelled oleic acid conjugated to FA-free BSA on their apical side. At the same time, in their apical side, some wells received 8 μ M of VU0155069, 8 μ M of CAY10594, 8 μ M of VU0155069 and CAY10594 or 100 pM of lomitapide mesylate, an MTTP inhibitor (Selleck chemicals, USA). The use of MTTP inhibitor is to support the relevance of our cellular model in secreting CMs. After another 18-hour incubation,

enterocytes were scraped in cold PBS containing 1 mM of leupeptin, PMSF and pepstatin. Basolateral medium from transwell plates was collected and post prandial lipid-rich plasma (as a carrier to drag the lipoproteins synthesized by Caco-2/15 cells) was added (4:1). CM were first isolated by ultracentrifugation (OptimaMax Ultracentrifuge, Beckman Coulter, USA) at 25 000 rpm for 40 min, and VLDL were subsequently separated by ultracentrifugation at 100 000 rpm for 2.5 hours, at a density gradient of 1.006 g/mL. Once again, lipids from the lipoprotein fractions were extracted overnight in chloroform-methanol (2:1) and separated by TLC. The TG band was scraped and the radioactivity was counted. The isolation of CMs from the basolateral media was conducted since Caco-2/15 can also secrete VLDL-sized apoB-lipoproteins. As to HepG2 cells, they went through the same protocol, but they were seeded on normal 6-well plates without inserts.

Effects of Phospholipase D on Lipid Esterification

As described above, Caco-2/15 and HepG2 cells were cultured in the presence PLD1 KD, or with the PLD1, PLD2, PLD1/2 and MTPP inhibitors. Then, lipids from the cells and the medium were extracted overnight in chloroform-methanol. Total cholesterol, phospholipids (PL) and TG were then separated by TLC. The corresponding bands were scraped off the spots and put in EcoLite counting fluid (MP Biomedicals, USA). Radioactivity was measured by scintillation counting (Hidex 300, Finland).

Protein Expression Analysis by Western Blot

Caco-2/15 cell homogenates were prepared for Western blotting as described previously (31, 32). Twenty micrograms of proteins were separated on 8% SDS-PAGE gels and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Nonspecific binding sites on the membranes were blocked using defatted milk proteins followed by the addition of primary antibodies directed against acetyl CoA carboxylase (ACC, 1/1000), carnitine palmitoyl transferase α (CPT-1 α , 1/1000), fatty acid synthase (FAS, 1/1000), AMP-activated protein kinase α (AMPK α) and phospho-AMPK^{Thr172} (P-AMPK, 1/1000), phospholipase D1 (PLD1, 1/500) from Cell Signalling, USA; peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC1 α , 1/1000) and occludin (1/1000) from Abcam, USA; peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha (PPAR α , 1/1000) from Cayman Chemical, USA; phospho-acetyl CoA carboxylase^{ser79} (P-ACC, 1/1000) from Millipore, USA; β -actin

(1/250,000) from Sigma-Aldrich, USA; microsomal triglyceride transfer protein (MTTP, 1/1000) from Thermo Fisher Scientific, USA, and villin (1/1000) from BD Biosciences, USA. After incubation with their relative secondary antibodies (mouse or rabbit IgG (1/10 000, Roche Diagnostics, CH)), the bands were revealed using Clarity Max Western ECL substrate (Bio-Rad, USA), captured with the Chemidoc Imaging System (Bio-Rad, USA) and analyzed with the ImageLab software (Bio-Rad, USA). Two different molecular ladders were used in the experiments, the Precision Plus Protein All Blue ladder (Biorad, USA) or the BLUeye protein ladder (Froggabio, CA). For each protein of interest, β -actin was used for sample normalization. Several proteins were analyzed on the same nitrocellulose membrane, indicating that various proteins shared the same β -actin.

RNA Isolation and RT-PCR Analysis

RNA from Caco-2/15 cells were extracted using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Ambion, USA). RNA concentration and purity were measured using a Biodrop spectrophotometer (Montreal Biotech Inc., CAN) and the ratio absorbance at 260 and 280 nm was used to determine purity as described previously (21, 22). The cDNA was synthesized by reverse transcription with the SuperScript Vilo MaterMix from Thermo Fisher Scientific, USA, and cDNA was amplified by PCR using a Taq polymerase (Invitrogen, USA). The PLD1 and GAPDH primers used are as follows: F-AAACGAGCCACGGGTAAATA and R-GACAGCCGGAGAGATACGTC for PLD1, and F-AGAAGGCTGGGGCTCATT and R-CACTGCTGGTATGCTCTCCA for GAPDH which was used for normalization. PCR products were visualized on agarose gels and the corresponding protein bands were visualized with the Chemidoc Imaging System (Bio-Rad, USA).

Statistical Analysis

Results with more than 2 variables were analyzed by ANOVA and the differences between means were determined using the *post-hoc* Tukey test. When there are only 2 variables, results were evaluated by an unpaired sample two-parametric *t*-test. GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, USA) was used for all statistical analyses. Results are presented as mean \pm SEM and significance is considered at $P < 0.05$.

3. RESULTS

Caco-2/15 cell integrity in response to modification of PLD activity and PLD1 gene expression

To define the role of PL in intestinal lipid transport and metabolism, two experimental strategies were employed in Caco-2/15 cells: inhibition of PLD1 and 2 activities, and PLD1 KD. The PLD1 inhibitor, VU0155069, was specifically developed as an inhibitor of the PLD1 isoform, while CAY10594 was specifically developed as an inhibitor of PLD2 (23-25). With this inhibitor, PLD1 activity was markedly decreased (> 90%) at different concentrations. As for PLD2 inhibitors, it seems less effective than PLD1 inhibitors and needs a concentration of at least 8 μ M to reduce PLD activity by half. The most effective condition at reducing PLD activity has been with the use of both PLD1 and PLD2 inhibitors at a concentration of 8 μ M (**Figure 1A**), which was used in all subsequent experiments. We then investigated the influence of PLD1 and PLD2 inhibitions on Caco-2/15 cell viability and monolayer integrity. It appeared that these inhibitions had no effect on villin (**Figures 1B**) and occludin (**Figure 1C**) protein expressions, as well as transepithelial resistance (**Figure 1D**), which clearly indicates the absence of disruption of cellular barrier function and differentiation. On the other hand, stable Caco-2/15 cells with PLD1 KD were engineered with the crispr-cas9 technology. Pronounced reduction of transcript (**Figure 1E**) and protein (**Figure 1F**) expressions resulted from the genetic manipulation, which had an important impact (50%), as expected, on PLD activity (**Figure 1G**). Similar to the use of an inhibitor, PLD1 KD had no effect on cell barrier function and differentiation since we observed no divergences in the protein expression of villin (**Figure 1H**) and occludin (**Figure 1I**) and in transepithelial resistance (**Figure 1J**). Therefore, it may be concluded that decline of PLD1 expression and PLD activity did not exert significant cytotoxic effects on Caco-2/15 cells.

***De novo* lipid synthesis and secretion following PLD modification in Caco-2/15 cells**

To elucidate the role of PLD in lipid homeostasis, Caco-2/15 cells were supplemented with [³H]-oleic acid. The addition of PLD1 inhibitor had no impact on cellular TG (**Figure 2A**), substantially increased PL (25%) (**Figure 2B**), and drastically decreased cholesterol ester (CE) (90%) (**Figure 2C**) without affecting FFA (**Figure 2D**). Similar trends were observed with PLD1 KD (**Figures 2E-2H**).

PLD2 inhibitor had no effect on these conditions, whereas the use of PLD1 and 2 inhibitors gave a similar result to the use of PLD1 inhibitor alone.

The examination of lipids released into the basolateral medium showed no alterations in TG and CE (**Figures 3A and C**), but an accretion of PL (**Figure 3B**) as a function of PLD1 and PLD1/2 inhibition. However, these results were not confirmed by the use of a PLD2 inhibitor on its own. In contrast, the secretion of the three lipid components TG (**Figure 3D**), PL (**Figure 3E**) and CE (**Figure 3F**) was efficiently diminished in response to PLD1 KD. To ensure that the findings with PLD1 KD were compelling, we repressed the activity of MTTP as a control protein that regulates the critical step in assembly and delivery of TG-rich lipoproteins. As expected, the addition of lomitapide, a potent inhibitor of MTTP, drastically inhibited TG output (**Figure 3G**) while having no effect on PL release (**Figure 3H**).

In the next set of experiments, we studied the repercussion of PLD modifications on the secretion of CM, the major vehicle for intra-enterocyte lipid transport. Although no effect was recorded for the PLD1, PLD2 and PLD1/2 inhibitors (**Figure 4A**), there was a clear CM release blockage following MTTP inhibition by lomitapide as a positive control (**Figure 4B**) or PLD1 KD (**Figure 4C**). Our data demonstrate that it is the ablation of PLD1 expression and not the abrogation of its activity that can modulate CM release.

The presence of MTTP and PLD inhibitors reduced the secretion of lipids and VLDL from HepG2 cells

Subsequent studies focused on how PLD activity inhibition alters lipid exocytosis and VLDL secretion in HepG2. Blocking PLD1 and PLD2 activities resulted in a pronounced decrease of TG (**Figure 5A**). Only a downward trend characterized CE and PL (**Figure 5B and 5C**). The extraction of lipids from VLDL also confirmed the significant reduction in TG (**Figure 5D**). Inhibition of MTTP (as a reference protein) interfered even more significantly with TG output (**Figure 5A**) and VLDL (**Figure 5D**) secretion. These results confirm that PLD activity is essential for the delivery of TG-rich lipoproteins in the liver, but not in the intestine.

PLD1 KD alters the expression of important markers of lipogenesis in Caco-2/15 cells

The subsequent series of studies was conducted to appraise the effects of PLD modifications on lipid homeostasis by targeting critical proteins regulating FA β -oxidation and lipogenesis. We first examined the enzymes regulating the lipogenesis pathway. As noted from panels of Figure 6, FAS (**Figure 6A**), ACC (**Figure 6B**), P-ACC (**Figure 6C**) and the ratio P-ACC/ACC (**Figure 6D**) did not change following PLD1, PLD2 and PLD1/2 inhibition. As AMPK α is a cellular energy sensor negatively regulating ATP-consuming biosynthetic processes, including lipogenesis, we evaluated its expression and its active phosphorylation form and no significant alterations were discerned in the protein expression of AMPK (**Figure 6E**), his active form (P-AMPK α) (**Figure 6F**) and in the ratio P-AMPK α /AMPK α (**Figure 6G**). However, in PLD1 KD cells, an increase in FAS (**Figure 7A**) and a decline of P-ACC (**Figure 7C**) were noticed, indicating a stimulation of lipogenesis. This assumption was confirmed by the reduction of the P-ACC/ACC ratio (**Figure 7D**). Accordingly, the protein expression of AMPK α (**Figure 7E**) did not change while P-AMPK α (**Figure 7F**) and the ratio P-AMPK α /AMPK α (**Figure 7G**) decreased by half.

PLD1 KD reduces the protein expression of important β -oxidation markers in Caco2/15 cells

We also analyzed the expression of CPT1a since it represents the rate-controlling enzyme of the FA β -oxidation pathway. No effect on CPT1a (**Figure 8A**), PGC1 α (**Figure 8B**) or PPAR α (**Figure 8C**) expressions was observed in the presence of the PLD1, PLD2 and PLD1/2 inhibitors. On the contrary, there was a decline in CPT1a expression (**Figure 8D**), in accordance with the reduced expression of PGC1 α (**Figure 8E**) and PPAR α (**Figure 8F**) in response to PLD1 KD.

4. DISCUSSION

Rare inherited diseases characterized by genetic defects of *APOB*, *MTTP* and *SAR1B* have taught us so much about CM formation and secretion (26, 27). Despite tremendous progress made in this field, intense efforts are still needed to further improve our understanding of additional, new key factors governing the multi-step CM assembly and exocytosis from the enterocyte. The present study is precisely part of this endeavour as it aims to determine whether PLD is required for CM formation. The inactivation of PLD1 and PLD2 by its specific inhibitors and the reduction of PLD1 gene expressions allowed us to appreciate its involvement. In particular, PLD1 KD revealed perturbations in intestinal lipid homeostasis and CM secretion. Most of the experiments in this work were conducted with the human-derived immortalized Caco-2/15 cell line. This human epithelial cell line has been widely used as a model of the intestinal epithelial barrier and its most advantageous properties is its ability to spontaneously differentiate into a monolayer of cells with many properties typical of absorptive enterocytes with brush border layer as found in the small intestine and largely reported by our previous studies (28-31). Hence, it is also entirely suitable to explore gut absorption in response to nutritional, hormonal, toxicological, microbiological and medicinal agents (32). Proper testing of barrier function and monolayer integrity was absolutely critical in exploiting Caco-2/15 cells. It thus seemed quite optimal to us to employ Caco-2/15 cells to investigate the role of PLD in intestinal lipid transport and metabolism.

PLD is thought to have important functions in signal transduction, membrane trafficking and cytoskeletal reorganization, and even if these features are central in intracellular CM movement, the involvement of PLD in intestinal lipid transport has not been addressed (11). Yet this relationship between intracellular CM transport and PLD is particularly relevant since, specifically for PLD1, since the latter was shown to regulate the formation of the COPII, coat protein carriers critical for the transfer of CM from the ER to the Golgi apparatus (33). Furthermore, PLD1 is known to contribute to various steps of the secretory pathway and may thus regulate the CM exocytosis machinery (34-38). Therefore, we planned two experimental routes to study the contribution of PLD1, but also PLD2, to lipid transport and metabolism. The first approach was to treat the cells

with PLD1, PLD2 or PLD1 and 2 inhibitors, thereby preventing the hydrolysis of phosphatidylcholine into choline and PA that has emerged as a pleiotropic regulator for a number of cellular processes (i.e., cellular survival, migration, proliferation, differentiation, cytoskeletal architecture, membrane trafficking, and autophagy) as reviewed in (6, 11, 39). These different actions are mediated by the linkage of PA to protein kinases, phosphatases and proteins involved in vesicle trafficking or endocytosis (7). In our studies, although the PLD1 inhibitor strongly reduced PLD activity, whereas PLD2 slightly affected it in Caco-2/15 cells, it had no substantial influence on CM production and intestinal lipid metabolism, apart from PLD1 inhibitor decreasing CE formation and increasing PL accumulation in Caco-2/15 cells.

In stark contrast to the inhibitors, genetic ablation of PLD1 significantly affected the release of CMs into the basolateral medium. For this study, we decided to genetically target PLD1 and not PLD2 since more modulations were found with PLD1 inhibitors but also because PLD1 is mostly found on intracellular membranes such as Golgi and ER, while PLD2 is mostly found on the plasma membrane. PLD1 has also been found to regulate the formation of vesicles from the ER and the Golgi (40). In this study, while PLD1 ARN expression was shutdown, protein expression is still around 50%. This could be explained by the fact that PLD isoforms have really long half-lives which also explains why PLD antisense-oligonucleotides only cause small downregulation in many cell types (41-43). Collectively, our results suggest that PLD1 protein *per se* rather than PLD activity might be an important contributor to CM exocytosis. Although the causes are still unclear with regard to the divergent effects of PLD1 activity inhibition and KD on CM release from Caco-2/15 cells, some ideas may be put forward. It is possible that PLD1 may be physically necessary given the observations made in previous studies emphasizing the link between Sar1b recruitment and PLD1 (33). Of note, Sar1b enzyme recruits the COPII heterodimers (i.e., Sec23/24 and Sec13/31) to the ER membrane, to form pre-CM transport vesicles (44-46). Otherwise, defects in Sar1b result in CM secretion failure and CM retention disease (3, 27, 47-49). On the other hand, the specific PLD inhibitor did not produce any impact on Sar1b recruitment to the ER membrane (50). Further experiments are certainly needed to elucidate the possible synergy between Sar1b and PLD1 by measuring mRNA and protein levels of Sar1b. Another explanation is that PLD functions upstream of protein kinase C (PKC) ζ (51), an important factor for the budding of the pre-CM

transport vesicle, and the rate-limiting phase in the transfer of CM across the cell (52). PLD1 may not only interact with PKC ζ (53) but also with c-Jun N-terminal kinase 1, which controls basolateral CM output (54-56). One last element that is relevant to mention is the nuclear localization of PLD1 mediating the activation of nuclear signalling pathways, which may effectively contribute to the regulation of CM output (57). In fact, the nucleus appears a location of dynamic lipid metabolism with an influence on synthesis and degradation of lipids in subcellular compartments.

Importantly, PLD1 directly interacts with more than 40 different proteins. Although most of the protein-protein interactions with PLD1 are made to increase or inhibit its own activity, PLD1 can in turn influence the activity of the other proteins or trigger intracellular processes (7). For example, the PX domain of PLD1 has been found to interact directly with dynamin to activate its GTPase, an important enzyme involved in endocytosis such as vesicle budding from trans-Golgi (58, 59). Similarly, the interaction of PLD1 with phosphoprotein enriched in diabetes/phosphoprotein enriched in astrocytes-15 modulates skeletal muscle insulin sensitivity (60). PLD1 can also connect to glucose transporter type 4-containing membranes to promote the translocation of the latter in response to insulin (61). Finally, PLD1 protein, but not its enzymatic activity, regulates tumour necrosis factor α and myocardial wound healing (62).

It should be also taken into consideration that the role of PLD1 activity in the CM secretion and formation might be hindered by the roles of the inhibitor VU0155069. Indeed, not only has PLD1 activity inhibition has been highly found to reduce inflammation level in several type of cells, as reviewed in (11), the inhibitor VU0115069 can also independently of PLD1 reduce inflammation, the production inflammatory cytokines and leukocytes apoptosis (63). Given that increased levels of inflammation can strongly affect lipid and lipoprotein metabolism and that its inhibition restores such metabolism, this effect may also play a role in the findings made in this study (64-66).

It should be noted that the original intention of the present work was to focus primarily on the role of PLD in the delivery of CMs as lipid transporters. However, to validate our experimental procedures and results regarding the lack of impact on CM release in response to inhibitors of PLD1 and PLD2 activities, we tested hepatocytes as positive controls. This initiative was pertinent

because PLD appears to be central to VLDL assembly in liver McA-RH7777 cells since blocking its activity by 1-butanol prevents VLDL assembly (8). Also, it appeared that PLD 1 and 2 inhibition reduce the secretion of VLDL by altering the production of aldosterone (67). Our findings were fully consistent as the exposure of HepG2 cells to VU0155069, a specific PLD1 inhibitor, and to CAY10594, a specific PLD2 inhibitor, restricted the output of VLDL. Interestingly, the action of PLD was also noted to raise the formation of cytosolic lipid droplets that may serve as precursors for VLDL biosynthesis and output in the secretory pathway (68-72). The disparity between the two organs involved in TG-rich lipoproteins is intriguing as PLD inhibitors has no significant impact on the secretion of CM by intestinal Caco-2/15 cells, but decreased VLDL release from hepatic HepG2 cells. Further studies are still needed to clarify this important aspect.

It is possible that a compensatory mechanism occurs in Caco-2/15 cells in the presence of the PLD inhibitors to ensure stable provision of PA, a process that may be quite different in liver cells. In this context, PA can be produced by lysophosphatidic acid with lysophosphatidic acid acyltransferase and by diacylglycerol with diacylglycerol kinases (DGK) (11, 73, 74). For example, in BSC-1 epithelial cells, it was observed that inhibition of PLD increases cellular PA in contrast to inhibition of DGK, which drastically reduces PA content (75). Similarly, when PLD is inhibited in 1321N1 astrocytoma cells, additional sources contribute to PA production as a sort of compensatory mechanism (19). In fact, PLD may not be the major PA producer in Caco2-/15 cells unlike HepG2 cells, and within this context, DGK appeared as the major pathway for PA production (76). In HEK293 cells, DGK has been shown to be the key generator of PA (77). Similarly, in mouse *extensor digitorum longus* muscle, DGK and not PLD is primarily responsible for PA increases (78).

In the present studies, as a validation of our experimental techniques and results, and for comparative purposes to PLD, we evaluated the inhibition of MTTP. As per PLD, the suppression of MTTP activity in Caco-2/15 and HepG2 cells provided the same inhibitory effect on lipid and lipoprotein output. It is clear that PLD behaves as a key intracellular factor in the release of TG-rich lipoprotein. In addition, similar to the inhibition of MTTP that moderates FA oxidation in the liver (79), PLD1 KD dampens β -oxidation of FA and increased lipogenesis, two important processes that control intestinal lipid metabolism. These observations could be explained by the

downregulation of PPAR α and PGC1 α . As well established, these two primordial transcription factors are involved in FA oxidation regulation (80, 81), and the decline of their protein *per se* may downregulate CPT1a, which is the key regulator of intramitochondrial β -oxidation. As for lipogenesis, the decrease of ACC phosphorylation that leads to the inactivity of ACC may result from the low AMPK activity in response to PLD1 KD (82-84). Consequently, since ACC is more active, this leads to the formation of malonyl-CoA from acetyl-CoA. Similarly, the increment of FAS may promote FA generation from malonyl-CoA (85). Lipogenesis is tightly linked with FA oxidation since the increased production of malonyl-CoA from ACC inhibits the activity of CPT1a.

The impact of PLD1 protein or even PLD activity on lipogenesis and FA oxidation is not yet clear. However, several elements could support its role in these processes. Indeed, in MDA-MB-231, Calu-1, and BJ-hTERT cells, there is a reciprocal feedback mechanism between AMPK and PLD (86). Whereas inhibition of AMPK increases PLD activity, suppression of PLD increases AMPK activity. However, because AMPK isoforms can form 12 different complexes endowed with different properties, and these complexes have relative tissue specificities, the eventual regulation of AMPK by PLD could be different in different cell types (86-89). It is also known that mammalian target of rapamycin (mTOR) is an important regulator of lipid metabolism (90). In particular, it has been observed in muscle cells that this member of the phosphoinositide 3-kinase family of protein kinases is important for the maintenance of mitochondrial oxidative functions by increasing PGC1 α expression (91). Since PLD strongly influences mTOR activity, it may be suggested that its regulation also has an impact on mitochondrial functions. Furthermore, as an important regulator of autophagy, inhibition of PLD1 in MDA-MB-231 breast cancer cells reduces the supply of FAs from autophagy-derived PLs, which in turn reduces FA oxidation from mitochondria (92). Also, the transcription factor PPAR γ , an important activator of lipogenesis, is inhibited by the production of PA from PLD in several cell lines (93). These results are supported *in vivo* with mice since the deletion of PLD1 increased the gene expression of important transcription factors implicated in lipogenesis such as the sterol regulatory element binding protein 1c, the CCAAT-enhancer-binding protein alpha and the PPAR γ in the liver and adipose tissues (94). Finally, it was shown that the presence of PLD *in vitro* with ACC isolated from rat

livers reduced the activity of ACC (95). These results could be due to the fact that the reduction of PL content can deteriorate the substrate binding property of the enzyme (96).

In conclusion, our results suggest that the inhibitor of PLD1, but not PLD2, affects the lipid content of intestinal cells. We also highlight the major role of PLD activity in lipoprotein secretion in the liver, but not in the intestine. Nevertheless, this study highlights that PLD1 protein interaction may be a modulator of CM exocytosis in human intestinal cells since we observed reduced lipid and CM secretion with reduced PLD1 protein content in Caco-2/15 cells. In addition, information on its role in lipid metabolism, such as increased lipogenesis and increased fatty acid oxidation, is proposed. However, further studies are needed to conclude these results. Indeed, only the expression of PLD1 protein was studied on CM, but we did not change the expression of PLD2 protein and PLD1 and 2 proteins simultaneously, which is necessary to conclude the effect of both isoforms. Additional experiments are also needed to confirm the role of PLD in lipogenesis and fatty acid oxidation, because only the protein content of important markers was analyzed. Finally, further efforts are needed to elucidate the intra-enterocyte mechanisms, most likely the protein-protein interaction, responsible for the impact of PLD.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data supporting the findings of this study are contained in the manuscript and in the supplementary file. Raw data can be shared upon request by contacting Nickolas Auclair.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Gene Editing Platform of the CHU Sainte-Justine Research Center for the development of the PLD1 KD cells.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Nickolas Auclair: Conceptualization, Methodology, Formal Analysis, Investigation, Writing-Original Draft, Visualization **Alain T Sané:** Validation, Investigation, Supervision, Writing – Review and Editing **Emile Levy:** Conceptualization, Methodology, Writing-Original Draft, Resources, Supervision, Project administration, Funding acquisition

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

The funders had no role in study design, decision to publish, or preparation of the manuscript. Therefore, the authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Giammanco A, Cefalu AB, Noto D, Aversa MR. The pathophysiology of intestinal lipoprotein production. *Front Physiol.* 2015;6:61.
2. Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. Postprandial lipemia as a cardiometabolic risk factor. *Curr Med Res Opin.* 2014;30(8):1489-503.
3. Peretti N, Sassolas A, Roy CC, Deslandres C, Charcosset M, Castagnetti J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of chylomicron retention disease based on a review of the literature and the experience of two centers. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:24.
4. Dash S, Xiao C, Morgantini C, Lewis GF. New Insights into the Regulation of Chylomicron Production. *Annu Rev Nutr.* 2015;35:265-94.
5. Ko CW, Qu J, Black DD, Tso P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;17(3):169-83.
6. Selvy PE, Lavieri RR, Lindsley CW, Brown HA. Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem Rev.* 2011;111(10):6064-119.
7. Jang JH, Lee CS, Hwang D, Ryu SH. Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. *Prog Lipid Res.* 2012;51(2):71-81.
8. Asp L, Claesson C, Boren J, Olofsson SO. ADP-ribosylation factor 1 and its activation of phospholipase D are important for the assembly of very low density lipoproteins. *J Biol Chem.* 2000;275(34):26285-92.
9. Freyberg Z, Sweeney D, Siddhanta A, Bourgoin S, Frohman M, Shields D. Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. *Mol Biol Cell.* 2001;12(4):943-55.
10. Toda K, Nogami M, Murakami K, Kanaho Y, Nakayama K. Colocalization of phospholipase D1 and GTP-binding-defective mutant of ADP-ribosylation factor 6 to endosomes and lysosomes. *FEBS Lett.* 1999;442(2-3):221-5.
11. Auclair N, Sane AT, Delvin E, Spahis S, Levy E. Phospholipase D as a Potential Modulator of Metabolic Syndrome: Impact of Functional Foods. *Antioxid Redox Signal.* 2021;34(3):252-78.
12. Harkins AL, Yuan G, London SD, Dolan JW. An oleate-stimulated, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-independent phospholipase D in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res.* 2010;10(6):717-26.

13. Kim JH, Kim Y, Lee SD, Lopez I, Arnold RS, Lambeth JD, et al. Selective activation of phospholipase D2 by unsaturated fatty acid. *FEBS Lett.* 1999;454(1-2):42-6.
14. Beaulieu JF, Quaroni A. Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem J.* 1991;280 (Pt 3)(Pt 3):599-608.
15. Riebeling C, Morris AJ, Shields D. Phospholipase D in the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791(9):876-80.
16. Kleme ML, Sane A, Garofalo C, Seidman E, Brochiero E, Berthiaume Y, et al. CFTR Deletion Confers Mitochondrial Dysfunction and Disrupts Lipid Homeostasis in Intestinal Epithelial Cells. *Nutrients.* 2018;10(7).
17. Koudoufio M, Feldman F, Ahmarani L, Delvin E, Spahis S, Desjardins Y, et al. Intestinal protection by proanthocyanidins involves anti-oxidative and anti-inflammatory actions in association with an improvement of insulin sensitivity, lipid and glucose homeostasis. *Sci Rep.* 2021;11(1):3878.
18. Yang SF, Freer S, Benson AA. Transphosphatidylation by phospholipase D. *J Biol Chem.* 1967;242(3):477-84.
19. Scott SA, Xiang Y, Mathews TP, Cho HP, Myers DS, Armstrong MD, et al. Regulation of phospholipase D activity and phosphatidic acid production after purinergic (P2Y6) receptor stimulation. *J Biol Chem.* 2013;288(28):20477-87.
20. Zouwail S, Pettitt TR, Dove SK, Chibalina MV, Powner DJ, Haynes L, et al. Phospholipase D activity is essential for actin localization and actin-based motility in *Dictyostelium*. *Biochem J.* 2005;389(Pt 1):207-14.
21. Sane A, Ahmarani L, Delvin E, Auclair N, Spahis S, Levy E. SAR1B GTPase is necessary to protect intestinal cells from disorders of lipid homeostasis, oxidative stress, and inflammation. *J Lipid Res.* 2019;60(10):1755-64.
22. Sane AT, Seidman E, Peretti N, Kleme ML, Delvin E, Deslandres C, et al. Understanding Chylomicron Retention Disease Through Sar1b Gtpase Gene Disruption: Insight From Cell Culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(12):2243-51.

23. Lakoski SG, Xu F, Vega GL, Grundy SM, Chandalia M, Lam C, et al. Indices of cholesterol metabolism and relative responsiveness to ezetimibe and simvastatin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(2):800-9.
24. Lewis JA, Scott SA, Lavieri R, Buck JR, Selvy PE, Stoops SL, et al. Design and synthesis of isoform-selective phospholipase D (PLD) inhibitors. Part I: Impact of alternative halogenated privileged structures for PLD1 specificity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009;19(7):1916-20.
25. Lee SK, Bae GH, Kim YS, Kim HS, Lee M, Ghim J, et al. A phospholipase D2 inhibitor, CAY10594, ameliorates acetaminophen-induced acute liver injury by regulating the phosphorylated-GSK-3 β /JNK axis. *Sci Rep.* 2019;9(1):7242.
26. Levy E, Beaulieu JF, Spahis S. From Congenital Disorders of Fat Malabsorption to Understanding Intra-Enterocyte Mechanisms Behind Chylomicron Assembly and Secretion. *Front Physiol.* 2021;12:629222.
27. Levy E. Insights from human congenital disorders of intestinal lipid metabolism. *J Lipid Res.* 2015;56(5):945-62.
28. Auclair N, Patey N, Melbouci L, Ou Y, Magri-Tomaz L, Sane A, et al. Acylated Ghrelin and The Regulation of Lipid Metabolism in The Intestine. *Sci Rep.* 2019;9(1):17975.
29. Foisy-Sauve M, Ahmarani L, Delvin E, Sane AT, Spahis S, Levy E. Glycomacropptide Prevents Iron/Ascorbate-Induced Oxidative Stress, Inflammation and Insulin Sensitivity with an Impact on Lipoprotein Production in Intestinal Caco-2/15 Cells. *Nutrients.* 2020;12(4).
30. Marcil V, Delvin E, Seidman E, Poitras L, Zoltowska M, Garofalo C, et al. Modulation of lipid synthesis, apolipoprotein biogenesis, and lipoprotein assembly by butyrate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283(2):G340-6.
31. Courtois F, Suc I, Garofalo C, Ledoux M, Seidman E, Levy E. Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;279(1):G12-9.
32. Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol Prog.* 2006;22(1):186-98.

33. Pathre P, Shome K, Blumental-Perry A, Bielli A, Haney CJ, Alber S, et al. Activation of phospholipase D by the small GTPase Sar1p is required to support COPII assembly and ER export. *EMBO J.* 2003;22(16):4059-69.
34. Hodgkin MN, Masson MR, Powner D, Saqib KM, Ponting CP, Wakelam MJ. Phospholipase D regulation and localisation is dependent upon a phosphatidylinositol 4,5-biphosphate-specific PH domain. *Curr Biol.* 2000;10(1):43-6.
35. Brito de Souza L, Pinto da Silva LL, Jamur MC, Oliver C. Phospholipase D is involved in the formation of Golgi associated clathrin coated vesicles in human parotid duct cells. *PLoS One.* 2014;9(3):e91868.
36. Chen YG, Siddhanta A, Austin CD, Hammond SM, Sung TC, Frohman MA, et al. Phospholipase D stimulates release of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network. *J Cell Biol.* 1997;138(3):495-504.
37. Takaoka R, Kurosaki H, Nakao H, Ikeda K, Nakano M. Formation of asymmetric vesicles via phospholipase D-mediated transphosphatidylation. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2018;1860(2):245-9.
38. Ktistakis NT, Brown HA, Waters MG, Sternweis PC, Roth MG. Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. *J Cell Biol.* 1996;134(2):295-306.
39. Brown HA, Thomas PG, Lindsley CW. Targeting phospholipase D in cancer, infection and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(5):351-67.
40. Du G, Altshuller YM, Vitale N, Huang P, Chasserot-Golaz S, Morris AJ, et al. Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. *J Cell Biol.* 2003;162(2):305-15.
41. Jin S, Schatter B, Weichel O, Walev I, Ryu S, Klein J. Stability of phospholipase D in primary astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;297(3):545-51.
42. Zhao D, Frohman MA, Blusztajn JK. Generation of choline for acetylcholine synthesis by phospholipase D isoforms. *BMC Neurosci.* 2001;2:16.
43. Klein J. Functions and pathophysiological roles of phospholipase D in the brain. *J Neurochem.* 2005;94(6):1473-87.

44. Siddiqi SA, Gorelick FS, Mahan JT, Mansbach CM, 2nd. COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 2):415-27.
45. Siddiqi S, Mansbach CM, 2nd. Phosphorylation of Sar1b protein releases liver fatty acid-binding protein from multiprotein complex in intestinal cytosol enabling it to bind to endoplasmic reticulum (ER) and bud the pre-chylomicron transport vesicle. *J Biol Chem.* 2012;287(13):10178-88.
46. Mansbach CM, 2nd, Siddiqi S. Control of chylomicron export from the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016;310(9):G659-68.
47. Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, et al. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet.* 2003;34(1):29-31.
48. Roy CC, Levy E, Green PH, Sniderman A, Letarte J, Buts JP, et al. Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology.* 1987;92(2):390-9.
49. Auclair N, Sane AT, Ahmarani L, Patey N, Beaulieu JF, Peretti N, et al. Sar1b mutant mice recapitulate gastrointestinal abnormalities associated with chylomicron retention disease. *J Lipid Res.* 2021;62:100085.
50. Nakagawa H, Hazama K, Ishida K, Komori M, Nishimura K, Matsuo S. Inhibition of PLD1 activity causes ER stress via regulation of COPII vesicle formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;490(3):895-900.
51. Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y, Standaert ML, Quon MJ, Reed BC, et al. Glucose activates protein kinase C-zeta /lambda through proline-rich tyrosine kinase-2, extracellular signal-regulated kinase, and phospholipase D: a novel mechanism for activating glucose transporter translocation. *J Biol Chem.* 2001;276(38):35537-45.
52. Siddiqi SA, Mansbach CM, 2nd. PKC zeta-mediated phosphorylation controls budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 14):2327-38.
53. Altiok N, Changeux JP. Electrical activity regulates AChR gene expression via JNK, PKCzeta and Sp1 in skeletal chick muscle. *FEBS Lett.* 2001;487(3):333-8.

54. Stremmel W, Staffer S, Wannhoff A, Pathil A. The overall fatty acid absorption controlled by basolateral chylomicron excretion under regulation of p-JNK1. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862(9):917-28.
55. Oh CH, Park SY, Han JS. Phospholipase D1 is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression and production through S6K1/JNK/c-Jun pathway in Raw 264.7 cells. *Cytokine*. 2014;66(1):69-77.
56. Kim JH, Choi HJ, Oh CH, Oh JW, Han JS. PLD1 activation mediates Amb a 1-induced Th2-associated cytokine expression via the JNK/ATF-2 pathway in BEAS-2B cells. *Cell Immunol*. 2015;298(1-2):9-17.
57. Jang YH, Min do S. Nuclear localization of phospholipase D1 mediates the activation of nuclear protein kinase C(alpha) and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *J Biol Chem*. 2011;286(6):4680-9.
58. Lee CS, Kim IS, Park JB, Lee MN, Lee HY, Suh PG, et al. The phox homology domain of phospholipase D activates dynamin GTPase activity and accelerates EGFR endocytosis. *Nat Cell Biol*. 2006;8(5):477-84.
59. Hinshaw JE. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16:483-519.
60. Viparelli F, Cassese A, Doti N, Paturzo F, Marasco D, Dathan NA, et al. Targeting of PED/PEA-15 molecular interaction with phospholipase D1 enhances insulin sensitivity in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. 2008;283(31):21769-78.
61. Emoto M, Klarlund JK, Waters SB, Hu V, Buxton JM, Chawla A, et al. A role for phospholipase D in GLUT4 glucose transporter translocation. *J Biol Chem*. 2000;275(10):7144-51.
62. Klier M, Gorressen S, Urbahn MA, Barbosa D, Ouwens M, Fischer JW, et al. Enzymatic Activity Is Not Required for Phospholipase D Mediated TNF-alpha Regulation and Myocardial Healing. *Front Physiol*. 2018;9:1698.
63. Lee SK, Kim YS, Bae GH, Lee HY, Bae YS. VU0155069 inhibits inflammasome activation independent of phospholipase D1 activity. *Sci Rep*. 2019;9(1):14349.

64. Feingold KR, Grunfeld C. The Effect of Inflammation and Infection on Lipids and Lipoproteins. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. Endotext. South Dartmouth (MA)2000.
65. Kleme ML, Levy E. Cystic fibrosis-related oxidative stress and intestinal lipid disorders. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(7):614-31.
66. van Diepen JA, Berbee JF, Havekes LM, Rensen PC. Interactions between inflammation and lipid metabolism: relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2013;228(2):306-15.
67. Tsai YY, Rainey WE, Pan ZQ, Frohman MA, Choudhary V, Bollag WB. Phospholipase D activity underlies very-low-density lipoprotein (VLDL)-induced aldosterone production in adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology*. 2014;155(9):3550-60.
68. Wiggins D, Gibbons GF. The lipolysis/esterification cycle of hepatic triacylglycerol. Its role in the secretion of very-low-density lipoprotein and its response to hormones and sulphonylureas. *Biochem J*. 1992;284 (Pt 2):457-62.
69. Gibbons GF, Islam K, Pease RJ. Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1483(1):37-57.
70. Auclair N, Melbouci L, St-Pierre D, Levy E. Gastrointestinal factors regulating lipid droplet formation in the intestine. *Exp Cell Res*. 2018;363(1):1-14.
71. Marchesan D, Rutberg M, Andersson L, Asp L, Larsson T, Boren J, et al. A phospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiation-related protein, and vimentin in a cell-free system. *J Biol Chem*. 2003;278(29):27293-300.
72. Andersson L, Bostrom P, Ericson J, Rutberg M, Magnusson B, Marchesan D, et al. PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 11):2246-57.
73. Frohman MA. The phospholipase D superfamily as therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(3):137-44.
74. Morris AJ. Phospholipases D: making sense of redundancy and duplication. *Biosci Rep*. 2019;39(6).
75. Antonescu CN, Danuser G, Schmid SL. Phosphatidic acid plays a regulatory role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell*. 2010;21(16):2944-52.

76. Wang X, Devaiah SP, Zhang W, Welti R. Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid Res.* 2006;45(3):250-78.
77. Morita SY, Ueda K, Kitagawa S. Enzymatic measurement of phosphatidic acid in cultured cells. *J Lipid Res.* 2009;50(9):1945-52.
78. You JS, Lincoln HC, Kim CR, Frey JW, Goodman CA, Zhong XP, et al. The role of diacylglycerol kinase zeta and phosphatidic acid in the mechanical activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling and skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem.* 2014;289(3):1551-63.
79. Letteron P, Sutton A, Mansouri A, Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology.* 2003;38(1):133-40.
80. Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ.* 2006;30(4):145-51.
81. Bougarne N, Weyers B, Desmet SJ, Deckers J, Ray DW, Staels B, et al. Molecular Actions of PPARalpha in Lipid Metabolism and Inflammation. *Endocr Rev.* 2018;39(5):760-802.
82. Song S, Attia RR, Connaughton S, Niesen MI, Ness GC, Elam MB, et al. Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha) and PPAR gamma coactivator (PGC-1alpha) induce carnitine palmitoyltransferase IA (CPT-1A) via independent gene elements. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;325(1-2):54-63.
83. Vega RB, Huss JM, Kelly DP. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol.* 2000;20(5):1868-76.
84. Lee WH, Kim SG. AMPK-Dependent Metabolic Regulation by PPAR Agonists. *PPAR Res.* 2010;2010.
85. Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *Br J Cancer.* 2009;100(9):1369-72.
86. Mukhopadhyay S, Saqcena M, Chatterjee A, Garcia A, Frias MA, Foster DA. Reciprocal regulation of AMP-activated protein kinase and phospholipase D. *J Biol Chem.* 2015;290(11):6986-93.

87. Daval M, Foufelle F, Ferre P. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J Physiol*. 2006;574(Pt 1):55-62.
88. Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem*. 1997;246(2):259-73.
89. Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J*. 2000;346 Pt 3:659-69.
90. Lamming DW, Sabatini DM. A Central role for mTOR in lipid homeostasis. *Cell Metab*. 2013;18(4):465-9.
91. Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature*. 2007;450(7170):736-40.
92. Cai M, He J, Xiong J, Tay LW, Wang Z, Rog C, et al. Phospholipase D1-regulated autophagy supplies free fatty acids to counter nutrient stress in cancer cells. *Cell Death Dis*. 2016;7(11):e2448.
93. Tsukahara T, Tsukahara R, Fujiwara Y, Yue J, Cheng Y, Guo H, et al. Phospholipase D2-dependent inhibition of the nuclear hormone receptor PPARgamma by cyclic phosphatidic acid. *Mol Cell*. 2010;39(3):421-32.
94. Kang DW, Hwang WC, Noh YN, Che X, Lee SH, Jang Y, et al. Deletion of phospholipase D1 decreases bone mass and increases fat mass via modulation of Runx2, beta-catenin-osteoprotegerin, PPAR-gamma and C/EBPalpha signaling axis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2021;1867(5):166084.
95. Heger HW, Peter HW. Effects of phospholipids in the action of acetyl-CoA carboxylase from rat liver. *Z Naturforsch C Biosci*. 1977;32(1-2):97-100.
96. Murtazina DA, Andersson U, Hahn IS, Bjorkhem I, Ansari GA, Pikuleva IA. Phospholipids modify substrate binding and enzyme activity of human cytochrome P450 27A1. *J Lipid Res*. 2004;45(12):2345-53.

5.1.2 FIGURES

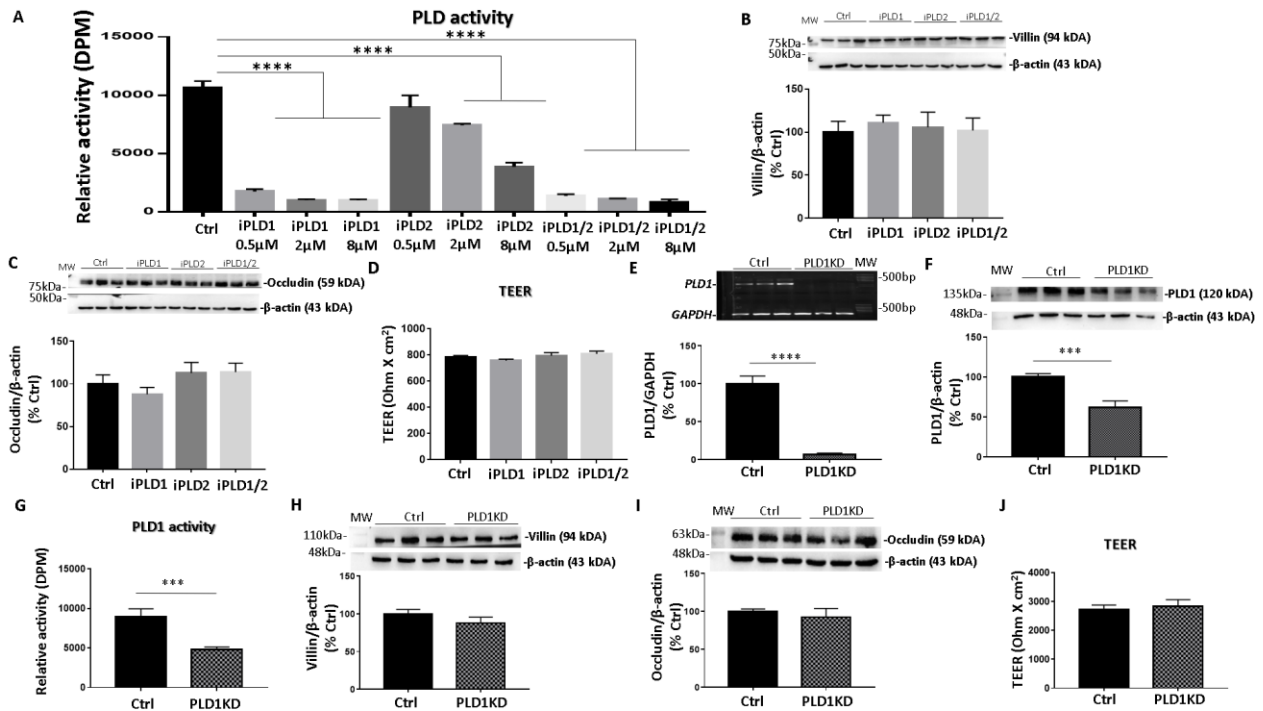


Figure 1 Characterization of Caco-2/15 cells in the presence of phospholipase D inhibitors or with the knockdown of phospholipase D1. Differentiated Caco-2/15 cells were pre-incubated overnight in serum-free EMEM. They were then cultured in the presence of 9 μCi [³H]-oleic acid for 24h with 100 nM phorbol 12-myristate 13-acetate alone to promote phospholipase D activity, or in the presence of various concentrations of PLD1 inhibitor (iPLD1), PLD2 inhibitor (iPLD2) or PLD1 and PLD2 inhibitors (iPLD1/2). The enzymatic activity was subsequently measured (**A**) as described in the Materials and Methods section. Cells integrity was analyzed by the Western blot of villin (**B**), occludin (**C**) and transepithelial resistance (TEER) (**D**). Concomitantly, Caco-2/15 cells were genetically engineered to deplete PLD1 (PLD1KD). To validate ablation efficiency, gene (**E**) and protein (**F**) expressions were determined by PCR and Western blot, respectively. As for the use of inhibitor, PLD activity (**G**), villin expression (**H**), occludin expression (**I**), and TEER (**J**) were analyzed for genetically altered cells. Western blot membranes were cut between molecular weights in order to specifically document the proteins of interest while being able to analyze multiple proteins on the same membrane. In this instance, β-actin from **Figure 1F** is the same as that of **Figure 7A**, while β-actin from **Figure 1I** is the same as that of **Figure 8E**. Data are expressed

as the mean \pm SEM of at least 2 independent experiments in triplicates. *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$ represent significant differences compared with their respective controls (Ctrl).

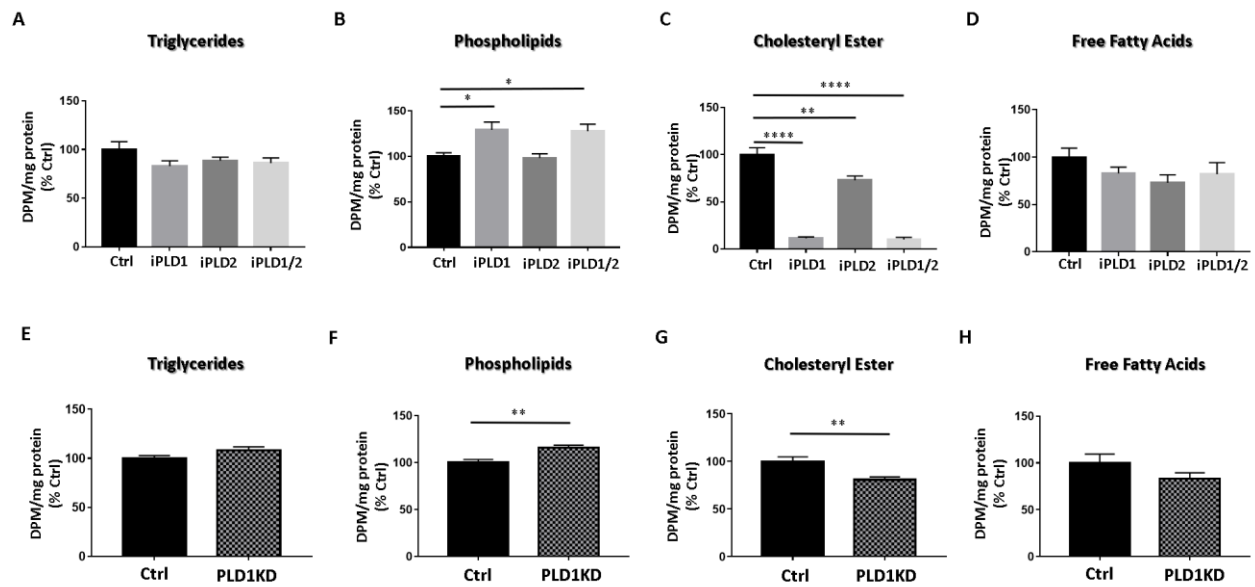


Figure 2 Effects of phospholipase D activity inhibition or phospholipase D1 knockdown on lipid accumulation in Caco-2/15 cells. Following an overnight pre-incubation in serum-free EMEM, Caco-2/15 cells were cultured with 1 μ M albumin-bound oleic acid and 0.9 μ Ci [3 H]-oleic acid for 24 hours in the presence or not of 8 μ M phospholipase D1 inhibitor (iPLD1), phospholipase D2 inhibitor (iPLD2) or phospholipase D1 and D2 inhibitors (iPLD1/2). Triglycerides (TG) (A), phospholipids (PL) (B), cholesteryl esters (CE) and free fatty acids (FFA) (D) from cell homogenates were extracted and measured as described in the Materials and Methods section. TG (E), PL (F), CE (G) and FFA (H) were also determined in PLD1-depleted (PLD1KD) cell homogenates. Results represent the means \pm SEM of at least 2 independent experiments in triplicates. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and **** $P < 0.0001$ represent significant differences compared with their respective controls (Ctrl).

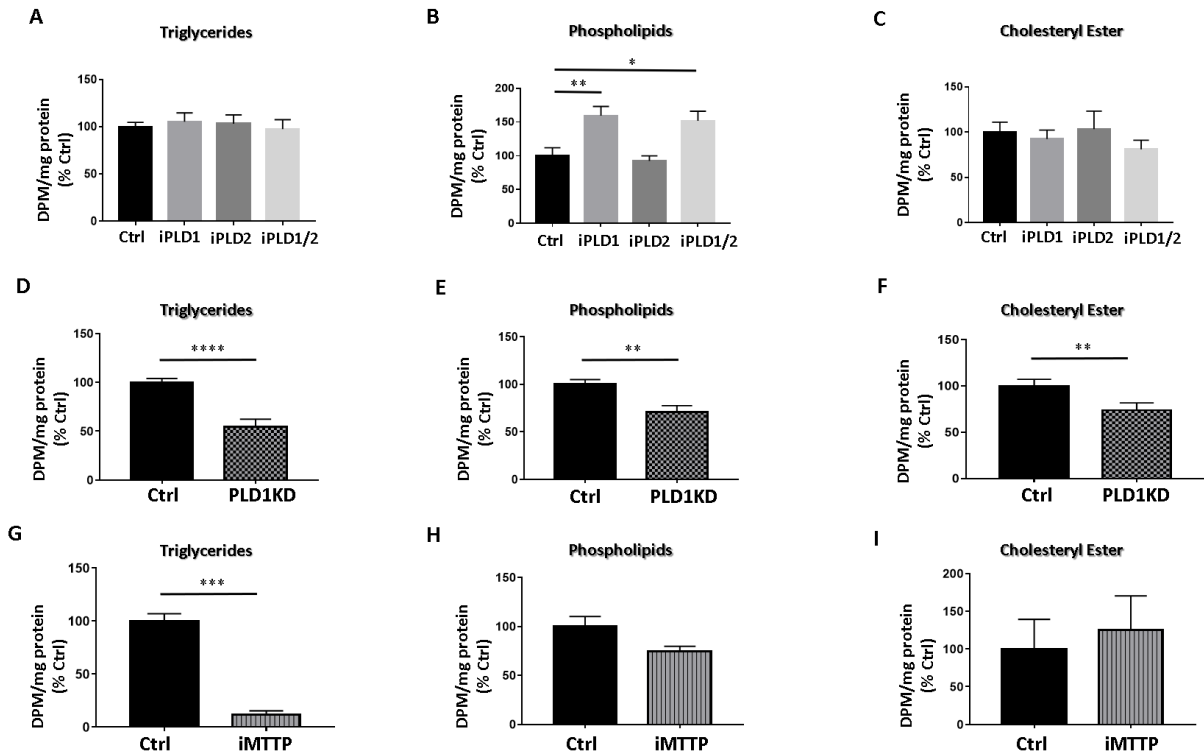


Figure 3 Impacts of phospholipase D and microsomal triglyceride transfer protein inhibition, and phospholipase D1 knockdown on Caco-2/15 cell lipid secretion. Differentiated Caco-2/15 cells were incubated with 1 μ M albumin-bound oleic and 0.9 μ Ci-[3 H] oleic acid for 24 hours in the presence of 8 μ M phospholipase D1 inhibitor (iPLD1), phospholipase D2 (iPLD2) inhibitor, phospholipase D1 and D2 (iPLD1/2) inhibitors or 100 pM microsomal triglyceride transfer protein inhibitor (iMTTP). Triglycerides (TG) (**A**, **G**), phospholipids (PL) (**B**, **H**), and cholesteryl esters (CE) (**C**, **I**) from the basolateral media were extracted and measured as described in the Materials and Methods section. TG (**D**), PL (**E**) and CE (**F**) were also examined in the basolateral media of PLD1-impaired cells (PLD1KD). Data represent the means \pm SEM of at least 2 independent experiments in triplicates. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001 and **** P <0.0001 represent significant differences compared with their respective controls (Ctrl).

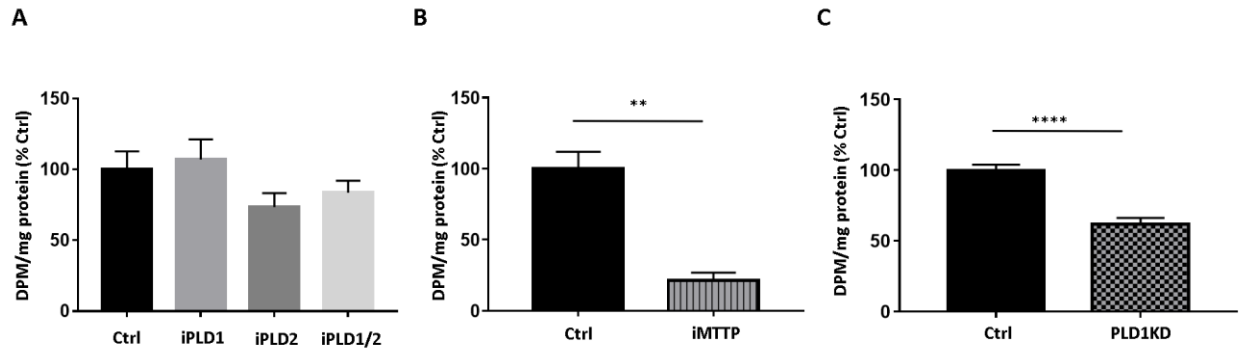


Figure 4 Effects of phospholipase D and microsomal triglyceride transfer protein inhibition, and phospholipase D1 knockdown on the triglyceride content of chylomicrons fractions from Caco-2/15 cells. Differentiated Caco-2/15 cells were incubated with 1 μ M albumin-bound oleic acid and 0.9 μ Ci [3 H]-oleic acid for 24 hours in the presence of 8 μ M phospholipase D1 inhibitor (iPLD1), phospholipase D2 inhibitor (iPLD2), phospholipase D1 and D2 inhibitors (iPLD1/2) or 100 pM microsomal triglyceride transfer protein inhibitor (iMTTP). The basolateral media was harvested and centrifuged to isolate the chylomicron (CM) fraction. Triglycerides (TG) from this fraction from both conditions respectively (**A**, **B**) were analyzed as described in the Materials and Methods section. The same procedure was also carried out for PLD1 knockdown (PLD1KD) cells (**C**). Data represent the means \pm SEM of at least 2 experiments in triplicates. ** $P < 0.01$ and **** $P < 0.0001$ represent significant differences compared with their respective controls (Ctrl).

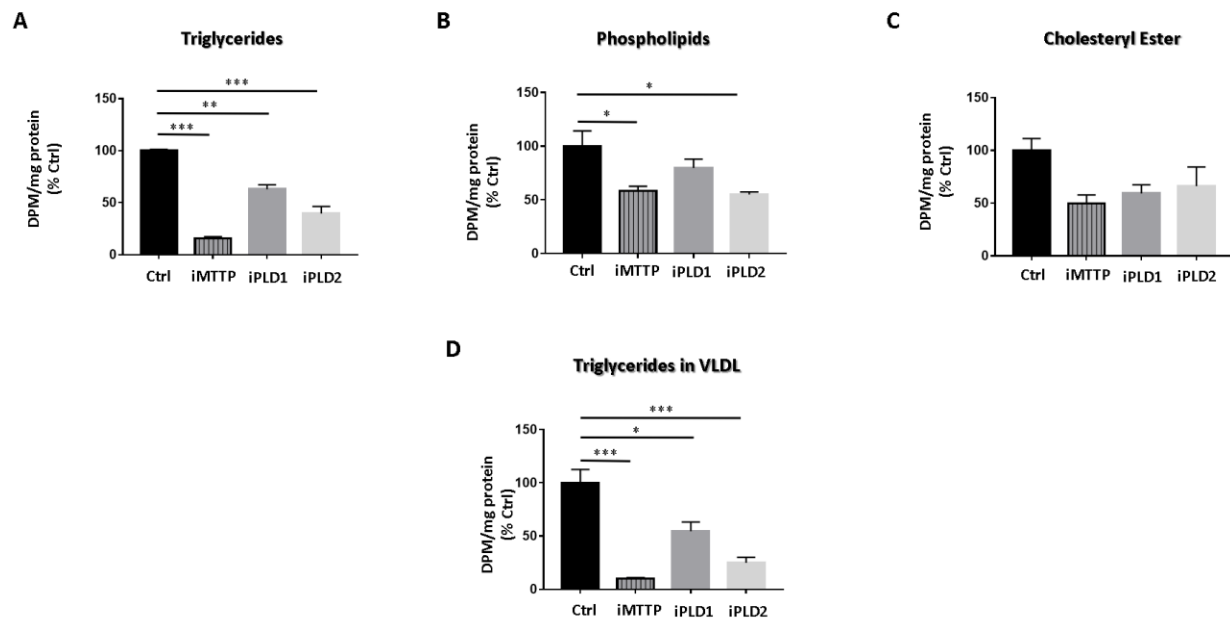


Figure 5 The inhibitory effects of microsomal triglyceride transfer protein and phospholipase D on lipid secretion by HepG2 cells. HepG2 cells were pre-incubated overnight in serum-free EMEM prior to treatment for 24 hours either with 100 pM microsomal triglyceride transfer protein inhibitor (iMTTP), 8 μ M phospholipase D1 inhibitor (iPLD1) or phospholipase D2 inhibitor (iPLD2) together with 1 μ M albumin-bound oleic acid and 0.9 μ Ci [3 H]-oleic acid. Triglycerides (TG) **(A)**, phospholipids (PL) **(B)**, and cholesteryl esters (CE) **(C)** from the media were isolated and measured as reported earlier. Very-low-density lipoprotein (VLDL) fraction was also isolated from the media and its TG content assessed **(D)**. Results are the means \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ represent significant differences compared with their respective controls (Ctrl).

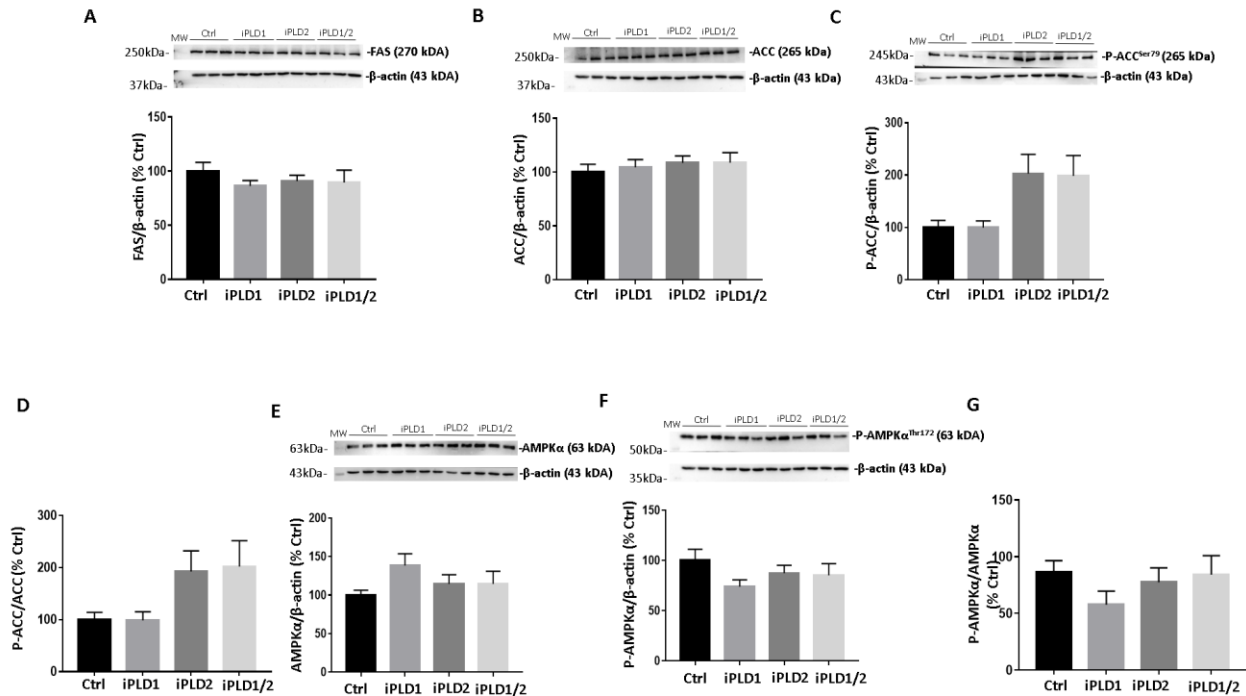


Figure 6 Consequences of phospholipase D inhibition on the expression of lipogenesis markers in Caco-2/15 cells. Cells were pre-incubated overnight in serum-free EMEM prior to exposition for 24 hours with or without 8 μ M phospholipase D1 inhibitor (iPLD1), phospholipase D2 inhibitor (iPLD2) or phospholipase D1 and D2 inhibitors (iPLD1/2), together with 1 μ M albumin-bound oleic acid. Protein levels of AMPK (A), P-AMPK (B), the ratio P-AMPK/AMPK (C), FAS (D), ACC (E), P-ACC (F) and the ratio P-ACC/ACC (G) were determined by Western blot. Western blot membranes were cut between molecular weights in order to specifically document the proteins of interest while being able to analyze multiple proteins on the same membrane. In this instance, β -actin from **Figure 6D** is the same as that in **Figure 8A**, while β -actin from **Figure 6E** is the same as that in **Figure 6B**. Results are the means \pm SEM of at least 2 independent experiments in triplicates. * $P < 0.05$ represent significant differences compared with their respective controls (Ctrl).

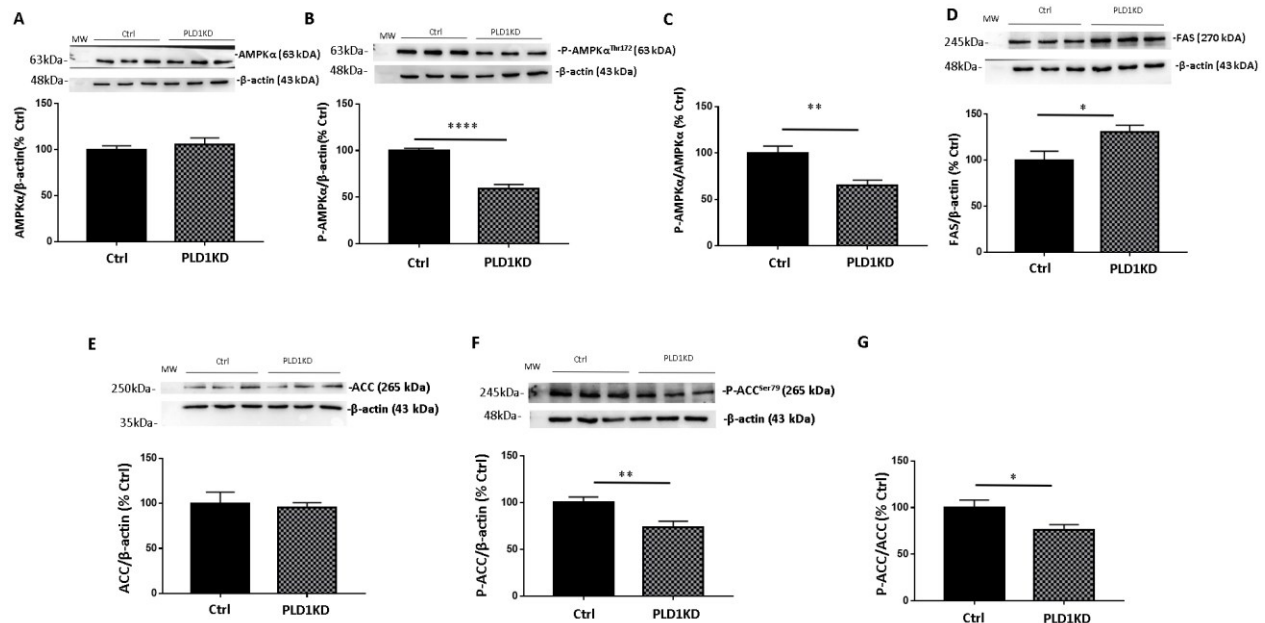


Figure 7 Implications of phospholipase D1 knockdown on the expression of lipogenesis markers in Caco-2/15 cells. PLD1 knockdown cells (PLD1KD) were pre-incubated overnight in serum-free EMEM prior to exposition for 24 hours with 1 μ M albumin-bound oleic acid. Protein levels of AMPK (A), P-AMPK (B), the ratio P-AMPK/AMPK (C), FAS (D), ACC (E), P-ACC (F) and the ratio P-ACC/ACC (G) were determined. Results are the means \pm SEM of at least 2 independent experiments in triplicates. * p <0.05; ** p <0.01; **** p <0.0001 represent significant differences compared with their respective controls (Ctrl). Membranes were cut between molecular weights to see only the protein of interest and to be able to analyze multiple proteins on the same membrane.

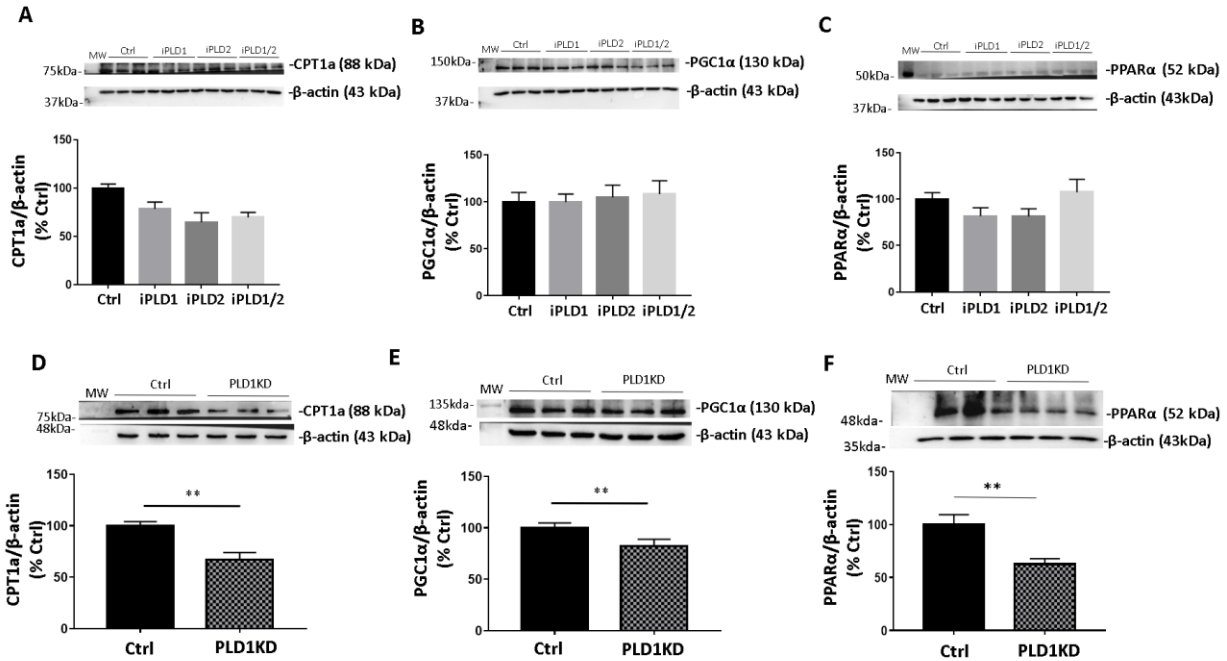


Figure 8 Effects of phospholipase D activity impairment and phospholipase D1 depletion on the expression of β -oxidation key modulators. Cells were pre-incubated overnight in serum-free EMEM prior to exposition for 24 hours either with or without 8 μ M phospholipase D1 inhibitor (iPLD1), phospholipase D2 inhibitor (iPLD2) and phospholipase D1 and D2 inhibitors (iPLD1/2), together with 1 μ M albumin-bound oleic acid. Protein levels of CPT1a (**A**), PGC1 α (**B**), PPAR α (**C**) were determined by Western blot in cells treated with PLD inhibitors as well as in PLD1-disrupted cells (PLD1KD) for CPT1a (**D**), PGC1 α (**E**), PPAR α (**F**). Western blot membranes were cut between molecular weights in order to specifically document the proteins of interest while being able to analyze multiple proteins on the same membrane. In this instance, β -actin from **Figure 11** is the same as that of **Figure 8E**, while β -actin from **Figure 8A** is the same as that of **Figure 6D**. Results are the means \pm SEM of at least 2 independent experiments in triplicates. ** $P < 0.01$ represent significant differences compared with their respective controls (Ctrl).

5.2 Article 2

Sar1b mutant mice recapitulate gastrointestinal abnormalities associated with chylomicron retention disease

Nickolas Auclair, Alain sané, Léna Ahmarani, Nathalie Patey, Jean-François Beaulieu, Noel Peretti, Schohraya Spahis et Emile Levy

Article publié dans la revue *Journal of Lipid Research* en mai 2021

Cet article répond aux objectifs spécifiques 2.1, 2.2, 2.3 et 2.4

Contributions :

Nickolas Auclair : L'étudiant a réalisé et planifié les expériences, compilé les données obtenues et les a analysées, effectué les analyses statistiques et rédigé l'article

Alain Sané et Léna Ahmarani : Ont aidé à l'obtention de certains des résultats, à la rédaction de l'article et à sa révision avant soumission.

Nathalie Patey : A pris des images microscopiques des tissus et a effectué des analyses pathologiques.

Jean-François Beaulieu et Noel Peretti : Ont révisé l'article

Schohraya Spahis : A révisé l'article et l'a préparé pour sa soumission à la revue.

Emile Levy : A dirigé l'étudiant dans la réalisation et la planification des expériences, a aidé à la rédaction de l'article et l'a corrigé et révisé avant de le soumettre au journal.

5.2.1 MAIN TEXT OF THE ARTICLE

SAR1B MUTANT MICE RECAPITULATE GASTROINTESTINAL ABNORMALITIES ASSOCIATED WITH CHYLOMICRON RETENTION DISEASE

Nickolas Auclair^{1,2} Alain T. Sané¹, Lena Ahmarani^{1,3}, Nathalie Patey^{1,4}, Jean-François Beaulieu⁵, Noel Peretti⁶ Schohraya Spahis^{1,3} and Emile Levy^{1,2,3*}

¹Research Center, CHU Ste-Justine, Departments of ²Pharmacology & Physiology, ³Nutrition and ⁴Pathology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5 ⁴Laboratory of Intestinal Physiopathology, Department of Immunology and Cell Biology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada. ⁶Department of Pediatric Gastroenterology-Hepatology and Nutrition, Laboratory INSERM 1060 Cardiovascular Metabolism Endocrinology and Nutrition CarMEN, Lyon, France

Running Title: *Sar1b* defects result in abnormal lipid absorption and metabolism

Funding : This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research [Grant number PJT 153113] and the J. A. DeSève Research Chair in Nutrition.

Address for correspondence:

*Dr. Emile Levy

GI-Nutrition Unit

CHU Sainte-Justine

3175 Ste-Catherine Road #4.17.005

Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5

Tel.: (514) 345-7783

Abbreviations

ACADL (Acyl-CoA dehydrogenase and long chain), **ACC** (Acetyl CoA carboxylase), **AMPK** (AMP-Activated protein kinase), **CHOL** (Cholesterol), **CM** (Chylomicron), **COPII** (Coat protein complex II), **CPT1** (Carnitine palmitoyl transferase), **CRD** (Chylomicron retention disease), **MTTP** (Microsomal triglyceride transfer protein), **pACC** (Phospho ACC), **pAMPK** (Phospho AMPK), **PGC-1 α** (Peroxisome proliferator activated receptor coactivator 1 α).

ABSTRACT

Background: Chylomicron retention disease (CRD) is an autosomal recessive disorder due to biallelic *Sar1b* mutations, leading to defects in intracellular chylomicron (CM) trafficking and secretion. To date, the direct cause-effect relationship has not been established, but genetically modified animal models provide an opportunity to elucidate and disclose unrecognized aspects.

Objective/Design: To examine the physiological role and molecular mechanisms of *Sar1b* in mice carrying either a targeted human *Sar1b* deletion or mutation using the CRISPR Cas9 system.

Results: Deletion/mutation of *Sar1b* in mice resulted in late-gestation lethality of homozygous embryos. Moreover, compared to WT mice, heterozygotes for a single disrupted *Sar1b* allele displayed lower plasma levels of triglycerides, cholesterol and HDL-cholesterol, along with reduced CM secretion following a gastric lipid gavage. Similarly, a decreased expression was observed in apolipoprotein B and microsomal triglyceride transfer protein in consistency with mucosal lipid accumulation. The inefficient fat absorption in heterozygotes was confirmed by an increase in fecal lipids. Furthermore, genetically modified *Sar1b* affected intestinal lipid homeostasis as reflected by enhanced fatty acid β -oxidation and diminished lipogenesis through modulation of powerful transcription factors. **Conclusions:** This is the first reported mammalian animal model with human *Sar1b*-genetic defects, which reproduces some of the characteristic CRD features and provides a direct cause-effect demonstration.

Keywords:

Sar1b gene defects, embryonic lethality, chylomicron/dietary fat, lipid metabolism.

1. INTRODUCTION

Chylomicron retention disease (CRD) (OMIM # 246700) is an integral part of congenital disorders of intestinal lipid transport (1). It is a rare, autosomal recessive disorder, featured with failure to thrive in infancy, fat malabsorption, chronic diarrhea, loose greasy stools, frequent vomiting and abdominal swelling. A few CRD patients sporadically exhibit hepatomegaly with a moderate degree of macrovesicular steatosis and cytolysis (2-5). Ataxia, proprioceptive abnormalities, sensory neuropathy, decreased bone density, cardiomyopathy, muscular pain, and ophthalmological manifestations are additional complications observed in some CRD subjects.

Biallelic mutations in the *SARA2* or *Sar1b* gene characterize CRD patients (6, 7). The gene encodes a guanosine triphosphatase (*Sar1b*), an essential factor of the coat protein complex II (COPII), ensuring vesicular traffic from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi apparatus. As reported by elegant studies, the *Sar1b* enzyme recruits the COPII complex heterodimers (i.e. Sec23/24 and Sec13/31) to the ER membrane, to form pre-chylomicron (CM) transport vesicles (8-11). The latter efficiently transpose their pre-CM cargo to the Golgi, before being targeted to the basolateral site of the enterocyte in order to enter blood via the lymphatic duct. Therefore, genetic *Sar1b* defects are expected to result in CM secretion failure.

Approximately 60 patients with CRD have so far been described with frameshift, splice site and missense mutations affecting the *Sar1b* gene, located on chromosome 5q31.1. The pioneering exploration of genetic defects in eight families disclosed three frameshift (75-76 delTG, 555-558 dupTTAC, 349-1 G>C) and five missense mutations (109 G>A, 409 G>A, 537 T>A, 536 G>T, 542 T>C) (6). The second exploration of the genetic *Sar1b* abnormalities from 8 families identified 3 new molecular aberrations: a stop codon mutation (364 G>T), a 5946 bp deletion (total exon 2) and a missense mutation (554 G>T) (12). Subsequently, a stop codon mutation (G19T) was brought out in exon 7 (13) while two additional mutations were detected in exon 2 (G11D) and exon 4 (D75G) (14). More recently, a novel homozygous deletion at position 142 (c.142delG) gave rise to a frameshift-derived premature stop codon, 17 amino acids further on (p.Asp48ThrfsX17), thereby resulting in a truncated protein (15). Further studies on Tunisian CRD children reported a novel nucleotide transition in *Sar1b* exon 4 (c.184G>A), resulting in a non-conservative amino

acid substitution (p.Glu62Lys) (16). D137N was the most prevalent *Sar1b* gene mutation found in French Canadians, which resides in the highly conserved guanine-nucleotide binding motifs (G'xG³⁷KT³⁹ and NKxD¹³⁷) of the small GTPases (17). The D137N mutation breaks the guanine H-bond, thereby abolishing the guanine recognition site and damaging the protein (18). Apparently, truncated and non-functional proteins are produced by nonsense mutations and the whole deletion of exon 2, which are predicted to modify the affinity of Sar1b protein for GDP and GTP, thereby affecting its interaction with the endoplasmic reticulum and COPII machinery components.

Although CM secretion was significantly decreased in CRD patients, recent studies in genetically modified *Sar1b* in intestinal Caco-2/15 cells emphasized the need to double knockout (KO) the *Sar1b* and its *Sar1a* paralog in order to abolish CM secretion (19). Whether the discrepancy is due to the colonic tissue and cancer origin of the parental Caco-2 cells is completely unknown. In McArdle-RH7777 hepatocytes, *Sar1b* expression increased apolipoprotein (Apo) B-containing lipoproteins, while his *Sar1a* paralog antagonized *Sar1b*'s Apo B-lipoprotein secretion (20). Interestingly, in zebrafish, the tissue distribution of *Sar1b* and *Sar1a* was different during development while *Sar1b* deficient embryos accumulate dietary lipids in enterocytes and displayed abnormal formation of craniofacial cartilage and absence of neuroD-positive neurons in embryo brain (21). Quite recently, *Sar1b* has been reported to be crucial to radial migration and axon morphogenesis of the cortical neurons (22).

Although the above studies contributed to the advancement of our scientific knowledge about the *Sar1b* physiological functions, additional proof-of-principle experiments are highly needed to scrutinize the specific role of *Sar1b*. In particular, greater effort is needed to understand the mechanisms of *Sar1b* not only on CM assembly and delivery failure, but also on typical CRD hypocholesterolaemia and *HDL-C* decrease (2, 12, 23, 24). Moreover, whether human *Sar1b* mutations and deletions differently affect intracellular lipid homeostasis [e.g. fatty acid (FA) β -oxidation and lipogenesis]) remain to be explored. Finally, additional puzzling issues remain unanswered, and among them: Is it possible to engineer mice with full *Sar1b* deficiency even though past studies observed important abnormal brain development in congenital

malabsorption syndromes or does the KO lead to lethal embryos? Are half-normal levels of the *Sar1b* mRNA and protein insufficient to maintain normal phenotype? Does the intestine and liver differ in their lipid metabolism in response to defects in *Sar1b*? To gain insight into most of the above issues, we attempted to generate a CRD mouse model using the CRISPR-Cas9 editing system by separately introducing a deletion and a point mutation identified in patients.

2. MATERIALS AND METHODS

Generation of *Sar1b* KO (*Sar1b*^{del/+}) and mutated (*Sar1b*^{mut/+}) mice

Heterozygous male and female *Sar1b*^{del/+} and *Sar1b*^{mut/+} mice were obtained with the CRISPR-Cas9 technology at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), as broadly described in **the supplementary file**. In particular, CRISPR-Cas9 editing technology was used to (i) generate a deletion of 545 base pairs removing *Sar1b* exon 2 on chromosome 11 (GRCm38/mm10, chr11:51, 777, 181-51, 777, 725 Del) (*Sar1b*^{del/+}), or (ii) to substitute G to A on chromosome 11 (GRCm38/mm10, chr11: 51, 789, 257 G>A). This mutation result in the substitution of an aspartic acid (D) to an asparagine (N) amino acid at position 137 (D137N) (*Sar1b*^{mut/+}). To this end, two synonymous mutations were introduced in the mouse generation process: 1) a C to T substitution at position 51(GRCm38/mm10, chr11: 51, 789, 256 C>T) was incorporated to facilitate the genotyping procedure (introduction of a *MseI* restriction site), and 2) a C to G substitution at position 51 (GRCm38/mm10, chr11: 51, 789, 271 C>G) was introduced to mutate the PAM site and avoid repair template cleavage by the cas9 endonuclease. The heterozygous mice with similar mutation or deletion were intercrossed to produce the homozygous mice. Genetically modified mice were housed individually and fed *ad libitum* with a standard chow diet. Body weight and food intake were measured every day. All experimental procedures performed in the study were approved by the Institutional Animal Care Committee of Ste-Justine Hospital.

Determination of postprandial chylomicron secretion

Following a 6-hour fast, blood was taken from the tail vein. Immediately after this procedure, male and female mice received a 200 μ L oral gavage of olive oil or 4 μ Ci [¹⁴C]-triolein. Ten minutes later, animals were injected with an intraperitoneal dose (1 mg/kg) of Pluronic F-127 (10% in saline) to inhibit lipoprotein lipase activity and prevent CM catabolism. Blood (50 μ L) was transferred into EDTA-containing tubes at times 60, 90 and 120 minutes after olive oil gavage. Mice were sacrificed, and blood was collected. Plasma and isolated tissues were flash-frozen and kept at -80°C for further analyses.

Chylomicron isolation

CMs were separated by ultracentrifugation using an MLA-130 rotor as described previously (25). The upper fraction was collected and its lipid moieties, triglycerides (TG) and cholesterol (CHOL), were determined by commercial kits (Wako Diagnostics, USA). Scintillation liquid was added to 200 μ L of each fraction moiety to determine the radioactivity derived from the labelled [14 C]-triolein, using a β counter.

Biochemical analysis

As above, commercial kits were used to analyze insulin (Merckodia), TG and CHOL in plasma. *HDL-C* was analyzed by precipitation with polyethylene glycol 6000 as previously described with some modifications (26). Briefly, plasma (10 μ L) was mixed with polyethylene glycol at a ratio 1:1 and allowed to rest at room temperature for 20 min. Then after, samples were centrifuged at 4600 rpm for 40 min, the upper phase was harvested and CHOL was measured.

Lipid analysis

Approximately 0.1 g of proximal intestine and liver tissues were homogenized in 1 mL of EDTA buffer, and lipids were extracted in a 2:1 chloroform/methanol solution overnight at 4 $^{\circ}$ C. After evaporation of the lower phase, lipids were resuspended in 400 μ L of H $_2$ O, and TG and CHOL were determined. For fecal lipids, feces were collected on isopad over a 24-hour period. Feces (50 mg) were dried at 70 $^{\circ}$ C and extracted with chloroform/methanol before lipid determination as described above.

Liver and intestinal histology

Tissues were fixed in formalin (10%) and embedded in paraffin. Thereafter, they were processed for light microscopy with hematoxylin-eosin. Images of stained tissues were captured by a Zeiss Imager A1. Measurements were taken with the axiovision software.

Western blot analysis

Intestinal and liver tissues were prepared for Western blotting as described previously (25). Proteins were separated on 8% SDS-PAGE gel and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Nonspecific binding sites of the membranes were blocked using defatted milk proteins, followed by the addition of primary antibodies directed against acetyl CoA carboxylase (ACC); carnitine

palmitoyl transferase a (CPT1a); fatty acid synthase (FAS); AMP-Activated protein kinase α (AMPK α) and phosphoAMPK^{Thr172} (pAMPK α) (1/1000, Cell signaling); GAPDH; ABCA1; peroxisome proliferator activated receptor coactivator 1 α (PGC-1 α) (1/1000, Abcam); Apo A1 (1/5000, Abcam); microsomal triglyceride transport protein (MTTP); acyl-CoA dehydrogenase long chain (ACADL) (1/1000, Thermo Fisher Scientific); PPAR- α (1/1000, Cayman Chemical); phospho acetyl CoA carboxylase (pACC) (1/1000, Millipore); Apo B (1/1000, Sigma-Aldrich); and β -actin (1/250000, Sigma-Aldrich). Bands were captured with the Chemidoc Imaging System and analyzed with the ImageLab software (Biorad). For every protein of interest, β -actin or GAPDH was used for sample normalization.

RNA extraction and RT-qPCR analysis

RNAs from flash frozen jejunum and liver were extracted using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Ambion). RNA concentration and purity were measured using a Biodrop spectrophotometer (Montreal Biotech Inc.) and the ratio absorbance at 260 and 280 nm was used to determine purity as described previously (19, 27). The thermal profile included an initial denaturation step at 95°C for 30 s, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 3 s, and annealing and extension at 60°C for 30 s. Amplified genes were quantified by fluorescence using the PowerUp SYBR Green Master Mix (Life Technologies) Levels of expression of target-gene mRNAs were calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (19). The list of all primers used is found in **the supplementary file**.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SEM. Since each group of genetically modified mice were compared to the WT group, data were evaluated by an unpaired sample two- parametric *t*-test. GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, CA) was used for all statistical analysis. Significance is considered at $P < 0.05$.

3. RESULTS

Generation of *Sar1b*^{del/+} and *Sar1b*^{mut/+} mice

To generate mice with deleted or mutated *Sar1b*, a specific region of *Sar1b* was targeted as shown in **Figures 1A** and **1D**, respectively. Genotyping of postnatal offspring from both altered *Sar1b* heterozygous intercrosses revealed the total absence of viable mouse homozygous for the *Sar1b* for both alterations, indicating embryonic lethality during gestation (**Table 1**). In order to exclude possible susceptibility due to genetic C57BL/6 background, we examined whether the 129/sv mouse strain was more amenable to produce live *Sar1b*^{-/-}, since, in some circumstances, this strain has been found to be more resistant to several diseases (28-30). There again, no live and dead homozygotes were observed.

Figures 1B and **C** show typical electrophoretic band profile after genotyping of offspring from *Sar1b*^{del/+}. To validate the hypothesis that *Sar1b* deletion and mutation produce a lethal phenotype in homozygous mice, the cages of pregnant animals were inspected daily, and any dead pups were removed. The dead pups were genotyped, and they were all found homozygous for the deletion, indicating late-gestation lethality and the inability of producing homozygous viable mice. As to the point mutation model, there was no living or dead pup with the mutation on both alleles, suggesting early embryonic lethality. On the other hand, screening the intestine and liver of living adult mice revealed half level of *Sar1b* gene and protein expression in heterozygous mice compared to WT mice (**Figure 2A-2D**).

Anthropometric and biochemical analyses of *Sar1b*^{del/+} and *Sar1b*^{mut/+} mice

No marked changes were noted in energy intake, body weight and weight of various tissues (**Figure S1**) as well as the plasma glucose and insulin concentrations (**Figures 3A** and **3B**) in genetically modified male and female *Sar1b* mice. However, plasma lipid profile analysis showed a significant drop of TG, CHOL and HDL-C (**Figures 3C-E**) levels with an increase in non-HDL-C (**Figure 3F**).

In vivo intestinal fat absorption as a function of *Sar1b* heterozygosity

To examine the effects of genetic *Sar1b* modifications on lipid absorption, plasma TG concentrations were measured at different time points after the olive oil intragastric administration (**Figures 4A and 4B**). Compared to controls, *Sar1b*^{mut/+} and *Sar1b*^{del/+} mice had a reduced plasma TG concentration, and the severity of fat malabsorption was more striking in *Sar1b*^{mut/+} mice (**Figure 4C**). A similar trend was noticed with [¹⁴C]-triolein gavage, thereby confirming defective intestinal TG transport (**Figure 4D**).

Furthermore, the quantification of lipid content in CM revealed lower TG (**Figure 4E**) and total CHOL (**Figure 4F**) content, indicating depressed CM output in genetically modified *Sar1b* mice. A similar modulation was observed with [¹⁴C]-triolein treatment (**Figure 4G**), suggesting the inability of *Sar1b*^{mut/+} and *Sar1b*^{del/+} mice to export alimentary lipids in the form of CM. Finally, we examined the intestinal fat malabsorption by the estimation of lipids following stool collection. A significant increase in fecal TG was detected in *Sar1b*^{mut/+} compared to control mice (**Figure 4H**). Nevertheless, only a marginal fat augmentation was noted in *Sar1b*^{del/+} mice. Therefore, there is a consistent evidence that *Sar1b* genetic modification results in defects in intestinal lipid transport due to inefficient CM formation, particularly in *Sar1b*^{mut/+} mice.

Genetic alteration of *Sar1b* in mice impairs key players of intestinal CM assembly and HDL biosynthesis

Findings above pointed out perturbations in CM output as a result of *Sar1b* disruption. The next logical step was to determine whether *Sar1b* defects had an impact on critical proteins for CM assembly (Apo B and MTP) as well as HDL biosynthesis (Apo A-I and ABCA1). We therefore analyzed their protein and gene expressions in intestinal and liver tissues. **Figure 5** documents a significant reduction of Apo B and MTP (**Figure 5A**) with no apparent differences in Apo A-I and ABCA1 (**Figure 5B**) protein expression in the small intestine of *Sar1b*^{mut/+} and *Sar1b*^{del/+} mice. In contrast, the gene expression displayed a significant drop of Apo A-I and ABCA1 without changes in Apo B and MTP mRNA levels (**Figure 5C**). Moreover, analyzes of liver tissues of *Sar1b*^{mut/+} and *Sar1b*^{del/+} mice showed a significant decrease in ABCA1 protein mass (**Figure 5E**) and an increase in Apo B and ABCA1 mRNA expression (**Figure 5F**) without modulation of other key proteins.

Intestinal and liver lipid content following fat load

Since genetic *Sar1b* modifications affected intestinal fat absorption through abnormal CM output, lipid retention was assessed in the small intestine and liver. An increase was observed in TG (**Figure 6A**), total CHOL (**Figure 6B**) and radioactivity (**Figure 6C**) in the gut of *Sar1b^{mut/+}* and *Sar1b^{del/+}* mice with a more marked difference in *Sar1b^{mut/+}* mice. As for the liver, only *Sar1b^{mut/+}* mice showed a total CHOL accretion (**Figures 6D and 6E**). The biochemical TG results were corroborated by histopathological hematoxylin-eosin staining in the intestine (**Figures 6F-6H**) and the liver (**Figures 6I-6K**).

***Sar1b* heterozygosity altered intestinal but not liver lipid metabolism**

CRD is highly characterized by impaired intestinal fat transport due to the limitation of CM assembly and secretion, and we hypothesized that *Sar1b* deficiency may lead to disturbed lipid homeostasis in the gastrointestinal tract. To this end, the protein and gene expressions of key factors in lipid metabolism were analyzed. Our data revealed a plausible enhancement of FA β -oxidation in the intestine via the upregulation of the mitochondrial enzymes ACADL and CPT1a (**Figure 7A**) as well as the protein mass of the powerful transcription factors PPAR- α and PGC-1 α , responsible for the modulation of FA homeostasis. (**Figure 7A**). On the other hand, AMPK α , pAMPK α and pACC (**Figure 7B**) were conversely modulated in the small intestine of *Sar1b^{mut/+}* and *Sar1b^{del/+}* mice. This was supported by the diminution of *SREBP-1* gene expression in the intestine of genetically modified mice (**Figure 7C**), pointing out a decline in the lipogenesis process. With respect to the liver, no drastic alterations were noticed either in the protein or mRNA levels of both genetic mouse models (**Figures 7D-7F**).

4. DISCUSSION

As remarkable progress in genetic manipulation allows the generation of powerful animal models for understanding the pathogenesis and modelling of human disease, we followed the same experimental strategy to probe and decipher various aspects of CRD. Using the genome-editing CRISPR-Cas9 approach, we generated two mutant mice, one with the deletion and the other with a point mutation of the *Sar1b* gene. Our first finding was that genetic modification of mouse *Sar1b* results in embryonic lethality of homozygotes, pointing out the essential role of *Sar1b* in mouse embryonic development. In a second step, we demonstrated that disrupting only one *Sar1b* allele causes significant lipid intestinal malabsorption because of CM secretion failure, which establishes the cause-effect association of *Sar1b* defects and CRD. Subsequently, viable heterozygotes exhibit a decrease in the intestinal protein expression of Apo B and MTTP, presumably contributing to the decrease of CM output. Further experiments showed perturbations of lipid homeostasis (e.g. high β -FA oxidation and low lipogenesis) as a consequence of *Sar1b* abnormalities. Besides, defective *Sar1b* lowers HDL-C biogenesis by affecting mRNA expression of Apo A-I and ABCA1 in the intestine. Another highlight of the present study includes the little effect of *Sar1b* alterations on the liver (compared to the intestine),

During our analysis of the genotype of 21-day-old mice from heterozygote crosses, we noted a total absence of homozygous mice, which is not consistent with the 1:2:1 Mendelian frequency ratios of WT: heterozygotes: homozygotes. The reason for the deficiency of homozygotes is certainly related to embryonic lethality as was the case for homozygous mouse models of Apo B and MTTP mutations (31, 32). Such studies have pointed to the possibility of deficient yolk sac lipoprotein production, which may reduce the delivery of lipid nutrients to the developing embryo at a critical developmental period. Still others cited neurodevelopmental abnormalities, which are characterized by exencephalus and hydrocephalus (32, 33) or defects in erythropoiesis, known to lead to mid gestational embryonic death (34). But regardless of the etiopathogenesis, homozygous mouse models of hypobetalipoproteinemia, abetalipoproteinemia and CRD share embryonic lethality, which emphasizes the critical importance of their respective proteins Apo B, MTTP and *Sar1b*. Whether homozygous *Sar1b*^{-/-} mice are not viable because of a defect in

embryonic brain development deserves complementary studies. It has already been known that *Sar1b* is abundant in the brain and its deletion in zebrafish embryos cause absence of neuroD-positive neurons (21). On the other hand, *Sar1b* knockdown in the developing cerebral cortex impedes the radial migration and axon elongation of the cortical neurons in mice (22). It remains important to determine the contribution not only of intestinal lipid malabsorption to neuronal disorders, and vice versa, but also the influence of each on embryogenesis processes. Efforts are also required to understand the reasons why mice fail to give birth to homozygotes with defective *Sar1b* when humans have this ability. Definitely, further research is warranted to investigate the gestational age and mechanisms of embryonic lethality in our two *Sar1b*^{mut/+} and *Sar1b*^{del/+} mice.

The difference in lethality between mice and humans is intriguing. This divergence has already been observed in other congenital intestinal fat malabsorption such as hypobetalipoproteinemia and abetalipoproteinemia (31, 35). Furthermore, the species heterogeneity was as well noted in a plethora of additional diseases (36-38). Although the causes are still poorly understood, plausible explanations may be proposed. First of all, it has been reported that human and mice exhibit considerable differences in development and morphology (e.g. gastrulation and neurulation) (39, 40). Even global expression profiling in physiological and pathophysiological conditions indicated changes in genetic programs behind significant human–mouse differences in embryogenesis (39).

Another meaningful point is the important differences in the distinctive role of the yolk sac between mice and human. In mice, the secretion of Apo B-containing lipoproteins from the yolk sac is essential for the survival of the embryo (41), since the deletion of *ApoB* and *MTTP* causes embryo death and high accumulation of lipids in the yolk sac (31, 35), which is not the case for humans. Even though the placenta can secrete Apo B-lipoproteins and the yolk sac do express Apo B (42, 43), the absence of lipoprotein formation is not lethal in humans since TGs are available to the fetus from other sources (44). In fact, the yolk sac in humans, compared to mice, is a rudimentary organ that rapidly loses its nutritional functions in the early embryogenesis, but FAs bound to albumin can cross the placental barrier by diffusion (45). Another possible difference between mice and humans refers to the significant role of *Sar1b* in the brain of mice (22). Finally, it is possible that *Sar1b* activity is pivotal given in mice given the limited compensation by its *Sar1a*

isoform, contrary to human (19). Accordingly, *Sar1a* gene expression increases in the intestine of CRD patients (15).

RT-qPCR and Western blot were used to confirm heterozygosity by evaluating *Sar1b* mRNA and protein mass in intestinal and hepatic tissue samples. As expected, *Sar1b* gene and protein expressions in *Sar1b*^{del/+} mice showed about half the value of control WT mice. However, even if we anticipated no changes in *Sar1b* gene and protein expressions in the framework of testing mice with the point mutation, we surprisingly noticed that the protein expression was reduced by half. Our assumption is that the point mutation promoted *Sar1b* protein instability and proteasomal degradation. It is possible that the point mutation led to inappropriate *Sar1b* protein folding, which was monitored through the ER quality control mechanisms, leading to ER-associated protein degradation (46, 47). Noteworthy, misfolded proteins are eliminated after being recognized, retro translocated into the cytosol, polyubiquitinated and then extracted from the ER membrane to be degraded in the cytosol by the ubiquitin/proteasomal system (48). In particular, genetic mutations of secretory proteins result in their accumulation in the ER lumen followed by premature ER associated protein degradation, a strategy largely implicated in various pathologies such as hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2 (49, 50). Such observations have been reported in tumoral calcinosis where the missense mutation of *KL1* gene led to a change from histidine to arginine, thereby destabilizing the glycosides catalytic domain while lessening *KL1* protein production (51). A similar metabolic protein fate was also observed in *PTEN* mutants and Miller syndrome (52).

We decided to use 12-week-old mice because we wanted to avoid experiments with old mice since CRD begins in the earliest months and years of life. In fact, there were only 4 adults among the 62 very young patients reported in the literature (13, 53). These adults must certainly have escaped an early and precise diagnosis despite their symptoms. Importantly, the characteristic CRD phenotypes were already apparent in 12-week-old mice (25). It is also important to note that many studies on congenital fat malabsorption diseases (e.g. hypobetalipoproteinemia and abetalipoproteinemia) used animal mouse models of the same age (32, 42, 54-56).

Packaging of intestinal CM and hepatic VLDL has been the subject of intense research over the last four decades. Their assembly has in common several key proteins and critical processes. First, Apo B provides the structural framework for their formation, but CM contains Apo B-48, representing 48% of the Apo B-100 within hepatic VLDL. Second, the resident endoluminal ER protein MTP physically transfers the lipid components to the nascent Apo B to initiate the assembly of CM and VLDL, which then undergo progressive modification and vesicular transport to the Golgi apparatus. Third, the translocation of CM and VLDL to the Golgi requires *Sar1b* protein to initiate vesicle formation for COPII-dependent transport to the Golgi. Fourth, mutations in *Apo B*, *MTP* and *Sar1b* completely interrupt initiation stages of pre-CM and VLDL formation in the case of the two former genes and blocks the maturation and exit of CM from the ER towards the Golgi in the case of the last gene. Therefore, congenital defects lead to intestinal fat malabsorption and VLDL delivery failure. However, unexpectedly, only sporadic and very limited steatosis was noticed in few CRD patients despite *Sar1b* aberrations (2, 18, 57). Moreover, contrary to the total absence of small intestine-derived CM in CRD in response to a fat meal test, the level of VLDL of hepatic origin was similar to that of control human participants. In line with these observations, our two *Sar1b^{mut/+}* and *Sar1b^{del/+}* mouse models display a similar behaviour in view of little liver damage. Indeed, no significant hepatic lipid accumulation and abnormal lipid metabolism were observed despite genetically modified *Sar1b*. Nevertheless, the little impact of *Sar1b* mutations on VLDL delivery by the liver of CRD patients and mice compared to McArdle-RH7777 hepatocytes (20) is an intriguing issue, which needs clarifications in future investigations.

As mentioned above, our *Sar1b^{mut/+}* and *Sar1b^{del/+}* mouse models recapitulated intestinal fat malabsorption and CM secretion defects, which are the most dominant features of CRD patients. Probably, these mutations disable the formation of COPII and thus block the transport of CM from the ER to the Golgi complex, resulting in an increased deposition of lipids in the mucosal cells of the proximal small intestine and, hence, decreased plasma lipids concentration. Interestingly, *Sar1b^{mut/+}* and *Sar1b^{del/+}* mice displayed intestinal depletion of MTP and Apo B protein expression, which may contribute to fat malabsorption. This is consistent with the decreased Apo B protein expression in response to *Sar1b* gene silencing in Caco-2/15 cells recently reported, using the zinc finger nuclease technique (19). It is necessary to investigate whether the

accumulation of defective Sar1b protein induces ER stress, which triggers the ubiquitin-proteasome system with a potency to degrade Apo B (58, 59).

The finding of HDL-C decline, in our genetically *Sar1b* modified mice, led us to examine Apo A-I and ABCA1, two critical proteins for early HDL biogenesis. As well established, newly secreted Apo A-I is lipidated by phospholipids and CHOL, primarily stimulated by membrane protein ABCA1 at the cell surface (60, 61). In our experiments, the low gene expression of Apo A-I and ABCA 1 in the gut resulted in low levels of HDL-C in CRD animals. These results not only confirm the data previously obtained in intestinal Caco-2/15 cells in response to *Sar1b* deletion (2, 23, 57) but might explain the severely reduced CHOL content of the HDL fraction of CRD patients (7, 57). A reduction in Apo A-1 and HDL secretion was also observed in patients with a deletion of Apo B (62), and MTTP (63), but the mechanisms are still unknown. Whether increased catabolism of Apo A-I and HDL constitute an additional mechanism for the low HDL-C levels might be an avenue to explore further.

In conclusion, we have established two novel animal models that recapitulate various features of congenital CRD, including CM secretion failure, hypocholesterolaemia and hypoalphalipoproteinemia (low HDL levels). In addition, among the mouse model disturbances that could not be scrutinized in humans given the limitation of tissues, we have noticed perturbations in lipid homeostasis, such as FA β -oxidation and lipogenesis, due to abnormal status of powerful transcription factors. In addition, the liver did not display the same metabolic behaviour as the intestine despite the defect in its intrinsic *Sar1b* gene. Another central finding of our study is related to embryonic lethality of homozygous mice with *Sar1b* genetic defects as the breeding of heterozygous mice yielded no viable homozygotes, which indicates the essential role of the Sar1b protein in mouse embryonic development.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data supporting the findings of this study are contained in the manuscript and in the supplementary file.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr Randy W. Schekman, Howard Hugues Medical Institute Reagents of the University of California, for providing the *SAR1A/B* antibody. We also thank Jean-François Schmouth and his team at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) for the development of the murine models of *Sar1b* deletion and mutation.

CONTRIBUTION

EL-concept and design. NA, AS, LA-Analysis and Interpretation of data. EL-drafting of the manuscript, NA, AS, SS-statistical analysis. EL, NP, JFB and SS-critical revision of the manuscript for important intellectual content.

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

The funders had no role in study design, decision to publish, or preparation of the manuscript. Therefore, the authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Levy E. Insights from human congenital disorders of intestinal lipid metabolism. *J Lipid Res.* 2015;56(5):945-62.
2. Roy CC, Levy E, Green PH, Sniderman A, Letarte J, Buts JP, et al. Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology.* 1987;92(2):390-9.
3. Bouma ME, Infante R, Jos J, Schmitz J. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology.* 1988;94(2):554-6.
4. Hussain MM, Kedees MH, Singh K, Athar H, Jamali NZ. Signposts in the assembly of chylomicrons. *Front Biosci.* 2001;6:D320-31.
5. Hussain MM, Fatma S, Pan X, Iqbal J. Intestinal lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16(3):281-5.
6. Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, et al. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet.* 2003;34(1):29-31.
7. Peretti N, Roy CC, Sassolas A, Deslandres C, Drouin E, Rasquin A, et al. Chylomicron retention disease: a long term study of two cohorts. *Mol Genet Metab.* 2009;97(2):136-42.
8. Siddiqi SA, Gorelick FS, Mahan JT, Mansbach CM, 2nd. COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 2):415-27.
9. Siddiqi S, Mansbach CM, 2nd. Phosphorylation of Sar1b protein releases liver fatty acid-binding protein from multiprotein complex in intestinal cytosol enabling it to bind to endoplasmic reticulum (ER) and bud the pre-chylomicron transport vesicle. *J Biol Chem.* 2012;287(13):10178-88.
10. Neeli I, Siddiqi SA, Siddiqi S, Mahan J, Lagakos WS, Binas B, et al. Liver fatty acid-binding protein initiates budding of pre-chylomicron transport vesicles from intestinal endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2007;282(25):17974-84.
11. Mansbach CM, 2nd, Siddiqi S. Control of chylomicron export from the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016;310(9):G659-68.

12. Charcosset M, Sassolas A, Peretti N, Roy CC, Deslandres C, Sinnett D, et al. Anderson or chylomicron retention disease: molecular impact of five mutations in the SAR1B gene on the structure and the functionality of Sar1b protein. *Mol Genet Metab.* 2008;93(1):74-84.
13. Silvain M, Bligny D, Aparicio T, Laforet P, Grodet A, Peretti N, et al. Anderson's disease (chylomicron retention disease): a new mutation in the SARA2 gene associated with muscular and cardiac abnormalities. *Clin Genet.* 2008;74(6):546-52.
14. Treepongkaruna S, Chongviriyaphan N, Suthutvoravut U, Charoenpipop D, Choubtum L, Wattanasirichaigoon D. Novel missense mutations of SAR1B gene in an infant with chylomicron retention disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48(3):370-3.
15. Georges A, Bonneau J, Bonnefont-Rousselot D, Champigneulle J, Rabes JP, Abifadel M, et al. Molecular analysis and intestinal expression of SAR1 genes and proteins in Anderson's disease (Chylomicron retention disease). *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:1.
16. Magnolo L, Najah M, Fancello T, Di Leo E, Pinotti E, Brini I, et al. Novel mutations in SAR1B and MTTP genes in Tunisian children with chylomicron retention disease and abetalipoproteinemia. *Gene.* 2013;512(1):28-34.
17. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 2001;81(1):153-208.
18. Simone ML, Rabacchi C, Kuloglu Z, Kansu A, Ensari A, Demir AM, et al. Novel mutations of SAR1B gene in four children with chylomicron retention disease. *J Clin Lipidol.* 2019;13(4):554-62.
19. Sane AT, Seidman E, Peretti N, Kleme ML, Delvin E, Deslandres C, et al. Understanding Chylomicron Retention Disease Through Sar1b Gtpase Gene Disruption: Insight From Cell Culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(12):2243-51.
20. Fryer LG, Jones B, Duncan EJ, Hutchison CE, Ozkan T, Williams PA, et al. The endoplasmic reticulum coat protein II transport machinery coordinates cellular lipid secretion and cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem.* 2014;289(7):4244-61.
21. Levic DS, Minkel JR, Wang WD, Rybski WM, Melville DB, Knapik EW. Animal model of Sar1b deficiency presents lipid absorption deficits similar to Anderson disease. *J Mol Med (Berl).* 2015;93(2):165-76.

22. Li X, Yan M, Guo Z, Yan L, Feng R, Zhu H, et al. Inhibition of Sar1b, the Gene Implicated in Chylomicron Retention Disease, Impairs Migration and Morphogenesis of Developing Cortical Neurons. *Neuroscience*. 2020;449:228-40.
23. Levy E, Marcel Y, Deckelbaum RJ, Milne R, Lepage G, Seidman E, et al. Intestinal apoB synthesis, lipids, and lipoproteins in chylomicron retention disease. *J Lipid Res*. 1987;28(11):1263-74.
24. Ramasamy I. Update on the molecular biology of dyslipidemias. *Clin Chim Acta*. 2016;454:143-85.
25. Levy E, Spahis S, Garofalo C, Marcil V, Montoudis A, Sinnet D, et al. Sar1b transgenic male mice are more susceptible to high-fat diet-induced obesity, insulin insensitivity and intestinal chylomicron overproduction. *J Nutr Biochem*. 2014;25(5):540-8.
26. Vikari J. Precipitation of plasma lipoproteins by PEG-6000 and its evaluation with electrophoresis and ultracentrifugation. *Scand J Clin Lab Invest*. 1976;36(3):265-8.
27. Sane A, Ahmarani L, Delvin E, Auclair N, Spahis S, Levy E. SAR1B GTPase is necessary to protect intestinal cells from disorders of lipid homeostasis, oxidative stress, and inflammation. *J Lipid Res*. 2019;60(10):1755-64.
28. Lu X, Li N, Shushakova N, Schmitt R, Menne J, Susnik N, et al. C57BL/6 and 129/Sv mice: genetic difference to renal ischemia-reperfusion. *J Nephrol*. 2012;25(5):738-43.
29. Brown DE, Libby SJ, Moreland SM, McCoy MW, Brabb T, Stepanek A, et al. Salmonella enterica causes more severe inflammatory disease in C57/BL6 Nrampl1G169 mice than Sv129S6 mice. *Vet Pathol*. 2013;50(5):867-76.
30. Piirsalu M, Taalberg E, Lillevali K, Tian L, Zilmer M, Vasar E. Treatment With Lipopolysaccharide Induces Distinct Changes in Metabolite Profile and Body Weight in 129Sv and Bl6 Mouse Strains. *Front Pharmacol*. 2020;11:371.
31. Raabe M, Flynn LM, Zlot CH, Wong JS, Veniant MM, Hamilton RL, et al. Knockout of the abetalipoproteinemia gene in mice: reduced lipoprotein secretion in heterozygotes and embryonic lethality in homozygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(15):8686-91.
32. Huang LS, Voyiaziakis E, Markenson DF, Sokol KA, Hayek T, Breslow JL. apo B gene knockout in mice results in embryonic lethality in homozygotes and neural tube defects, male

infertility, and reduced HDL cholesterol ester and apo A-I transport rates in heterozygotes. *J Clin Invest.* 1995;96(5):2152-61.

33. Homanics GE, Smith TJ, Zhang SH, Lee D, Young SG, Maeda N. Targeted modification of the apolipoprotein B gene results in hypobetalipoproteinemia and developmental abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(6):2389-93.

34. Copp AJ. Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends Genet.* 1995;11(3):87-93.

35. Farese RV, Jr., Ruland SL, Flynn LM, Stokowski RP, Young SG. Knockout of the mouse apolipoprotein B gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(5):1774-8.

36. Qiao F, Law HC, Krieger KL, Clement EJ, Xiao Y, Buckley SM, et al. Ctdp1 deficiency leads to early embryonic lethality in mice and defects in cell cycle progression in MEFs. *Biol Open.* 2021;10(1).

37. Turgeon B, Meloche S. Interpreting neonatal lethal phenotypes in mouse mutants: insights into gene function and human diseases. *Physiol Rev.* 2009;89(1):1-26.

38. Xue Y, Gao X, Lindsell CE, Norton CR, Chang B, Hicks C, et al. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet.* 1999;8(5):723-30.

39. Xue L, Cai JY, Ma J, Huang Z, Guo MX, Fu LZ, et al. Global expression profiling reveals genetic programs underlying the developmental divergence between mouse and human embryogenesis. *BMC Genomics.* 2013;14:568.

40. Hillman RB, Loy RG. Oestrogen excretion in mares in relation to various reproductive states. *J Reprod Fertil Suppl.* 1975(23):223-30.

41. Terasawa Y, Cases SJ, Wong JS, Jamil H, Jothi S, Traber MG, et al. Apolipoprotein B-related gene expression and ultrastructural characteristics of lipoprotein secretion in mouse yolk sac during embryonic development. *J Lipid Res.* 1999;40(11):1967-77.

42. Farese RV, Jr., Cases S, Ruland SL, Kayden HJ, Wong JS, Young SG, et al. A novel function for apolipoprotein B: lipoprotein synthesis in the yolk sac is critical for maternal-fetal lipid transport in mice. *J Lipid Res.* 1996;37(2):347-60.

43. Madsen EM, Lindegaard ML, Andersen CB, Damm P, Nielsen LB. Human placenta secretes apolipoprotein B-100-containing lipoproteins. *J Biol Chem*. 2004;279(53):55271-6.
44. Herrera E, Amusquivar E, Lopez-Soldado I, Ortega H. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm Res*. 2006;65 Suppl 3:59-64.
45. Herrera E, Amusquivar E. Lipid metabolism in the fetus and the newborn. *Diabetes Metab Res Rev*. 2000;16(3):202-10.
46. Preston GM, Brodsky JL. The evolving role of ubiquitin modification in endoplasmic reticulum-associated degradation. *Biochem J*. 2017;474(4):445-69.
47. Sun Z, Brodsky JL. Protein quality control in the secretory pathway. *J Cell Biol*. 2019;218(10):3171-87.
48. Wu X, Rapoport TA. Mechanistic insights into ER-associated protein degradation. *Curr Opin Cell Biol*. 2018;53:22-8.
49. Ali BR, Ben-Rebeh I, John A, Akawi NA, Milhem RM, Al-Shehhi NA, et al. Endoplasmic reticulum quality control is involved in the mechanism of endoglin-mediated hereditary haemorrhagic telangiectasia. *PLoS One*. 2011;6(10):e26206.
50. Hume AN, John A, Akawi NA, Al-Awadhi AM, Al-Suwaidi SS, Al-Gazali L, et al. Retention in the endoplasmic reticulum is the underlying mechanism of some hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2 ALK1 missense mutations. *Mol Cell Biochem*. 2013;373(1-2):247-57.
51. Ichikawa S, Imel EA, Kreiter ML, Yu X, Mackenzie DS, Sorenson AH, et al. A homozygous missense mutation in human KLOTHO causes severe tumoral calcinosis. *J Clin Invest*. 2007;117(9):2684-91.
52. Fang J, Uchiumi T, Yagi M, Matsumoto S, Amamoto R, Saito T, et al. Protein instability and functional defects caused by mutations of dihydro-orotate dehydrogenase in Miller syndrome patients. *Biosci Rep*. 2012;32(6):631-9.
53. Mignard S, Calon E, Hespel JP, Le Treut A. [A severely disturbed lipid profile]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2004;62(3):330-3.
54. Dominguez JA, Xie Y, Dunne WM, Yoseph BP, Burd EM, Coopersmith CM, et al. Intestine-specific Mttp deletion decreases mortality and prevents sepsis-induced intestinal injury in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *PLoS One*. 2012;7(11):e49159.

55. Iqbal J, Parks JS, Hussain MM. Lipid absorption defects in intestine-specific microsomal triglyceride transfer protein and ATP-binding cassette transporter A1-deficient mice. *J Biol Chem.* 2013;288(42):30432-44.
56. Xie Y, Matsumoto H, Nalbantoglu I, Kerr TA, Luo J, Rubin DC, et al. Intestine-Specific Mttp Deletion Increases the Severity of Experimental Colitis and Leads to Greater Tumor Burden in a Model of Colitis Associated Cancer. *PLoS One.* 2013;8(6):e67819.
57. Peretti N, Sassolas A, Roy CC, Deslandres C, Charcosset M, Castagnetti J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of chylomicron retention disease based on a review of the literature and the experience of two centers. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:24.
58. Lee HY, Lee GH, Bhattarai KR, Park BH, Koo SH, Kim HR, et al. Bax Inhibitor-1 regulates hepatic lipid accumulation via ApoB secretion. *Sci Rep.* 2016;6:27799.
59. Hebert DN, Molinari M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev.* 2007;87(4):1377-408.
60. Sorci-Thomas MG, Thomas MJ. High density lipoprotein biogenesis, cholesterol efflux, and immune cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(11):2561-5.
61. Fisher EA, Feig JE, Hewing B, Hazen SL, Smith JD. High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(12):2813-20.
62. Elias N, Patterson BW, Schonfeld G. In vivo metabolism of ApoB, ApoA-I, and VLDL triglycerides in a form of hypobetalipoproteinemia not linked to the ApoB gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(5):1309-15.
63. Ikewaki K, Rader DJ, Zech LA, Brewer HB, Jr. In vivo metabolism of apolipoproteins A-I and E in patients with abetalipoproteinemia: implications for the roles of apolipoproteins B and E in HDL metabolism. *J Lipid Res.* 1994;35(10):1809-19.

5.2.2 TABLES

Table 1: Results of heterozygous mice breeding

		<i>Sar1b</i> genotype			
Genotypes of offspring from intercross of heterozygous <i>Sar1b</i>^{del/+} mice					
Mating		Total	+/+	<i>del</i> /+	<i>del</i> / <i>del</i>
		pups			
Intercross	(■C57BL/6 ^{del/+} x ■C57BL/6 ^{del/+})	57	18 (32%)	32 (56%)	7* (12%)
Intercross	(■sv129 ^{del/+} x ■sv129 ^{del/+})	11	7 (64%)	4 (36%)	0
Genotypes of offspring from intercross of heterozygous <i>Sar1b</i>^{mut/+} mice					
Mating		Total	+/+	<i>mut</i> /+	<i>mut</i> / <i>mut</i>
		pups			
Intercross	(■C57BL/6 ^{mut/+} x ■C57BL/6 ^{mut/+})	69	13 (19%)	56 (81%)	0
Intercross	(■sv129 ^{mut/+} x ■sv129 ^{mut/+})	14	7 (50%)	7 (50%)	0

The predicted proportions of *Sar1b* genotypes (*del*/+; *del*/*del*) and (*mut*/+; *mut*/*mut*) for intercrosses are 25:50:25 but they are distorted in this case because of embryonic lethality and cannibalism of dead pups. * pups were dead at birth.

a wild type mouse and a D137N point mutation. Introducing the mutation (CG to TA) introduced a MseI restriction site without affecting the isoleucine amino acid and has mutated the aspartic acid amino acid to an asparagine in position 137. **(B-C)** Genotyping for deletion and zygosity. Analysis of gene-targeting events was performed by PCR assay of purified genomic DNA demonstrating wild type, heterozygous and homozygous mice for the *Sar1b* KO mutation. Wild type (+/+) mice typically exhibit an intense 439 bp fragment while a supernumerary 275 bp fragment, only present in homozygous (-/-), is distinguishable in heterozygous (+/-) mice. **(D)** Map of the *Sar1b* locus together with the targeted point mutation of *Sar1b* strategy. Exons (blue filled boxes), introns (thin line) and start of the *Sar1b* ORF (arrow) are indicated. CRISPR-Cas9 was successfully used to introduce a d.409G. to a nAsp137Asn (arrow) mutation in *Sar1b*. The 405 bp-sequence encompassing the point mutation, was amplified by PCR with forward primer: GACTGAGTCCTTGGCTATTGG, and reverse primer: CCTTCTTAAGCTGGGTATGGA. The chromatograms compare the original sequence from gene bank (NM_025535.2) with the ones of a wild type mouse and a D137N point mutation. Introducing the mutation (CG to TA) introduced a MseI restriction site without affecting the isoleucine amino acid and has mutated the aspartic acid amino acid to an asparagine in position 137.

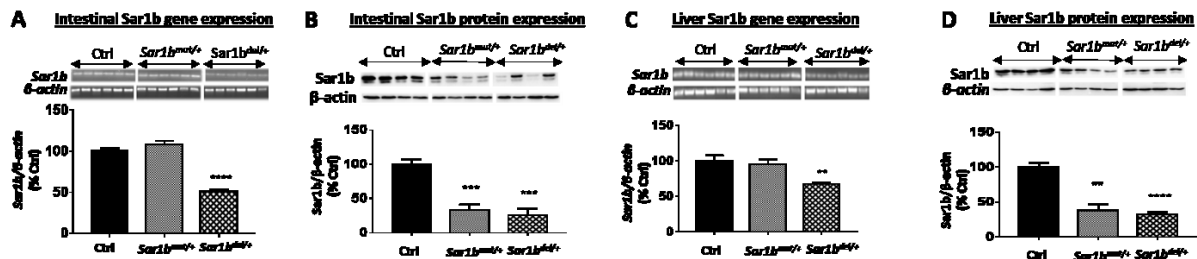


FIGURE 2 Protein expression of *Sar1b* in the small intestine and liver of *Sar1b*^{mut/+}, and *Sar1b*^{del/+} mice. Wild type, *Sar1b*^{mut/+} and *Sar1b*^{del/+} female and male mice (9-11 weeks) were fed ad libitum with a conventional chow diet for 1 week. Prior to the sacrifice, mice were fasted 6 hours and their tissues were flash frozen. *Sar1b* **(A and C)** gene and **(B and D)** protein expressions were assessed by RT-qPCR and Western blot, respectively, in the intestine and liver. Results represent the means ± SEM of 4-6 mice in each group. **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 vs. wild type mice (Ctrl).

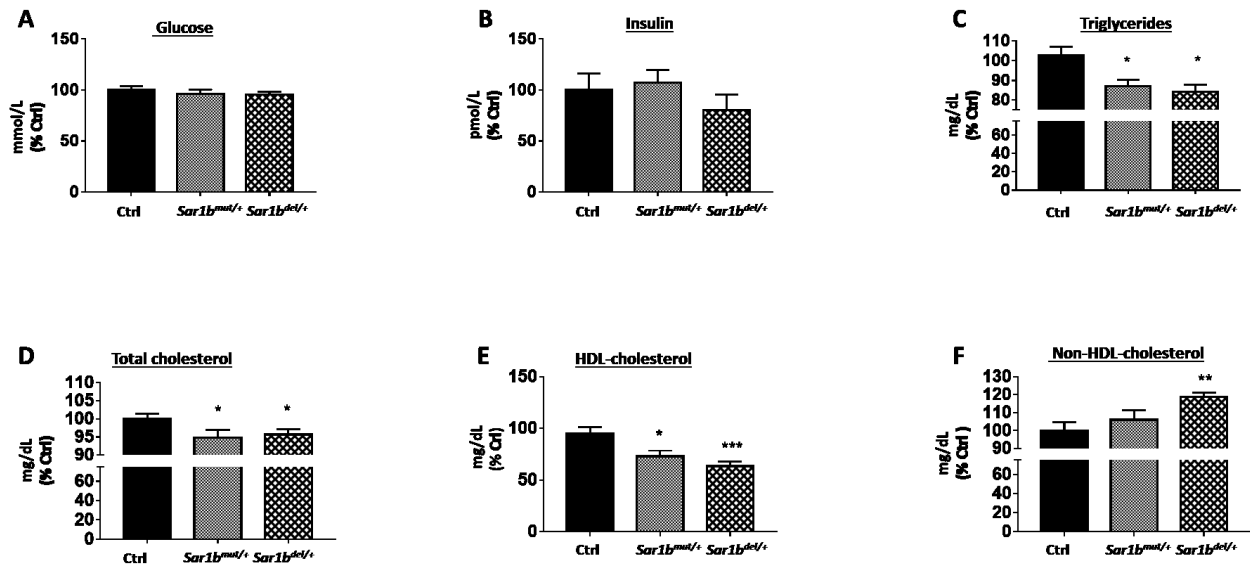


FIGURE 3 Consequences of *Sar1b* mutation and deletion on biochemical parameters. Wild type, *Sar1b*^{mut/+} and *Sar1b*^{del/+} female and male mice (9-11 weeks) were fed ad libitum with a conventional chow diet for 1 week. Before the sacrifice, mice were fasted for 6 hours, followed by the recovery of 50 μ L of blood from the tail vein. Fasting plasma (A) glucose, (B) insulin, (C) triglycerides, (D) total cholesterol and (E) HDL-cholesterol concentrations were determined as described in the Materials and Method section. (F) Non-HDL-cholesterol was also calculated. Results represent the means \pm SEM of 10-13 mice in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. wild type mice (Ctrl).

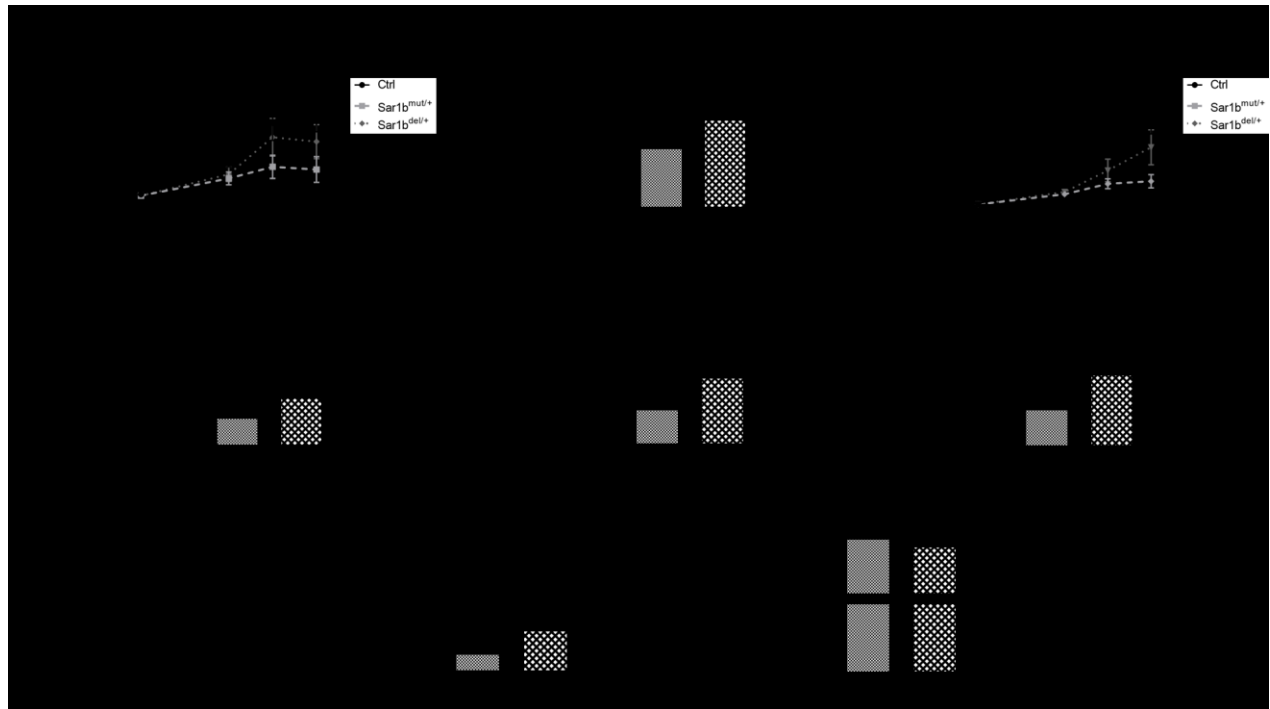


FIGURE 4 Intestinal fat absorption in *Sar1b*^{mut/+} and *Sar1b*^{del/+} mice. Wild type, *Sar1b*^{mut/+} and *Sar1b*^{del/+} female and male mice (9-11 weeks) were fed ad libitum with a conventional chow diet for 1 week. Prior to the sacrifice, mice were fasted 6 hours and then were given 200 μ L of olive oil and 4 μ Ci [¹⁴C]-triolein by oral gavage. Ten minutes later, mice were peritoneally injected with 1 mg/kg of Pluronic F-127 to inhibit lipoprotein lipase-induced chylomicron catabolism. Blood was taken at 60-, 90- and 120-minute time points. Plasma (**A**, **B**) triglycerides and (**C**, **D**) radioactivity derived from the labelled [¹⁴C]-triolein were determined as described in the Materials and Method section. At 120 minutes, chylomicrons (CM) content was determined by ultracentrifugation. (**E**) Triglycerides, (**F**) Total cholesterol and (**G**) CM scintillation counts were analyzed in this fraction. Finally, feces were dried and (**H**) triglycerides were measured as described previously. Results represent the means \pm SEM of 10-13 mice in each group. *P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001 vs. wild type mice (Ctrl).

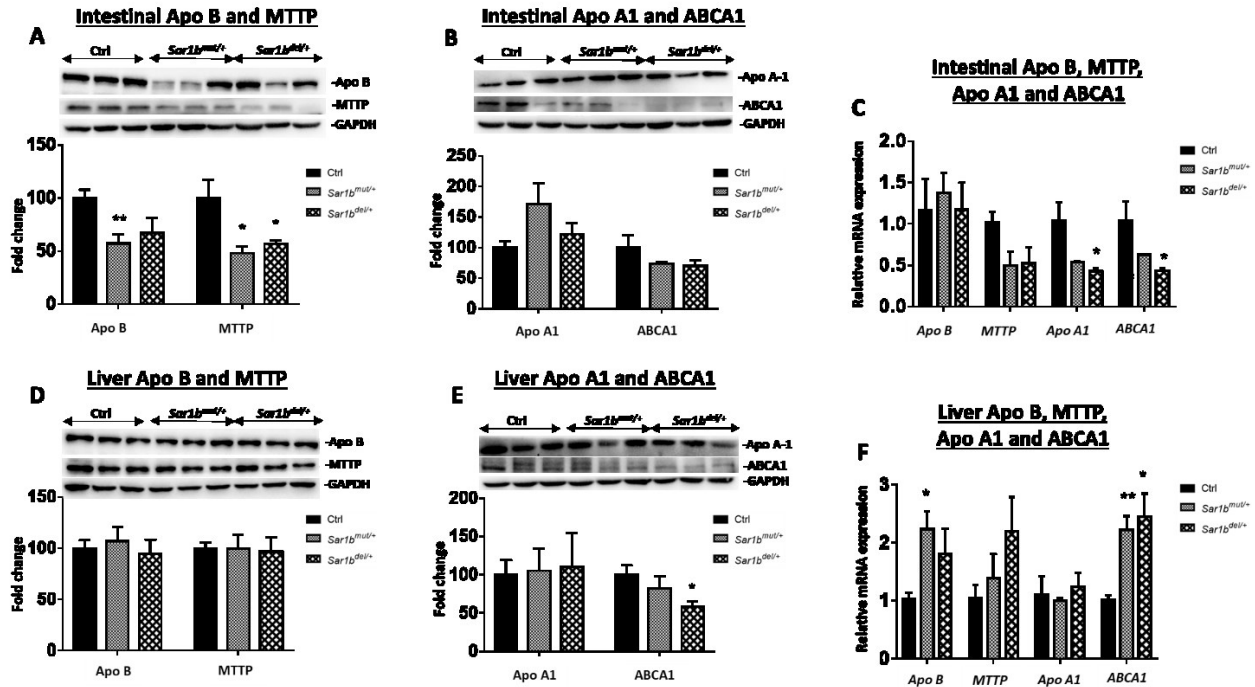


FIGURE 5 *Sar1b* genetic defects impair key players of intestinal chylomicron assembly and HDL biosynthesis. Wild type, *Sar1b^{mut/+}* and *Sar1b^{del/+}* female and male mice (9-11 weeks) were fed ad libitum with a conventional chow diet for 1 week. Prior to the sacrifice, mice were fasted 6 hours and then were given 200 μ L of olive oil and 4 μ Ci [14 C]-triolein by oral gavage. Intestinal and liver tissues were collected. Protein expressions of (A, D) Apo B, MTP, (B, E) Apo A1 and ABCA1 were analyzed by Western blot in the intestine and liver tissues, respectively. The gene expression was also assessed in (C) the intestine and (F) liver by RT-qPCR as described in the Materials and Method section. Results represent the means \pm SEM of 3-6 mice in each group. *P<0.05, **P<0.0 vs. wild type mice (Ctrl).

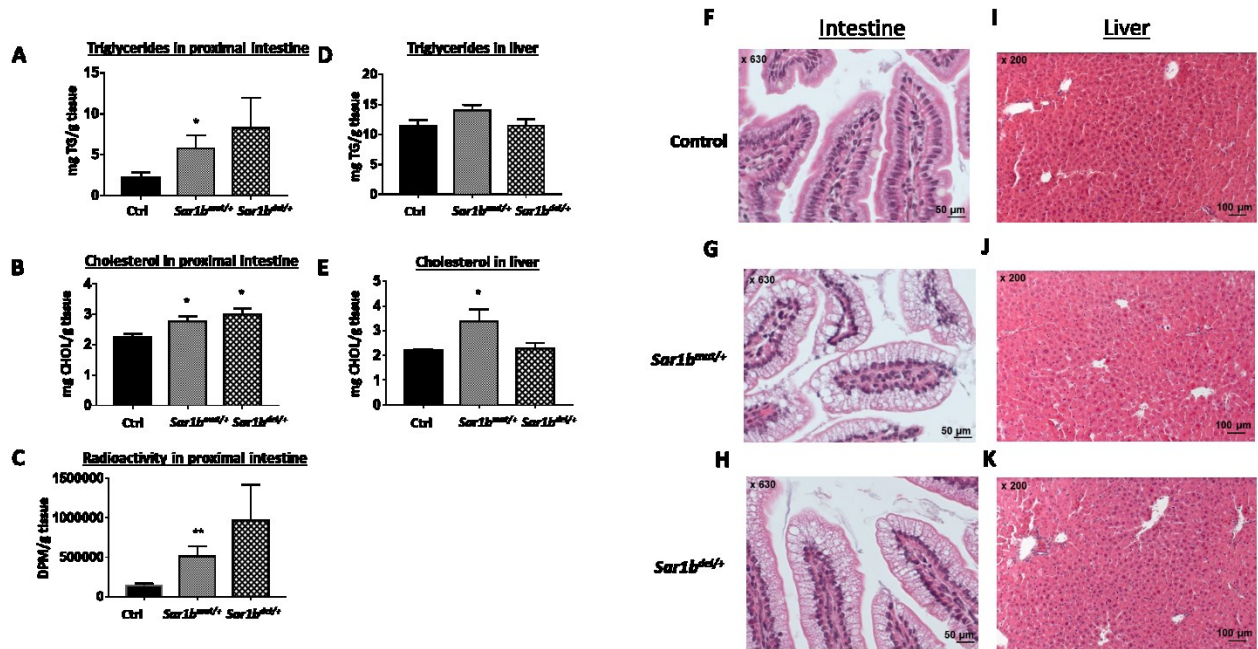


FIGURE 6 Effect of *Sar1b* genetic defects on intestinal and hepatic lipid accumulation. Wild type, *Sar1b^{mut/+}* and *Sar1b^{del/+}* female and male mice (9-11 weeks) were fed ad libitum with a conventional chow diet for 1 week. Prior to the sacrifice, mice were fasted 6 hours and then were given 200 μ L of olive oil and 4 μ Ci [14 C]-triolein by oral gavage. **(A, D)** triglycerides and **(B, E)** total cholesterol were extracted from the gut and liver, and the same for **(C)** radioactivity derived from the labelled [14 C]-triolein. They were all analyzed as described in the Materials and Method section. Finally, monographs of histology with hematoxylin-eosin were analyzed and expressed in the **(F, G, H)** intestine and **(I, J, K)** liver. The red arrow indicates the presence of numerous lipid droplets. Results represent the means \pm SEM of 10-13 mice in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. wild type mice (Ctrl).

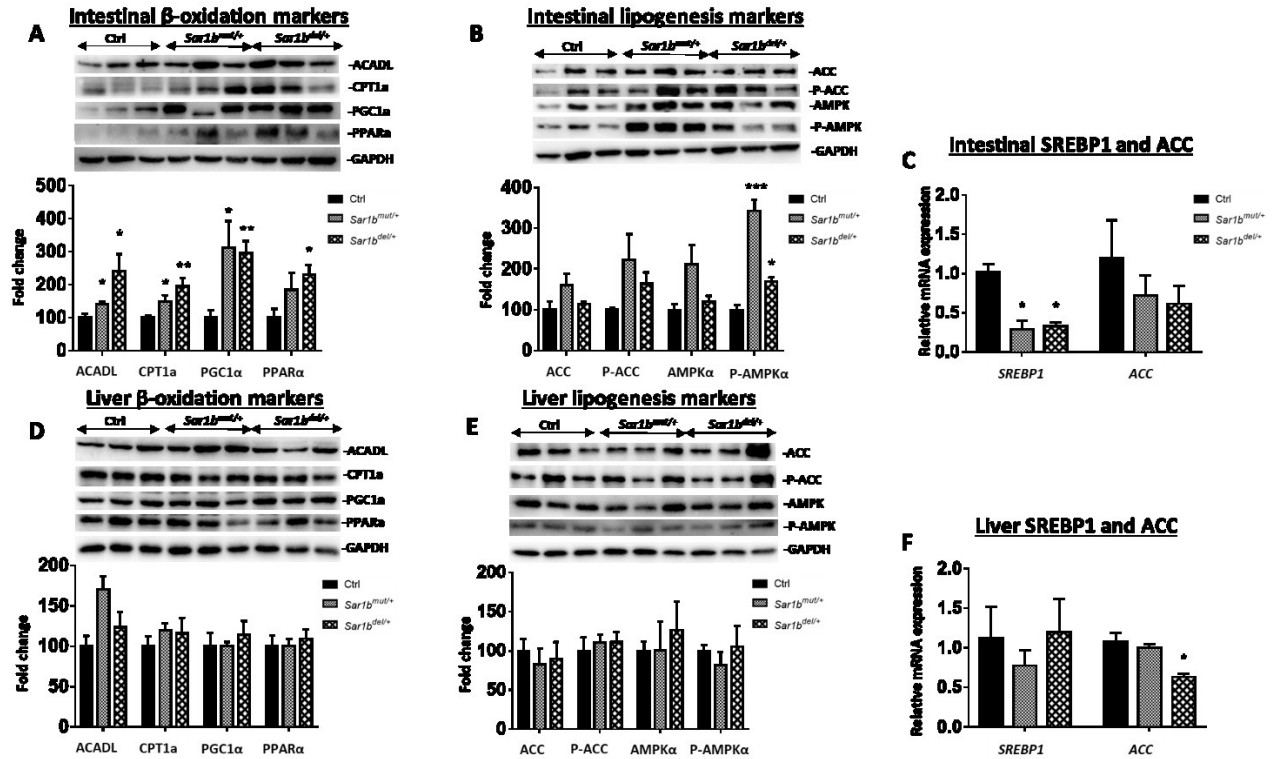


FIGURE 7 Impact of *Sar1b* genetic defects on intestinal and liver lipid metabolism. Wild type, *Sar1b^{mut/+}* and *Sar1b^{del/+}* female and male mice (9-11 weeks) were fed ad libitum with a conventional chow diet for 1 week. Prior to the sacrifice, mice were fasted 6 hours and then were given 200 μ L of olive oil and 4 μ Ci [14 C]-triolein by oral gavage. Protein expression of important markers of (A, B) fatty acid β -oxidation (ACADL, CPT1a, PGC1 α and PPAR α) and (D, E) lipogenesis (ACC, P-ACC, AMPK α and P-AMPK α) were analyzed in the intestine and liver by Western blot as described in the Materials and Method section. The gene expression was also assessed in (C) intestine and (F) liver by RT-qPCR as described in Materials and Method section. Results represent the means \pm SEM of 3-6 mice in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. wild type mice (Ctrl).

5.2.4 SUPPLEMENTARY DATA

Materials and methods

Generation of *Sar1b* KO (*Sar1b^{del/+}*) and mutated (*Sar1b^{mut/+}*) mice

Embryos were produced from C57BL/6N mice (Charles River Laboratories), and CD-1 female mice served for embryo transfer. The CD-1 line is robust and largely used for genetic experiments because of their efficient breeding and large litter sizes. All animal care and procedures performed in this study were approved by the Research Center platform of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) animal care committee in accordance with the guidelines from the Canadian Council on Animal Care in science (CCAC).

Preparation of CRISPR-Cas9 electroporation mixes (*Sar1b^{del/+}*)

The Cas9 protein (Integrated DNA technologies (IDT, # 1081058), custom crRNA (IDT, Alt-R™crRNA) and generic tracrRNA (IDT # 1072533) were prepared as previously described. Briefly, CRISPR RNA-Trans-activating CRISPR RNA complex paired-guide RNA (pgRNA) was formed by mixing an equimolar ratio of the aforementioned components, which were incubated 5 minutes at 95°C and allowed to cool down to room temperature (10 minutes). The Cas9 Ribonucleoprotein (Cas9 RNP) complex was assembled by incubating 20 μmoles of Cas9 protein with 20 μmoles of assembled pgRNA for 10 minutes at room temperature. The RNP complexes were then combined in 20 μl Opti-MEM at a final concentration of 4 μM (ThermoFisher Scientific #31985070).

Preparation of CRISPR-Cas9 electroporation mixes (*Sar1b^{mut/+}*)

The Cas9 RNP complex was assembled as previously described. Briefly, Cas9 protein (80 μmoles) was incubated with assembled pgRNA (80 μmoles) and incubated for 10 minutes at room temperature. The RNP complex was then combined in 20 μl Opti-MEM at a final concentration of 4 μM (Thermo Fisher Scientific # 31985070) along with 10 μM of repair template (custom Ultramer ssDNA, IDT).

Zygote preparation

Prepubescent 3 weeks old C57BL/6 females were superovulated 67 hours prior zygote collection by 5 IU intraperitoneal administration of pregnant mare serum gonadotrophin (Genway Biotech Inc, GWB-2AE30A) followed 47-48 hours later with 5 IU of human chorionic gonadotrophin (Sigma-Aldrich, CG10-1VL) before being bred. Fertilized 1-cell stage embryos were collected and kept in embryomax KSOM advance media (Millipore Sigma) at 37°C under 5% CO₂ until electroporation.

Electroporation procedure

Briefly, 1-cell embryos were washed in batch of 50 through 5 drops of M2 media before being rinsed in a single drop of Opti-MEM. The embryos were then transferred to the 20 ul electroporation mix. The solution was then transposed to a pre-warmed 1-mm cuvette (BioRad). Electroporation was carried out using a Gene Pulser XCell electroporator with the following conditions: 30V, 3 ms pulse duration, 2 pulse 100 ms interval. Electroporated embryos were recovered from the cuvette and washed in three drops of embryomax KSOM advance media before being incubated a least one hour at 37°C under 5% CO₂ prior implantation in pseudopregnant females. Surviving embryos, up to the 2-cell stage, were implanted in pseudo pregnant females (0.5 dpc).

Genotyping

Briefly, ear biopsies from 21-day old mice were digested in MyTaq Extract PCR kit according to the manufacturer (Bioline, # BIO-21126). PCR amplification was performed using the high-fidelity enzyme Q5 from New England Biolab (# M0530L) with locus specific primers (*Sar1b*^{del/+}): [(CATCACACATGGCTCTTCATTT and TGATGTGCTCAGTTCAGTCCTT, and ACTTCGGCTTTGCTCTTTGTAG and AAAGGCTTCACCTCTCCATACA)]; (*Sar1b*^{mut/+}): [(GACTGAGTCCTTGGCTATTTGG and CCTTCTTAAGCTGGGTATGGA)]. PCR products were gel-electrophoresed to assess for zygosity through visualization of specific bands and the desired mutation presence was confirmed by sequence alignment using the Snapgene software.

Western blot

Table 2 : List of all antibodies with their corresponding dilution and compagny

	Dilution	Compagny
ACC	1/1000	Cell signaling
CPT1a	1/1000	Cell signaling
FAS	1/1000	Cell signaling
AMPKα	1/1000	Cell signaling
pAMPKα	1/1000	Cell signaling
GAPDH	1/1000	Abcam
ABCA1	1/1000	Abcam
ApoA1	1/5000	Abcam
PGC1α	1/1000	Abcam
MTTP	1/1000	Thermo Fisher Scientific
ACADL	1/1000	Thermo Fisher Scientific
PPARα	1/1000	Cayman Chemical
pACC	1/1000	Millipore
ApoB	1/1000	Sigma-Aldrich
β-actin	1/250000	Sigma-Aldrich

RNA extraction and qPCR analysis

Table 3: List of all primers used for qPCR analysis

	Primers
ApoB	Forward: 5-TGAATGCACGGGCAATGA-3
	Reverse: 5-GGCATTACTTGTTCCATGGTTCT-3
MTTP	Forward: 5-ATGATCCTCTTGGCAGTGCTT-3
	Reverse: 5-TGAGAGGCCAGTTGTGTGAC-3
ApoA1	Forward: 5-CCACACCCTTCAGGATGAAAG-3
	Reverse: 5-TGGCTCCCTGTCAGGAAGAC-3
ABCA1	Forward: 5-AGGGTTTCTTTGCTCAGATTGTC-3

	Reverse: 5-TGCCAAAGGGTGGCACA-3
SREBP1	Forward: 5-GACCCTACGAAGTGCACACA-3
	Reverse: 5-TCATGCCCTCCATAGACACA-3
ACC	Forward: 5-TGGCTTCTCCAGCAGAATTT-3
	Reverse: 5-AGATCGCATGCATTTCACTG-3

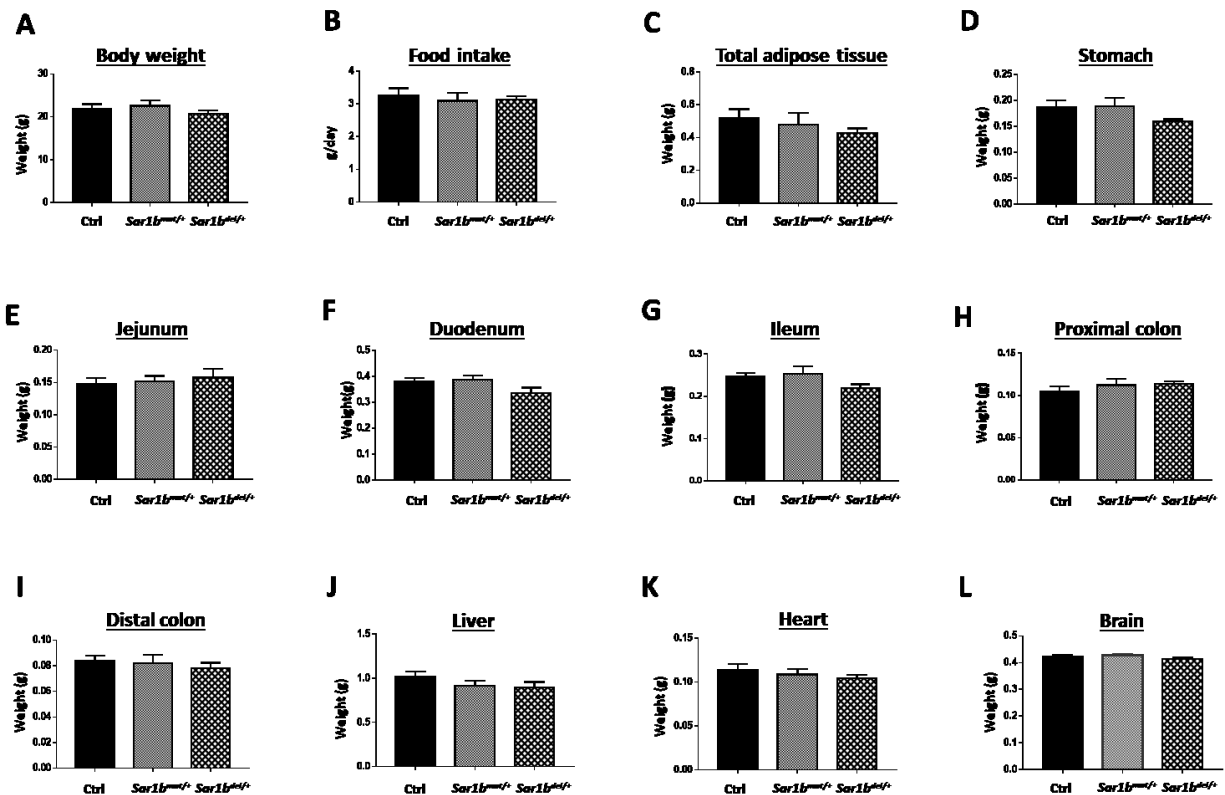


Figure S1: Impact of *Sar1b* deletion and mutation on body weight, food intake and weight of several organs. After weaning, wild type (Ctrl), heterozygous *Sar1b^{mut/+}* and *Sar1b^{del/+}* mice were fed ad libitum with a conventional chow diet. **(A)** Body weight and **(B)** food intake was recorded every day for 1 week. Prior to the sacrifice, mice were fasted for 6 hours followed by an oral gavage of olive oil (200 μ L). **(C)** Total adipose tissue, **(D)** stomach, **(E-G)** small intestine, **(H-I)** colon, **(J)** liver, **(K)** heart and **(L)** brain tissues were weighted. Results represent the means \pm SEM of 10-13 mice (9-11 weeks old) in each group.

5.5 Article 3

The high-fat diet highlights the impact of genetic Sar1b defects on lipid profile, lipoprotein composition, tissue cholesterol metabolism, and ER stress

Nickolas Auclair, Alain Sané, Lena Ahmarani, Nour-EL-Houda Ould-Chikh et Emile Levy

Article en préparation

Cet article répond aux objectifs spécifiques 2.1, 2.2, 2.3, 2.5 et 2.6

Contributions :

Nickolas Auclair : L'étudiant a réalisé et planifié les expériences, compilé les données obtenues et les a analysées, effectué les analyses statistiques et rédigé l'article

Alain Sané et Léna Ahmarani : Ils m'ont supporté dans l'obtention de plusieurs résultats tels que le génotypage des souris et les photos histologiques.

Nour-EL-Houda Ould-Chikh : A obtenu les résultats des AG.

Emile Levy : A dirigé l'étudiant dans la réalisation et la planification des expériences, a aidé à la rédaction de l'article et l'a corrigé et révisé avant de le soumettre au journal

5.3.1 MAIN TEXT OF THE ARTICLE

The high-fat diet highlights the impact of genetic Sar1b defects on lipid profile, lipoprotein composition, tissue cholesterol metabolism and ER stress

Nickolas Auclair^{1,2}, Alain T. Sané¹, Léna Ahmarani^{1,3}, Nour-El-Houda Ould-Chikh¹ and Emile Levy^{1,2,3*}

¹Research Center, CHU Ste-Justine, Departments of ²Pharmacology & physiology AND

³Nutrition, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada

Short Title: Sar1b genetic change affects lipid metabolism under an high-fat diet

Address for correspondence:

*Dr. Emile Levy

GI-Nutrition Unit

CHU Sainte-Justine

3175 Ste-Catherine Road #4.17.005

Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5

Tel.: (514) 345-7783

Abbreviation list:

ATF6: Activating transcription factor 6; **CE:** Cholesteryl ester; **CHOL:** Cholesterol; **CM:** Chylomicron; **COPII:** Vesicular coat protein complex II; **CRD:** Chylomicron retention disease; **FC:** Free cholesterol; **GPR78:** G protein-coupled receptor 78; **HFD:** High-fat diet; **IRE1:** Inositol-requiring enzyme 1; **MTTP:** Microsomal triglyceride transfer protein; **NPC1L1:** Niemann–Pick C1-like 1; **PERK:** Protein kinase RNA-like ER kinase; **PL:** Phospholipids; **SFA:** Saturated fatty acids; **SR-B1:** Scavenger receptor, class B type 1; **TG:** Triglycerides

ABSTRACT

Background: Biallelic pathogenic variants of the *Sar1b* gene cause chylomicron retention disease (CRD) whose central phenotype is the inability to secrete chylomicrons (CM). Patients with CRD experience numerous clinical symptoms such as gastrointestinal, hepatic, neuromuscular, ophthalmologic and cardiologic abnormalities. Recently, the production of mice expressing either a targeted deletion or mutation of *Sar1b* recapitulated biochemical and gastrointestinal defects associated with CRD. **Objective:** The present study was conducted to better understand little-known aspects of *Sar1b* mutations, including mouse embryonic development, lipid profile and lipoprotein composition in response to high-fat diet (HFD), gut and liver cholesterol metabolism, sex-specific effects, and genotype-phenotype differences. **Results:** *Sar1b* deletion and mutation produce a lethal phenotype in homozygous mice, which display intestinal lipid accumulation without any gross morphological abnormalities. On HFD, mutant mice exhibit more marked decreases in body, adipose tissue and liver weight, plasma cholesterol and non-HDL cholesterol, and polyunsaturated fatty acids compared to those on regular Chow diet. Divergences were also noted in lipoprotein lipid composition, lipid ratios (serving as indices of particle size) and lipoprotein-apolipoprotein distribution. *Sar1b* defects significantly reduce cholesterol accumulation in the gut while altering key players in cholesterol metabolism such as reducing gene expression of NPC1L1, SR-B1, and LDLr, and increasing expression of LXR α , ABCA1, HMG-CoAr, PCSK9, and MTP. Interestingly, variations are observed between males and females, with males being more likely to gain weight and develop cardiometabolic complications under HFD, whereas females are better protected. In addition, *Sar1b* mutant mice were more inclined than KO mice to be significantly different from their control counterparts in all aspects discussed above. **Conclusions:** Overall, our results with the mutant mice reveal the importance of *Sar1b* in several biochemical aspects such as lipid disorders, metabolic aspects such as cholesterol metabolism, and embryo developmental processes.

Keywords: Chylomicrons, intestine, cholesterol absorption, dyslipidemias, triglycerides

1. INTRODUCTION

Lipid transport and metabolism are complex processes, but the development of cellular and molecular tools over the past two decades has greatly advanced our knowledge of the critical players and pathways involved. The two organs responsible for transporting hydrophobic lipids in the form of large macromolecules, known as lipoproteins, are the intestine and liver (1-4). While dietary lipids are assembled with apolipoproteins (Apos) in the enterocytes to form chylomicrons (CM), endogenous lipids are complexed with Apos to generate very-low-density lipoproteins (VLDL). Both CM and VLDL are composed of a central lipid core consisting of triglycerides (TG) and cholesteryl ester (CE), which is surrounded by a free cholesterol (FC), phospholipid (PL) and Apo outer shell.

The biogenesis of CMs and VLDLs definitely requires the presence of critical proteins in the endoplasmic reticulum (ER) of both the enterocyte and hepatocyte. Investigation of genetic disorders, such as abetalipoproteinemia and hypobetalipoproteinemia, have been of immense support in defining the indispensable role of microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) and Apo B (B-48 for the gut and B-100 for the liver), respectively (5-9). A third congenital disorder, called chylomicron retention disease (CRD), has been identified subsequently, and is caused by mutations in the *Sar1b* gene, coding for a GTPase of the Ras superfamily. The *Sar1b* protein product is a part of the vesicular coat protein complex II (COPII), forming a shell around the vesicles that transport CM cargo in the secretory pathway (10, 11). It has been suggested that the *Sar1b* mutations inhibit CM trafficking between the ER and Golgi, resulting in CM secretion, thus causing vitamin and essential fatty acid deficiency in patients.

Quite recently, we generated a mouse expressing either a targeted deletion or mutation of human *Sar1b* using the CRISPR-Cas9 system (3). Heterozygous mice recapitulated the gastrointestinal abnormalities observed in CRD patients, including fat intestinal malabsorption, steatorrhea, CM secretion failure, hypocholesterolemia and hypoalphalipoproteinemia (12). Moreover, these genetically modified *Sar1b* mice exhibited disturbed intestinal lipid homeostasis as reflected by elevated fatty acid β -oxidation and diminished lipogenesis in association with powerful transcription factors (12).

Despite great achievements accomplished to date, additional efforts are still necessary to improve our understanding of CRD disorders, at least by tapping the potential of animal models. Among the aspects that need to be clarified, there are the following questions: (i) What is the importance of Sar1b in mouse embryonic development, and may lethality of homozygous embryos be explained by abnormal phenotypes?; (ii) How do heterozygous mice respond to a high-fat diet in terms of lipid profile and lipoprotein composition?; (iii) Do genetic Sar1b defects affect cholesterol (CHOL) metabolism in the gut and liver?; (iv) Does disruption of Sar1b contribute to sex disparities?; and (v) Are mice carrying targeted Sar1b mutation and deletion characterized by genotype-phenotype differences? The objective of the present work is precisely to focus on these different issues.

2. MATERIALS AND METHODS

Mouse models

CRISPR-Cas9 technology was used to obtain heterozygous male and female $Sar1b^{del/+}$ and $Sar1b^{mut/+}$ mice on a C57BL/6N background. The detailed steps for the generation and confirmation of these two mouse models were described previously (12). Briefly, $Sar1b^{del/+}$ mice were developed by generating a 545-base pair deletion in exon 2 of *Sar1b* on chromosome 11 whereas for $Sar1b^{mut/+}$ mice, a c.409G-to-A (p.D137N) substitution was inserted in exon 2 on chromosome 11.

For embryonic experiments, heterozygous male and female mice ($Sar1b^{del/+}$ and $Sar1b^{mut/+}$) were mated. As soon as a vaginal plug was detected, the female was separated from the male and considered pregnant (day E0.5). At E9.5, E13.5 and E18.5, the female was sacrificed by exposure to CO₂, and the embryos were removed. The intestine, liver and brain of the embryos at E18.5 were harvested for histology and/or flash frozen for future experiments. Similarly, the yolk sacs of E13.5 embryos were also harvested for histology.

Animal experiments

Heterozygous mice were fed a chow diet (Teklad 18% protein diet, Harlan Laboratories, Envigo, USA) or a high-fat diet (HFD, 60% fat Bioserv F3282, Bioserv, USA) for 8 weeks. Mice were housed individually in a controlled environment (22°C and a 12-hour daylight cycle) while food and water were given *ad libitum*. Body weight was measured twice a week. The mice were fasted for 6 hours, anesthetized with isoflurane, and sacrificed by heart puncture. Plasma was isolated from blood by 10 min centrifugation at 2000 x g, and different organs were removed, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. All procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee of the Sainte-Justine Hospital Research Center.

Biochemical analysis

Plasma TG, total CHOL and FC were analyzed with commercial colorimetric kits (Wako Diagnostics, USA). Insulin was determined with a commercial ELISA kit (Mercodia, Sweden). Blood glucose was measured with a glucometer (Contour Next, Bayer, Germany). The index for insulin resistance (IR)

(HOMA-IR) was calculated with the formula: $\text{insulin (mIU/mL)} \times \text{glucose (mM)} / 22.5$. HDL-CHOL was isolated from plasma by precipitation with polyethylene glycol 6000 and analyzed as previously described (12).

Lipoproteins isolation

Isolation of VLDL, LDL, and HDL was performed as previously described (13). Briefly, pooled plasmas from 3 to 5 mice of the same groups were subjected to sequential gradient centrifugation at 4°C in a Beckman LE-80 ultracentrifuge. First, CMs were floated at 25,000 x g for 30 min with a SW 55 Ti at a density of 1.006 g/mL (Beckman Coulter, USA). Subsequently, VLDL and LDL were isolated at 40 000 x g for 18 h with a Ti 70.1 (Beckman Coulter, USA) at gradients of 1.006 g/mL and 1.063 g/mL, respectively. Finally, HDLs were isolated at 1.21 g/mL with the same Ti 70.1 at 40,000 x g for 48 h.

Lipoprotein composition and apolipoprotein analysis

Protein and lipid compositions of each lipoprotein fraction were analyzed. TG, CHOL and FC were measured with the same kits specified above. The CHOL ester (CE) moiety was calculated by subtracting FC from CHOL. PLs were measured with Bartlett's method (14) while proteins were quantified with Bradford's solution (Biorad, USA).

As for Apo evaluation, lipoprotein proteins were loaded into a 4-20% SDS-PAGE stain-free gel (Biorad, USA). Using the Biorad's new Stain-free technology (10), the densitometric distribution of Apos on the gels was estimated with the Image Lab software after image acquisition with the Chemidoc MP (Biorad, USA). The proportion of Apos was defined as a percent of total Apo content.

Intestinal and liver lipid analysis

Lipids from approximately 25-30 mg of homogenized jejunum and liver in EDTA buffer were overnight extracted in Folch solution (chloroform/methanol, 2:1) at 4°C. Thereafter, the lower phase was dried under nitrogen at 50°C and the lipids were resuspended in 400µL of H₂O. Total TG and CHOL were determined with the same commercial kits.

Fatty acid composition

Plasma fatty acids (FA) were extracted by transesterification as described previously (15). Briefly, an internal standard (C19:1) dissolved in hexane:methanol (1:4) and acetyl chloride solution were added to plasma (100 μ L) and heated (100°C) for 1 hour. After cooling, 6% K₂CO₃ was added to the solution that was centrifuged at 3000 x g for 10 min. FAs from the upper phase were separated by gas chromatography equipped with a flame ionization detector (7890A, Agilent Technology, USA) (15). FAs of the different samples were identified and calculated based on the retention times of known FAs standards. The area under the curve of the FAs was calculated with the Agilent ChemStation (Agilent Technology, USA).

Tissue histology

The specimens of the brains, livers and intestines were fixed in 10% formalin overnight and then embedded in paraffin. Sections of liver and intestine (3 μ m) and brain (7 μ m) were obtained with a microtome, stained with hematoxylin-eosin, and examined by light microscopy. Images of the stained tissues were captured with a Zeiss Imager A1 and measurements were carried out with the axiovision software. The yolk sac was fixed in 10% formalin and embedded with optimal cutting temperature (O.C.T.) compound. Tissues were cryo-sectioned (4 μ m) with a cryostat and stained with hematoxylin and Oil Red O (Sigma-Aldrich, USA). Total lipid surface area and number of particles per microscopic field were assessed with Image J software (NIH, USA) and calculated as previously described (16).

RNA Isolation and RT-qPCR analysis

Liver and jejunum were homogenized, and RNA was extracted using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Ambion, Thermo Fisher Scientific, USA). RNA concentration was measured using a Biodrop spectrophotometer (NanoDrop 8000, Thermo Scientific, USA) while the absorbance ratio at 260 and 280 nm was used to determine purity as previously described (17, 18). The cDNA was generated by reverse transcription with the All-In-One 5X RT MasterMix from Applied Biological Materials (CAN), and gene expression was amplified with PowerUP SYBR Green Master Mix (Life Technologies, USA) using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied

Biosystems, USA). The thermal profile for qPCR was as follows: initial denaturation at 95°C for 10 minutes, 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing and extension at 60°C for 1 minute. Relative mRNA expression for each gene was obtained by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ calculation method (19). Primers used for the experiments are listed in the supplementary materials (**Table S1**).

Statistical analysis

For the embryonic experiments, data were analyzed by a one-way ANOVA and differences between means were determined by the Tukey post hoc test. For the adult mice, a two-way ANOVA was used for experiments with diet and genetic background as two independent variables. Dunnett's post-hoc multiple comparisons test was chosen to compare our groups with their respective controls. GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, CA) was used for all statistical analyses. Results are presented as means \pm SEM and significance is considered at $P < 0.05$.

3. RESULTS

Embryonic development and tissue histology of *Sar1b*-altered embryos

Murine models for CRD were developed. Both heterozygous *Sar1b*^{del/+} and *Sar1b*^{mut/+} mice were phenotypically healthy and fertile. To confirm and extend the data of our recent publication (5), these heterozygous mice were intercrossed for several generations. Weaned offspring genotyping revealed no viable homozygous *Sar1b*^{del/del} and *Sar1b*^{mut/mut} mice, suggesting that *Sar1b* defects could cause embryonic lethality (**Table 1**). To delineate the stage of development at which homozygous *Sar1b* defects induce lethality, we examined embryos at embryonic days 9.5, 13.5 and 18.5. It was under these conditions that the presence of homozygous embryos (*Sar1b*^{del/del} and *Sar1b*^{mut/mut}) was noticed at the three stages of development.

The morphological examination of the homozygous embryos did not disclose any macroscopic abnormalities compared to control embryos (**Figure 1a**). The *Sar1b* mutated or deleted embryos did not appear growth retarded or less developed. Attention was then shifted to the organs of these embryonic homozygotes. The morphology of the brain, liver and intestine of 18.5-day embryos revealed to be normal (**Figure 2**). We then turned to the yolk sac membrane of 13.5-day embryos and no apparent lipid alterations were observed following Oil Red O staining (**Figure 2**), and they showed similar localization and labeling of MTP and ApoB (**Figure S1**). Nevertheless, histology of the intestine showed a marked increase in white vesicles in homozygous mice that were not present in controls, which could be attributed to lipid accumulation (**Figure 1b**). Analysis of the histological photos with Image J software confirmed a large and significant increase in total lipids surface area (**Figure 1c**) and particle number (**Figure 1d**) in both homozygous mouse lines compared to controls.

Anthropometric parameters and biochemical analysis of plasma from *Sar1b*^{del/+} and *Sar1b*^{mut/+} mice

To find out how mice with *Sar1b* aberrations cope with a high-fat diet, we subjected the animals to either a 60% fat or a regular Chow diet for 8 weeks. Overall, control mice fed a HFD clearly gained more weight (**Figures 3a and 3b**), displayed more adipose tissue (**Figure 3c**), had a larger liver (**Figure 3d**) and developed insulin resistance as reflected by plasma insulin and HOMA-IR

(**Figures 3e-g**). These results were much more pronounced in males than in females. On their part, heterozygotes, especially those with the *Sar1b* mutation subjected to the Chow diet, showed a slight downward trend of anthropometric parameters and insulin resistance compared to controls. However, changes in anthropometric and insulin resistance parameters were more important in heterozygotes on HFD compared to controls, which indicates a significant interaction between genotypes and dietary effects. Importantly, the results were more consistent for the *Sar1b*^{mut/+} mice than for the *Sar1b*^{del/+} mice, and were much more meaningful for males than for females.

With regards to lipid parameters on the Chow diet, our genetically modified mice had lower plasma TG and CHOL concentrations compared to controls (**Figures 4a and 4b**). Although levels of these lipids increased in heterozygotes on the HFD compared with the Chow diet, the elevation was more restricted than in controls. Similar results characterize HDL-CHOL and non-HDL-CHOL (**Figures 4c and 4d**). Again, differences were observed between the *Sar1b*^{mut/+} and *Sar1b*^{del/+} mice, and between male and female mice. Likewise, when lipids were examined in the liver and intestine, genetic *Sar1b* aberrations limited the magnitude of elevations when switching from the regular diet to the HFD (**Figures 4e-h**). Male–female differences were evidenced with respect to lipid accumulation in the jejunum and liver.

As the composition and incorporation of FA in plasma is the result of distinct processes, including intake, metabolism and peripheral utilization, it was necessary to examine the FA response to *Sar1b* genetic defects and following HFD challenge. The complete fatty acid analysis of males and females can be found in Supplementary Data **Tables S3** and **S4**. Both controls and heterozygotes, male and female, show similar FA composition on the regular Chow diet (**Figures 5a-h**). However, divergences were obvious between controls and heterozygous mice on the HFD: male and female heterozygous mice had more saturated fatty acids (SFA) (**Figure 5a**), less polyunsaturated fatty acids (PUFA) (**Figure 5b**), a lower SFA/PUFA ratio (**Figure 5c**), less omega-6 (**Figure 5d**), no changes in omega-3 (**Figure 5e**), but away smaller ratio of omega-6/omega-3 (**Figure 5f**). A small increase was noted in the ratio of 16:1/18:2 (**Figure 5g**) while no changes were noted for the ratio 18:1/18:2 (**Figure 5h**). These results were more significant in *Sar1b*^{mut/+} than in *Sar1b*^{del/+} mice.

Chemical and apolipoprotein composition of lipoproteins isolated from heterozygous *Sar1b* mice

The noticeable decrease in plasma CHOL in heterozygous mice and the fact that *Sar1b* protein is involved in lipoprotein secretion prompted us to analyze the composition of important plasma lipoproteins such as VLDL, LDL, and HDL. As shown in **Table II**, the chemical composition of VLDL was altered in heterozygous mice. In particular, compared to controls, heterozygous mice under Chow or HFD diet had less TG in VLDL, with the exception of *Sar1b*^{mut/+} which exhibited more VLDL-TG on HFD diet. As a consequence, changes were noted in VLDL weight ratio calculated as the ratio of core constituents (TG and CE) to surface constituents (FC + protein + PL). Regarding the composition of LDL and HDL, both heterozygous mice subjected to Chow or HFD diet showed an increase in their proteins, resulting in the reduction of the CE/protein ratio. However, this phenomenon was more predominant and significant in *Sar1b*^{mut/+} mice on the HFD diet.

Apo content was also quantified using SDS-PAGE for these 3 types of lipoproteins, and representative gel images are shown in **Figure 6 (6a-c)**. VLDL and LDL were characterized by a drop in ApoB-100 content in *Sar1b*^{mut/+} and *Sar1b*^{del/+} on HFD compared with their respective controls (**Figures 6d and 6h**). This reduction was drastic for LDL (**Figure 6h**) and caused a large drop in the ApoB-100/ApoA-1 ratio (**Figure 6k**). As for the other Apos, no significant differences were noted in ApoB-48 and ApoE content of VLDL (**Figures 6e and 6f**), ApoE and ApoA-1 content of LDL (**Figures 6i and 6j**), and ApoE, ApoA-1 and ApoA-2 content of HDL (**Figures 6l-o**) between controls and heterozygous mice on Chow or HFD.

***Sar1b* defects and endoplasmic reticulum stress**

Experiments were performed to assess whether defects in *Sar1b* promote ER stress. Our findings show a decreased gene expression of *Protein kinase RNA-like ER kinase (PERK)* in the liver of *Sar1b*^{mut/+} and *Sar1b*^{del/+} females on a Chow diet (**Figure 7a**). On the other hand, no change was observed for *Activating transcription factor 6 (ATF6)* and *Inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)* (**Figures 7b and 7c**), while the expression of *G protein-coupled receptor 78 (GPR78)* slightly raised for both sexes and genotypes in mice on a HFD diet (**Figure 7d**). The results in the gut documented

increased gene expression of *PERK*, *IRE1*, *ATF6* and *GPR78* for mutant mice on the HFD (**Figure 7e-h**).

***Sar1b* defects and liver triglyceride accumulation**

Because HFD increases the development of hepatic steatosis, it was important to evaluate TG accumulation in the liver of *Sar1b*^{mut/+} and *Sar1b*^{del/+} mice in response to HFD. As was the case for liver weight, we have previously observed that hepatic TG of male heterozygous *Sar1b* mice on HFD was significantly lower than that of their respective controls (**Figure 4e**). Confirmation was obtained with histology (**Figure 8a**). Analysis of histological photographs actually revealed a lower abundance of total lipid surface area (**Figure 8b**) and lipid particle number (**Figure 8c**).

***Sar1b* defects and cholesterol metabolism in the liver and intestine.**

The alterations of CHOL concentrations in plasma and lipoproteins could imply a modification of intestinal and/or hepatic CHOL metabolism in heterozygous *Sar1b* mice. We therefore analyzed CHOL accumulation in these organs along with the gene expression of important CHOL metabolism biomarkers. As we have seen previously, slight increase in liver CHOL content was apparent in female *Sar1b*^{mut/+} mice subjected to HFD, as opposed to the reduction in male *Sar1b*^{del/+} mice compared with their respective controls (**Figure 4g**). On the other hand, a consistent reduction in CHOL content was observed in the gut of male and female *Sar1b*^{mut/+} mice subjected to both diets, though more pronounced in male mice under a HFD (**Figure 4h**). PCR analysis was performed to assess the expression of several important genes involved in CHOL endocytosis [proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease (*PCSK9*)], low-density lipoprotein receptor (*LDLr*) (**Figure 9a**), transport [Niemann–Pick C1-like 1 (*NPC1L1*)], scavenger receptor class B type I (*SR-BI*), ATP-binding cassette transporters G8 (*ABCG8*), microsomal triglyceride transfer protein (*MTTP*)] (**Figure 9b**), synthesis [3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (*HMG-CoAr*), sterol regulatory element-binding protein-2 (*SREBP2*)] (**Figure 9c**) and reverse CHOL transport [ATP-binding cassette A1 (*ABCA1*), Liver X receptor α (*LXR α*)] (**Figure 9d**). Notable differences were noted between control and heterozygous mice, liver and intestine, *Sar1b*^{del/+} and *Sar1b*^{mut/+} genotypes, males and females under the two diets.

4. DISCUSSION

Animal models have provided undeniable contributions to basic medical understanding and advancement. In the present study, we have developed mice with targeted defects similar to human *Sar1b* aberrations to gain more insight into CRD pathophysiology. Our findings pointed out the repercussions of *Sar1b* mutation or deletion, including embryonic alterations, lipid profile and lipoprotein composition abnormalities, cholesterol metabolism inconsistencies, insulin resistance, and ER stress.

Given our poor understanding of the interplay between *Sar1b* aberrations and fat feeding-mediated metabolism, we challenged *Sar1b*^{mut/+} and *Sar1b*^{del/+} mice with long-term HFD. The outcomes of these experiments would be all the more important in order to better appraise the recommendations to CRD patients to abstain from fat consumption. In addition, these experimental steps will help test the hypothesis that mice with *Sar1b* defects are protected from HFD-induced weight gain and metabolic abnormalities. As validated by our results, this assumption is largely due to the fact that the mutant mice showed some protection against weight gain, adipose tissue expansion, insulin resistance, hyperlipidemia and hepatic steatosis in a gender and genotype-dependent manner. Our findings may indicate a novel link between *Sar1b*-mediated lipid absorption and metabolism, which is supported by our previous work pointing out that transgenic mice overexpressing *Sar1b* developed a rise in body weight, adiposity, [hepatic steatosis](#), plasma lipids and insulin insensitivity (20).

Our recent study has reported that mice with *Sar1b* allelic disruption showed not only a failure of CM secretion, but also decreased plasma levels of TG, CHOL and HDL-CHOL, all abnormalities observed in CRD patients (21). In the present work, we completed the lipid profiling to include the composition of the different classes of fatty acids in order to examine whether heterozygous mice exhibit fatty acid abnormalities, especially essential fatty acid deficiency. It quickly became apparent that the *Sar1b*^{mut/+} and *Sar1b*^{del/+} mice on HFD presented with more saturated fatty acids, less polyunsaturated fatty acids, a low abundance of n-6, and a reduced SFA/PUFA ratio. More specifically, the *Sar1b*^{mut/+} mice displayed a rise in 16:1(n-7)/18:2(n-6), an essential fatty acid index deficiency, and a decrease in the ratio omega-6/omega-3 (22, 23). Evidence of essential

fatty acid deficiency and a reduction of the ratio omega-6/omega-3 were also documented in Canadian and French CRD patients (24).

In congenital malabsorption disorders, not only the quantity of lipoproteins is altered, but also their quality. Our previous studies on hypobetalipoproteinemia and CRD reported irregular lipoprotein composition in patients as reflected by abnormal profile of VLDL, LDL and HDL (7, 25). In the present work, even with a single disturbed allele, *Sar1b*^{mut/+} and *Sar1b*^{del/+} mice on long-term HFD presented altered lipoprotein composition. At this time, it is not possible to know whether the changes in lipoprotein composition and size are due to abnormalities in their biogenesis or in their bloodstream metabolism.

Heterozygous *Sar1b* mice were phenotypically normal and have been intercrossed to define the genotype of their progeny. Among the multitude of newborns from heterozygous mating, no homozygous for *Sar1b*^{mut/mut} and *Sar1b*^{del/del} were detected which is not consistent with Mendelian frequency ratios. Thus we hypothesized that these discrepancies might be due to embryonic lethality as was the case for homozygous murine models with *ApoB* and *MTTP* deletions (26, 27). Monitoring of the cages revealed on rare occasions dead homozygous *Sar1b*^{del/del} pups following *Sar1b*^{del/+} intercrossing, which was not the case for *Sar1b*^{mut/+} matings. Due to the lack of success in finding live births of homozygotes, we subsequently proceeded to identify them during pregnancy. To this end, genomic DNA was isolated from embryos harvested at different stages of embryonic development from *Sar1b*^{del/+} and *Sar1b*^{mut/+} pregnant mice and PCR-genotyped. It was at this point that homozygous embryos (*Sar1b*^{del/del} and *Sar1b*^{mut/mut}) were identified at embryonic days 9.5, 13.5 and 18.5. Unlike homozygous embryos in abetalipoproteinemia and hypobetalipoproteinemia (with *ApoB* and *MTTP* deletions, respectively), which developed malformations leading to embryo resorption (26, 27), homozygous *Sar1b*^{del/del} and *Sar1b*^{mut/mut} embryos revealed no macroscopic abnormalities at E18.5. Contrary to homozygous embryos for *ApoB* and *MTTP* deletions, which are thought to be generated by an impediment of the yolk sac to transfer lipids to the embryo, homozygous *Sar1b*^{del/del} and *Sar1b*^{mut/mut} embryos displayed normal embryonic growth and no irregular amounts of lipids were observed in the yolk sacs. Histological examination of the brain and other

organs from the homozygous *Sar1b*^{del/del} and *Sar1*^{mutl/mut} embryos did not disclose abnormal phenotypes even if (i) *Sar1b GTPase* gene expression was abundantly found in the brain (28); (ii) *Sar1b GTPase* deletion in zebrafish embryos resulted in the absence of neuro-D-positive neurons (29); and (iii) *Sar1b GTPase* deletion in the developing cerebral cortex impaired radial migration and axon elongation of cortical neurons in mice (30). For the time being, we cannot exclude the possibility that maternal defects in the transfer of fat-soluble vitamins is a potential cause for late death of homozygous embryos with *Sar1b* deletion or mutation. It should also be kept in mind that additional molecular or biochemical abnormalities are most likely behind lethality in the presence of *Sar1b* defects. *Sar1b* is an ubiquitous protein and it may play crucial roles at multiple sites (28). As indicated by Turgeon et al, it is very difficult to determine the cause of prenatal and neonatal death in mice because the complex biological network of relationships between organ defects and physiological processes, which are necessary for mouse survival (31). For example, skeletal and neuromuscular defects can prevent the embryo from breathing (31). Furthermore, metabolic defects could affect the homeostasis of the fetus and prevent it from surviving as documented by various groups (18-20).

Despite the growing interest in the influence of sex and gender on health, little attention has been paid to congenital malabsorption diseases. Yet, they may influence prevalence, onset, response to treatment and prognosis. In the present study, our results showed that female mice were less affected by HFD and *Sar1b* alterations than male mice. Recently, and in line with our findings, a number of investigations have demonstrated that female rodents were more protected than males against the development of obesity and hepatic steatosis when fed a HFD (32-35). Postprandial lipid clearance in females is also faster and their postprandial peak is lower than in males, most likely due to a higher activity of their lipoprotein lipase (36). These sex differences should not be overlooked in this era of personalized medicine, especially since several studies have reported sex differences in lipid and lipoprotein metabolism (37-39). Clearly, other useful approaches should be undertaken to understand the mechanisms associated with gender and how the discrepancies affect outcomes and treatments of CRD.

The genotype-phenotype relationship is also an important factor to take into account when engineering genetically modified mice. Noteworthy, the possible presence of allelic heterogeneity indicates that different mutations of the same genetic locus can lead to divergent clinical phenotypes (40). Furthermore, genetic compensation is also a widespread phenomenon that must be taken into consideration (41). The loss of function of a protein triggered by a knockout could lead to the upregulation of other genes or proteins that can compensate for this impairment, which explains why some knockdown resulted in more severe phenotypes than those of knockout genetic manipulations (41). It was also noted in many diseases that loss-of-function mutations rarely occur in contrast with subtle mutations that are much more common and influence protein properties (42, 43). Therefore, defects in a gene may result in more severe phenotypes or, on the contrary, cause a compensatory mechanism that is not relevant to the disease observed in humans (44). In a previous study, there was genetic compensation with the complete deletion of *Sar1b* in epithelial Caco-2/15 cells (18). This deletion resulted in upregulation of *Sar1a* gene and protein expression, still allowing the secretion of CM despite the genetic defect of *Sar1b* GTPase. Only the double knockout of *Sar1a* and *Sar1b* led to the abrogation of lipid secretion. For these reasons, we decided to develop mice with a large base pair deletion and mice with a subtle mutation that was shown to have a severe clinical impact in patients (45). Interestingly, the point mutation of the *Sar1b* gene (described in CRD patients) was more deleterious than the deletion in our mouse models. The exact reasons for these differences are unknown, but allelic heterogeneity or genetic compensation could represent important and influential factors that possibly contributed to our findings since the deletion resulted in the absence of Sar1b GTPase protein production whereas the point mutation led to the formation of an unstable and/or non-functional protein (42, 43).

Our last published paper reported that mice with altered *Sar1b* can recapitulate some aspects of CRD (12). However, many of these biochemical characteristics were only slightly altered, most likely because heterozygous mice with *Sar1b* defects were only fed a Chow diet with limited fat intake. In the present study, not only did we confirm several previous biochemical factors, but our findings also point out that these genetically modified mice on a HFD are more representative

of CRD because they exhibited a lower final body weight, less adipose tissue, and abnormal CHOL concentrations and metabolism in response to intestinal fat absorption.

Our findings suggest that alteration of *Sar1b* promoted ER stress, especially in the intestine of mice on a HFD, since the gene expression of key factors such as *PERK*, *IRE1*, *ATF6*, and *GPR78* was increased. *In vitro* studies showed that *Sar1b* mutations caused defective transport of proteins in the ER, leading to ER stress as a result of accumulation of misfolded proinsulin (46).

In conclusion, this paper has shed light on various aspects of the CRD and the *Sar1b* GTPase protein, which were unknown until now. Our results concluded that homozygous alteration of *Sar1b* in mice affects their postnatal viability, while documenting abnormalities in diverse biochemical parameters in association with diet, sex and *Sar1b* genotype.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data supporting the findings of this study are contained in the manuscript and in the supplementary file. Raw data can be shared upon request by contacting Nickolas Auclair.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jean-François Schmouth and his team at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) for the development of the murine models of *Sar1b* deletion and mutation. We also thank Nathalie Patey and Catherine Fallet-Bianco for their pathological evaluation of the histological tissues and Irene Londono for the immunohistochemistry experiments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Nickolas Auclair: Conceptualization, Methodology, Formal Analysis, Investigation, Writing-Original Draft, Visualization **Alain T Sané:** Validation, Investigation, Supervision **Léna Ahmarani:** Investigation **Nour-El-Houda Ould-Chikh:** Investigation **Schohraya Spahis:** Writing – Review and Editing, Resources, Supervision **Emile Levy:** Conceptualization, Methodology, Writing-Original Draft, Supervision, Project administration, Funding acquisition

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

The funders had no role in study design, decision to publish, or preparation of the manuscript. Therefore, the authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Abumrad NA, Davidson NO. Role of the gut in lipid homeostasis. *Physiol Rev.* 2012;92(3):1061-85.
2. Levy E. Insights from human congenital disorders of intestinal lipid metabolism. *J Lipid Res.* 2015;56(5):945-62.
3. Adeli K, Lewis GF. Intestinal lipoprotein overproduction in insulin-resistant states. *Curr Opin Lipidol.* 2008;19(3):221-8.
4. Xiao C, Stahel P, Lewis GF. Regulation of Chylomicron Secretion: Focus on Post-Assembly Mechanisms. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2019;7(3):487-501.
5. Newberry EP, Strout GW, Fitzpatrick JAJ, Davidson NO. Liver-specific deletion of Mttp versus Tm6sf2 reveals distinct defects in stepwise VLDL assembly. *J Lipid Res.* 2021;62:100080.
6. Hussain MM, Shi J, Dreizen P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res.* 2003;44(1):22-32.
7. Levy E, Roy CC, Thibault L, Bonin A, Brochu P, Seidman EG. Variable expression of familial heterozygous hypobetalipoproteinemia: transient malabsorption during infancy. *J Lipid Res.* 1994;35(12):2170-7.
8. Black DD, Hay RV, Rohwer-Nutter PL, Ellinas H, Stephens JK, Sherman H, et al. Intestinal and hepatic apolipoprotein B gene expression in abetalipoproteinemia. *Gastroenterology.* 1991;101(2):520-8.
9. Lee J, Hegele RA. Abetalipoproteinemia and homozygous hypobetalipoproteinemia: a framework for diagnosis and management. *J Inherit Metab Dis.* 2014;37(3):333-9.
10. Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, et al. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nature genetics.* 2003;34(1):29-31.
11. Siddiqi S, Mansbach CM, 2nd. Phosphorylation of Sar1b protein releases liver fatty acid-binding protein from multiprotein complex in intestinal cytosol enabling it to bind to endoplasmic reticulum (ER) and bud the pre-chylomicron transport vesicle. *The Journal of biological chemistry.* 2012;287(13):10178-88.
12. Auclair N, Sane AT, Ahmarani L, Patey N, Beaulieu JF, Peretti N, et al. Sar1b mutant mice recapitulate gastrointestinal abnormalities associated with chylomicron retention disease. *Journal of lipid research.* 2021;62:100085.
13. Morel S, Leahy J, Fournier M, Lamarche B, Garofalo C, Grimard G, et al. Lipid and lipoprotein abnormalities in acute lymphoblastic leukemia survivors. *J Lipid Res.* 2017;58(5):982-93.
14. Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem.* 1959;234(3):466-8.

15. Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res.* 1986;27(1):114-20.
16. Piao D, Ritchey JW, Holyoak GR, Wall CR, Sultana N, Murray JK, et al. In vivo percutaneous reflectance spectroscopy of fatty liver development in rats suggests that the elevation of the scattering power is an early indicator of hepatic steatosis. *Journal of Innovative Optical Health Sciences.* 2018;11(04):1850019.
17. Sane A, Ahmarani L, Delvin E, Auclair N, Spahis S, Levy E. SAR1B GTPase is necessary to protect intestinal cells from disorders of lipid homeostasis, oxidative stress, and inflammation. *Journal of lipid research.* 2019;60(10):1755-64.
18. Sane AT, Seidman E, Peretti N, Kleme ML, Delvin E, Deslandres C, et al. Understanding Chylomicron Retention Disease Through Sar1b Gtpase Gene Disruption: Insight From Cell Culture. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2017;37(12):2243-51.
19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
20. Levy E, Spahis S, Garofalo C, Marcil V, Montoudis A, Sinnet D, et al. Sar1b transgenic male mice are more susceptible to high-fat diet-induced obesity, insulin insensitivity and intestinal chylomicron overproduction. *J Nutr Biochem.* 2014;25(5):540-8.
21. Peretti N, Sassolas A, Roy CC, Deslandres C, Charcosset M, Castagnetti J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of chylomicron retention disease based on a review of the literature and the experience of two centers. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:24.
22. Levy E, Lepage G, Bendayan M, Ronco N, Thibault L, Galeano N, et al. Relationship of decreased hepatic lipase activity and lipoprotein abnormalities to essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patients. *J Lipid Res.* 1989;30(8):1197-209.
23. Lepage G, Levy E, Ronco N, Smith L, Galeano N, Roy CC. Direct transesterification of plasma fatty acids for the diagnosis of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis. *J Lipid Res.* 1989;30(10):1483-90.
24. Peretti N, Roy CC, Sassolas A, Deslandres C, Drouin E, Rasquin A, et al. Chylomicron retention disease: a long term study of two cohorts. *Mol Genet Metab.* 2009;97(2):136-42.
25. Levy E, Marcel Y, Deckelbaum RJ, Milne R, Lepage G, Seidman E, et al. Intestinal apoB synthesis, lipids, and lipoproteins in chylomicron retention disease. *J Lipid Res.* 1987;28(11):1263-74.
26. Farese RV, Jr., Ruland SL, Flynn LM, Stokowski RP, Young SG. Knockout of the mouse apolipoprotein B gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995;92(5):1774-8.
27. Raabe M, Flynn LM, Zlot CH, Wong JS, Veniant MM, Hamilton RL, et al. Knockout of the abetalipoproteinemia gene in mice: reduced lipoprotein secretion in heterozygotes and

embryonic lethality in homozygotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(15):8686-91.

28. Marcil V, Seidman E, Sinnott D, Sanchez R, Spahis S, Sane A, et al. Tissue distribution and regulation of the small Sar1b GTPase in mice. *Cell Physiol Biochem*. 2014;33(6):1815-26.

29. Levic DS, Minkel JR, Wang WD, Rybski WM, Melville DB, Knapik EW. Animal model of Sar1b deficiency presents lipid absorption deficits similar to Anderson disease. *J Mol Med (Berl)*. 2015;93(2):165-76.

30. Li X, Yan M, Guo Z, Yan L, Feng R, Zhu H, et al. Inhibition of Sar1b, the Gene Implicated in Chylomicron Retention Disease, Impairs Migration and Morphogenesis of Developing Cortical Neurons. *Neuroscience*. 2020;449:228-40.

31. Turgeon B, Meloche S. Interpreting neonatal lethal phenotypes in mouse mutants: insights into gene function and human diseases. *Physiol Rev*. 2009;89(1):1-26.

32. Heintz MM, McRee R, Kumar R, Baldwin WS. Gender differences in diet-induced steatotic disease in Cyp2b-null mice. *PLoS One*. 2020;15(3):e0229896.

33. Bachmann AM, Morel JD, El Alam G, Rodriguez-Lopez S, Imamura de Lima T, Goeminne LJE, et al. Genetic background and sex control the outcome of high-fat diet feeding in mice. *iScience*. 2022;25(6):104468.

34. Toth ME, Dukay B, Peter M, Balogh G, Szucs G, Zvara A, et al. Male and Female Animals Respond Differently to High-Fat Diet and Regular Exercise Training in a Mouse Model of Hyperlipidemia. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8).

35. Maric I, Krieger JP, van der Velden P, Borchers S, Asker M, Vujicic M, et al. Sex and Species Differences in the Development of Diet-Induced Obesity and Metabolic Disturbances in Rodents. *Front Nutr*. 2022;9:828522.

36. Staprans I, Rapp JH, Pan XM, Ong DL, Feingold KR. Testosterone regulates metabolism of plasma chylomicrons in rats. *Arteriosclerosis*. 1990;10(4):591-6.

37. Palmisano BT, Zhu L, Eckel RH, Stafford JM. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism. *Mol Metab*. 2018;15:45-55.

38. Wang X, Magkos F, Mittendorfer B. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism: it's not just about sex hormones. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(4):885-93.

39. Varlamov O, Bethea CL, Roberts CT, Jr. Sex-specific differences in lipid and glucose metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:241.

40. Prasun P, Pradhan M, Agarwal S. One gene, many phenotypes. *J Postgrad Med*. 2007;53(4):257-61.

41. El-Brolosy MA, Stainier DYR. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet*. 2017;13(7):e1006780.

42. Oliver PL, Davies KE. New insights into behaviour using mouse ENU mutagenesis. *Hum Mol Genet*. 2012;21(R1):R72-81.

43. Barbaric I, Miller G, Dear TN. Appearances can be deceiving: phenotypes of knockout mice. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2007;6(2):91-103.
44. Elsea SH, Lucas RE. The mousetrap: what we can learn when the mouse model does not mimic the human disease. *ILAR J*. 2002;43(2):66-79.
45. Roy CC, Levy E, Green PH, Sniderman A, Letarte J, Buts JP, et al. Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology*. 1987;92(2):390-9.
46. Zhu R, Li X, Xu J, Barrabi C, Kekulandara D, Woods J, et al. Defective endoplasmic reticulum export causes proinsulin misfolding in pancreatic beta cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2019;493:110470.

5.3.2 TABLES

Table 1: Genotypes of offspring from intercrosses of Sar1b^{del/+} mice and Sar1b^{mut/+} mice

				Sar1b genotype		
Genotypes of embryos or postnatal mice from intercross of heterozygous Sar1b^{del/+} mice						
Mating	Litters	Average pups/litter	Total pups	+/+	del/+	del/del
Postnatal	21	6.28	132	39(29.5%)	86(65.2%)	7 ^a (5.3%)
E18.5	4	7.75	31	8 (25.8%)	13 (41.9%)	10 (32.3%)
E13.5	3	7.33	22	8 (36.36%)	7 (31.81%)	7 (31.81%)
E9.5	2	10	20	0 (0%)	19 (95%)	1 (5%)
Genotypes of embryos or postnatal mice from intercross of heterozygous Sar1b^{mut/+} mice						
Mating	Litters	Average pups/litter	Total pups	+/+	mut/+	mut/mut
Postnatal	35	6.11	214	129(60.3%)	85(39.7%)	0
E18.5	3	9.33	28	9 (32.1%)	15 (53.6%)	4 (14.3%)
E13.5	3	7.66	23	5 (21.7%)	14 (60.9%)	4 (17.4%)
E9.5	3	8	24	8 (33.3%)	12 (50%)	4 (16.7%)

Male and female heterozygous Sar1b^{del/+} and Sar1b^{mut/+} mice were mated. Part of the tail of postnatal mice was collected and genotyped. Regarding embryos, as soon as a vaginal plug was found on female mice, they were considered pregnant at day E0.5. After 9, 13 or 18 days, female mice were euthanized with a CO₂ stream and the embryos were collected. A portion of the yolk sac was removed for genotyping. The number of litters, average pups per litter, total number of pups and number of pups for each genotype were calculated.

^aPups were dead at birth..

Table 2 Chemical composition of lipoproteins isolated from plasma of Sar1b^{del/+} and Sar1b^{mut/+} mice under Chow and high-fat diets

Lipoproteins	Diet	Genotype	Composition (%)					Weight ratios			
			TG	CE	FC	PL	PR	TG/CE	CE/PL	CE/PR	(TG+CE)/(FC+PL+PR)
CHOL	CHOW	Ctrl	52.85±4.32	2.68±0.27	8.13±0.30	18.24±1.99	18.10±2.52	20.0141±3.1778	0.1483±0.0204	0.1506±0.0247	1.2686±0.2079
		Sar1b ^{del/+}	30.32±2.41****	2.08±0.42	5.50±0.67*	41.43±0.38***	20.68±1.70	15.4371±4.2427	0.0502±0.0105	0.0995±0.0119	0.4804±0.0436***
		Sar1b ^{mut/+}	45.36±2.01	2.66±0.26	8.00±0.92	23.65±4.64	20.34±2.41	17.2875±2.3564	0.1158±0.0187	0.1330±0.0220	0.9259±0.0650 *
VLDL	HFD	Ctrl	47.34±4.94	2.59±1.04	4.87±0.55	24.12±3.29	21.07±2.94	23.2828±12.8931	0.1056±0.0377	0.1277±0.0524	1.0158±0.1988
		Sar1b ^{del/+}	35.71±2.58 ^{SS}	4.18±0.14 ^S	3.93±1.47	23.94±6.73	32.23±3.28 ^{SSS}	8.5547±0.7934	0.1908±0.0598	0.1309±0.0118	0.6667±0.0678 ^S
		Sar1b ^{mut/+}	56.54±0.30 ^S	3.01±0.61	8.50±0.18 ^{SSS}	12.16±2.26 ^{SS}	19.8±1.91	19.5487±3.7149	0.2621±0.0950 ^{SS}	0.1517±0.0243	1.4723±0.0264 ^{SS}
LDL	CHOW	Ctrl	10.96±2.28	23.32±1.63	11.06±0.44	32.92±3.41	21.74±2.57	0.4767±0.1273	0.7145±0.0806	1.0925±0.1822	0.5229±0.0437
		Sar1b ^{del/+}	12.85±2.54	20.62±1.05	11.05±0.40	27.24±0.92	28.24±1.21**	0.6312±0.1561	0.7564±0.0143	0.7314±0.0497**	0.5040±0.0361
		Sar1b ^{mut/+}	13.08±2.28	20.02±1.80	11.12±0.85	31.36±3.40	24.42±2.73	0.6602±0.1277	0.6464±0.0949	0.8383±0.1666	0.4974±0.0621

	Ctrl	7.31±1.29	23.32±1.63	12.57±0.63	37.69±1.56	19.11±1.12	0.3142±0.0527	0.6212±0.0644	1.2279±0.1405	0.4432±0.0476
HFD	Sar1b ^{del/+}	7.18±1.96	22.16±1.21	11.44±0.57	37.36±3.11	21.85±0.38	0.3245±0.0855	0.5996±0.0794	1.0137±0.0389	0.4169±0.0492
	Sar1b ^{mut/+}	9.01±2.03	25.41±0.75	12.99±0.33	23.79±2.85 ^{sssss}	28.79±1.74 ^{sssss}	0.3569±0.0899	1.0820±0.1198 ^{sssss}	0.8850±0.0480 ^s	0.5257±0.0350
	Ctrl	0.75±0.08	22.14±0.98	4.60±0.29	32.52±1.69	40.00±1.31	0.0336±0.0029	0.6834±0.0553	0.5541±0.0308	0.2970±0.0171
HDL	Sar1b ^{del/+}	0.66±0.11	20.45±1.04	4.42±0.38	30.61±3.06	43.86±4.24	0.0320±0.0036	0.6730±0.0591	0.4724±0.0683	0.2678±0.0187
	Sar1b ^{mut/+}	0.73±0.36	19.74±1.84	4.80±0.15	30.34±0.91	44.39±2.30	0.0388±0.0217	0.6504±0.0545	0.4478±0.0653	0.2579±0.0252
	Ctrl	1.14±0.81	18.99±1.01	4.91±0.40	37.10±2.17	37.87±2.02	0.0579±0.0386	0.5144±0.0507	0.5038±0.0461	0.2526±0.0286
HFD	Sar1b ^{del/+}	0.76±0.41	19.14±1.49	4.60±0.36	35.34±2.78	40.16±2.29	0.0400±0.0229	0.5454±0.0626	0.4788±0.0521	0.2488±0.0231
	Sar1b ^{mut/+}	0.38±0.05	17.29±0.48	4.36±0.22	33.19±0.88	44.78±0.84 ^{ss}	0.0222±0.0025	0.5214±0.0226	0.3863±0.0134 ^s	0.2147±0.0076

Plasma lipoproteins were separated by discontinuous density gradient ultracentrifugation. After preliminary centrifugation to remove chylomicrons (CM), very-low-density (VLDL), low-density (LDL) and high-density (HDL) lipoproteins were isolated at densities of 1.006 g/ml, 1.063 g/ml, and 1.210 g/ml, respectively. CE: Cholesteryl ester; FC: Free cholesterol; HFD: High-fat diet, TG: Triglycerides; PL: Phospholipids; PR: Proteins. Results represent the means ± SEM of 3-4 pooled plasma from mice. Data were analyzed using two-way ANOVA with the Dunnett Post-Hoc test. * P< 0.05, ** P< 0.01, ***P< 0.001 versus CHOW Ctrl; \$ P< 0.05, \$\$ P< 0.01, \$\$\$ P< 0.0001, \$\$\$\$ P< 0.0001 versus HFD Ctrl.

5.3.3 FIGURES

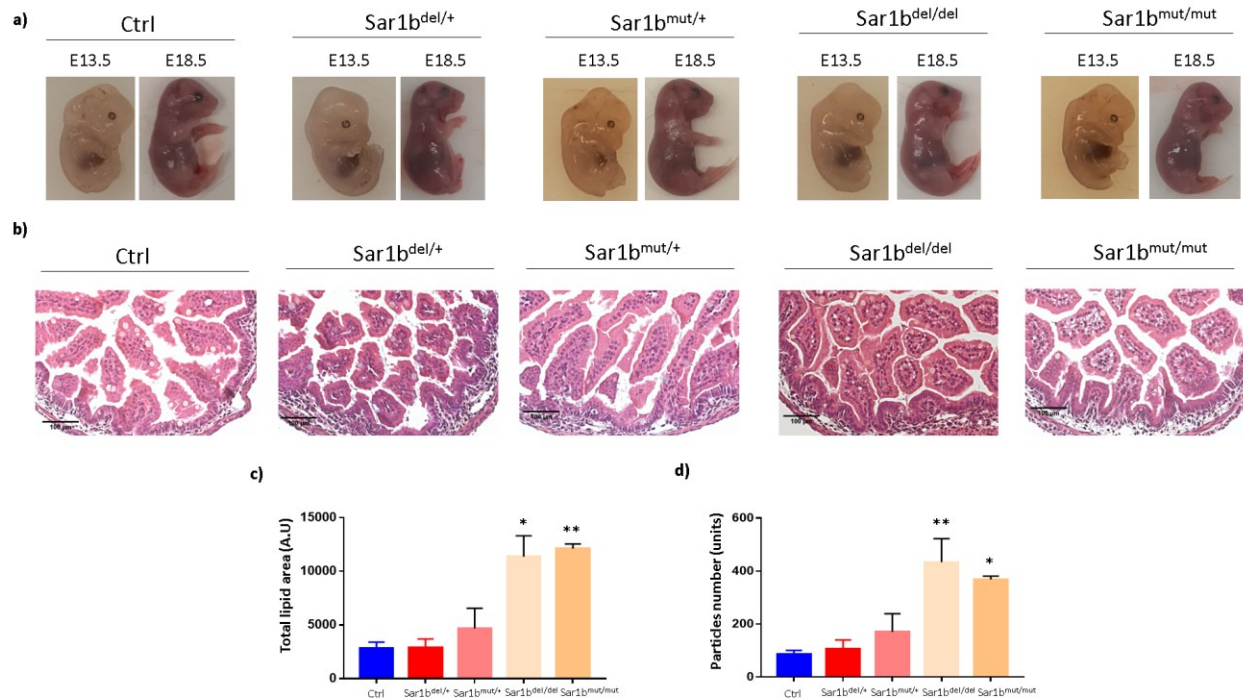


Figure 1 Embryonic development and tissue histology of Sar1b-altered embryos.

Heterozygous male and female Sar1b^{del/+} and Sar1b^{mut/+} mice were mated. As soon as a vaginal plug was found on the female mice, they were considered pregnant at day E0.5. After 13 or 18 days, the female mice were euthanized with a CO₂ stream and the embryos were collected. Photographs of the embryos at these 2 different time points were taken (a) and the intestines were isolated from the embryos at E18.5, fixed with formalin, embedded in paraffin, and stained with hematoxylin and eosin. Photographs of these intestines were taken under the microscope (b) and the total lipid surface area (c), as well as the number of lipid particles (d), were analyzed with image j software by applying a specific threshold, followed by the use of the particle analysis tool. Results represent means ± SEM of at least 2 embryos. * P<0.05, ** P<0.01, versus controls (ctrl).

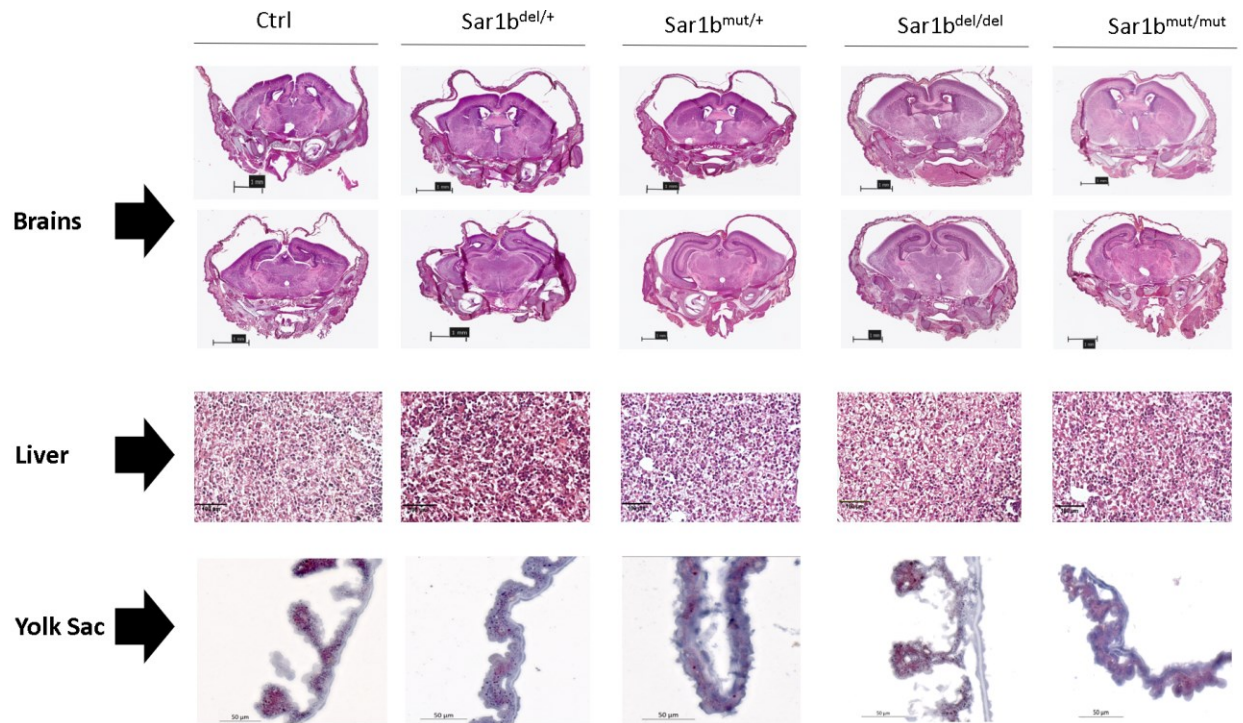


Figure 2 Histology of brain, liver and yolk sac of Sar1b^{del/+} and Sar1b^{mut/+} mouse embryos.

Heterozygous male and female Sar1b^{del/+} and Sar1b^{mut/+} mice were bred. As soon as a vaginal plug was found, the female mice were considered pregnant at day E0.5. After 18 days, the female mice were euthanized with a CO₂ stream and the embryos were collected. Livers and brains were isolated from the embryos at E18.5, fixed with formalin and embedded in paraffin. After staining with hematoxylin and eosin, photographs of these brains and livers were taken under the microscope. Yolk sacs were taken from mice at 13.5 days of age, fixed in formalin and embedded in O.C.T. Photographs of these membranes were also taken under the microscope and stained with Oil Red O and hematoxylin. At least two specimens per group were used for specified analyses.

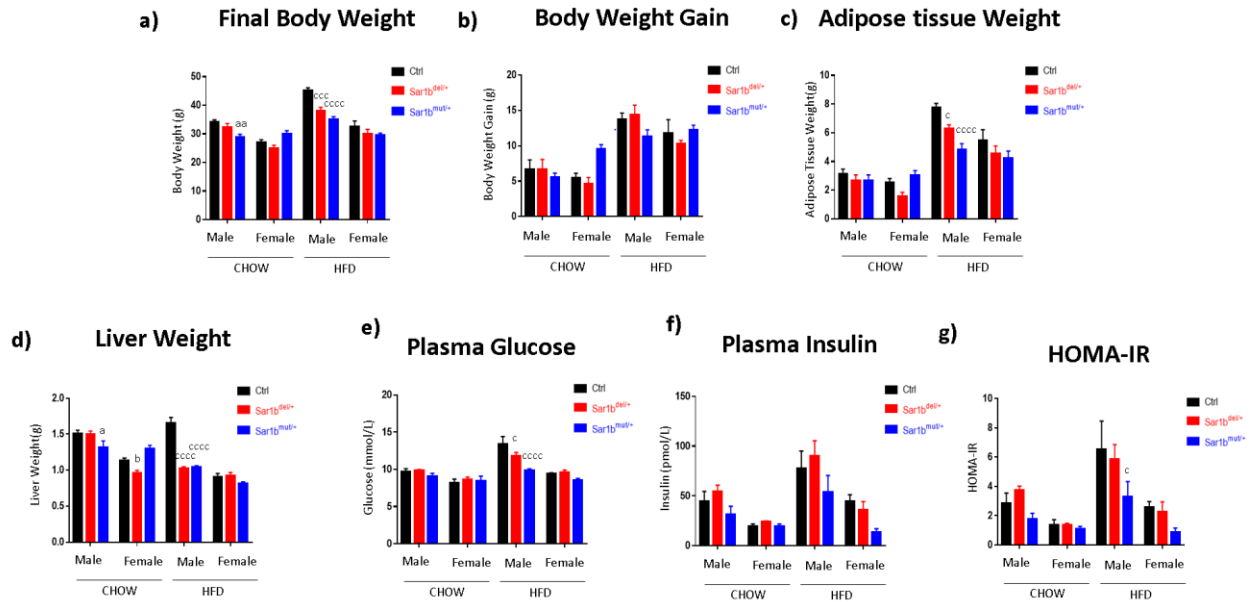


Figure 3 Impact of *Sar1b* mutation or deletion on anthropometric and insulin resistance parameters. Five-week-old male and female controls (Ctrl), *Sar1b*^{del/+}, and *Sar1b*^{mut/+} mice were fed a Chow or a high-fat diet (HFD) for 8 weeks. After a 6-hour fast, the body weight (**a**) of the mice was taken and the body weight gain was calculated (**b**) just before the mice were sacrificed by cardiac puncture. The weight of adipose tissue (**c**) and liver (**d**) was recorded, the tissues were flash frozen, and plasma was isolated from blood. Plasma glucose (**e**) was analyzed with a glucometer while insulin (**f**) was analyzed in plasma with commercial kits. HOMA-IR (**g**) was calculated with the previous plasma parameters. Results represent means \pm SEM of at least 5 mice. a = $P < 0.05$, aa = $P < 0.01$, aaa = $P < 0.001$ versus Chow ctrl male; b = $P < 0.05$ versus CHOW ctrl female; c = $P < 0.05$, ccc = $P < 0.001$; cccc = $P < 0.0001$ versus HFD ctrl male.

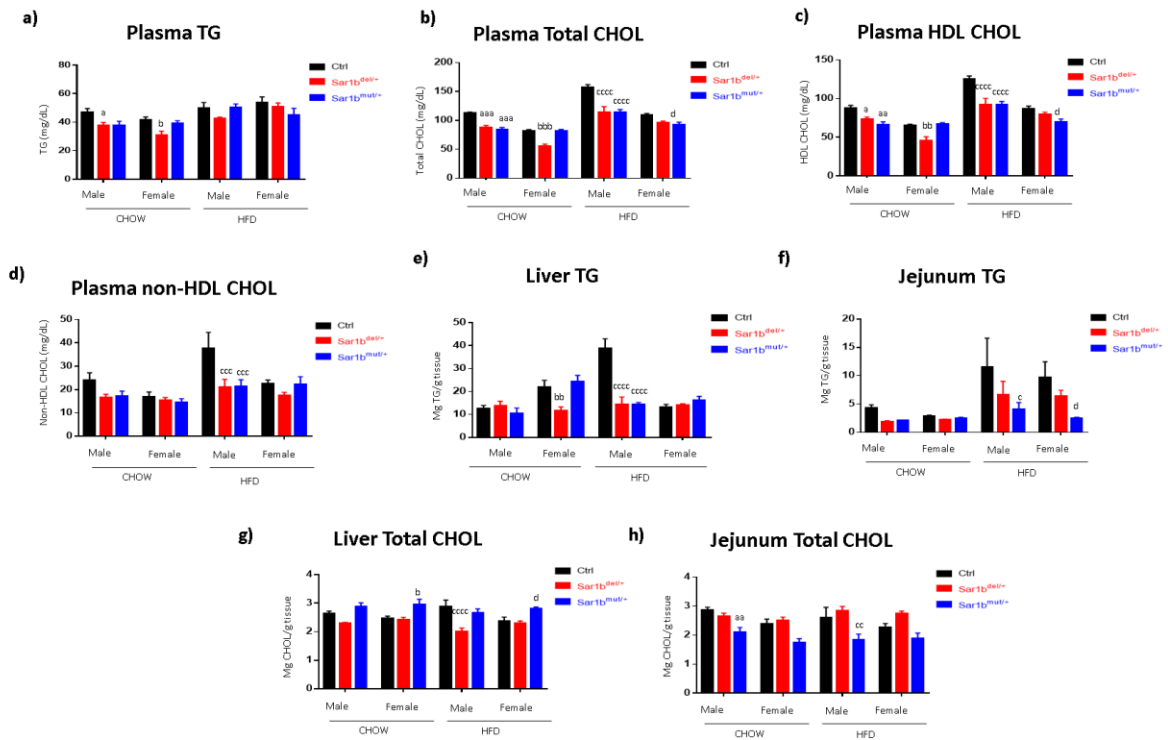


Figure 4 Effects of *Sar1b* mutation or deletion on plasma and tissues lipid parameters. Five-week-old male and female controls (Ctrl), *Sar1b^{del/+}*, and *Sar1b^{mut/+}* mice were fed a Chow or a high-fat diet (HFD) for 8 weeks. After a 6-hour fast, mice were sacrificed by cardiac puncture, tissues were flash frozen, and plasma was isolated from blood. Plasma triglycerides (TG) (a) and total cholesterol (CHOL) (b) were analyzed in plasma with commercial kits. As for HDL, it was isolated by precipitation with polyethylene Glycol 6000 (c), while non-HDL-CHOL (d) was calculated with the previous plasma parameters. As for lipids in the tissues, flash-frozen livers and jejunum of male and female mice were extracted with Folch (2:1 chloroform/methanol). After drying the lipids, they were resuspended in H₂O for TG (e and f) and CHOL (g and h) analysis by commercial kits. Results represent means ± SEM of at least 5 mice. a = P < 0.05, aa = P < 0.01, aaa = P < 0.001 versus Chow ctrl male; b = P < 0.05, bb = P < 0.01, bbb = P < 0.001 versus Chow ctrl female; c = P < 0.05, cc = P < 0.01, ccc = P < 0.001, cccc = P < 0.0001 versus HFD ctrl male; d = P < 0.05, dddd = P < 0.0001 versus HFD ctrl female.

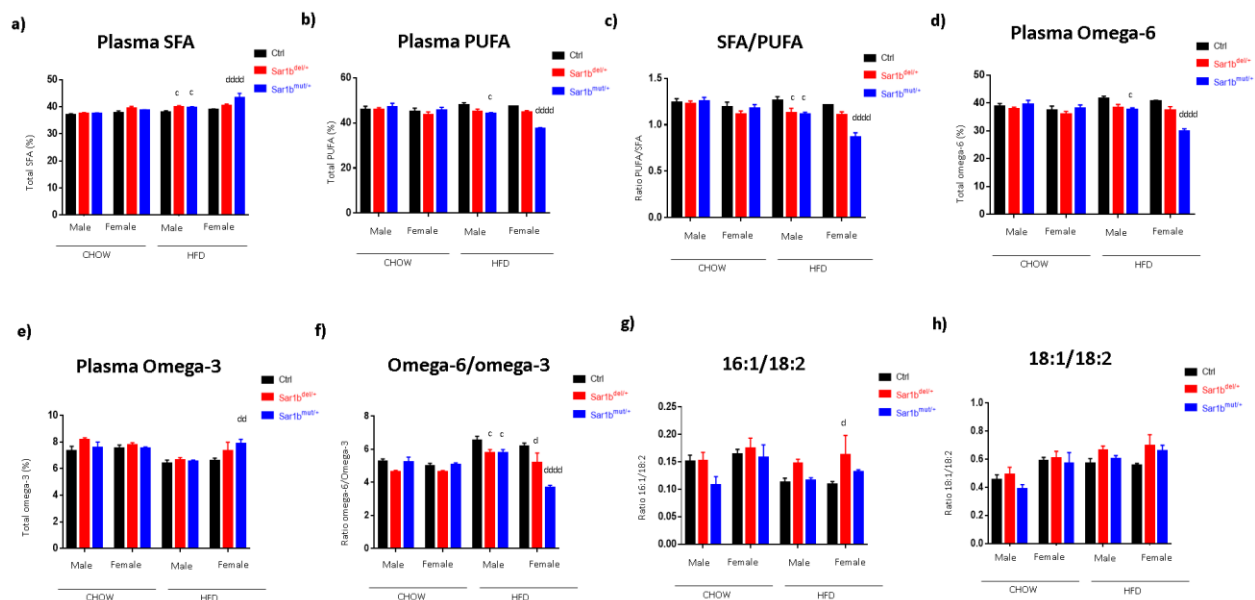


Figure 5 Effects of Sar1b alteration on plasma fatty acid composition. Five-week-old male and female controls (Ctrl), Sar1b^{del/+}, and Sar1b^{mut/+} mice were fed a Chow or a high-fat diet (HFD) for 8 weeks. After a 6-hour fast, mice were sacrificed by cardiac puncture, tissues were flash frozen, and plasma was isolated from blood. Fatty acids were extracted from plasma by transesterification and separated by gas chromatography as detailed in the Materials and Methods section. Total saturated fatty acids (SFA) (a), polyunsaturated fatty acids (PUFA) (b), SFA/PUFA ratio (c), omega-6 (d) and omega-3 (e) are shown. Specific ratios of omega 6/omega-3 (f), 16:1/18:2 (g) and 18:1/18:2 (h) are also demonstrated. Results represent means ± SEM of at least 4 mice; c = P < 0.05 versus HFD ctrl male; dd = P < 0.01, dddd = P < 0.0001 versus HFD ctrl female.

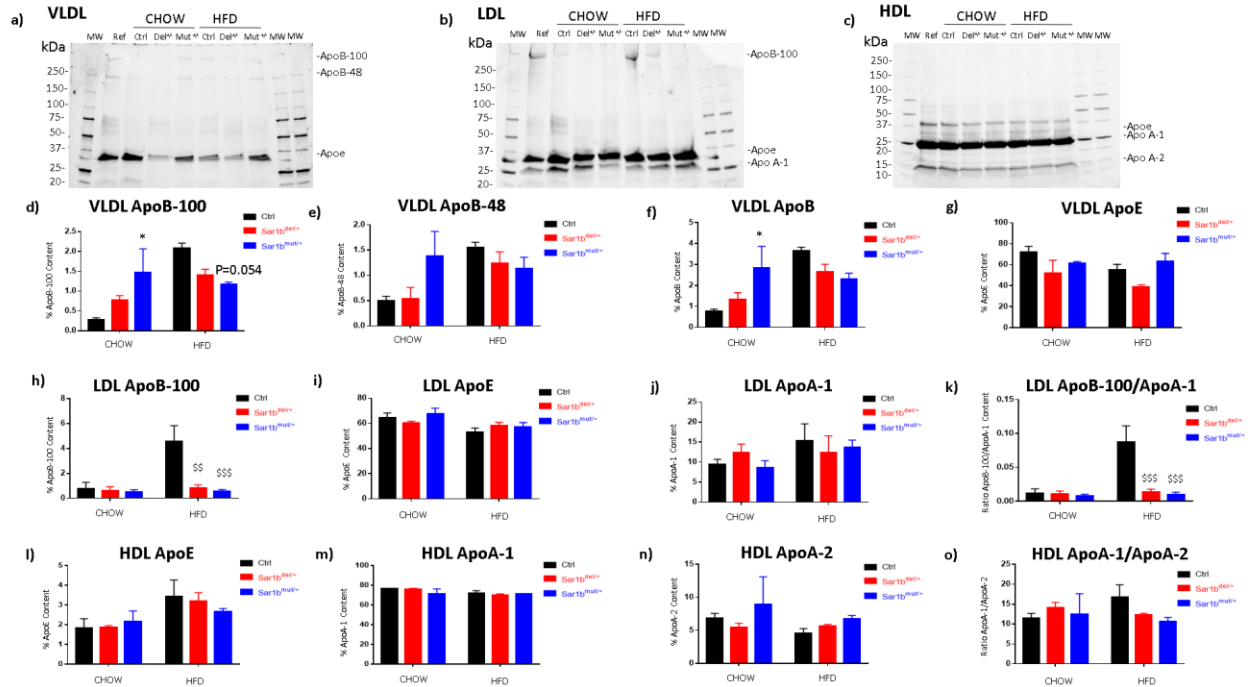


Figure 6 VLDL and LDL fractions of Sar1b^{del/+} and Sar1b^{mut/+} on HFD diet have less ApoB-100 than controls. Five-week-old male and female controls (Ctrl), Sar1b^{del/+}, and Sar1b^{mut/+} mice were fed a Chow or a high-fat diet (HFD) for 8 weeks. After a 6-hour fast, mice were sacrificed by cardiac puncture and plasma was isolated from blood. Plasma from 3-5 mice was pooled and subjected to sequential gradient centrifugation to isolate VLDL, LDL, and HDL. Lipoprotein fractions were loaded into a 4-20% SDS-PAGE gel with Biorad stain-free technology. Apolipoprotein (Apo) bands were directly analyzed with Biorad Chemidoc and the percentage of a specific Apo was calculated based on the total Apo content. Example gels are given for VLDL (a), LDL (b), and HDL (c), and results for Apos are given for ApoB-100 (d), ApoB-48 (e), total ApoB (f), and ApoE (g) for VLDL, ApoB-100 (h), ApoE (i), ApoA-1 (j), and ApoB-100/ApoA-1 ratio (k) for LDL, and ApoE (l), ApoA-1 (m), ApoA-2 (n), and ApoA-1/ApoA-2 ratio (o) for HDL. Results represent means \pm SEM from 3 pools of mouse plasma. Data were analyzed using 2-way ANOVA with Dunnett's post hoc test. * P<0.05 versus Chow Ctrl; \$\$ P< 0.01, \$\$\$ P< 0.001 versus HFD Ctrl.

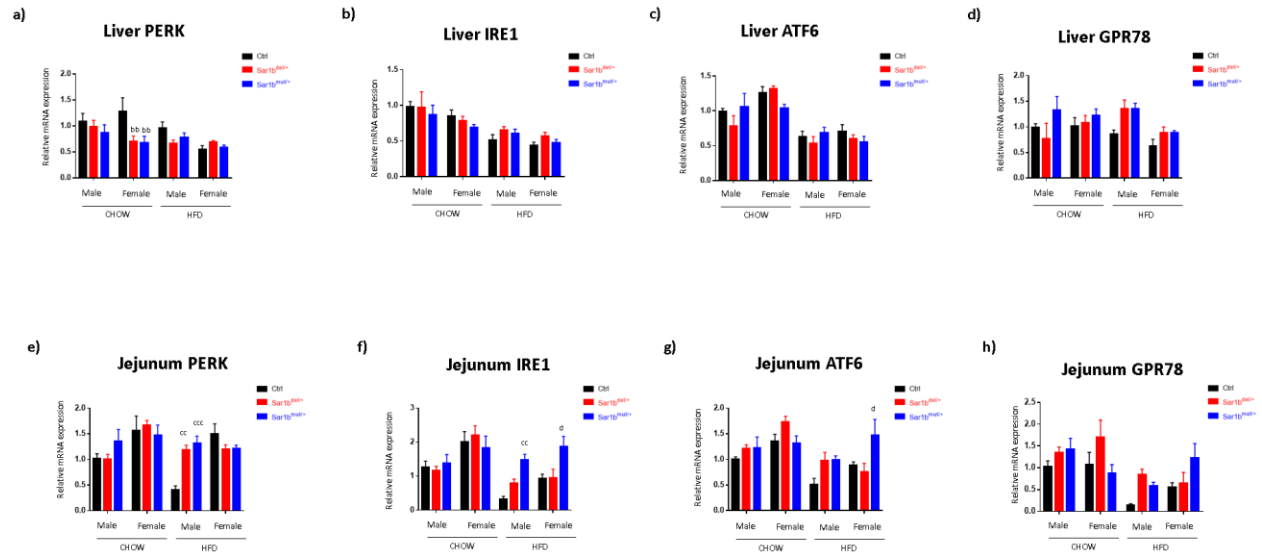


Figure 7 Sar1b mutation affects reticulum endoplasmic stress. Five-week-old male and female controls (Ctrl), Sar1b^{del/+} (del^{+/-}), and Sar1b^{mut/+} (mut^{+/-}) mice were fed a Chow or a high-fat diet (HFD) for 8 weeks. After a 6-hour fast, mice were sacrificed by cardiac puncture, and tissues were collected and flash-frozen. Liver and intestinal mRNAs were extracted with Trizol and cDNAs were generated by reverse transcription. For both tissues, PERK, IRE1, GPR78 and ATF6 were amplified by qPCR (**a-d** for the liver and **e-h** for the intestine). Results represent means \pm SEM from at least 4 mice. bb= $P < 0.01$ versus female Chow ctrl. cc = $P < 0.01$, ccc = $P < 0.001$ versus male HFD ctrl; d = $P < 0.05$ versus female HFD ctrl.

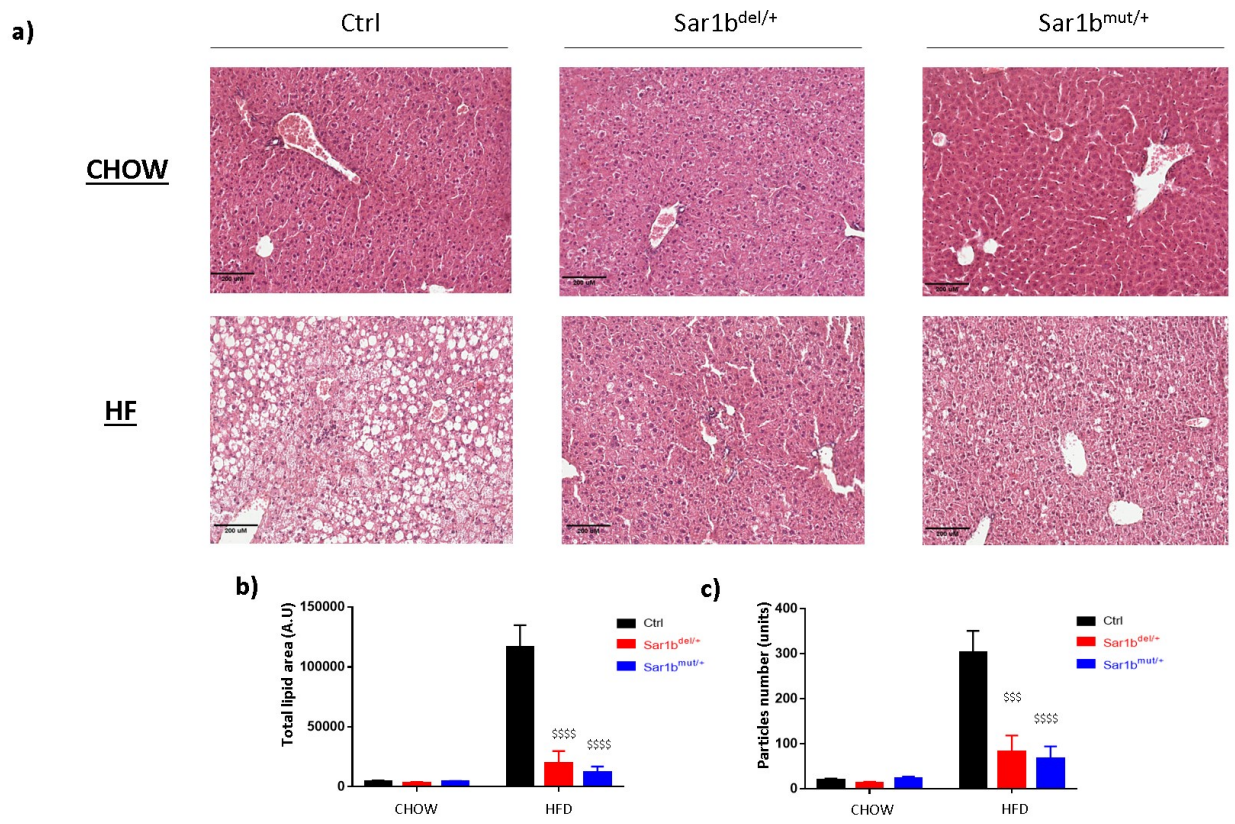


Figure 8 **Histological lipids accumulation in the liver of Sar1b-altered mice.** Five-week-old male and female controls (Ctrl), Sar1b^{del/+}, and Sar1b^{mut/+} mice were fed a Chow or a high-fat diet (HFD) for 8 weeks. After a 6-hour fast, mice were sacrificed by cardiac puncture, and tissues were fixed with formalin or flash frozen. For histology, after fixation, liver tissues from male mice were embedded in paraffin, stained with hematoxylin and eosin, and photographs were taken (a). Total lipid surface area (b), as well as the number of lipid particles (c), were analyzed with image j software by applying a specific threshold, followed by the use of the particle analysis tool. Results represent means ± SEM from 3 mice. \$\$\$ P<0.001, \$\$\$\$ P<0.0001 versus HFD Ctrl.

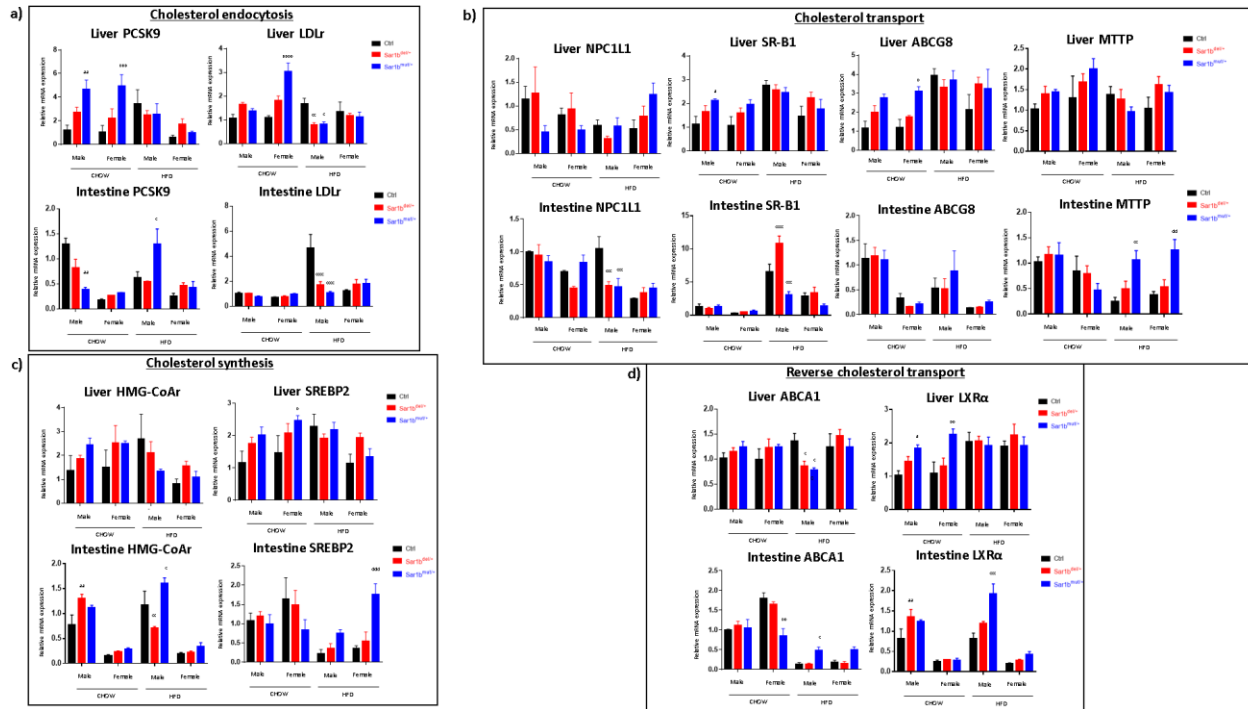


Figure 9 Alterations in *Sar1b* alter the expression of key genes involved in liver and gut cholesterol metabolism. Five-week-old male and female controls (Ctrl), *Sar1b^{del/+}*, and *Sar1b^{mut/+}* mice were fed either a Chow or a high-fat diet (HFD) for 8 weeks. After a 6-hour fast, mice were sacrificed by cardiac puncture, and tissues were collected and flash-frozen. Liver and intestinal mRNAs were extracted with Trizol and cDNAs were generated by reverse transcription. For both tissues, the genes for cholesterol endocytosis (**a**), cholesterol transport (**b**), cholesterol synthesis (**c**), and reverse cholesterol transport (**d**) were amplified by qPCR. Results represent means \pm SEM from 4 mice. a= $P < 0.05$, aa= $P < 0.01$ versus Chow ctrl male. b= $P < 0.05$, bb= $P < 0.01$, bbb= $P < 0.001$, bbbb= $P < 0.0001$ versus Chow female ctrl; c = $P < 0.05$, cc = $P < 0.01$, ccc = $P < 0.001$, cccc = $P < 0.0001$ versus HFD male ctrl; dd = $P < 0.01$, dddd = $P < 0.0001$ versus HFD female ctrl.

5.3.4 SUPPLEMENTARY DATA

Materials and methods

Immunohistochemistry

Yolk sac cryosections from WT, Sar1b^{del/del}, and Sar1b^{del/+} mice, as well as Sar1b^{mut/+} and Sar1b^{mut/mut} mice were cut at 4-6 µm and stored at -20°C. On the day of immunofluorescent staining, the slides were transferred to room temperature for 30 minutes, fixed with 4% PFA for 10 minutes and washed with PBS. They were then incubated with blocking solution (1% BSA, 3% NGS, 1% Triton X-100 in PBS) for 60-90 minutes at room temperature. The slides were then incubated for 2 hours with primary antibodies diluted in 1% BSA, 1% NGS, 0.1% Triton X-100 in PBS). After this incubation, the slides were washed three times with PBS and transferred with goat anti-rabbit secondary antibody for 1 to 1.5 hours. The slides were finally washed three times with PBS, dried and mounted with Gelmount (Sigma-Aldrich, USA). The list of antibodies and their dilution used for these experiments can be found in **Table S2**.

Table S1: List of all primers used for RT-qPCR analysis

	Primers
ABCG8	Forward: 5-GCACTGGTCATGGCTGAGAA-3' Reverse: 5-CACAGGAGTCTTGGCTGCTA-3
MTTP	Forward: 5-ATGATCCTCTTGGCAGTGCTT-3 Reverse: 5-TGAGAGGCCAGTTGTGTGAC-3
LDLr	Forward: 5-GCTCCATAGGCTATCTGCTCTTCA-3 Reverse: 5-CTGCGGTCCAGGGTCATC-3
ABCA1	Forward: 5-AGGGTTTCTTTGCTCAGATTGTC-3 Reverse: 5-TGCCAAAGGGTGGCACA-3

SR-B1	Forward: 5-TCAGAAGCTGTTCTTGGTCTGAAC-3 Reverse: 5-GTTCATGGGGATCCCAGAGA-3
NPC1L1	Forward: 5-CCACAGACCCTGTGGAAGT-3 Reverse: 5-GCTCGTCATGGAAAGCCTTT-3
Actin	Forward: GACAGGATGCAGAAGGAGATTACTG Reverse: CCACCGATCCACACAGAGTACTT
HMG-CoAr	Forward: 5-ATTCTGGCAGTCAGTGGGAACT-3 Reverse: 5-CCTCGTCCTTCGATCCAATTTA-3
PCSK9	Forward: 5-GCACCAGACAGAGGAAGACC-3 Reverse: 5-GTGACCCTGCCCTCAATCT-3
SREBP2	Forward: 5-CGACCAGCTTTCAAGTCCTG-3 Reverse: 5-CCTGTACCGTCTGCACCTG-3
LXRα	Forward: 5-GGAGTGTGCGACTTCGCAAAT-3 Reverse: 5-CTTGCCGCTTCAGTTTCTTC-3
PERK	Forward: 5-ATCTGTTCTGCCTTGGGATG-3 Reverse: 5-CAAAGTGGCCAACACTGAAA-3
GPR78	Forward: 5-TGCAGCAGGACATCAAGTTC-3 Reverse: 5-TACGCCTCAGCAGTCTCCTT-3
IRE1	Forward: 5-CGCATCACCAAGTGGAAAGTA-3 Reverse: 5-CCTTCCAGCAAAGGAAGAGT-3
ATF6	Forward: 5-TGTCACTGGTCCTGGAAACA-3

Reverse: 5-TGAATGATGATGGCTTTTGC-3

Table S2: List of all antibodies used for immunohistochemistry analysis

Antibody	Company	Type	Dilution
Anti-ApoB	Proteintech #20578-1-AP	Rabbit anti human	1:20
Anti-MTTP	Dr Jean Davignon	Rabbit anti mouse	1:20
Anti-Rabbit IgG – Alexa Fluor 488	Invitrogen # A-11008	Goat anti rabbit	1:500

Table S3: Fatty acids composition in plasma of male Sar1b^{del/+} and sar1b^{mut/+} mice under a CHOW or HFD

Fatty Acids (%)	CHOW Ctrl Mean		CHOW KO Mean		CHOW MUT Mean		HF Ctrl Mean		HF KO Mean		HF MUT Mean	
SFA												
C16:0	17.058	± 0.859	16.249	± 0.775	16.647	± 0.628	16.174	± 0.665	15.209	± 0.733	17.137	± 0.486
C18:0	8.041	± 0.025	7.892	± 0.050	8.632	± 0.742	11.787	± 0.595	10.500	± 0.256**	10.415	± 0.380**
C24:0	0.718	± 0.080	0.823	± 0.068	0.811	± 0.014	0.634	± 0.044	0.821	± 0.100**	0.651	± 0.014
MUFA												
C16:1n7	2.872	± 0.098	2.890	± 0.322	2.207	± 0.234	2.103	± 0.085	2.481	± 0.138*	2.134	± 0.081
C18:1n9	6.477	± 0.190	7.076	± 0.373	6.421	± 0.061	8.778	± 0.990	9.125	± 0.995	9.252	± 0.482
C18:1n7	1.759	± 0.288	1.641	± 0.232	1.210	± 0.190**	1.268	± 0.121	1.242	± 0.021	1.156	± 0.027
C24:1	0.336	± 0.030	0.376	± 0.028	0.358	± 0.019	0.338	± 0.012	0.409	± 0.033**	0.330	± 0.015
PUFA												
Omega-3												
C18:3n3	1.296	± 0.091	1.462	± 0.077	1.443	± 0.067	1.021	± 0.068	1.300	± 0.161**	1.065	± 0.034
C20:5n3	1.068	± 0.074	1.169	± 0.096	1.092	± 0.100	0.865	± 0.067	1.059	± 0.120*	0.854	± 0.028
C22:5n3	1.028	± 0.091	1.190	± 0.098	1.051	± 0.047	0.889	± 0.047	1.118	± 0.129**	0.912	± 0.047
C22:6n3	3.761	± 0.450	3.664	± 0.304	3.591	± 0.281	3.619	± 0.358	3.164	± 0.431	3.502	± 0.359
Omega-6												
C18:2n6	19.242	± 2.017	19.181	± 1.470	21.207	± 2.526	18.847	± 1.579	16.861	± 0.690	18.355	± 0.805
C18:3n6	2.355	± 0.222	2.662	± 0.228	2.615	± 0.046	2.161	± 0.135	2.822	± 0.323**	2.217	± 0.095
C20:3n6	3.397	± 0.232	3.714	± 0.307	3.072	± 0.168	2.981	± 0.083	3.437	± 0.358*	2.848	± 0.059
C22:4n6	0.763	± 0.079	0.869	± 0.050	0.859	± 0.014	0.716	± 0.074	0.840	± 0.058*	0.690	± 0.015
Total FA												
Total SAT	37.104	± 0.681	37.556	± 0.573	37.502	± 0.526	38.065	± 0.844	39.853	± 1.063*	39.684	± 0.682*
Total MUFA	17.346	± 2.532	16.927	± 0.905	15.886	± 3.181	13.905	± 1.058	15.126	± 1.164	16.549	± 0.275
Total PUFA	46.030	± 2.438	46.029	± 1.334	47.069	± 2.888	48.010	± 1.675	45.000	± 2.035	44.121	± 0.883*
PUFA/Saturated	1.241	± 0.071	1.226	± 0.054	1.255	± 0.070	1.263	± 0.069	1.131	± 0.081*	1.113	± 0.041*
n-3	7.355	± 0.577	8.163	± 0.294	7.590	± 0.717	6.394	± 0.447	6.641	± 0.332	6.523	± 0.232
n-6	38.675	± 1.936	37.866	± 1.147	39.478	± 2.495	41.616	± 1.441	38.360	± 1.913	37.598	± 1.079*
n-7	5.051	± 0.799	4.744	± 0.419	3.670	± 0.855**	3.371	± 0.185	3.723	± 0.150	3.290	± 0.069
n-9	7.683	± 0.202	8.443	± 0.519	7.720	± 0.112	9.913	± 0.989	10.588	± 1.047	10.414	± 0.507
FA Ratio												
16:1(n-7)/18:2(n-6)	0.151	± 0.019	0.152	± 0.026	0.107	± 0.027*	0.113	± 0.013	0.148	± 0.013**	0.117	± 0.008
Δ ⁶ (20:3(n-6)/18:2(n-6))	0.179	± 0.027	0.196	± 0.032	0.148	± 0.029	0.160	± 0.017	0.205	± 0.031	0.156	± 0.009
Δ ⁸ (18:1(n-9)/18:0)	0.806	± 0.023	0.896	± 0.042	0.750	± 0.069	0.747	± 0.096	0.867	± 0.075	0.889	± 0.050*
Δ ⁷ (16:1(n-7)/16:0)	0.169	± 0.011	0.179	± 0.026	0.133	± 0.014*	0.130	± 0.004	0.164	± 0.016*	0.125	± 0.006

Table S4: Fatty acids composition in plasma of female Sar1b^{del/+} and sar1b^{mut/+} mice under a CHOW or HFD

Fatty Acids (%)	CHOW Ctrl Mean		CHOW KO Mean		CHOW MUT Mean		HF Ctrl Mean		HF KO Mean		HF MUT Mean	
SFA												
C16:0	14.759	± 0.685	14.545	± 0.736	14.887	± 1.036	15.883	± 0.487	14.528	± 0.944	17.505	± 1.322
C18:0	9.643	± 0.788	9.838	± 0.732	10.485	± 0.800	11.948	± 0.538	10.666	± 1.138	12.096	± 1.177
C24:0	0.823	± 0.057	0.939	± 0.106	0.823	± 0.079	0.625	± 0.029	0.920	± 0.149*	0.868	± 0.117
MUFA												
C16:1n7	2.660	± 0.071	2.624	± 0.324	2.599	± 0.427	2.059	± 0.139	2.479	± 0.330	1.404	± 0.187
C18:1n9	7.185	± 0.472	6.877	± 0.557	7.087	± 0.908	8.600	± 0.466	8.839	± 0.320	10.562	± 1.234**
C18:1n7	1.572	± 0.185	1.388	± 0.211	1.535	± 0.382	1.197	± 0.153	1.157	± 0.032	1.404	± 0.118
C24:1	0.376	± 0.023	0.411	± 0.044	0.358	± 0.035	0.347	± 0.016	0.429	± 0.058*	0.408	± 0.040
PUFA												
Omega-3												
C18:3n3	1.460	± 0.088	1.630	± 0.200	1.420	± 0.106	1.108	± 0.110	1.422	± 0.217	1.368	± 0.148
C20:5n3	1.240	± 0.068	1.319	± 0.074	1.245	± 0.104	0.929	± 0.072	1.178	± 0.184	1.111	± 0.138
C22:5n3	1.119	± 0.095	1.216	± 0.113	1.100	± 0.095	0.946	± 0.078	1.254	± 0.268*	1.145	± 0.140
C22:6n3	3.704	± 0.293	3.613	± 0.383	3.757	± 0.467	3.627	± 0.131	3.483	± 0.361	3.851	± 0.413
Omega-6												
C18:2n6	16.352	± 1.706	15.223	± 1.576	16.777	± 1.466	18.845	± 0.741	16.087	± 2.569	18.330	± 2.913
C18:3n6	2.655	± 0.215	3.017	± 0.354	2.604	± 0.292	2.315	± 0.202	3.041	± 0.514*	2.817	± 0.326
C20:3n6	3.380	± 0.063	3.562	± 0.310	3.395	± 0.429	2.997	± 0.132	3.557	± 0.424	3.430	± 0.407
C22:4n6	0.924	± 0.039	1.039	± 0.073	0.923	± 0.046	0.791	± 0.091	0.980	± 0.143	0.993	± 0.117*
Total FA												
Total SAT	37.843	± 1.158	39.360	± 1.453	38.593	± 0.572	39.060	± 0.303	40.479	± 0.809	43.345	± 2.861***
Total MUFA	17.871	± 2.683	17.635	± 2.570	16.571	± 2.554	13.699	± 0.566	14.864	± 0.405	19.883	± 2.190**
Total PUFA	44.972	± 2.807	43.690	± 2.100	45.502	± 2.449	47.225	± 0.394	44.641	± 1.208	37.311	± 1.063****
PUFA/Saturated	1.190	± 0.093	1.112	± 0.066	1.179	± 0.067	1.209	± 0.012	1.104	± 0.052	0.866	± 0.083****
n-3	7.524	± 0.438	7.779	± 0.309	7.521	± 0.201	6.611	± 0.321	7.337	± 0.931	7.475	± 0.825
n-6	37.448	± 2.514	35.911	± 1.862	37.980	± 2.295	40.614	± 0.621	37.304	± 1.931	29.836	± 1.571****
n-7	4.479	± 0.497	4.251	± 0.697	4.134	± 0.808	3.256	± 0.153	3.636	± 0.336	4.163	± 0.288
n-9	8.488	± 0.467	8.361	± 0.733	8.365	± 1.081	9.771	± 0.503	10.332	± 0.143	11.194	± 1.106
FA Ratio												
16:1(n-7)/18:2(n-6)	0.164	± 0.015	0.175	± 0.032	0.158	± 0.040	0.109	± 0.008	0.162	± 0.051	0.141	± 0.016
Δ ⁶ (20:3(n-6)/18:2(n-6))	0.209	± 0.025	0.236	± 0.025	0.206	± 0.044	0.159	± 0.012	0.232	± 0.070	0.189	± 0.019
Δ ⁹ (18:1(n-9)/18:0)	0.748	± 0.063	0.706	± 0.106	0.686	± 0.141	0.722	± 0.065	0.835	± 0.064	0.876	± 0.084
Δ ⁷ (16:1(n-7)/16:0)	0.181	± 0.010	0.181	± 0.025	0.177	± 0.041	0.130	± 0.010	0.173	± 0.035	0.145	± 0.007

Results

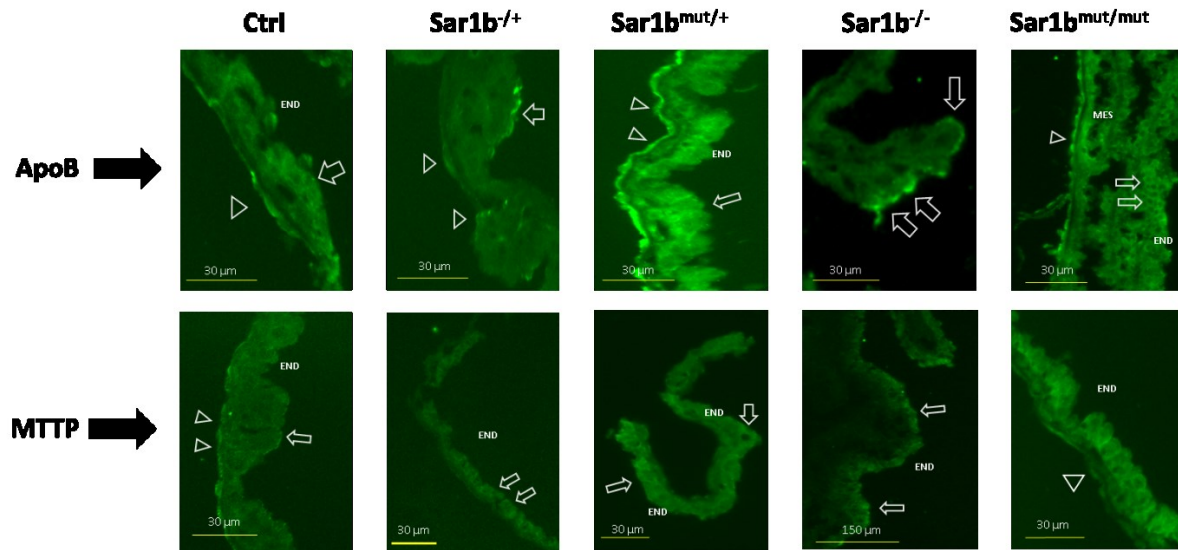


Figure S1 Immunostaining of ApoB and MTTP in the yolk sac of *Sar1b*-disrupted mice.

Male and female heterozygous *Sar1b*^{del/+} and *Sar1b*^{mut/+} mice were mated. Once a vaginal plug was found, female mice were considered pregnant at day E0.5. Yolk sacs were collected from mice at 13.5 days of age, fixed in formalin and embedded in O.C.T. Cryosections of the yolk sacs were cut at 4–6 μM for ApoB and MTTP immunostaining as described in Materials and Methods. This figure contains examples of images obtained after labeling, with the location of endodermal cells (END) and arrows indicating the presence of labeling. At least two specimens per group were used for the specified analyses.

Chapitre 6 – Discussion

L'objectif général de cette thèse était donc de clarifier et de mieux comprendre les mécanismes intestinaux responsables de malabsorptions des graisses. Pour ce faire, nous avons étudié deux protéines clés, la Sar1b GTPase et la PLD1, dont les mutations peuvent générer des désordres au niveau intestinal.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons utilisé des souris C57BL/6 ainsi que des cellules épithéliales Caco-2/15 qui, lorsqu'elles sont différenciées, ont des caractéristiques similaires aux entérocytes de l'intestin grêle. Grâce à de nouvelles technologies de transgénèse, nous avons modifié le gène de nos protéines d'intérêt. Les résultats obtenus à partir de ces modèles ont permis d'atteindre tous nos objectifs et de mieux comprendre le transfert et le métabolisme des lipides intestinaux. Plus précisément : 1) notre article de synthèse nous a permis de conclure que la PLD est possiblement impliquée dans le transfert intestinal des lipides et le développement des maladies métaboliques et vasculaires ([article 1 de l'annexe](#)); 2) nos données soulignent le rôle possible de la PLD, en particulier la PLD1, dans la sécrétion des CM et le métabolisme lipidique ([article 1](#)); 3) L'élaboration de deux modèles de souris avec des modifications génétiques a confirmé la relation de cause à effet entre la Sar1b GTPase et la MRC, en mettant en évidence que l'altération du gène *Sar1b* a récapitulé plusieurs des caractéristiques des patients ([articles 2 et 3](#)); 4) la disponibilité de ces modèles a conduit à démontrer que le type de régime alimentaire et le génotype des souris sont tous d'importants facteurs pouvant influencer la fonctionnalité de la protéine Sar1b ([article 2 et 3](#)); 5) les résultats militent en faveur de la capacité régulatoire de la Sar1b GTPase à modifier l'expression génique et protéique de facteurs clés dans plusieurs voies métaboliques comme la β -oxydation, la lipogenèse et le métabolisme du CHOL, ainsi que dans d'autres voies comme le stress du réticulum ([articles 2 et 3](#)); 6) les observations expérimentales mettent en évidence les anomalies de la composition des lipoprotéines plasmatiques en fonction des défauts génétiques de *Sar1b* ([article 3](#)); et 6) nos observations témoignent de l'importance de maintenir l'intégrité du Sar1GTPase en vue des répercussions de ses mutations sur la létalité des souris homozygotes ([article 3](#)). L'ensemble de ces points seront discutés dans les paragraphes suivants.

6.1 La phospholipase D1

Largement étudiée chez les plantes et les mammifères, l'enzyme appelée PLD a pour rôle principal de produire du PA à partir de PC. Le PA est un lipide de signalisation qui régule une grande variété de processus cellulaires tels que la survie, la migration, la prolifération, la différenciation, le trafic membranaire et l'autophagie des cellules (6, 464, 545). Bien qu'elle soit largement étudiée, elle n'est pas connue dans les domaines qui touchent aux désordres cardiométaboliques tels que l'obésité, la dyslipidémie, le syndrome métabolique, et les maladies cardiovasculaires. Dans l'article de synthèse qui a été élaboré au cours du présent programme de recherche, nous avons voulu comprendre davantage la PLD avec l'objectif de rassembler tous les articles qui proposent un rôle dans les composantes du syndrome métabolique telles que le stress oxydatif, l'inflammation, l'obésité, le diabète, les dyslipidémies, l'hypertension et la stéatose hépatique. Nous avons également examiné de près son implication dans le trafic vésiculaire tels que l'endocytose et l'exocytose. Nous avons conclu que les deux principales isoformes de la PLD chez les mammifères, PLD1 et PLD2, ont le potentiel de réguler l'ensemble des composantes du syndrome métabolique, particulièrement la résistance à l'insuline, à travers ses principaux facteurs étiologies à savoir le stress oxydatif et l'inflammation. En ce qui concerne la dyslipidémie et la formation des particules lipoprotéiniques, certaines études ont rapporté que l'inhibition de la PLD réduit la sécrétion de VLDL par le foie et que les isoformes de PLD, notamment la PLD1, sont essentielles à la formation du COPII et du COPI, ainsi qu'à la voie de sécrétion du RE et du Golgi.

Étant donné les diverses fonctions importantes de la PLD, nous avons voulu savoir si la PLD, en particulier PLD1, était essentielle dans la formation de CM. La première approche était d'employer des inhibiteurs de l'activité enzymatique des isoformes de PLD dans des cellules Caco-2/15. Dans ces études, bien que l'inhibiteur de la PLD1 ait fortement réduit l'activité totale de l'enzyme et que PLD2 l'ait légèrement diminué dans les cellules Caco-2/15, ils n'ont pas eu une influence substantielle sur la production de CM et le métabolisme lipidique intestinal, autre que la diminution de la formation d'esters de CHOL et l'augmentation de l'accumulation de PL dans les cellules intestinales par PLD1. Les résultats concernant la teneur en PL ne sont pas surprenants et confirment largement le fonctionnement de nos modèles. L'activité enzymatique de la PLD

étant de couper la choline de la phosphatidylcholine, une réduction de l'activité enzymatique augmentera nécessairement l'accumulation de phosphatidylcholine dans les cellules, qui est de loin le type de phospholipide le plus prédominant dans les cellules de mammifères (546-549). Cependant, les raisons de la réduction drastique de la synthèse du cholestérol en présence d'inhibiteurs de la PLD1 sont actuellement inconnues car aucune étude n'a montré que la PA ou la PLD peuvent influencer la synthèse du CHOL. Cependant, il est possible que la réduction de l'hydrolyse des phospholipides par les isoformes de PLD limite l'apport d'AG nécessaire à la formation *de novo* de l'ester CHOL. Il a déjà été observé que l'inhibition de la PLD réduit l'apport d'AG nécessaire à plusieurs événements tels que l'autophagie et que d'autres phospholipases telles que A2 peuvent réduire la formation de l'ester CHOL en réduisant l'apport d'AG à partir du PL. (550, 551). Toutefois, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces observations.

Comme deuxième approche, nous avons diminué l'expression du gène *PLD1* dans ces mêmes cellules. Contrairement à l'utilisation d'un inhibiteur, l'ablation génétique de la PLD1 a affecté de manière significative la libération de CM dans le milieu basolatéral. Pour cette étude, nous avons décidé de cibler génétiquement la PLD1 et non la PLD2, parce que les inhibiteurs de PLD1 ont entraîné davantage de modulations, que la PLD1 se trouve principalement sur les membranes intracellulaires telles que le Golgi et le RE, alors que la PLD2 se trouve principalement sur la membrane plasmique, que PLD1 a des rôles importants dans la formation de vésicules du Golgi et du RE, et que nous avons observé des patients avec un syndrome de malabsorption avec une mutation du gène de la *PLD1* (470). Nos résultats démontrent que bien que l'expression de l'ARN de PLD1 ait été fortement diminuée, l'expression de la protéine était encore d'environ 50 %. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les isoformes PLD ont des demi-vies très longues, ce qui explique également pourquoi les oligonucléotides antisens de PLD ne provoquent qu'une faible diminution de l'expression dans de nombreux types de cellules (552-554).

Collectivement, nos résultats suggèrent que l'expression de la protéine PLD1 peut être un contributeur critique à l'exocytose du CM vu la diminution de la sécrétion de lipides par les cellules PLD1 KD. Bien que les mécanismes soient encore nébuleux, PLD1 pourrait physiquement

réguler le trafic intracellulaire du CM. En effet, la PLD1 interagit directement avec plus de 40 protéines différentes (497). Comme il a été indiqué précédemment, la plupart des interactions protéine-protéine avec PLD1 sont faites pour augmenter ou inhiber sa propre activité, mais PLD1 peut aussi à son tour directement influencer l'activité d'autres protéines ou déclencher des sentiers intracellulaires qui pourraient ainsi moduler la sécrétion des CM. Dans ce contexte, des études précédentes ont rapporté un lien entre le recrutement de Sar1b et la PLD1 (504, 505). D'autres expériences sont certainement nécessaires pour élucider l'interaction synergique possible entre Sar1b et PLD1 en mesurant les niveaux d'ARNm et de protéines de Sar1b. Aussi, la PLD fonctionne en amont de la PKC ζ , un facteur crucial pour le bourgeonnement de la vésicule de transport du pré-CM, et la régulation de la vitesse de transfert du CM à travers la cellule (555). La PLD1 peut non seulement interagir avec la PKC ζ mais aussi avec la c-Jun N-terminal kinase 1 qui contrôle la sortie basolatérale du CM (556-558).

Il faut également considérer que le rôle de l'activité de la PLD1 dans la sécrétion et la formation des CM pourrait être altéré par le rôle de l'inhibiteur VU0155069. En effet, il a été démontré que l'inhibition de l'activité de la PLD1 réduit le niveau d'inflammation dans plusieurs types de cellules, comme indiqué dans (6), mais l'inhibiteur VU0115069 peut également, indépendamment de la PLD1, réduire l'inflammation, la production de cytokines inflammatoires et l'apoptose des leucocytes (559). Comme l'augmentation des niveaux d'inflammation peut fortement affecter le métabolisme des lipides et des lipoprotéines et que son inhibition rétablit ce métabolisme, cet effet peut également jouer un rôle dans les résultats obtenus dans cette étude (560-562).

Il est aussi à noter qu'un mécanisme compensatoire peut se produire dans les cellules Caco-2/15 en présence d'un inhibiteur de la PLD1 pour assurer un approvisionnement stable en PA. Dans ce contexte, le PA peut être produit par l'acide lysophosphatidique avec l'acide lysophosphatidique acyltransférase et par le DG avec les DGK (6, 496, 563). Par exemple, dans les cellules épithéliales BSC-1, il a été observé que l'inhibition de la PLD augmente le PA cellulaire contrairement à l'inhibition de la DGK qui réduit drastiquement le contenu en PA (564). De même, lorsque la PLD est inhibée dans les cellules de l'astrocytome 1321N1, d'autres sources contribuent à la production de PA comme une sorte de mécanisme compensatoire (565).

La différence entre la sécrétion hépatique et intestinale des lipoprotéines est particulièrement intéressante. Ce fait est évident chez les patients atteints de CRD qui ne sécrètent pas de CM (59). Bien que cette maladie affecte fortement la formation et la sécrétion de CM avec une stéatose intestinale et une diarrhée, le foie n'est que légèrement affecté et semble être capable de sécréter des VLDL avec une concentration normale de TG dans le plasma, ce qui indique que Sar1b n'est pas aussi important dans le foie (3). Dans notre étude, nous avons une dichotomie similaire, puisque l'activité de PLD semble être plus importante dans le foie que dans l'intestin pour la sécrétion des lipoprotéines. Il a été démontré précédemment que la PLD semble jouer un rôle central dans l'assemblage des VLDL et que l'inhibition des PLD 1 et 2 réduit la sécrétion des VLDL en modifiant la production d'aldostérone (10, 519). D'autres études sont nécessaires pour élucider cette dichotomie, mais il est possible que la PLD joue un rôle plus important dans la production de PA dans le foie que dans l'intestin et que la DGK joue peut-être un rôle plus important dans la formation de PA dans l'intestin.

Enfin, comme pour l'inhibition du MTPP qui modère l'oxydation des AG dans le foie (566), le KD de la PLD1 a ralenti la β -oxydation des AG et a augmenté la lipogénèse, deux processus importants qui contrôlent le métabolisme lipidique intestinal. Ces observations pourraient être expliquées par la régulation négative de PPAR α et PGC1 α . Comme commenté précédemment, ces deux facteurs de transcription sont primordiaux dans la régulation de l'oxydation des AG, et la diminution de leur expression protéique pourrait réguler à la baisse CPT1a (417, 567). En ce qui concerne la lipogénèse, la diminution de la phosphorylation de l'ACC, la forme non active de l'ACC, pourrait résulter d'une faible activité de l'AMPK α en réponse au KD de la PLD1.

L'impact de la protéine PLD1 ou même de l'activité de la PLD sur la lipogénèse et l'oxydation des AG n'est pas encore clair. Cependant, plusieurs éléments pourraient soutenir son rôle dans ces processus. En effet, dans les cellules MDA-MB-231, Calu-1 et BJ-hTERT, il existe un mécanisme de rétroaction réciproque entre l'AMPK et la PLD (533). Alors que l'inhibition de l'AMPK augmente l'activité de la PLD, la suppression de la PLD augmente l'activité de l'AMPK. Il est également connu que mTOR est un régulateur important du métabolisme lipidique (568). En particulier, il a été observé dans les cellules musculaires qu'il est important pour le maintien des fonctions

oxydatives mitochondriales en augmentant l'expression de PGC1 α (569). Comme la PLD influence fortement l'activité de mTOR, on peut suggérer que sa régulation a également un impact indirect sur les fonctions mitochondriales. En outre, en tant que régulateur important de l'autophagie, l'inhibition de la PLD1 dans les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231, réduit l'apport d'AG provenant des PL issus de l'autophagie, ce qui réduit à son tour l'oxydation des AG par les mitochondries (550). Enfin, le facteur de transcription PPAR γ , un important activateur de la lipogénèse, est inhibé par la production d'AG provenant des PLD dans plusieurs lignées cellulaires ainsi que chez la souris (570, 571).

6.2 Le Sar1b GTPase

Comparativement à la PLD1 qui n'était pas connue pour moduler la formation de CM avant l'obtention des présents résultats, le gène *Sar1b* a déjà été associé à la MRC plusieurs années auparavant (5). Cependant, même si une telle association avait été proposée, aucune étude démontrant une relation de cause à effet entre ce gène et la sécrétion de CM n'avait été publiée à ce jour. De plus, les conséquences sur l'homéostasie lipidique de la délétion de ce gène étaient inconnues. La première étape pour élucider tous ces aspects mystérieux était évidemment de simplement procéder par des expériences cellulaires. Au début de mon doctorat, on a pu observer que la délétion du gène *Sar1b* dans les cellules Caco-2/15 réduisait effectivement la sécrétion de CM, sans nécessairement l'abolir comme on le constate chez les patients avec la MRC (195). Pour empêcher totalement la libération des CM, il était nécessaire de supprimer à la fois le gène *Sar1b* ainsi que le gène de son isoforme *Sar1a*. Cette abolition s'est accompagnée alors d'une accumulation de TG cellulaires et d'une diminution de la production de HDL.

Dans une deuxième étape dans un article dont j'ai été coauteur ([article de l'annexe 2](#)), nous avons placé l'emphase sur des expériences *in vitro* qui consistaient à examiner si la déficience en *Sar1b* pouvait affecter l'homéostasie des lipides. Les résultats obtenus ont confirmé ces hypothèses et nous avons pu observer une augmentation de la β -oxydation et une diminution de la lipogénèse qui pourraient s'expliquer par l'accumulation de lipides, des anomalies dans le transport des protéines, des défauts dans la formation des vésicules naissantes et de la courbure des membranes favorisant la production des vésicules intracellulaires, un mauvais recrutement des composants du manteau COPII et des altérations dans la biogénèse du CHOL (572, 573).

Des avancées importantes ont été réalisées par nos travaux *in vitro* en démontrant pour la première fois que la délétion spécifique de *Sar1b* pouvait abaisser la sécrétion des CM. Nos résultats témoignent également que la délétion de *Sar1b* modifie l'homéostasie lipidique, des informations non connues chez les patients avec MRC. Cependant, les modèles cellulaires ont leurs limites et ces résultats doivent évidemment être confirmés dans des organismes complexes qui permettent de scruter les phénotypes cliniques établis chez les patients et d'élucider plusieurs aspects de la MRC, notamment les divergences fonctionnelles du *Sar1b*, pertinentes à l'intestin et le foie.

En utilisant l'approche d'édition de génome CRISPR-Cas9, nous avons donc généré deux lignées de souris, l'une avec une délétion et l'autre avec une mutation ponctuelle du gène *Sar1b*. Effectivement, la relation génotype-phénotype est également un facteur important à prendre en compte lors de la conception de souris génétiquement modifiées. Il convient de noter que la présence potentielle d'une hétérogénéité allélique indique que différentes mutations dans le même locus génétique peuvent entraîner des phénotypes cliniques divergents (584). En outre, la compensation génétique est également un phénomène répandu qui doit être pris en compte (585). La perte de fonction d'une protéine causée par un *knockout* pourrait entraîner une régulation ascendante d'autres gènes ou protéines susceptibles de compenser cette déficience, ce qui explique pourquoi les souris présentant certains *knockdowns* présentent des phénotypes plus sévères que les souris *knockout* (585). Il a également été noté que dans de nombreuses maladies, les mutations de perte de fonction se produisent rarement, contrairement aux mutations subtiles qui sont beaucoup plus fréquentes et qui influencent les propriétés des protéines (586, 587). Par conséquent, les défauts dans un gène peuvent conduire à des phénotypes plus sévères ou, au contraire, provoquer un mécanisme compensatoire sans rapport avec la maladie observée chez l'homme (588). Comme il a été dit précédemment, une compensation génétique de *Sar1a* a été observée avec la délétion complète de *Sar1b* dans les cellules entérocytaires Caco-2/15 (195). Pour ces raisons, nous avons décidé de développer des souris avec une grande délétion de paires de bases et des souris avec une mutation subtile qui s'est avérée avoir un impact clinique sévère chez les patients (528). Il est intéressant de noter que la mutation ponctuelle du gène *Sar1b* (décrite chez les patients atteints de CRD) était plus

délétère dans la quasié totalité des résultats que nous avons obtenu dans ce projet. Les raisons exactes de ces différences sont inconnues, mais l'hétérogénéité allélique ou la compensation génétique pourraient être des facteurs importants jouant un rôle significatif dans nos résultats puisque la délétion entraîne l'absence de production de la protéine GTPase *Sar1b*, alors que la mutation ponctuelle entraîne la formation d'une protéine instable et/ou non fonctionnelle (586, 587).

Lors de ce projet, notre première observation se réfère à l'absence totale de souris homozygotes suite au croisement de souris hétérozygotes, ce qui n'est pas cohérent avec les rapports de fréquence mendéliens. Nous avons alors émis l'hypothèse d'une létalité embryonnaire comme cela a été le cas pour les modèles de souris homozygotes avec des délétions d'ApoB et de MTPP correspondant à l'hypobétalipoprotéïnémie et l'abétalipoprotéïnémie, respectivement (589, 590).

Des expériences intra-utérines subséquentes ont été menées pour examiner la présence d'embryons homozygotes. Nous avons été alors surpris de constater que les embryons de souris homozygotes pour *Sar1b* étaient effectivement capables de se développer jusqu'à un stade de développement assez avancé (18,5 jours) sans anomalies macroscopiques, ce qui est dichotomique avec les autres modèles de maladies congénitales (hypobétalipoprotéïnémie et abétalipoprotéïnémie) où les embryons développent dès l'âge de 13,5 jours des malformations entraînant leur résorption, les empêchant ainsi de croître davantage (589, 590). Ce résultat est dû au défaut du sac vitellin à transférer les lipides à l'embryon. Par contre, les embryons homozygotes pour la mutation et la délétion de *Sar1b* affichent une croissance embryonnaire normale et une quantité normale de lipides dans les sacs vitellins, ce qui les exclut comme cause de létalité embryonnaire. Nous avons examiné histologiquement à 18,5 jours certains organes des embryons incluant le cerveau, le foie et l'intestin. Il a été démontré précédemment que *Sar1b* est abondant dans le cerveau et que sa délétion dans les embryons de poisson-zèbre entraîne l'absence de neurones neuro-D-positifs (591), et que sa délétion dans le cortex cérébral en développement altère la migration radiale et l'élongation des axones des neurones corticaux chez la souris (592). Les neurones Neuro-D-positifs sont des neurones qui expriment la protéine neuro-D, un facteur de transcription qui contrôle la transcription de

nombreux gènes dans le développement du cerveau (593). Cependant, nous n'avons pas observé de pathologies dans le cerveau et le foie des embryons, mais nous avons constaté une accumulation de lipides dans l'intestin. Il se pourrait que le défaut du transfert des lipides et des vitamines liposolubles vers la circulation empêche les embryons de survivre après l'accouchement. Effectivement, dans le ventre de la mère, les embryons reçoivent directement les nutriments dans la circulation sanguine de la mère grâce au placenta et dès qu'ils sortent de ce ventre, les aliments passent par l'intestin, ce qui pourrait expliquer cette situation (594, 595).

Il faut aussi garder à l'esprit que ces observations ont eu comme base que l'histologie, mais des anomalies moléculaires ou biochimiques non explorées jusqu'à présent peuvent entraîner la létalité. De plus, *Sar1b* est présent dans de nombreux tissus, il peut donc jouer un rôle à plusieurs sites (596). Comme indiqué par Turgeon et al, 2009, il est très difficile de déterminer la cause de la mort néonatale chez la souris (597). En effet, il existe un réseau biologique très complexe de relations entre les défauts des organes et les processus physiologiques qui sont nécessaires à la survie de la souris. Par exemple, les défauts squelettiques et neuromusculaires peuvent empêcher l'embryon de respirer ou simplement de téter (597). De nombreux défauts du métabolisme peuvent altérer l'homéostasie du fœtus et l'empêcher de survivre. Un bon exemple est l'homozygotie de *ATG5* et *ATG7* qui empêche l'autophagie (598, 599). Juste après la naissance, le taux de sucre dans le sang de la souris étant très bas, elle doit donc synthétiser du glucose. L'un des moyens est l'autophagie qui est un des processus critiques pour obtenir de l'énergie en raison de sa capacité à décomposer le glycogène du foie pour la biogenèse du glucose, une source d'énergie nécessaire à la survie de l'animal (600).

Même en absence d'homozygotes, nous avons encore des hétérozygotes viables sous la main, et notre première étape consistait à caractériser ces animaux hétérozygotes et d'examiner s'ils présentaient certaines des caractéristiques des patients. Nous avons pu démontrer que la perturbation d'un seul allèle de *Sar1b* entraîne une importante malabsorption intestinale des lipides due au défaut de sécrétion de CM et une altération de son métabolisme lipidique, établissant ainsi l'association cause-effet entre *Sar1b* et la MRC. Effectivement, nos modèles de souris *Sar1b^{mut/+}* et *Sar1b^{del/+}* ont récapitulé les défauts de malabsorption des graisses intestinales

et de sécrétion de CM, qui sont les caractéristiques les plus dominantes des patients atteints de la MRC. Il est probable que ces mutations empêchent la formation de COPII et bloquent ainsi le transport de CM du RE au complexe de Golgi, ce qui entraîne une augmentation du dépôt de lipides dans les cellules absorbatives de l'intestin grêle proximal et, par conséquent, une diminution de la concentration de lipides dans le plasma. Il est intéressant de noter que les souris *Sar1b^{mut/+}* et *Sar1b^{del/+}* présentent une déplétion intestinale de l'expression des protéines MTTP et ApoB-48, ce qui peut contribuer à la malabsorption des graisses (601, 602). Ceci est cohérent avec la diminution récemment rapportée de l'expression de la protéine ApoB-48 en réponse à la délétion du gène *Sar1b* dans les cellules Caco-2/15 (195).

L'assemblage des CM intestinaux et des VLDL hépatiques a fait l'objet d'intenses recherches au cours des quatre dernières décennies. La biogenèse de ces lipoprotéines partage plusieurs protéines clés telles que l'ApoB-48, la MTTP et la Sar1b GTPase. Leurs mutations perturbent complètement les étapes d'initiation de la formation des pré-CM et des VLDL dans le cas des deux premiers gènes, et bloquent la maturation et la sortie des CM du RE vers le Golgi dans le cas du dernier gène. De façon inattendue, seule une stéatose sporadique et très limitée a été notée chez quelques patients atteints de la MRC malgré les aberrations de *Sar1b* (457, 461, 528). De plus, contrairement à l'absence totale de CM dérivé de l'intestin grêle chez les patients avec MRC en réponse à un challenge de repas gras, le niveau de VLDL dérivé du foie était similaire à celui des participants humains témoins. En accord avec ces observations, nos deux modèles de souris *Sar1b^{mut/+}* et *Sar1b^{del/+}* présentent un comportement similaire compte tenu de la faible implication du foie sous une diète chow. En effet, aucune accumulation significative de lipides hépatiques et aucune anomalie du métabolisme lipidique n'ont été observées malgré la modification génétique de *Sar1b*. Néanmoins, le peu d'impact des mutations de *Sar1b* sur la sécrétion des VLDL par le foie des patients et des souris avec MRC par rapport aux hépatocytes McArdle-RH7777 est une question intrigante, qui doit être clarifiée dans de futures investigations (572).

La constatation d'une baisse du taux de HDL-CHOL, chez nos souris, nous a conduits à examiner l'ApoA-I et l'ABCA1, deux protéines essentielles à la biogenèse du HDL. Dans nos expériences, une faible expression génétique de l'ApoA-I et de l'ABCA1 dans l'intestin a entraîné un faible taux de HDL-CHOL chez les animaux atteints de la MRC. Ces résultats confirment non seulement les

données obtenues précédemment dans les cellules intestinales Caco-2/15 en réponse à la délétion de Sar1b (461, 528, 603), mais peuvent également expliquer la teneur fortement réduite en CHOL de la fraction HDL des patients atteints de la MRC (460, 461). Une sécrétion réduite d'ApoA-1 et de HDL a également été observée chez les patients présentant une délétion de l'ApoB et de MTTP, mais les mécanismes sont encore inconnus (604, 605). Bien que ces mécanismes restent à être définis, il a été démontré que l'afflux de CHOL à travers la membrane apicale des entérocytes Caco2/15 augmente l'expression de l'ABCA1 et qu'une diminution de la quantité de CHOL au niveau apical diminue le transport des lipides par l'ABCA1. Cependant, l'expression d'ABCA1 n'a pas changé avec cette diminution, mais cet article démontre l'importance de l'entrée de CHOL dans l'activité d'ABCA1 (606). Il a également été démontré qu'une consommation accrue de CHOL chez les souris augmentait l'excrétion de CHOL dans les cellules par le biais des voies de signalisation LXR α -ABCA1 (607). Puisque l'accumulation de lipides, comme cela a été observé chez nos souris dont le gène Sar1b est altéré et chez les patients souffrant de malabsorption des lipides, affecte l'entrée des lipides dans la cellule, il serait possible que cela affecte l'expression de l'ABCA1 et de l'ApoA-1 (2). De plus, une augmentation du catabolisme de l'ApoA-1 et des HDL comme mécanisme supplémentaire expliquant les faibles niveaux de HDL-CHOL pourrait être une piste à explorer.

Compte tenu de notre faible compréhension de l'interaction entre les aberrations de Sar1b et le métabolisme médié par la consommation de graisses, nous avons soumis des souris Sar1b^{mut/+} et Sar1b^{del/+} à un régime riche en graisses à long terme. Les résultats de ces expériences seront importants pour mieux évaluer les recommandations faites aux patients atteints de MRC de s'abstenir de consommer des graisses. En outre, ces étapes expérimentales permettront de tester l'hypothèse selon laquelle les souris présentant des défauts de Sar1b sont protégées contre la prise de poids et les anomalies métaboliques induites par le HFD. Comme le montrent nos résultats, cette hypothèse est largement confirmée puisque les souris mutantes ont montré une certaine protection contre la prise de poids, l'expansion du tissu adipeux, la résistance à l'insuline, l'hyperlipidémie et la stéatose hépatique de manière dépendante du sexe et du génotype. Nos résultats peuvent indiquer un nouveau lien entre l'absorption des lipides médiée par Sar1b et le métabolisme, ce qui est soutenu par nos travaux précédents mettant en évidence que les souris

transgéniques surexprimant Sar1b développent un poids corporel accru, une adiposité, une stéatose hépatique, des lipides plasmatiques et une insensibilité à l'insuline (196). De plus, nos résultats soulignent également que ces souris génétiquement modifiées soumises à un régime HFD sont plus représentatives de la MRC que les souris sous une diète CHOW, car elles avaient des différences significatives plus importantes comparativement à leur contrôle respectif dans les différents paramètres métaboliques étudiés.

Nous avons analysé la composition de différentes classes d'AG afin d'examiner si les souris hétérozygotes sont affectées par des troubles des AG, en particulier la carence en AG essentiels. Il est rapidement apparu que les souris mutantes Sar1b^{mut/+} et Sar1b^{del/+} sous HFD présentaient plus d'AG saturés, moins d'AG polyinsaturés, une faible abondance de n-6 et un rapport SFA/PUFA réduit. Plus précisément, les souris Sar1b^{mut/+} présentaient un rapport 16:1(n-7)/18:2(n-6) accru, un indice de carence en AG essentiels, et un rapport oméga-6/oméga-3 réduit (608, 609). Des preuves de carence en AG essentiels et une diminution du rapport oméga-6/oméga-3 ont également été documentées chez des patients canadiens et français atteints de MRC (460). Ces résultats sont probablement dus au fait que les souris, ainsi que les patients, ont une sécrétion réduite de CM (461, 610). Il est évident que les CM sont essentiels pour le transport des AG, et ce mécanisme est particulièrement important pour les AG qui ne peuvent pas être produits par des enzymes dans notre corps. Ces acides gras sont polyinsaturés comme les oméga-6 et les oméga-3, ce qui explique les résultats observés. Cependant, il faut également tenir compte du fait que l'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque, tous deux oméga-3, peuvent être synthétisés par l'acide linoléique, un oméga-6, et l'acide α -linoléique, un oméga-3, même si ce taux de conversion est faible (611-614). En outre, certaines enzymes peuvent modifier le profil des acides gras comme le SCD1, un facteur à prendre en compte. (615). Justement, il a été observé qu'une délétion spécifique à l'intestin de la protéine 4 du locus Surfei, une protéine dont on a récemment proposé qu'elle joue un rôle synergique avec Sar1b dans la formation du COPII, diminue l'expression génétique de plusieurs facteurs de la lipogenèse tels que SCD1 et FAS, et de la β -oxydation tels que CPT1a (463, 616).

Dans les troubles de malabsorption congénitale, non seulement la quantité de lipoprotéines est altérée, mais aussi leur qualité. Nos études précédentes sur l'hypobétalipoprotéïnémie et la MRC

ont rapporté une composition irrégulière des lipoprotéines chez les patients, reflétée par un profil anormal de VLDL, LDL et HDL (603, 617). Dans le présent projet, même avec un seul allèle modifié, les souris Sar1b^{mut/+} et Sar1b^{del/+} soumises à un régime HFD à long terme présentaient une composition lipoprotéique altérée. A l'heure actuelle, il n'est pas possible de savoir si les modifications de la composition et de la taille des lipoprotéines sont dues à des anomalies de leur biogenèse ou de leur métabolisme sanguin.

Malgré l'intérêt croissant pour l'influence du sexe et du genre sur la santé, peu d'attention a été accordée aux maladies de malabsorption congénitales. Pourtant, ils peuvent influencer la prévalence, l'apparition, la réponse au traitement et le pronostic. Nos résultats ont montré que les souris femelles étaient moins affectées par le HFD et l'altération de Sar1b que les souris mâles. Récemment, de nombreuses études ont montré que les rongeurs femelles étaient plus protégés que les mâles du développement de l'obésité et de la stéatose hépatique lorsqu'ils étaient nourris avec un régime riche en graisses (618-621), ce qui est cohérent avec nos résultats. La clairance postprandiale des lipides est également plus rapide chez les femelles et leur pic postprandial est plus bas que chez les mâles, très probablement en raison d'une activité plus élevée de leur lipoprotéine lipase (281). Ces différences entre les sexes ne doivent pas être négligées à l'ère de la médecine personnalisée, d'autant plus que plusieurs études ont signalé des différences entre les sexes dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines (280, 622, 623).

Finalement, nos résultats suggèrent que l'altération de Sar1b favorise le stress du RE, en particulier dans l'intestin des souris soumises à un régime HFD, car l'expression génétique de facteurs clés tels que *Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK), *Inositol-requiring enzyme 1* (IRE1), *Activating transcription factor 6* (ATF6) et *G protein-coupled receptor 78* (GPR78) a augmenté. Ces résultats sont appuyés par des études *in vitro* qui ont montré que les mutations de Sar1b provoquent un transport défectueux des protéines dans le RE, entraînant un stress du RE suite à l'accumulation de proinsuline mal repliée (624).

Chapitre 7 – Conclusion et perspectives

En conclusion, nous pensons que les résultats obtenus dans cette thèse ont permis d'élargir notre compréhension des processus et des mécanismes qui régulent le transport intestinal des lipides, ainsi que la formation et la sécrétion des CM. En effet, nos résultats originaux soulignent que retirer la protéine PLD1 affecte la sécrétion des CM et le métabolisme lipidique intestinal, même si des résultats supplémentaires seraient nécessaire pour confirmer cet effet. Nous sommes également les premiers à confirmer la relation de cause à effet entre la MRC et la protéine Sar1b GTPase dans un modèle de mammifère, et à découvrir que l'altération du gène *Sar1b* peut fortement modifier l'homéostasie lipidique intestinale dépendamment de son génotype et de sa diète. Par ailleurs, nos travaux ont mis en relief que le défaut des deux allèles de *Sar1b* entraîne une létalité embryonnaire. Finalement, nos observations mettent en évidence les anomalies de la composition chimique et protéique des lipoprotéines plasmatiques en réponse aux défauts génétiques de Sar1b.

Nous pensons que la présente thèse de doctorat présente plusieurs atouts. Tout d'abord, elle est très diversifiée puisqu'elle a permis la production d'un article de synthèse et des articles scientifiques différents les uns des autres, mais complémentaires. En nous attaquant à la fois au PLD1 et au Sar1b GTPase, nous avons substantiellement contribué à la compréhension de l'absorption intestinale des lipides, mais aussi à l'élucidation des mécanismes qui sont essentiels pour le diagnostic, traitement et suivi des patients. Enfin, le projet a également pris en compte le sexe de l'animal, son régime alimentaire, ainsi que son génotype. En effet, même s'il n'est pas courant de considérer les deux sexes dans des études, il est de plus en plus recommandé d'en tenir compte, car les résultats peuvent évidemment différer selon le sexe. Quant au génotype, il est encore rare de voir des auteurs employer plus qu'un seul génotype afin d'étudier une maladie en raison des coûts et du temps que cela peut demander. Nos travaux ont mis l'emphase sur deux génotypes du Sar1b GTPase qui ont démontré une utilité biologique certaine.

Notre programme de recherche a plusieurs limites. Pour la PLD1, seules des cellules immortalisées ont été utilisées pour identifier sa contribution à la formation et sécrétion des CM. L'emploi des cellules a des limites dans l'interprétation des résultats, et il aurait été intéressant

de comparer les résultats cellulaires à ceux de souris avec une délétion de la PLD1. De plus, nous n'avons pas comparé avec des cellules dont l'expression des gènes PLD2 et PLD1+2 est diminuée, ce qui empêche de confirmer que seule la PLD1 joue un rôle. Enfin, il est possible que d'autres facteurs masquent les effets de l'inhibition de l'activité de PLD1, puisque cette inhibition peut affecter l'inflammation et que l'inhibiteur utilisé, indépendamment de PLD1, peut affecter l'inflammasome. Quant aux expériences sur des animaux présentant une altération de *Sar1b*, les modèles, même s'ils ont produit des résultats remarquables, sont une limite en soi. En effet, étant hétérozygotes, ils ne représentent pas exactement la situation des patients qui ne peuvent sécréter de CM. Il faut quand même mentionner que cette situation n'était pas sous notre contrôle puisque les deux génotypes créés produisaient des homozygotes non viables. Il aurait pu être intéressant de produire des souris avec une délétion spécifique à l'intestin ou au foie de la *sar1b* GTPase, ou de développer des souris dont la délétion est induite par le tamoxifène. Ces différents modèles auraient pu nous permettre d'obtenir possiblement des homozygotes viables. En outre, d'autres variables doivent être prises en compte pour confirmer la différence entre les mâles et les femelles. Par ailleurs, les analyses histologiques des embryons nécessiteraient toutes une confirmation par Oil Red O avec quantification des GTL.

Enfin, ces projets fondamentaux ont plusieurs perspectives à long terme. Tout d'abord, la découverte du rôle de la PLD1 dans la sécrétion de CM est très intéressante car il serait tout à fait envisageable de développer des médicaments ciblant cette enzyme pour réduire la sécrétion de CM et donc éventuellement traiter les désordres associés aux maladies cardiométaboliques. De plus, ces résultats pourraient aider au génotypage des patients atteints de malabsorption lipidique puisque, selon nos résultats, il serait possible qu'une mutation du gène *PLD1* provoque bien des maladies absorptives. Quant à la *Sar1b* GTPase, nos résultats rassureront les cliniciens en démontrant la relation de cause à effet entre ce gène et la MRC, et pour les alerter sur des complications supplémentaires. Comme pour la PLD1, il pourrait être intéressant de développer des médicaments qui réduisent l'activité de la *Sar1b* GTPase pour modifier la sécrétion de CM dans des pathologies cardiométaboliques. Cette enzyme serait encore plus pertinente que le MTPP puisqu'elle ne provoquerait pas les effets indésirables de ce dernier, à savoir le développement d'une stéatose hépatique. Nos résultats ont également mis en évidence

l'importance de prendre en compte le sexe et le type de mutation pour diagnostiquer la sévérité de la maladie.

Références bibliographiques

1. Festi D, Schiumerini R, Eusebi LH, Marasco G, Taddia M, Colecchia A. Gut microbiota and metabolic syndrome. *World J Gastroenterol.* 2014;20(43):16079-94.
2. Levy E, Beaulieu JF, Spahis S. From Congenital Disorders of Fat Malabsorption to Understanding Intra-Enterocyte Mechanisms Behind Chylomicron Assembly and Secretion. *Front Physiol.* 2021;12:629222.
3. Chait A, Ginsberg HN, Vaisar T, Heinecke JW, Goldberg IJ, Bornfeldt KE. Remnants of the Triglyceride-Rich Lipoproteins, Diabetes, and Cardiovascular Disease. *Diabetes.* 2020;69(4):508-16.
4. Saito K, Maeda M, Katada T. Regulation of the Sar1 GTPase Cycle Is Necessary for Large Cargo Secretion from the Endoplasmic Reticulum. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5:75.
5. Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, et al. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet.* 2003;34(1):29-31.
6. Auclair N, Sane AT, Delvin E, Spahis S, Levy E. Phospholipase D as a Potential Modulator of Metabolic Syndrome: Impact of Functional Foods. *Antioxid Redox Signal.* 2021;34(3):252-78.
7. Chen YG, Siddhanta A, Austin CD, Hammond SM, Sung TC, Frohman MA, et al. Phospholipase D stimulates release of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network. *J Cell Biol.* 1997;138(3):495-504.
8. Roth MG, Bi K, Ktistakis NT, Yu S. Phospholipase D as an effector for ADP-ribosylation factor in the regulation of vesicular traffic. *Chem Phys Lipids.* 1999;98(1-2):141-52.
9. Jones D, Morgan C, Cockcroft S. Phospholipase D and membrane traffic. Potential roles in regulated exocytosis, membrane delivery and vesicle budding. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1439(2):229-44.
10. Asp L, Claesson C, Boren J, Olofsson SO. ADP-ribosylation factor 1 and its activation of phospholipase D are important for the assembly of very low density lipoproteins. *J Biol Chem.* 2000;275(34):26285-92.

11. Tang BL, Wang Y, Ong YS, Hong W. COPII and exit from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1744(3):293-303.
12. Beck R, Rawet M, Wieland FT, Cassel D. The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS Lett*. 2009;583(17):2701-9.
13. LaLonde M, Janssens H, Yun S, Crosby J, Redina O, Olive V, et al. A role for Phospholipase D in *Drosophila* embryonic cellularization. *BMC Dev Biol*. 2006;6:60.
14. Reed KK, Wickham R. Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro. *Semin Oncol Nurs*. 2009;25(1):3-14.
15. DeSesso JM, Jacobson CF, Williams AL, Edm, interactions. Anatomical and physiological parameters that influence gastrointestinal absorption. 2011:1-35.
16. Ogobuiro I, Gonzales J, Tuma F. *Physiology, Gastrointestinal*. StatPearls. Treasure Island (FL)2022.
17. Haschek WM, Rousseaux CG. *Handbook of Toxicologic Pathology*: Elsevier Science; 2013.
18. Tortora GJ, Derrickson BH. *Principles of Anatomy and Physiology*, 14th Edition: 14th Edition: Wiley; 2013.
19. Griffin BA. Lipid metabolism. *Surgery (Oxford)*. 2013;31(6):267-72.
20. Brockerhoff H, Yurkowski M. Stereospecific analyses of several vegetable fats. *J Lipid Res*. 1966;7(1):62-4.
21. Christie WW, Nikolova-Damyanova B, Laakso P, Herslof B. Stereospecific analysis of triacyl-sn-glycerols via resolution of diastereomeric diacylglycerol derivatives by high-performance liquid chromatography on silica. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1991;68(10):695-701.
22. Christie WW, Moore JH, Lorimer AR, Lawrie TDV. The structures of triglycerides from atherosclerotic plaques and other human tissues. *Lipids*. 1971;6(11):854-6.
23. Brockerhoff H, Hoyle RJ, Wolmark N. Positional distribution of fatty acids in triglycerides of animal depot fats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1966;116(1):67-72.
24. Christie WW, Moore JH. Structures of triglycerides isolated from various sheep tissues. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1971;22(3):120-4.

25. Christie WW, Moore JH. A comparison of the structures of triglycerides from various pig tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1970;210(1):46-56.
26. Christie WW, Moore JH. The structures of adipose tissue and heart muscle triglycerides in the domestic chicken (*Gallus gallus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1972;23(1):73-7.
27. Wilson MD, Rudel LL. Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *J Lipid Res*. 1994;35(6):943-55.
28. Gregory EL. Thermoregulatory aspects of adipose tissue. *Clin Dermatol*. 1989;7(4):78-92.
29. Hamilton RL. Synthesis and secretion of plasma lipoproteins. *Adv Exp Med Biol*. 1972;26(0):7-24.
30. Salvia-Trujillo L, Qian C, Martin-Belloso O, McClements DJ. Influence of particle size on lipid digestion and beta-carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chem*. 2013;141(2):1472-80.
31. Glatz JF. Challenges in Fatty Acid and lipid physiology. *Front Physiol*. 2011;2:45.
32. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*. 2010;327(5961):46-50.
33. Brown FD, Rozelle AL, Yin HL, Balla T, Donaldson JG. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol*. 2001;154(5):1007-17.
34. Layne J, Majkova Z, Smart EJ, Toborek M, Hennig B. Caveolae: a regulatory platform for nutritional modulation of inflammatory diseases. *J Nutr Biochem*. 2011;22(9):807-11.
35. Ohanian J, Ohanian V. Lipid second messenger regulation: the role of diacylglycerol kinases and their relevance to hypertension. *J Hum Hypertens*. 2001;15(2):93-8.
36. Foster DA. Phosphatidic acid signaling to mTOR: signals for the survival of human cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791(9):949-55.
37. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*. 2002;56(8):365-79.
38. Botham KM, Mayes PA. Lipids of Physiologic Significance. In: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA, editors. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 30e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2016.

39. Feingold KR. Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, et al., editors. Endotext. South Dartmouth (MA)2000.
40. Morel S, Leahy J, Fournier M, Lamarche B, Garofalo C, Grimard G, et al. Lipid and lipoprotein abnormalities in acute lymphoblastic leukemia survivors. *J Lipid Res.* 2017;58(5):982-93.
41. Welty FK. Hypobetalipoproteinemia and abetalipoproteinemia. *Curr Opin Lipidol.* 2014;25(3):161-8.
42. Ferreira H, Ramos RN, Quan CF, Ferreiro SR, Ruiz VC, Juamperez Goni J, et al. Chylomicron Retention Disease: a Description of a New Mutation in a Very Rare Disease. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2018;21(2):134-40.
43. Ko CW, Qu J, Black DD, Tso P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;17(3):169-83.
44. Wood P, Imaichi K, Knowles J, Michaels G, Kinsell L. The Lipid Composition of Human Plasma Chylomicrons. *J Lipid Res.* 1964;5:225-31.
45. Blanc V, Davidson NO. C-to-U RNA editing: mechanisms leading to genetic diversity. *J Biol Chem.* 2003;278(3):1395-8.
46. Chester A, Weinreb V, Carter CW, Jr., Navaratnam N. Optimization of apolipoprotein B mRNA editing by APOBEC1 apoenzyme and the role of its auxiliary factor, ACF. *RNA.* 2004;10(9):1399-411.
47. Greeve J, Altkemper I, Dieterich JH, Greten H, Windler E. Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J Lipid Res.* 1993;34(8):1367-83.
48. Bisgaier CL, Glickman RM. Intestinal synthesis, secretion, and transport of lipoproteins. *Annu Rev Physiol.* 1983;45:625-36.
49. Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1529(1-3):245-56.
50. Dash S, Xiao C, Morgantini C, Lewis GF. New Insights into the Regulation of Chylomicron Production. *Annu Rev Nutr.* 2015;35:265-94.

51. Bruin T, Tuzgol S, van Diermen DE, Hoogerbrugge-van der Linden N, Brunzell JD, Hayden MR, et al. Recurrent pancreatitis and chylomicronemia in an extended Dutch kindred is caused by a Gly154-->Ser substitution in lipoprotein lipase. *J Lipid Res.* 1993;34(12):2109-19.
52. Tg, Hdl Working Group of the Exome Sequencing Project NHL, Blood I, Crosby J, Peloso GM, Auer PL, et al. Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *N Engl J Med.* 2014;371(1):22-31.
53. Willnow TE. Mechanisms of hepatic chylomicron remnant clearance. *Diabet Med.* 1997;14 Suppl 3:S75-80.
54. Su X, Kong Y, Peng DQ. New insights into apolipoprotein A5 in controlling lipoprotein metabolism in obesity and the metabolic syndrome patients. *Lipids Health Dis.* 2018;17(1):174.
55. Huang JK, Lee HC. Emerging Evidence of Pathological Roles of Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL). *Int J Mol Sci.* 2022;23(8).
56. Fon Tacer K, Rozman D. Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation. *J Lipids.* 2011;2011:783976.
57. Brites FD, Bonavita CD, Cloes M, Yael MJ, Fruchart JC, Castro GR, et al. VLDL compositional changes and plasma levels of triglycerides and high density lipoprotein. *Clin Chim Acta.* 1998;269(2):107-24.
58. Jong MC, Dahlmans VE, van Gorp PJ, van Dijk KW, Breuer ML, Hofker MH, et al. In the absence of the low density lipoprotein receptor, human apolipoprotein C1 overexpression in transgenic mice inhibits the hepatic uptake of very low density lipoproteins via a receptor-associated protein-sensitive pathway. *J Clin Invest.* 1996;98(10):2259-67.
59. Berbee JF, van der Hoogt CC, Sundararaman D, Havekes LM, Rensen PC. Severe hypertriglyceridemia in human APOC1 transgenic mice is caused by apoC-I-induced inhibition of LPL. *J Lipid Res.* 2005;46(2):297-306.
60. Hevonoja T, Pentikainen MO, Hyvonen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1488(3):189-210.
61. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(4):431-8.

62. Orlova EV, Sherman MB, Chiu W, Mowri H, Smith LC, Gotto AM, Jr. Three-dimensional structure of low density lipoproteins by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(15):8420-5.
63. Zhou L, Li C, Gao L, Wang A. High-density lipoprotein synthesis and metabolism (Review). *Mol Med Rep*. 2015;12(3):4015-21.
64. Rosenson RS, Brewer HB, Jr., Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, et al. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*. 2012;125(15):1905-19.
65. Charles MA, Kane JP. New molecular insights into CETP structure and function: a review. *J Lipid Res*. 2012;53(8):1451-8.
66. Shen WJ, Azhar S, Kraemer FB. SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annu Rev Physiol*. 2018;80:95-116.
67. Salonen JT, Salonen R, Seppanen K, Rauramaa R, Tuomilehto J. HDL, HDL2, and HDL3 subfractions, and the risk of acute myocardial infarction. A prospective population study in eastern Finnish men. *Circulation*. 1991;84(1):129-39.
68. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1998;27(3):503-19.
69. Lippi G, Guidi G. Lipoprotein(a): from ancestral benefit to modern pathogen? *QJM*. 2000;93(2):75-84.
70. Leischik R, Dworrak B. [Lipoprotein(a): importance for the fibrinolytic system and thromboembolic complications]. *Herz*. 2006;31(2):144-52.
71. Pamir N, Fazio S. Lipoprotein(a) Gets Worse. *Circ Res*. 2020;126(10):1360-2.
72. Kraft HG, Menzel HJ, Hoppichler F, Vogel W, Utermann G. Changes of genetic apolipoprotein phenotypes caused by liver transplantation. Implications for apolipoprotein synthesis. *J Clin Invest*. 1989;83(1):137-42.
73. Hrzenjak A, Frank S, Wo X, Zhou Y, Van Berkel T, Kostner GM. Galactose-specific asialoglycoprotein receptor is involved in lipoprotein (a) catabolism. *Biochem J*. 2003;376(Pt 3):765-71.

74. Cain WJ, Millar JS, Himebauch AS, Tietge UJ, Maugeais C, Usher D, et al. Lipoprotein [a] is cleared from the plasma primarily by the liver in a process mediated by apolipoprotein [a]. *J Lipid Res.* 2005;46(12):2681-91.
75. Berg K. A New Serum Type System in Man--the Lp System. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1963;59:369-82.
76. Maranhao RC, Carvalho PO, Strunz CC, Pileggi F. Lipoprotein (a): structure, pathophysiology and clinical implications. *Arq Bras Cardiol.* 2014;103(1):76-84.
77. Gaubatz JW, Chari MV, Nava ML, Guyton JR, Morrisett JD. Isolation and characterization of the two major apoproteins in human lipoprotein [a]. *J Lipid Res.* 1987;28(1):69-79.
78. Tsimikas S. A Test in Context: Lipoprotein(a): Diagnosis, Prognosis, Controversies, and Emerging Therapies. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(6):692-711.
79. Leibundgut G, Scipione C, Yin H, Schneider M, Boffa MB, Green S, et al. Determinants of binding of oxidized phospholipids on apolipoprotein (a) and lipoprotein (a). *J Lipid Res.* 2013;54(10):2815-30.
80. Hofmann AF, Borgstrom B. Hydrolysis of long-chain monoglycerides in micellar solution by pancreatic lipase. *Biochim Biophys Acta.* 1963;70:317-31.
81. Pan X, Hussain MM. Gut triglyceride production. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(5):727-35.
82. Murota K, Storch J. Uptake of micellar long-chain fatty acid and sn-2-monoacylglycerol into human intestinal Caco-2 cells exhibits characteristics of protein-mediated transport. *J Nutr.* 2005;135(7):1626-30.
83. Shah N, editor *The Use of Medium-Chain Triglycerides in Gastrointestinal Disorders* 2017.
84. Spector AA, Yorek MA. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res.* 1985;26(9):1015-35.
85. Alpers DH, Bass NM, Engle MJ, DeSchryver-Kecsckemeti K. Intestinal fatty acid binding protein may favor differential apical fatty acid binding in the intestine. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1483(3):352-62.
86. Naupert C, Rommel K. Absorption of short and medium chain fatty acids in the jejunum of the rat. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 1975;13(12):553-62.

87. Atshaves BP, Martin GG, Hostetler HA, McIntosh AL, Kier AB, Schroeder F. Liver fatty acid-binding protein and obesity. *J Nutr Biochem.* 2010;21(11):1015-32.
88. Ishizawa R, Masuda K, Sakata S, Nakatani A. Effects of different fatty acid chain lengths on fatty acid oxidation-related protein expression levels in rat skeletal muscles. *J Oleo Sci.* 2015;64(4):415-21.
89. Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal.* 2009;2(72):re3.
90. Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem.* 1993;268(24):17665-8.
91. Lobo MV, Huerta L, Ruiz-Velasco N, Teixeira E, de la Cueva P, Celdran A, et al. Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids. *J Histochem Cytochem.* 2001;49(10):1253-60.
92. Coburn CT, Knapp FF, Jr., Febbraio M, Beets AL, Silverstein RL, Abumrad NA. Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem.* 2000;275(42):32523-9.
93. Hirano K, Kuwasako T, Nakagawa-Toyama Y, Janabi M, Yamashita S, Matsuzawa Y. Pathophysiology of human genetic CD36 deficiency. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13(4):136-41.
94. Furuhashi M, Ura N, Nakata T, Shimamoto K. Insulin sensitivity and lipid metabolism in human CD36 deficiency. *Diabetes Care.* 2003;26(2):471-4.
95. Miyaoka K, Kuwasako T, Hirano K, Nozaki S, Yamashita S, Matsuzawa Y. CD36 deficiency associated with insulin resistance. *Lancet.* 2001;357(9257):686-7.
96. Drover VA, Ajmal M, Nassir F, Davidson NO, Nauli AM, Sahoo D, et al. CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1290-7.

97. Nauli AM, Nassir F, Zheng S, Yang Q, Lo CM, Vonlehmden SB, et al. CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology*. 2006;131(4):1197-207.
98. Lynes M, Narisawa S, Millan JL, Widmaier EP. 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*. 2011;301(6):R1738-47.
99. Stahl A, Hirsch DJ, Gimeno RE, Punreddy S, Ge P, Watson N, et al. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol Cell*. 1999;4(3):299-308.
100. Shim J, Moulson CL, Newberry EP, Lin MH, Xie Y, Kennedy SM, et al. Fatty acid transport protein 4 is dispensable for intestinal lipid absorption in mice. *J Lipid Res*. 2009;50(3):491-500.
101. Gimeno RE, Hirsch DJ, Punreddy S, Sun Y, Ortegon AM, Wu H, et al. Targeted deletion of fatty acid transport protein-4 results in early embryonic lethality. *J Biol Chem*. 2003;278(49):49512-6.
102. Altmann SW, Davis HR, Jr., Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*. 2004;303(5661):1201-4.
103. Wang LJ, Wang J, Li N, Ge L, Li BL, Song BL. Molecular characterization of the NPC1L1 variants identified from cholesterol low absorbers. *J Biol Chem*. 2011;286(9):7397-408.
104. Li PS, Fu ZY, Zhang YY, Zhang JH, Xu CQ, Ma YT, et al. The clathrin adaptor Numb regulates intestinal cholesterol absorption through dynamic interaction with NPC1L1. *Nat Med*. 2014;20(1):80-6.
105. Nihei W, Nagafuku M, Hayamizu H, Odagiri Y, Tamura Y, Kikuchi Y, et al. NPC1L1-dependent intestinal cholesterol absorption requires ganglioside GM3 in membrane microdomains. *J Lipid Res*. 2018;59(11):2181-7.
106. Ge L, Qi W, Wang LJ, Miao HH, Qu YX, Li BL, et al. Flotillins play an essential role in Niemann-Pick C1-like 1-mediated cholesterol uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(2):551-6.
107. Betters JL, Yu L. NPC1L1 and cholesterol transport. *FEBS Lett*. 2010;584(13):2740-7.

108. Ge L, Wang J, Qi W, Miao HH, Cao J, Qu YX, et al. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. *Cell Metab.* 2008;7(6):508-19.
109. Biatrix F, Yan D, Nauze M, Rolland C, Bertrand-Michel J, Comera C, et al. Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *J Biol Chem.* 2006;281(11):7214-9.
110. Bura KS, Lord C, Marshall S, McDaniel A, Thomas G, Warriar M, et al. Intestinal SR-BI does not impact cholesterol absorption or transintestinal cholesterol efflux in mice. *J Lipid Res.* 2013;54(6):1567-77.
111. Mardones P, Quinones V, Amigo L, Moreno M, Miquel JF, Schwarz M, et al. Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res.* 2001;42(2):170-80.
112. Hayashi AA, Webb J, Choi J, Baker C, Lino M, Trigatti B, et al. Intestinal SR-BI is upregulated in insulin-resistant states and is associated with overproduction of intestinal apoB48-containing lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301(2):G326-37.
113. Lino M, Farr S, Baker C, Fuller M, Trigatti B, Adeli K. Intestinal scavenger receptor class B type I as a novel regulator of chylomicron production in healthy and diet-induced obese states. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;309(5):G350-9.
114. Morel E, Ghezzal S, Lucchi G, Truntzer C, Pais de Barros JP, Simon-Plas F, et al. Cholesterol trafficking and raft-like membrane domain composition mediate scavenger receptor class B type 1-dependent lipid sensing in intestinal epithelial cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2018;1863(2):199-211.
115. Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, et al. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem.* 2003;278(48):48275-82.
116. Weingartner O, Lutjohann D, Ji S, Weisshoff N, List F, Sudhop T, et al. Vascular effects of diet supplementation with plant sterols. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(16):1553-61.
117. Bjorkhem I, Starck L, Andersson U, Lutjohann D, von Bahr S, Pikuleva I, et al. Oxysterols in the circulation of patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome: abnormal levels of 24S- and 27-hydroxycholesterol. *J Lipid Res.* 2001;42(3):366-71.

118. Bhattacharyya AK, Connor WE. Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters. *J Clin Invest.* 1974;53(4):1033-43.
119. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, et al. Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(25):16237-42.
120. Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, et al. Overexpression of *ABCG5* and *ABCG8* promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest.* 2002;110(5):671-80.
121. Wang J, Mitsche MA, Lutjohann D, Cohen JC, Xie XS, Hobbs HH. Relative roles of *ABCG5/ABCG8* in liver and intestine. *J Lipid Res.* 2015;56(2):319-30.
122. Bass NM. Function and regulation of hepatic and intestinal fatty acid binding proteins. *Chem Phys Lipids.* 1985;38(1-2):95-114.
123. Lagakos WS, Gajda AM, Agellon L, Binas B, Choi V, Mandap B, et al. 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.* 2011;300(5):G803-14.
124. Thumser AE, Storch J. Liver and intestinal fatty acid-binding proteins obtain fatty acids from phospholipid membranes by different mechanisms. *J Lipid Res.* 2000;41(4):647-56.
125. Hsu KT, Storch J. Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *J Biol Chem.* 1996;271(23):13317-23.
126. Ellis JM, Frahm JL, Li LO, Coleman RA. Acyl-coenzyme A synthetases in metabolic control. *Curr Opin Lipidol.* 2010;21(3):212-7.
127. Oikawa E, Iijima H, Suzuki T, Sasano H, Sato H, Kamataki A, et al. A novel acyl-CoA synthetase, *ACS5*, expressed in intestinal epithelial cells and proliferating preadipocytes. *J Biochem.* 1998;124(3):679-85.
128. Suzuki H, Kawarabayasi Y, Kondo J, Abe T, Nishikawa K, Kimura S, et al. Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem.* 1990;265(15):8681-5.
129. Yen CL, Cheong ML, Grueter C, Zhou P, Moriwaki J, Wong JS, et al. Deficiency of the intestinal enzyme acyl CoA:monoacylglycerol acyltransferase-2 protects mice from metabolic disorders induced by high-fat feeding. *Nat Med.* 2009;15(4):442-6.

130. Yen CL, Farese RV, Jr. MGAT2, a monoacylglycerol acyltransferase expressed in the small intestine. *J Biol Chem*. 2003;278(20):18532-7.
131. Yen CL, Stone SJ, Koliwad S, Harris C, Farese RV, Jr. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res*. 2008;49(11):2283-301.
132. Buhman KK, Smith SJ, Stone SJ, Repa JJ, Wong JS, Knapp FF, Jr., et al. DGAT1 is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis. *J Biol Chem*. 2002;277(28):25474-9.
133. Stone SJ, Myers HM, Watkins SM, Brown BE, Feingold KR, Elias PM, et al. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem*. 2004;279(12):11767-76.
134. Meiner VL, Cases S, Myers HM, Sande ER, Bellosta S, Schambelan M, et al. Disruption of the acyl-CoA:cholesterol acyltransferase gene in mice: evidence suggesting multiple cholesterol esterification enzymes in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(24):14041-6.
135. Buhman KK, Accad M, Novak S, Choi RS, Wong JS, Hamilton RL, et al. Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat Med*. 2000;6(12):1341-7.
136. Abumrad NA, Davidson NO. Role of the gut in lipid homeostasis. *Physiol Rev*. 2012;92(3):1061-85.
137. Meiner V, Tam C, Gunn MD, Dong LM, Weisgraber KH, Novak S, et al. Tissue expression studies on the mouse acyl-CoA: cholesterol acyltransferase gene (*Acact*): findings supporting the existence of multiple cholesterol esterification enzymes in mice. *J Lipid Res*. 1997;38(9):1928-33.
138. Anderson RA, Joyce C, Davis M, Reagan JW, Clark M, Shelness GS, et al. Identification of a form of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase specific to liver and intestine in nonhuman primates. *J Biol Chem*. 1998;273(41):26747-54.
139. Rong X, Wang B, Dunham MM, Hedde PN, Wong JS, Gratton E, et al. *Lpcat3*-dependent production of arachidonoyl phospholipids is a key determinant of triglyceride secretion. *Elife*. 2015;4.
140. Li Z, Jiang H, Ding T, Lou C, Bui HH, Kuo MS, et al. Deficiency in lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 reduces plasma levels of lipids by reducing lipid absorption in mice. *Gastroenterology*. 2015;149(6):1519-29.

141. Kabir I, Li Z, Bui HH, Kuo MS, Gao G, Jiang XC. Small Intestine but Not Liver Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3 (Lpcat3) Deficiency Has a Dominant Effect on Plasma Lipid Metabolism. *J Biol Chem*. 2016;291(14):7651-60.
142. Auclair N, Melbouci L, St-Pierre D, Levy E. Gastrointestinal factors regulating lipid droplet formation in the intestine. *Exp Cell Res*. 2018;363(1):1-14.
143. Hashemi HF, Goodman JM. The life cycle of lipid droplets. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;33:119-24.
144. Lee B, Zhu J, Wolins NE, Cheng JX, Buhman KK. Differential association of adipophilin and TIP47 proteins with cytoplasmic lipid droplets in mouse enterocytes during dietary fat absorption. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791(12):1173-80.
145. Seyer A, Cantiello M, Bertrand-Michel J, Roques V, Nauze M, Bezirard V, et al. Lipidomic and spatio-temporal imaging of fat by mass spectrometry in mice duodenum during lipid digestion. *PLoS One*. 2013;8(4):e58224.
146. D'Aquila T, Sirohi D, Grabowski JM, Hedrick VE, Paul LN, Greenberg AS, et al. Characterization of the proteome of cytoplasmic lipid droplets in mouse enterocytes after a dietary fat challenge. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126823.
147. Sztalryd C, Kimmel AR. Perilipins: lipid droplet coat proteins adapted for tissue-specific energy storage and utilization, and lipid cytoprotection. *Biochimie*. 2014;96:96-101.
148. Athenstaedt K, Daum G. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(12):1355-69.
149. Ohsaki Y, Cheng J, Fujita A, Tokumoto T, Fujimoto T. Cytoplasmic lipid droplets are sites of convergence of proteasomal and autophagic degradation of apolipoprotein B. *Mol Biol Cell*. 2006;17(6):2674-83.
150. Demignot S, Beilstein F, Morel E. Triglyceride-rich lipoproteins and cytosolic lipid droplets in enterocytes: key players in intestinal physiology and metabolic disorders. *Biochimie*. 2014;96:48-55.
151. Yang H, Galea A, Sytnyk V, Crossley M. Controlling the size of lipid droplets: lipid and protein factors. *Curr Opin Cell Biol*. 2012;24(4):509-16.

152. Gong J, Sun Z, Li P. CIDE proteins and metabolic disorders. *Curr Opin Lipidol.* 2009;20(2):121-6.
153. Gross DA, Silver DL. Cytosolic lipid droplets: from mechanisms of fat storage to disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014;49(4):304-26.
154. Kraemer N, Farese RV, Jr., Walther TC. Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol Med.* 2013;5(7):973-83.
155. Kuerschner L, Moessinger C, Thiele C. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic.* 2008;9(3):338-52.
156. Salo VT, Belevich I, Li S, Karhinen L, Vihinen H, Vigouroux C, et al. Seipin regulates ER-lipid droplet contacts and cargo delivery. *EMBO J.* 2016;35(24):2699-716.
157. Sahu-Osen A, Montero-Moran G, Schittmayer M, Fritz K, Dinh A, Chang YF, et al. CGI-58/ABHD5 is phosphorylated on Ser239 by protein kinase A: control of subcellular localization. *J Lipid Res.* 2015;56(1):109-21.
158. Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A, et al. FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab.* 2012;15(3):279-91.
159. Yamaguchi T, Osumi T. Chanarin-Dorfman syndrome: deficiency in CGI-58, a lipid droplet-bound coactivator of lipase. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791(6):519-23.
160. Storch J, Zhou YX, Lagakos WS. Metabolism of apical versus basolateral sn-2-monoacylglycerol and fatty acids in rodent small intestine. *J Lipid Res.* 2008;49(8):1762-9.
161. Windmueller HG, Spaeth AE. Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels in vivo for postabsorptive rat small intestine. *J Biol Chem.* 1978;253(1):69-76.
162. Khaldoun SA, Emond-Boisjoly MA, Chateau D, Carriere V, Lacasa M, Rousset M, et al. Autophagosomes contribute to intracellular lipid distribution in enterocytes. *Mol Biol Cell.* 2014;25(1):118-32.
163. Hayashi H, Fujimoto K, Cardelli JA, Nutting DF, Bergstedt S, Tso P. Fat feeding increases size, but not number, of chylomicrons produced by small intestine. *Am J Physiol.* 1990;259(5 Pt 1):G709-19.
164. Hussain MM, Rava P, Pan X, Dai K, Dougan SK, Iqbal J, et al. Microsomal triglyceride transfer protein in plasma and cellular lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2008;19(3):277-84.

165. Rava P, Hussain MM. Acquisition of triacylglycerol transfer activity by microsomal triglyceride transfer protein during evolution. *Biochemistry*. 2007;46(43):12263-74.
166. Atzel A, Wetterau JR. Mechanism of microsomal triglyceride transfer protein catalyzed lipid transport. *Biochemistry*. 1993;32(39):10444-50.
167. Hussain MM, Bakillah A, Nayak N, Shelness GS. Amino acids 430-570 in apolipoprotein B are critical for its binding to microsomal triglyceride transfer protein. *J Biol Chem*. 1998;273(40):25612-5.
168. Jiang ZG, Liu Y, Hussain MM, Atkinson D, McKnight CJ. Reconstituting initial events during the assembly of apolipoprotein B-containing lipoproteins in a cell-free system. *J Mol Biol*. 2008;383(5):1181-94.
169. Kulinski A, Rustaeus S, Vance JE. Microsomal triacylglycerol transfer protein is required for luminal accretion of triacylglycerol not associated with ApoB, as well as for ApoB lipidation. *J Biol Chem*. 2002;277(35):31516-25.
170. Raabe M, Veniant MM, Sullivan MA, Zlot CH, Bjorkegren J, Nielsen LB, et al. Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *J Clin Invest*. 1999;103(9):1287-98.
171. Xie Y, Newberry EP, Young SG, Robine S, Hamilton RL, Wong JS, et al. Compensatory increase in hepatic lipogenesis in mice with conditional intestine-specific Mttp deficiency. *J Biol Chem*. 2006;281(7):4075-86.
172. Berriot-Varoqueaux N, Aggerbeck LP, Samson-Bouma M, Wetterau JR. The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *Annu Rev Nutr*. 2000;20:663-97.
173. Fisher EA, Ginsberg HN. Complexity in the secretory pathway: the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J Biol Chem*. 2002;277(20):17377-80.
174. Hussain MM, Shi J, Dreizen P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res*. 2003;44(1):22-32.
175. Liang S, Wu X, Fisher EA, Ginsberg HN. The amino-terminal domain of apolipoprotein B does not undergo retrograde translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. Proteasomal degradation of nascent apolipoprotein B begins at the carboxyl terminus of the

protein, while apolipoprotein B is still in its original translocon. *J Biol Chem.* 2000;275(41):32003-10.

176. Liao W, Chan L. Apolipoprotein B, a paradigm for proteins regulated by intracellular degradation, does not undergo intracellular degradation in CaCo2 cells. *J Biol Chem.* 2000;275(6):3950-6.

177. Shelness GS, Morris-Rogers KC, Ingram MF. Apolipoprotein B48-membrane interactions. Absence of transmembrane localization in nonhepatic cells. *J Biol Chem.* 1994;269(12):9310-8.

178. Dominiczak MH, Caslake MJ. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann Clin Biochem.* 2011;48(Pt 6):498-515.

179. Young SG, Cham CM, Pitas RE, Burri BJ, Connolly A, Flynn L, et al. A genetic model for absent chylomicron formation: mice producing apolipoprotein B in the liver, but not in the intestine. *J Clin Invest.* 1995;96(6):2932-46.

180. Burnett JR, Hooper AJ, Hegele RA. APOB-Related Familial Hypobetalipoproteinemia. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LH, Gripp KW, et al., editors. *GeneReviews*(R). Seattle (WA)1993.

181. Lu S, Yao Y, Cheng X, Mitchell S, Leng S, Meng S, et al. Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid secretion in IPEC-1 cells by increasing chylomicron size. *J Biol Chem.* 2006;281(6):3473-83.

182. Aalto-Setälä K, Bisgaier CL, Ho A, Kieft KA, Traber MG, Kayden HJ, et al. Intestinal expression of human apolipoprotein A-IV in transgenic mice fails to influence dietary lipid absorption or feeding behavior. *J Clin Invest.* 1994;93(4):1776-86.

183. Pan X, Munshi MK, Iqbal J, Queiroz J, Sirwi AA, Shah S, et al. Circadian regulation of intestinal lipid absorption by apolipoprotein AIV involves forkhead transcription factors A2 and O1 and microsomal triglyceride transfer protein. *J Biol Chem.* 2013;288(28):20464-76.

184. Weinstock PH, Bisgaier CL, Hayek T, Aalto-Setälä K, Sehayek E, Wu L, et al. Decreased HDL cholesterol levels but normal lipid absorption, growth, and feeding behavior in apolipoprotein A-IV knockout mice. *J Lipid Res.* 1997;38(9):1782-94.

185. Siddiqi S, Saleem U, Abumrad NA, Davidson NO, Storch J, Siddiqi SA, et al. A novel multiprotein complex is required to generate the prechylomicron transport vesicle from intestinal ER. *J Lipid Res.* 2010;51(7):1918-28.
186. Jensen D, Schekman R. COPII-mediated vesicle formation at a glance. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 1):1-4.
187. Gorur A, Yuan L, Kenny SJ, Baba S, Xu K, Schekman R. COPII-coated membranes function as transport carriers of intracellular procollagen I. *J Cell Biol.* 2017;216(6):1745-59.
188. Aridor M, Fish KN, Bannykh S, Weissman J, Roberts TH, Lippincott-Schwartz J, et al. The Sar1 GTPase coordinates biosynthetic cargo selection with endoplasmic reticulum export site assembly. *J Cell Biol.* 2001;152(1):213-29.
189. Zanetti G, Prinz S, Daum S, Meister A, Schekman R, Bacia K, et al. The structure of the COPII transport-vesicle coat assembled on membranes. *Elife.* 2013;2:e00951.
190. Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, et al. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell.* 1994;77(6):895-907.
191. Antonny B, Madden D, Hamamoto S, Orci L, Schekman R. Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol.* 2001;3(6):531-7.
192. Lee MC, Orci L, Hamamoto S, Futai E, Ravazzola M, Schekman R. Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell.* 2005;122(4):605-17.
193. Settles EI, Loftus AF, McKeown AN, Parthasarathy R. The vesicle trafficking protein Sar1 lowers lipid membrane rigidity. *Biophys J.* 2010;99(5):1539-45.
194. Hanna MGt, Mela I, Wang L, Henderson RM, Chapman ER, Edwardson JM, et al. Sar1 GTPase Activity Is Regulated by Membrane Curvature. *J Biol Chem.* 2016;291(3):1014-27.
195. Sane AT, Seidman E, Peretti N, Kleme ML, Delvin E, Deslandres C, et al. Understanding Chylomicron Retention Disease Through Sar1b Gtpase Gene Disruption: Insight From Cell Culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(12):2243-51.

196. Levy E, Spahis S, Garofalo C, Marcil V, Montoudis A, Sinnet D, et al. Sar1b transgenic male mice are more susceptible to high-fat diet-induced obesity, insulin insensitivity and intestinal chylomicron overproduction. *J Nutr Biochem*. 2014;25(5):540-8.
197. d'Enfert C, Barlowe C, Nishikawa S, Nakano A, Schekman R. Structural and functional dissection of a membrane glycoprotein required for vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol*. 1991;11(11):5727-34.
198. Weissman JT, Plutner H, Balch WE. The mammalian guanine nucleotide exchange factor mSec12 is essential for activation of the Sar1 GTPase directing endoplasmic reticulum export. *Traffic*. 2001;2(7):465-75.
199. Kung LF, Pagant S, Futai E, D'Arcangelo JG, Buchanan R, Dittmar JC, et al. Sec24p and Sec16p cooperate to regulate the GTP cycle of the COPII coat. *EMBO J*. 2012;31(4):1014-27.
200. Yorimitsu T, Sato K. Insights into structural and regulatory roles of Sec16 in COPII vesicle formation at ER exit sites. *Mol Biol Cell*. 2012;23(15):2930-42.
201. Siddiqi SA, Mahan J, Siddiqi S, Gorelick FS, Mansbach CM, 2nd. Vesicle-associated membrane protein 7 is expressed in intestinal ER. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 5):943-50.
202. Saito K, Chen M, Bard F, Chen S, Zhou H, Woodley D, et al. TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites. *Cell*. 2009;136(5):891-902.
203. Saito K, Yamashiro K, Ichikawa Y, Erlmann P, Kontani K, Malhotra V, et al. cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites. *Mol Biol Cell*. 2011;22(13):2301-8.
204. Saito K, Yamashiro K, Shimazu N, Tanabe T, Kontani K, Katada T. Concentration of Sec12 at ER exit sites via interaction with cTAGE5 is required for collagen export. *J Cell Biol*. 2014;206(6):751-62.
205. Pitman JL, Bonnet DJ, Curtiss LK, Gekakis N. Reduced cholesterol and triglycerides in mice with a mutation in Mia2, a liver protein that localizes to ER exit sites. *J Lipid Res*. 2011;52(10):1775-86.
206. Santos AJ, Nogueira C, Ortega-Bellido M, Malhotra V. TANGO1 and Mia2/cTAGE5 (TALI) cooperate to export bulky pre-chylomicrons/VLDLs from the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 2016;213(3):343-54.

207. Kloepper TH, Kienle CN, Fasshauer D. An elaborate classification of SNARE proteins sheds light on the conservation of the eukaryotic endomembrane system. *Mol Biol Cell*. 2007;18(9):3463-71.
208. Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(26):15781-6.
209. Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, et al. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*. 1998;92(6):759-72.
210. Siddiqi SA, Gorelick FS, Mahan JT, Mansbach CM, 2nd. COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 2):415-27.
211. Berriot-Varoqueaux N, Dannoura AH, Moreau A, Verthier N, Sassolas A, Cadiot G, et al. Apolipoprotein B48 glycosylation in abetalipoproteinemia and Anderson's disease. *Gastroenterology*. 2001;121(5):1101-8.
212. Hesse D, Jaschke A, Chung B, Schurmann A. Trans-Golgi proteins participate in the control of lipid droplet and chylomicron formation. *Biosci Rep*. 2013;33(1):1-9.
213. Jaschke A, Chung B, Hesse D, Kluge R, Zahn C, Moser M, et al. The GTPase ARFRP1 controls the lipidation of chylomicrons in the Golgi of the intestinal epithelium. *Hum Mol Genet*. 2012;21(14):3128-42.
214. Tso P, Balint JA, Rodgers JB. Effect of hydrophobic surfactant (Pluronic L-81) on lymphatic lipid transport in the rat. *Am J Physiol*. 1980;239(5):G348-53.
215. Kvietys PR, Specian RD, Grisham MB, Tso P. Jejunal mucosal injury and restitution: role of hydrolytic products of food digestion. *Am J Physiol*. 1991;261(3 Pt 1):G384-91.
216. Marat AL, Dokainish H, McPherson PS. DENN domain proteins: regulators of Rab GTPases. *J Biol Chem*. 2011;286(16):13791-800.
217. Gordon SM, Neufeld EB, Yang Z, Pryor M, Freeman LA, Fan X, et al. DENND5B Regulates Intestinal Triglyceride Absorption and Body Mass. *Sci Rep*. 2019;9(1):3597.
218. Bernier-Latmani J, Petrova TV. Intestinal lymphatic vasculature: structure, mechanisms and functions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(9):510-26.

219. Shew T, Wolins NE, Cifarelli V. VEGFR-3 Signaling Regulates Triglyceride Retention and Absorption in the Intestine. *Front Physiol.* 2018;9:1783.
220. Baluk P, Fuxe J, Hashizume H, Romano T, Lashnits E, Butz S, et al. Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J Exp Med.* 2007;204(10):2349-62.
221. Bernier-Latmani J, Cisarovsky C, Demir CS, Bruand M, Jaquet M, Davanture S, et al. DLL4 promotes continuous adult intestinal lacteal regeneration and dietary fat transport. *J Clin Invest.* 2015;125(12):4572-86.
222. Zhang F, Zarkada G, Han J, Li J, Dubrac A, Ola R, et al. Lacteal junction zippering protects against diet-induced obesity. *Science.* 2018;361(6402):599-603.
223. Choe K, Jang JY, Park I, Kim Y, Ahn S, Park DY, et al. Intravital imaging of intestinal lacteals unveils lipid drainage through contractility. *J Clin Invest.* 2015;125(11):4042-52.
224. Sabine A, Davis MJ, Bovay E, Petrova TV. Characterization of Mouse Mesenteric Lymphatic Valve Structure and Function. *Methods Mol Biol.* 2018;1846:97-129.
225. Kassis T, Yarlagadda SC, Kohan AB, Tso P, Breedveld V, Dixon JB. Postprandial lymphatic pump function after a high-fat meal: a characterization of contractility, flow, and viscosity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016;310(10):G776-89.
226. Takahara E, Yuasa H, Nishida M, Mantani Y, Udayanga KG, Qi WM, et al. Immunohistochemical and histoplanimetric study on the endothelial receptor involved in transportation of minute chylomicrons into subepithelial portal blood in intestinal villi of the rat jejunum. *J Vet Med Sci.* 2015;77(4):387-93.
227. Dixon JB. Mechanisms of chylomicron uptake into lacteals. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1207 Suppl 1:E52-7.
228. Van Dyck F, Braem CV, Chen Z, Declercq J, Deckers R, Kim BM, et al. Loss of the PlagL2 transcription factor affects lacteal uptake of chylomicrons. *Cell Metab.* 2007;6(5):406-13.
229. Xiao C, Stahel P, Lewis GF. Regulation of Chylomicron Secretion: Focus on Post-Assembly Mechanisms. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2019;7(3):487-501.
230. Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, et al. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest.* 2006;116(4):1052-62.

231. Kang MH, Singaraja R, Hayden MR. Adenosine-triphosphate-binding cassette transporter-1 trafficking and function. *Trends Cardiovasc Med*. 2010;20(2):41-9.
232. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet*. 1999;22(4):336-45.
233. Brufau G, Groen AK, Kuipers F. Reverse cholesterol transport revisited: contribution of biliary versus intestinal cholesterol excretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(8):1726-33.
234. van der Veen JN, van Dijk TH, Vrins CL, van Meer H, Havinga R, Bijsterveld K, et al. Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *J Biol Chem*. 2009;284(29):19211-9.
235. Stanley MM, Pineda EP, Cheng SH. Serum cholesterol esters and intestinal cholesterol secretion and absorption in obstructive jaundice due to cancer. *N Engl J Med*. 1959;261:368-73.
236. Cheng SH, Stanley MM. Secretion of cholesterol by intestinal mucosa in patients with complete common bile duct obstruction. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1959;101(2):223-5.
237. Zhao Y, Pennings M, Vrins CL, Calpe-Berdiel L, Hoekstra M, Kruijt JK, et al. Hypocholesterolemia, foam cell accumulation, but no atherosclerosis in mice lacking ABC-transporter A1 and scavenger receptor BI. *Atherosclerosis*. 2011;218(2):314-22.
238. Vrins CLJ, Ottenhoff R, van den Oever K, de Waart DR, Kruijt JK, Zhao Y, et al. Trans-intestinal cholesterol efflux is not mediated through high density lipoprotein. *J Lipid Res*. 2012;53(10):2017-23.
239. Meoli L, Ben-Zvi D, Panciotti C, Kvas S, Pizarro P, Munoz R, et al. Intestine-Specific Overexpression of LDLR Enhances Cholesterol Excretion and Induces Metabolic Changes in Male Mice. *Endocrinology*. 2019;160(4):744-58.
240. Peterson AS, Fong LG, Young SG. PCSK9 function and physiology. *J Lipid Res*. 2008;49(6):1152-6.
241. Le May C, Berger JM, Lespine A, Pillot B, Prieur X, Letessier E, et al. Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(7):1484-93.

242. Grefhorst A, Verkade HJ, Groen AK. The TICE Pathway: Mechanisms and Lipid-Lowering Therapies. *Methodist Debaquey Cardiovasc J*. 2019;15(1):70-6.
243. Li J, Pijut SS, Wang Y, Ji A, Kaur R, Temel RE, et al. Simultaneous Determination of Biliary and Intestinal Cholesterol Secretion Reveals That CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein) Alters Elimination Route in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(10):1986-95.
244. de Boer JF, Schonewille M, Boesjes M, Wolters H, Bloks VW, Bos T, et al. Intestinal Farnesoid X Receptor Controls Transintestinal Cholesterol Excretion in Mice. *Gastroenterology*. 2017;152(5):1126-38 e6.
245. Cohn JS, Marcoux C, Davignon J. Detection, quantification, and characterization of potentially atherogenic triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(10):2474-86.
246. Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med (Berl)*. 2002;80(12):753-69.
247. Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet*. 2009;10(2):109-21.
248. Johansen CT, Hegele RA. The complex genetic basis of plasma triglycerides. *Curr Atheroscler Rep*. 2012;14(3):227-34.
249. Van der Vusse GJ, Glatz JF, Van Nieuwenhoven FA, Reneman RS, Basingthwaighte JB. Transport of long-chain fatty acids across the muscular endothelium. *Adv Exp Med Biol*. 1998;441:181-91.
250. Jackson KG, Wolstencroft EJ, Bateman PA, Yaqoob P, Williams CM. Greater enrichment of triacylglycerol-rich lipoproteins with apolipoproteins E and C-III after meals rich in saturated fatty acids than after meals rich in unsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr*. 2005;81(1):25-34.
251. Weintraub MS, Zechner R, Brown A, Eisenberg S, Breslow JL. Dietary polyunsaturated fats of the W-6 and W-3 series reduce postprandial lipoprotein levels. Chronic and acute effects of fat saturation on postprandial lipoprotein metabolism. *J Clin Invest*. 1988;82(6):1884-93.
252. Wong AT, Chan DC, Barrett PH, Adams LA, Watts GF. Effect of omega-3 fatty acid ethyl esters on apolipoprotein B-48 kinetics in obese subjects on a weight-loss diet: a new tracer kinetic study in the postprandial state. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(8):E1427-35.

253. Bray GA. Fructose and risk of cardiometabolic disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2012;14(6):570-8.
254. Parks EJ, Krauss RM, Christiansen MP, Neese RA, Hellerstein MK. Effects of a low-fat, high-carbohydrate diet on VLDL-triglyceride assembly, production, and clearance. *J Clin Invest.* 1999;104(8):1087-96.
255. Cohen JC, Berger GM. Effects of glucose ingestion on postprandial lipemia and triglyceride clearance in humans. *J Lipid Res.* 1990;31(4):597-602.
256. Grant KI, Marais MP, Dhansay MA. Sucrose in a lipid-rich meal amplifies the postprandial excursion of serum and lipoprotein triglyceride and cholesterol concentrations by decreasing triglyceride clearance. *Am J Clin Nutr.* 1994;59(4):853-60.
257. Westphal S, Leodolter A, Kahl S, Dierkes J, Malferttheiner P, Luley C. Addition of glucose to a fatty meal delays chylomicrons and suppresses VLDL in healthy subjects. *Eur J Clin Invest.* 2002;32(5):322-7.
258. Xiao C, Dash S, Morgantini C, Lewis GF. Novel role of enteral monosaccharides in intestinal lipoprotein production in healthy humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(5):1056-62.
259. Mamo JC, James AP, Soares MJ, Griffiths DG, Purcell K, Schwenke JL. A low-protein diet exacerbates postprandial chylomicron concentration in moderately dyslipidaemic subjects in comparison to a lean red meat protein-enriched diet. *Eur J Clin Nutr.* 2005;59(10):1142-8.
260. Westphal S, Kastner S, Taneva E, Leodolter A, Dierkes J, Luley C. Postprandial lipid and carbohydrate responses after the ingestion of a casein-enriched mixed meal. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(2):284-90.
261. Mortensen LS, Hartvigsen ML, Brader LJ, Astrup A, Schrezenmeir J, Holst JJ, et al. Differential effects of protein quality on postprandial lipemia in response to a fat-rich meal in type 2 diabetes: comparison of whey, casein, gluten, and cod protein. *Am J Clin Nutr.* 2009;90(1):41-8.
262. Cara L, Dubois C, Borel P, Armand M, Senft M, Portugal H, et al. Effects of oat bran, rice bran, wheat fiber, and wheat germ on postprandial lipemia in healthy adults. *Am J Clin Nutr.* 1992;55(1):81-8.

263. Duez H, Lamarche B, Uffelman KD, Valero R, Cohn JS, Lewis GF. Hyperinsulinemia is associated with increased production rate of intestinal apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(6):1357-63.
264. Lewis GF, Naples M, Uffelman K, Leung N, Szeto L, Adeli K. Intestinal lipoprotein production is stimulated by an acute elevation of plasma free fatty acids in the fasting state: studies in insulin-resistant and insulin-sensitized Syrian golden hamsters. *Endocrinology.* 2004;145(11):5006-12.
265. Boden G. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2003;111(3):121-4.
266. Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Weller B, Steiner G. Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. *J Clin Invest.* 1995;95(1):158-66.
267. Pavlic M, Xiao C, Szeto L, Patterson BW, Lewis GF. Insulin acutely inhibits intestinal lipoprotein secretion in humans in part by suppressing plasma free fatty acids. *Diabetes.* 2010;59(3):580-7.
268. Sidiropoulos KG, Meshkani R, Avramoglu-Kohen R, Adeli K. Insulin inhibition of apolipoprotein B mRNA translation is mediated via the PI-3 kinase/mTOR signaling cascade but does not involve internal ribosomal entry site (IRES) initiation. *Arch Biochem Biophys.* 2007;465(2):380-8.
269. Ahlman H, Nilsson. The gut as the largest endocrine organ in the body. *Ann Oncol.* 2001;12 Suppl 2:S63-8.
270. Romijn JA, Corssmit EP, Havekes LM, Pijl H. Gut-brain axis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008;11(4):518-21.
271. Auclair N, Patey N, Melbouci L, Ou Y, Magri-Tomaz L, Sane A, et al. Acylated Ghrelin and The Regulation of Lipid Metabolism in The Intestine. *Sci Rep.* 2019;9(1):17975.
272. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* 2007;132(6):2131-57.

273. Hsieh J, Longuet C, Baker CL, Qin B, Federico LM, Drucker DJ, et al. The glucagon-like peptide 1 receptor is essential for postprandial lipoprotein synthesis and secretion in hamsters and mice. *Diabetologia*. 2010;53(3):552-61.
274. Xiao C, Bandsma RH, Dash S, Szeto L, Lewis GF. Exenatide, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, acutely inhibits intestinal lipoprotein production in healthy humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(6):1513-9.
275. Drucker DJ, Yusta B. Physiology and pharmacology of the enteroendocrine hormone glucagon-like peptide-2. *Annu Rev Physiol*. 2014;76:561-83.
276. Hsieh J, Longuet C, Maida A, Bahrami J, Xu E, Baker CL, et al. Glucagon-like peptide-2 increases intestinal lipid absorption and chylomicron production via CD36. *Gastroenterology*. 2009;137(3):997-1005, e1-4.
277. Meier JJ, Nauck MA, Pott A, Heinze K, Goetze O, Bulut K, et al. Glucagon-like peptide 2 stimulates glucagon secretion, enhances lipid absorption, and inhibits gastric acid secretion in humans. *Gastroenterology*. 2006;130(1):44-54.
278. Dash S, Xiao C, Morgantini C, Connelly PW, Patterson BW, Lewis GF. Glucagon-like peptide-2 regulates release of chylomicrons from the intestine. *Gastroenterology*. 2014;147(6):1275-84 e4.
279. Syed-Abdul MM, Stahel P, Zembroski A, Tian L, Xiao C, Nahmias A, et al. Glucagon-like Peptide-2 Acutely Enhances Chylomicron Secretion in Humans Without Mobilizing Cytoplasmic Lipid Droplets. *J Clin Endocrinol Metab*. 2023;108(5):1084-92.
280. Wang X, Magkos F, Mittendorfer B. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism: it's not just about sex hormones. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(4):885-93.
281. Staprans I, Rapp JH, Pan XM, Ong DL, Feingold KR. Testosterone regulates metabolism of plasma chylomicrons in rats. *Arteriosclerosis*. 1990;10(4):591-6.
282. Hazzard WR. Why do women live longer than men? Biologic differences that influence longevity. *Postgrad Med*. 1989;85(5):271-8, 81-3.
283. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2020;141(9):e139-e596.

284. Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Cohn SD, Schaefer MM, Ordovas JM, Castelli WP, et al. Effects of age, gender, and menopausal status on plasma low density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B levels in the Framingham Offspring Study. *J Lipid Res.* 1994;35(5):779-92.
285. McNamara JR, Campos H, Ordovas JM, Peterson J, Wilson PW, Schaefer EJ. Effect of gender, age, and lipid status on low density lipoprotein subfraction distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arteriosclerosis.* 1987;7(5):483-90.
286. Dias CB, Phang M, Wood LG, Garg ML. Postprandial lipid responses do not differ following consumption of butter or vegetable oil when consumed with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids.* 2015;50(4):339-47.
287. Koutsari C, Zagana A, Tzoras I, Sidossis LS, Matalas AL. Gender influence on plasma triacylglycerol response to meals with different monounsaturated and saturated fatty acid content. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58(3):495-502.
288. Cohn JS, McNamara JR, Cohn SD, Ordovas JM, Schaefer EJ. Postprandial plasma lipoprotein changes in human subjects of different ages. *J Lipid Res.* 1988;29(4):469-79.
289. Redard CL, Davis PA, Schneeman BO. Dietary fiber and gender: effect on postprandial lipemia. *Am J Clin Nutr.* 1990;52(5):837-45.
290. Sanders TA, Filippou A, Berry SE, Baumgartner S, Mensink RP. Palmitic acid in the sn-2 position of triacylglycerols acutely influences postprandial lipid metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2011;94(6):1433-41.
291. Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science.* 2001;292(5519):1115-8.
292. El Aidy S, Merrifield CA, Derrien M, van Baarlen P, Hooiveld G, Levenez F, et al. The gut microbiota elicits a profound metabolic reorientation in the mouse jejunal mucosa during conventionalisation. *Gut.* 2013;62(9):1306-14.
293. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(1):20-32.
294. Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(3):979-84.

295. Martinez-Guryn K, Hubert N, Frazier K, Ulass S, Musch MW, Ojeda P, et al. Small Intestine Microbiota Regulate Host Digestive and Absorptive Adaptive Responses to Dietary Lipids. *Cell Host Microbe*. 2018;23(4):458-69 e5.
296. Sato H, Zhang LS, Martinez K, Chang EB, Yang Q, Wang F, et al. Antibiotics Suppress Activation of Intestinal Mucosal Mast Cells and Reduce Dietary Lipid Absorption in Sprague-Dawley Rats. *Gastroenterology*. 2016;151(5):923-32.
297. Ji Y, Sakata Y, Yang Q, Li X, Xu M, Yoder S, et al. Activation of rat intestinal mucosal mast cells by fat absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302(11):G1292-300.
298. Scudamore CL, Jepson MA, Hirst BH, Miller HR. The rat mucosal mast cell chymase, RMCP-II, alters epithelial cell monolayer permeability in association with altered distribution of the tight junction proteins ZO-1 and occludin. *Eur J Cell Biol*. 1998;75(4):321-30.
299. Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proc Nutr Soc*. 2015;74(1):13-22.
300. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*. 1987;28(10):1221-7.
301. Yu Y, Raka F, Adeli K. The Role of the Gut Microbiota in Lipid and Lipoprotein Metabolism. *J Clin Med*. 2019;8(12).
302. Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, Parker HE, Habib AM, Diakogiannaki E, et al. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*. 2012;61(2):364-71.
303. Psichas A, Sleeth ML, Murphy KG, Brooks L, Bewick GA, Hanyaloglu AC, et al. The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(3):424-9.
304. Karaki S, Mitsui R, Hayashi H, Kato I, Sugiya H, Iwanaga T, et al. Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. *Cell Tissue Res*. 2006;324(3):353-60.
305. Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(43):16767-72.

306. Bhargava S, de la Puente-Secades S, Schurgers L, Jankowski J. Lipids and lipoproteins in cardiovascular diseases: a classification. *Trends Endocrinol Metab.* 2022;33(6):409-23.
307. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* 2011;472(7341):57-63.
308. Xiao C, Hsieh J, Adeli K, Lewis GF. Gut-liver interaction in triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;301(3):E429-46.
309. Lewis GF. Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr Opin Lipidol.* 1997;8(3):146-53.
310. Guo Q, Avramoglu RK, Adeli K. Intestinal assembly and secretion of highly dense/lipid-poor apolipoprotein B48-containing lipoprotein particles in the fasting state: evidence for induction by insulin resistance and exogenous fatty acids. *Metabolism.* 2005;54(5):689-97.
311. Morel E, Demignot S, Chateau D, Chambaz J, Rousset M, Delers F. Lipid-dependent bidirectional traffic of apolipoprotein B in polarized enterocytes. *Mol Biol Cell.* 2004;15(1):132-41.
312. Fisher EA, Zhou M, Mitchell DM, Wu X, Omura S, Wang H, et al. The degradation of apolipoprotein B100 is mediated by the ubiquitin-proteasome pathway and involves heat shock protein 70. *J Biol Chem.* 1997;272(33):20427-34.
313. Liang JS, Kim T, Fang S, Yamaguchi J, Weissman AM, Fisher EA, et al. Overexpression of the tumor autocrine motility factor receptor Gp78, a ubiquitin protein ligase, results in increased ubiquitinylation and decreased secretion of apolipoprotein B100 in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 2003;278(26):23984-8.
314. Ota T, Gayet C, Ginsberg HN. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest.* 2008;118(1):316-32.
315. Read A, Schroder M. The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology (Basel).* 2021;10(5).
316. Sundaram M, Zhong S, Bou Khalil M, Links PH, Zhao Y, Iqbal J, et al. Expression of apolipoprotein C-III in McA-RH7777 cells enhances VLDL assembly and secretion under lipid-rich conditions. *J Lipid Res.* 2010;51(1):150-61.

317. Siddiqi SA. VLDL exits from the endoplasmic reticulum in a specialized vesicle, the VLDL transport vesicle, in rat primary hepatocytes. *Biochem J.* 2008;413(2):333-42.
318. Gusarova V, Brodsky JL, Fisher EA. Apolipoprotein B100 exit from the endoplasmic reticulum (ER) is COPII-dependent, and its lipidation to very low density lipoprotein occurs post-ER. *J Biol Chem.* 2003;278(48):48051-8.
319. Siddiqi S, Mani AM, Siddiqi SA. The identification of the SNARE complex required for the fusion of VLDL-transport vesicle with hepatic cis-Golgi. *Biochem J.* 2010;429(2):391-401.
320. Tiwari S, Siddiqi S, Siddiqi SA. CideB protein is required for the biogenesis of very low density lipoprotein (VLDL) transport vesicle. *J Biol Chem.* 2013;288(7):5157-65.
321. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Douidi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med.* 2014;5(8):927-46.
322. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998;97(18):1837-47.
323. Harris WS, Jacobson TA. CHAPTER 27 - Omega-3 Fatty Acids. In: Ballantyne CM, editor. *Clinical Lipidology.* Philadelphia: W.B. Saunders; 2009. p. 326-38.
324. Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA.* 2007;298(3):309-16.
325. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA.* 2007;298(3):299-308.
326. Mora S, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting lipids and apolipoproteins for predicting incident cardiovascular events. *Circulation.* 2008;118(10):993-1001.
327. Lindman AS, Veierod MB, Tverdal A, Pedersen JI, Selmer R. Nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular death in men and women from the Norwegian Counties Study. *Eur J Epidemiol.* 2010;25(11):789-98.
328. Langsted A, Freiberg JJ, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Jensen GB, Nordestgaard BG. Nonfasting cholesterol and triglycerides and association with risk of myocardial infarction and

total mortality: the Copenhagen City Heart Study with 31 years of follow-up. *J Intern Med.* 2011;270(1):65-75.

329. Tada H, Nomura A, Yoshimura K, Itoh H, Komuro I, Yamagishi M, et al. Fasting and Non-Fasting Triglycerides and Risk of Cardiovascular Events in Diabetic Patients Under Statin Therapy. *Circ J.* 2020;84(3):509-15.

330. Esan O, Wierzbicki AS. Triglycerides and cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol.* 2021;36(4):469-77.

331. Nordestgaard BG, Stender S, Kjeldsen K. Reduced atherogenesis in cholesterol-fed diabetic rabbits. Giant lipoproteins do not enter the arterial wall. *Arteriosclerosis.* 1988;8(4):421-8.

332. Nordestgaard BG, Zilversmit DB. Large lipoproteins are excluded from the arterial wall in diabetic cholesterol-fed rabbits. *J Lipid Res.* 1988;29(11):1491-500.

333. Botham KM, Moore EH, De Pascale C, Bejta F. The induction of macrophage foam cell formation by chylomicron remnants. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 3):454-8.

334. Liu L, Wen T, Zheng XY, Yang DG, Zhao SP, Xu DY, et al. Remnant-like particles accelerate endothelial progenitor cells senescence and induce cellular dysfunction via an oxidative mechanism. *Atherosclerosis.* 2009;202(2):405-14.

335. Shin HK, Kim YK, Kim KY, Lee JH, Hong KW. Remnant lipoprotein particles induce apoptosis in endothelial cells by NAD(P)H oxidase-mediated production of superoxide and cytokines via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 activation: prevention by cilostazol. *Circulation.* 2004;109(8):1022-8.

336. Proctor SD, Mamo JC. Intimal retention of cholesterol derived from apolipoprotein B100- and apolipoprotein B48-containing lipoproteins in carotid arteries of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(9):1595-600.

337. Stahel P, Xiao C, Davis X, Tso P, Lewis GF. Glucose and GLP-2 (Glucagon-Like Peptide-2) Mobilize Intestinal Triglyceride by Distinct Mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(8):1565-73.

338. Williams KJ, Tabas I, Fisher EA. How an Artery Heals. *Circulation Research.* 2015;117(11):909-13.

339. Tabas I. 2016 Russell Ross Memorial Lecture in Vascular Biology: Molecular-Cellular Mechanisms in the Progression of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(2):183-9.
340. Geier RR, Tannock LR. Risk of Fasting and Non-Fasting Hypertriglyceridemia in Coronary Vascular Disease and Pancreatitis. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, et al., editors. *Endotext.* South Dartmouth (MA)2000.
341. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk.* 1996;3(2):213-9.
342. Patel A, Barzi F, Jamrozik K, Lam TH, Ueshima H, Whitlock G, et al. Serum triglycerides as a risk factor for cardiovascular diseases in the Asia-Pacific region. *Circulation.* 2004;110(17):2678-86.
343. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation.* 2007;115(4):450-8.
344. Murad MH, Hazem A, Coto-Yglesias F, Dzyubak S, Gupta S, Bancos I, et al. The association of hypertriglyceridemia with cardiovascular events and pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Endocr Disord.* 2012;12:2.
345. Thomsen M, Varbo A, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Low nonfasting triglycerides and reduced all-cause mortality: a mendelian randomization study. *Clin Chem.* 2014;60(5):737-46.
346. Dewey FE, Gusarova V, Dunbar RL, O'Dushlaine C, Schurmann C, Gottesman O, et al. Genetic and Pharmacologic Inactivation of ANGPTL3 and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2017;377(3):211-21.
347. Ference BA, Kastelein JJP, Ray KK, Ginsberg HN, Chapman MJ, Packard CJ, et al. Association of Triglyceride-Lowering LPL Variants and LDL-C-Lowering LDLR Variants With Risk of Coronary Heart Disease. *JAMA.* 2019;321(4):364-73.

348. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Jorgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol as a causal risk factor for ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(4):427-36.
349. Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, Nordestgaard BG, Kuivenhoven JA, Averna M, et al. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(8):655-66.
350. Rapp JH, Lespine A, Hamilton RL, Colyvas N, Chaumeton AH, Tweedie-Hardman J, et al. Triglyceride-rich lipoproteins isolated by selected-affinity anti-apolipoprotein B immunosorption from human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb*. 1994;14(11):1767-74.
351. Alipour A, van Oostrom AJ, Izraeljan A, Verseyden C, Collins JM, Frayn KN, et al. Leukocyte activation by triglyceride-rich lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(4):792-7.
352. Alaupovic P, Mack WJ, Knight-Gibson C, Hodis HN. The role of triglyceride-rich lipoprotein families in the progression of atherosclerotic lesions as determined by sequential coronary angiography from a controlled clinical trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(4):715-22.
353. Moyer MP, Tracy RP, Tracy PB, van't Veer C, Sparks CE, Mann KG. Plasma lipoproteins support prothrombinase and other procoagulant enzymatic complexes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(3):458-65.
354. Kexin W, Yaodong D, Wen G, Rui W, Jiabin Y, Xiaoli L, et al. Association of Increased Remnant Cholesterol and the Risk of Coronary Artery Disease: A Retrospective Study. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:740596.
355. Gao S, Xu H, Ma W, Yuan J, Yu M. Remnant Cholesterol Predicts Risk of Cardiovascular Events in Patients With Myocardial Infarction With Nonobstructive Coronary Arteries. *J Am Heart Assoc*. 2022;11(10):e024366.
356. Quispe R, Martin SS, Michos ED, Lamba I, Blumenthal RS, Saeed A, et al. Remnant cholesterol predicts cardiovascular disease beyond LDL and ApoB: a primary prevention study. *Eur Heart J*. 2021;42(42):4324-32.
357. Mortensen MB, Nordestgaard BG. Elevated LDL cholesterol and increased risk of myocardial infarction and atherosclerotic cardiovascular disease in individuals aged 70-100 years: a contemporary primary prevention cohort. *Lancet*. 2020;396(10263):1644-52.

358. Abdullah SM, Defina LF, Leonard D, Barlow CE, Radford NB, Willis BL, et al. Long-Term Association of Low-Density Lipoprotein Cholesterol With Cardiovascular Mortality in Individuals at Low 10-Year Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2018;138(21):2315-25.
359. Packard C, Chapman MJ, Sibartie M, Laufs U, Masana L. Intensive low-density lipoprotein cholesterol lowering in cardiovascular disease prevention: opportunities and challenges. *Heart*. 2021;107(17):1369-75.
360. Ison HE, Clarke SL, Knowles JW. Familial Hypercholesterolemia. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, et al., editors. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA)1993.
361. Vrablik M, Tichy L, Freiburger T, Blaha V, Satny M, Hubacek JA. Genetics of Familial Hypercholesterolemia: New Insights. *Front Genet*. 2020;11:574474.
362. Simionescu M. Cellular dysfunction in inflammatory-related vascular disorders' review series. The inflammatory process: a new dimension of a 19 century old story. *J Cell Mol Med*. 2009;13(11-12):4291-2.
363. von Eckardstein A, Rohrer L. Transendothelial lipoprotein transport and regulation of endothelial permeability and integrity by lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20(3):197-205.
364. Jiang H, Zhou Y, Nabavi SM, Sahebkar A, Little PJ, Xu S, et al. Mechanisms of Oxidized LDL-Mediated Endothelial Dysfunction and Its Consequences for the Development of Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:925923.
365. Asada Y, Yamashita A, Sato Y, Hatakeyama K. Pathophysiology of atherothrombosis: Mechanisms of thrombus formation on disrupted atherosclerotic plaques. *Pathol Int*. 2020;70(6):309-22.
366. Hu J, Xi D, Zhao J, Luo T, Liu J, Lu H, et al. High-density Lipoprotein and Inflammation and Its Significance to Atherosclerosis. *Am J Med Sci*. 2016;352(4):408-15.
367. Rye KA, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S195-200.
368. Randolph GJ, Miller NE. Lymphatic transport of high-density lipoproteins and chylomicrons. *J Clin Invest*. 2014;124(3):929-35.

369. Miller NE, Olszewski WL, Hattori H, Miller IP, Kujiraoka T, Oka T, et al. Lipoprotein remodeling generates lipid-poor apolipoprotein A-I particles in human interstitial fluid. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;304(3):E321-8.
370. Rudra DN, Myant NB, Pflug JJ, Reichl D. The distribution of cholesterol and apoprotein A-I between the lipoproteins in plasma and peripheral lymph from normal human subjects. *Atherosclerosis.* 1984;53(3):297-308.
371. Rohrer L, Cavalier C, Fuchs S, Schluter MA, Volker W, von Eckardstein A. Binding, internalization and transport of apolipoprotein A-I by vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1761(2):186-94.
372. Michel CC, Nanjee MN, Olszewski WL, Miller NE. LDL and HDL transfer rates across peripheral microvascular endothelium agree with those predicted for passive ultrafiltration in humans. *J Lipid Res.* 2015;56(1):122-8.
373. Lim HY, Thiam CH, Yeo KP, Bisioendial R, Hii CS, McGrath KC, et al. Lymphatic vessels are essential for the removal of cholesterol from peripheral tissues by SR-BI-mediated transport of HDL. *Cell Metab.* 2013;17(5):671-84.
374. Martel C, Li W, Fulp B, Platt AM, Gautier EL, Westerterp M, et al. Lymphatic vasculature mediates macrophage reverse cholesterol transport in mice. *J Clin Invest.* 2013;123(4):1571-9.
375. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med.* 1977;62(5):707-14.
376. Chapman MJ, Assmann G, Fruchart JC, Shepherd J, Sirtori C, European Consensus Panel on H-C. Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid--a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C. *Curr Med Res Opin.* 2004;20(8):1253-68.
377. Weissglas-Volkov D, Pajukanta P. Genetic causes of high and low serum HDL-cholesterol. *J Lipid Res.* 2010;51(8):2032-57.
378. Emerging Risk Factors C, Erqou S, Kaptoge S, Perry PL, Di Angelantonio E, Thompson A, et al. Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality. *JAMA.* 2009;302(4):412-23.

379. Clarke R, Peden JF, Hopewell JC, Kyriakou T, Goel A, Heath SC, et al. Genetic variants associated with Lp(a) lipoprotein level and coronary disease. *N Engl J Med.* 2009;361(26):2518-28.
380. Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, Smith JG, Smith AV, Peloso GM, et al. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med.* 2013;368(6):503-12.
381. Langsted A, Nordestgaard BG, Kamstrup PR. Elevated Lipoprotein(a) and Risk of Ischemic Stroke. *J Am Coll Cardiol.* 2019;74(1):54-66.
382. Kamstrup PR, Nordestgaard BG. Elevated Lipoprotein(a) Levels, LPA Risk Genotypes, and Increased Risk of Heart Failure in the General Population. *JACC Heart Fail.* 2016;4(1):78-87.
383. Mohammadi-Shemirani P, Chong M, Narula S, Perrot N, Conen D, Roberts JD, et al. Elevated Lipoprotein(a) and Risk of Atrial Fibrillation: An Observational and Mendelian Randomization Study. *J Am Coll Cardiol.* 2022;79(16):1579-90.
384. Masson W, Lobo M, Barbagelata L, Molinero G, Bluro I, Nogueira JP. Elevated lipoprotein (a) levels and risk of peripheral artery disease outcomes: A systematic review. *Vasc Med.* 2022;27(4):385-91.
385. von Eckardstein A, Schulte H, Cullen P, Assmann G. Lipoprotein(a) further increases the risk of coronary events in men with high global cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37(2):434-9.
386. Crawford DC, Peng Z, Cheng JF, Boffelli D, Ahearn M, Nguyen D, et al. LPA and PLG sequence variation and kringle IV-2 copy number in two populations. *Hum Hered.* 2008;66(4):199-209.
387. Boerwinkle E, Leffert CC, Lin J, Lackner C, Chiesa G, Hobbs HH. Apolipoprotein(a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein(a) concentrations. *J Clin Invest.* 1992;90(1):52-60.
388. Argraves KM, Kozarsky KF, Fallon JT, Harpel PC, Strickland DK. The atherogenic lipoprotein Lp(a) is internalized and degraded in a process mediated by the VLDL receptor. *J Clin Invest.* 1997;100(9):2170-81.

389. Schnitzler JG, Hoogeveen RM, Ali L, Prange KHM, Waissi F, van Weeghel M, et al. Atherogenic Lipoprotein(a) Increases Vascular Glycolysis, Thereby Facilitating Inflammation and Leukocyte Extravasation. *Circ Res.* 2020;126(10):1346-59.
390. van der Valk FM, Bekkering S, Kroon J, Yeang C, Van den Bossche J, van Buul JD, et al. Oxidized Phospholipids on Lipoprotein(a) Elicit Arterial Wall Inflammation and an Inflammatory Monocyte Response in Humans. *Circulation.* 2016;134(8):611-24.
391. Greenberg ME, Sun M, Zhang R, Febbraio M, Silverstein R, Hazen SL. Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med.* 2006;203(12):2613-25.
392. Marcovina SM, Albers JJ. Lipoprotein (a) measurements for clinical application. *J Lipid Res.* 2016;57(4):526-37.
393. Capoulade R, Chan KL, Yeang C, Mathieu P, Bosse Y, Dumesnil JG, et al. Oxidized Phospholipids, Lipoprotein(a), and Progression of Calcific Aortic Valve Stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66(11):1236-46.
394. Zheng KH, Tsimikas S, Pawade T, Kroon J, Jenkins WSA, Doris MK, et al. Lipoprotein(a) and Oxidized Phospholipids Promote Valve Calcification in Patients With Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73(17):2150-62.
395. Bjorntorp P, Sjostrom L. Carbohydrate storage in man: speculations and some quantitative considerations. *Metabolism.* 1978;27(12 Suppl 2):1853-65.
396. Ameer F, Scandiuzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism.* 2014;63(7):895-902.
397. AM AL, Syed DN, Ntambi JM. Insights into Stearoyl-CoA Desaturase-1 Regulation of Systemic Metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(12):831-42.
398. Lodhi IJ, Wei X, Semenkovich CF. Lipoexpediency: de novo lipogenesis as a metabolic signal transmitter. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22(1):1-8.
399. Strable MS, Ntambi JM. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2010;45(3):199-214.
400. Herman MA, Peroni OD, Villoria J, Schon MR, Abumrad NA, Bluher M, et al. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature.* 2012;484(7394):333-8.

401. Shao W, Espenshade PJ. Expanding roles for SREBP in metabolism. *Cell Metab.* 2012;16(4):414-9.
402. Ruderman NB, Saha AK, Kraegen EW. Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. *Endocrinology.* 2003;144(12):5166-71.
403. Samkani A, Skytte MJ, Anholm C, Astrup A, Deacon CF, Holst JJ, et al. The acute effects of dietary carbohydrate reduction on postprandial responses of non-esterified fatty acids and triglycerides: a randomized trial. *Lipids Health Dis.* 2018;17(1):295.
404. Sun L, Tan KWJ, Lim JZ, Magkos F, Henry CJ. Dietary fat and carbohydrate quality have independent effects on postprandial glucose and lipid responses. *Eur J Nutr.* 2018;57(1):243-50.
405. Surowska A, De Giorgi S, Theytaz F, Campos V, Hodson L, Stefanoni N, et al. Effects of roux-en-Y gastric bypass surgery on postprandial fructose metabolism. *Obesity (Silver Spring).* 2016;24(3):589-96.
406. Steenson S, Shojaee-Moradie F, M BW, K GJ, Lovegrove JA, B AF, et al. The Effect of Fructose Feeding on Intestinal Triacylglycerol Production and De Novo Fatty Acid Synthesis in Humans. *Nutrients.* 2020;12(6).
407. Haidari M, Leung N, Mahbub F, Uffelman KD, Kohen-Avramoglu R, Lewis GF, et al. Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and ApoB48-containing lipoprotein overproduction. *J Biol Chem.* 2002;277(35):31646-55.
408. Warfel JD, Vandanmagsar B, Dubuisson OS, Hodgeson SM, Elks CM, Ravussin E, et al. Examination of carnitine palmitoyltransferase 1 abundance in white adipose tissue: implications in obesity research. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2017;312(5):R816-R20.
409. Wyllie R, Hyams JS, Kay M. *Pediatric gastrointestinal and liver disease E-Book: Elsevier Health Sciences; 2020.*
410. Ke R, Xu Q, Li C, Luo L, Huang D. Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism. *Cell Biol Int.* 2018;42(4):384-92.

411. de Wit NJ, Bosch-Vermeulen H, de Groot PJ, Hooiveld GJ, Bromhaar MM, Jansen J, et al. The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice. *BMC Med Genomics*. 2008;1:14.
412. Kondo H, Minegishi Y, Komine Y, Mori T, Matsumoto I, Abe K, et al. Differential regulation of intestinal lipid metabolism-related genes in obesity-resistant A/J vs. obesity-prone C57BL/6J mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(5):E1092-9.
413. Uchida A, Slipchenko MN, Cheng JX, Buhman KK. Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, alters triglyceride metabolism in enterocytes of mice. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1811(3):170-6.
414. Berger J, Wagner JA. Physiological and therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptors. *Diabetes Technol Ther*. 2002;4(2):163-74.
415. Mochizuki K, Suruga K, Kitagawa M, Takase S, Goda T. Modulation of the expression of peroxisome proliferator-activated receptor-dependent genes through disproportional expression of two subtypes in the small intestine. *Arch Biochem Biophys*. 2001;389(1):41-8.
416. Karimian Azari E, Leitner C, Jaggi T, Langhans W, Mansouri A. Possible role of intestinal fatty acid oxidation in the eating-inhibitory effect of the PPAR-alpha agonist Wy-14643 in high-fat diet fed rats. *PLoS One*. 2013;8(9):e74869.
417. Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ*. 2006;30(4):145-51.
418. Zhou F, Sun X. Cholesterol Metabolism: A Double-Edged Sword in Hepatocellular Carcinoma. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:762828.
419. Pamela C, Richard A, Denise RJLW, Wilkins B. *Lippincotts illustrated reviews biochemistry*. 2005.
420. Dhillon KK, Gupta S. *Biochemistry, Ketogenesis*. StatPearls. Treasure Island (FL)2023.
421. Sever N, Yang T, Brown MS, Goldstein JL, DeBose-Boyd RA. Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Mol Cell*. 2003;11(1):25-33.
422. Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell*. 2006;124(1):35-46.

423. Clarke PR, Hardie DG. Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *EMBO J.* 1990;9(8):2439-46.
424. Feingold KR. Cholesterol Lowering Drugs. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
425. Huff MW, Burnett JR. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and hepatic apolipoprotein B secretion. *Curr Opin Lipidol.* 1997;8(3):138-45.
426. Kajinami K, Takekoshi N, Brousseau ME, Schaefer EJ. Pharmacogenetics of HMG-CoA reductase inhibitors: exploring the potential for genotype-based individualization of coronary heart disease management. *Atherosclerosis.* 2004;177(2):219-34.
427. Lakoski SG, Xu F, Vega GL, Grundy SM, Chandalia M, Lam C, et al. Indices of cholesterol metabolism and relative responsiveness to ezetimibe and simvastatin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(2):800-9.
428. Burnett JR, Bell DA, Hooper AJ, Hegele RA. Clinical utility gene card for: Familial hypobetalipoproteinaemia (APOB)--Update 2014. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(6).
429. Whitfield AJ, Marais AD, Robertson K, Barrett PH, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Four novel mutations in APOB causing heterozygous and homozygous familial hypobetalipoproteinemia. *Hum Mutat.* 2003;22(2):178.
430. Tarugi P, Aversa M, Di Leo E, Cefalu AB, Noto D, Magnolo L, et al. Molecular diagnosis of hypobetalipoproteinemia: an ENID review. *Atherosclerosis.* 2007;195(2):e19-27.
431. Wang LR, McIntyre AD, Hegele RA. Complex genetic architecture in severe hypobetalipoproteinemia. *Lipids Health Dis.* 2018;17(1):48.
432. Di Leo E, Magnolo L, Bertolotti M, Bourbon M, Carmo Pereira S, Pirisi M, et al. Variable phenotypic expression of homozygous familial hypobetalipoproteinaemia due to novel APOB gene mutations. *Clin Genet.* 2008;74(3):267-73.
433. Heeks LV, Hooper AJ, Adams LA, Robbins P, Barrett PH, van Bockxmeer FM, et al. Non-alcoholic steatohepatitis-related cirrhosis in a patient with APOB L343V familial hypobetalipoproteinaemia. *Clin Chim Acta.* 2013;421:121-5.

434. Bonnefont-Rousselot D, Condat B, Sassolas A, Chebel S, Bittar R, Federspiel MC, et al. Cryptogenic cirrhosis in a patient with familial hypocholesterolemia due to a new truncated form of apolipoprotein B. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009;21(1):104-8.
435. Welty FK, Lichtenstein AH, Barrett PH, Dolnikowski GG, Ordovas JM, Schaefer EJ. Decreased production and increased catabolism of apolipoprotein B-100 in apolipoprotein B-67/B-100 heterozygotes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(5):881-8.
436. Lonardo A, Tarugi P, Ballarini G, Bagni A. Familial heterozygous hypobetalipoproteinemia, extrahepatic primary malignancy, and hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci*. 1998;43(11):2489-92.
437. Cefalu AB, Pirruccello JP, Noto D, Gabriel S, Valenti V, Gupta N, et al. A novel APOB mutation identified by exome sequencing cosegregates with steatosis, liver cancer, and hypocholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(8):2021-5.
438. Lee J, Hegele RA. Abetalipoproteinemia and homozygous hypobetalipoproteinemia: a framework for diagnosis and management. *J Inherit Metab Dis*. 2014;37(3):333-9.
439. Bjorneboe A, Bjorneboe GE, Bodd E, Hagen BF, Kveseth N, Drevon CA. Transport and distribution of alpha-tocopherol in lymph, serum and liver cells in rats. *Biochim Biophys Acta*. 1986;889(3):310-5.
440. Muller DP, Lloyd JK, Wolff OH. The role of vitamin E in the treatment of the neurological features of abetalipoproteinaemia and other disorders of fat absorption. *J Inherit Metab Dis*. 1985;8 Suppl 1:88-92.
441. Bishara S, Merin S, Cooper M, Azizi E, Delpre G, Deckelbaum RJ. Combined vitamin A and E therapy prevents retinal electrophysiological deterioration in abetalipoproteinaemia. *Br J Ophthalmol*. 1982;66(12):767-70.
442. Triantafyllidis JK, Kottaras G, Peros G, Merikas E, Gikas A, Condilis N, et al. Endocrine function in abetalipoproteinemia: a study of a female patient of Greek origin. *Ann Ital Chir*. 2004;75(6):683-90.
443. Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(6):E1183-94.

444. Chardon L, Sassolas A, Dingeon B, Michel-Calemard L, Bovier-Lapierre M, Moulin P, et al. Identification of two novel mutations and long-term follow-up in abetalipoproteinemia: a report of four cases. *Eur J Pediatr.* 2009;168(8):983-9.
445. Colomb V, Jobert-Giraud A, Lacaille F, Goulet O, Fournet JC, Ricour C. Role of lipid emulsions in cholestasis associated with long-term parenteral nutrition in children. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2000;24(6):345-50.
446. Zamel R, Khan R, Pollex RL, Hegele RA. Abetalipoproteinemia: two case reports and literature review. *Orphanet J Rare Dis.* 2008;3:19.
447. Gaudet LM, MacKenzie J, Smith GN. Fat-soluble vitamin deficiency in pregnancy: a case report and review of abetalipoproteinemia. *J Obstet Gynaecol Can.* 2006;28(8):716-9.
448. Illingworth DR, Connor WE, Miller RG. Abetalipoproteinemia. Report of two cases and review of therapy. *Arch Neurol.* 1980;37(10):659-62.
449. Segal S, Sharma S. Ophthalmic problem. Vitamin A and vitamin E. *Can Fam Physician.* 2005;51:1079, 85-6.
450. Chowers I, Banin E, Merin S, Cooper M, Granot E. Long-term assessment of combined vitamin A and E treatment for the prevention of retinal degeneration in abetalipoproteinemia and hypobetalipoproteinemia patients. *Eye (Lond).* 2001;15(Pt 4):525-30.
451. Burnett JR, Bell DA, Hooper AJ, Hegele RA. Clinical utility gene card for: Abetalipoproteinemia--Update 2014. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(6).
452. Takahashi M, Okazaki H, Ohashi K, Ogura M, Ishibashi S, Okazaki S, et al. Current Diagnosis and Management of Abetalipoproteinemia. *J Atheroscler Thromb.* 2021;28(10):1009-19.
453. Fu J, Kwok S, Sinai L, Abdel-Razek O, Babula J, Chen D, et al. Western Database of Lipid Variants (WDLV): a catalogue of genetic variants in monogenic dyslipidemias. *Can J Cardiol.* 2013;29(8):934-9.
454. Levy E. Insights from human congenital disorders of intestinal lipid metabolism. *J Lipid Res.* 2015;56(5):945-62.
455. Doya LJ, Mohammad L, Omran R, Ibrahim AA, Yousef N, Ibrahim A, et al. Chylomicron retention disease caused by a new pathogenic variant in sar1b protein: a rare case report from Syria. *BMC Pediatr.* 2021;21(1):449.

456. Kumar S, Nanjiani D, Tahir F, Azim D, Parkash O. Chylomicron Retention Disease in A Male Infant: A Rare Case from Pakistan. *Cureus*. 2020;12(3):e7184.
457. Simone ML, Rabacchi C, Kuloglu Z, Kansu A, Ensari A, Demir AM, et al. Novel mutations of SAR1B gene in four children with chylomicron retention disease. *J Clin Lipidol*. 2019;13(4):554-62.
458. Charcosset M, Sassolas A, Peretti N, Roy CC, Deslandres C, Sinnott D, et al. Anderson or chylomicron retention disease: molecular impact of five mutations in the SAR1B gene on the structure and the functionality of Sar1b protein. *Mol Genet Metab*. 2008;93(1):74-84.
459. Cefalu AB, Calvo PL, Noto D, Baldi M, Valenti V, Lerro P, et al. Variable phenotypic expression of chylomicron retention disease in a kindred carrying a mutation of the Sara2 gene. *Metabolism*. 2010;59(4):463-7.
460. Peretti N, Roy CC, Sassolas A, Deslandres C, Drouin E, Rasquin A, et al. Chylomicron retention disease: a long term study of two cohorts. *Mol Genet Metab*. 2009;97(2):136-42.
461. Peretti N, Sassolas A, Roy CC, Deslandres C, Charcosset M, Castagnetti J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of chylomicron retention disease based on a review of the literature and the experience of two centers. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:24.
462. Ouguerram K, Zair Y, Kasbi-Chadli F, Nazih H, Bligny D, Schmitz J, et al. Low rate of production of apolipoproteins B100 and AI in 2 patients with Anderson disease (chylomicron retention disease). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(6):1520-5.
463. Wang X, Wang H, Xu B, Huang D, Nie C, Pu L, et al. Receptor-Mediated ER Export of Lipoproteins Controls Lipid Homeostasis in Mice and Humans. *Cell Metab*. 2021;33(2):350-66 e7.
464. Selvy PE, Lavieri RR, Lindsley CW, Brown HA. Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem Rev*. 2011;111(10):6064-119.
465. Peng X, Frohman MA. Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles. *Acta Physiol (Oxf)*. 2012;204(2):219-26.
466. Oude Weernink PA, Lopez de Jesus M, Schmidt M. Phospholipase D signaling: orchestration by PIP2 and small GTPases. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2007;374(5-6):399-411.
467. Sung TC, Zhang Y, Morris AJ, Frohman MA. Structural analysis of human phospholipase D1. *J Biol Chem*. 1999;274(6):3659-66.

468. Hammond SM, Altshuller YM, Sung TC, Rudge SA, Rose K, Engebrecht J, et al. Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J Biol Chem.* 1995;270(50):29640-3.
469. Lopez I, Arnold RS, Lambeth JD. Cloning and initial characterization of a human phospholipase D2 (hPLD2). ADP-ribosylation factor regulates hPLD2. *J Biol Chem.* 1998;273(21):12846-52.
470. Du G, Altshuller YM, Vitale N, Huang P, Chasserot-Golaz S, Morris AJ, et al. Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. *J Cell Biol.* 2003;162(2):305-15.
471. Wang X, Dyer JH, Zheng L. Purification and immunological analysis of phospholipase D from castor bean endosperm. *Arch Biochem Biophys.* 1993;306(2):486-94.
472. Wang X, Xu L, Zheng L. Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L. *J Biol Chem.* 1994;269(32):20312-7.
473. Kodaki T, Yamashita S. Cloning, expression, and characterization of a novel phospholipase D complementary DNA from rat brain. *J Biol Chem.* 1997;272(17):11408-13.
474. Cole R, Proulx P. Phospholipase D activity of gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* 1975;124(3):1148-52.
475. Eckert D, Williams O, Meseda CA, Merchlinsky M. Vaccinia virus nicking-joining enzyme is encoded by K4L (VACWR035). *J Virol.* 2005;79(24):15084-90.
476. Ponting CP, Kerr ID. A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Sci.* 1996;5(5):914-22.
477. Stuckey JA, Dixon JE. Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nat Struct Biol.* 1999;6(3):278-84.
478. Di Fulvio M, Gomez-Cambronero J. Phospholipase D (PLD) gene expression in human neutrophils and HL-60 differentiation. *J Leukoc Biol.* 2005;77(6):999-1007.
479. Redina OE, Frohman MA. Genomic analysis of murine phospholipase D1 and comparison to phospholipase D2 reveals an unusual difference in gene size. *Gene.* 1998;222(1):53-60.

480. Foster DA, Xu L. Phospholipase D in cell proliferation and cancer. *Mol Cancer Res.* 2003;1(11):789-800.
481. Roth E, Frohman MA. Proliferative and metastatic roles for Phospholipase D in mouse models of cancer. *Adv Biol Regul.* 2018;67:134-40.
482. Jang YH, Ahn BH, Namkoong S, Kim YM, Jin JK, Kim YS, et al. Differential regulation of apoptosis by caspase-mediated cleavage of phospholipase D isozymes. *Cell Signal.* 2008;20(12):2198-207.
483. Lu WJ, Chung CL, Chen RJ, Huang LT, Lien LM, Chang CC, et al. An Antithrombotic Strategy by Targeting Phospholipase D in Human Platelets. *J Clin Med.* 2018;7(11).
484. Oliveira TG, Di Paolo G. Phospholipase D in brain function and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801(8):799-805.
485. Henkels KM, Boivin GP, Dudley ES, Berberich SJ, Gomez-Cambronero J. Phospholipase D (PLD) drives cell invasion, tumor growth and metastasis in a human breast cancer xenograph model. *Oncogene.* 2013;32(49):5551-62.
486. Kang DW, Choi CY, Cho YH, Tian H, Di Paolo G, Choi KY, et al. Targeting phospholipase D1 attenuates intestinal tumorigenesis by controlling beta-catenin signaling in cancer-initiating cells. *J Exp Med.* 2015;212(8):1219-37.
487. Hsu YL, Hung JY, Ko YC, Hung CH, Huang MS, Kuo PL. Phospholipase D signaling pathway is involved in lung cancer-derived IL-8 increased osteoclastogenesis. *Carcinogenesis.* 2010;31(4):587-96.
488. Noble AR, Maitland NJ, Berney DM, Rumsby MG. Phospholipase D inhibitors reduce human prostate cancer cell proliferation and colony formation. *Br J Cancer.* 2018;118(2):189-99.
489. Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, Chen J. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science.* 2001;294(5548):1942-5.
490. Dennis EA, Deems RA, Harkewicz R, Quehenberger O, Brown HA, Milne SB, et al. A mouse macrophage lipidome. *J Biol Chem.* 2010;285(51):39976-85.
491. Colley WC, Sung TC, Roll R, Jenco J, Hammond SM, Altshuller Y, et al. Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr Biol.* 1997;7(3):191-201.

492. Hughes WE, Parker PJ. Endosomal localization of phospholipase D 1a and 1b is defined by the C-termini of the proteins, and is independent of activity. *Biochem J.* 2001;356(Pt 3):727-36.
493. Dall'Armi C, Hurtado-Lorenzo A, Tian H, Morel E, Nezu A, Chan RB, et al. The phospholipase D1 pathway modulates macroautophagy. *Nat Commun.* 2010;1:142.
494. Oliveira TG, Chan RB, Tian H, Laredo M, Shui G, Staniszewski A, et al. Phospholipase d2 ablation ameliorates Alzheimer's disease-linked synaptic dysfunction and cognitive deficits. *J Neurosci.* 2010;30(49):16419-28.
495. Foster DA, Salloum D, Menon D, Frias MA. Phospholipase D and the maintenance of phosphatidic acid levels for regulation of mammalian target of rapamycin (mTOR). *J Biol Chem.* 2014;289(33):22583-8.
496. Frohman MA. The phospholipase D superfamily as therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(3):137-44.
497. Jang JH, Lee CS, Hwang D, Ryu SH. Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. *Prog Lipid Res.* 2012;51(2):71-81.
498. Lee CS, Kim IS, Park JB, Lee MN, Lee HY, Suh PG, et al. The phox homology domain of phospholipase D activates dynamin GTPase activity and accelerates EGFR endocytosis. *Nat Cell Biol.* 2006;8(5):477-84.
499. Hinshaw JE. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:483-519.
500. Viparelli F, Cassese A, Doti N, Paturzo F, Marasco D, Dathan NA, et al. Targeting of PED/PEA-15 molecular interaction with phospholipase D1 enhances insulin sensitivity in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 2008;283(31):21769-78.
501. Emoto M, Klarlund JK, Waters SB, Hu V, Buxton JM, Chawla A, et al. A role for phospholipase D in GLUT4 glucose transporter translocation. *J Biol Chem.* 2000;275(10):7144-51.
502. Klier M, Gorressen S, Urbahn MA, Barbosa D, Ouwens M, Fischer JW, et al. Enzymatic Activity Is Not Required for Phospholipase D Mediated TNF-alpha Regulation and Myocardial Healing. *Front Physiol.* 2018;9:1698.
503. Stace CL, Ktistakis NT. Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1761(8):913-26.

504. Pathre P, Shome K, Blumental-Perry A, Bielli A, Haney CJ, Alber S, et al. Activation of phospholipase D by the small GTPase Sar1p is required to support COPII assembly and ER export. *EMBO J.* 2003;22(16):4059-69.
505. Nakagawa H, Hazama K, Ishida K, Komori M, Nishimura K, Matsuo S. Inhibition of PLD1 activity causes ER stress via regulation of COPII vesicle formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;490(3):895-900.
506. Ormazabal V, Nair S, Elfeky O, Aguayo C, Salomon C, Zuniga FA. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol.* 2018;17(1):122.
507. Trujillo Viera J, El-Merahbi R, Nieswandt B, Stegner D, Sumara G. Phospholipases D1 and D2 Suppress Appetite and Protect against Overweight. *PLoS One.* 2016;11(6):e0157607.
508. Huang P, Altshuller YM, Hou JC, Pessin JE, Frohman MA. Insulin-stimulated plasma membrane fusion of Glut4 glucose transporter-containing vesicles is regulated by phospholipase D1. *Mol Biol Cell.* 2005;16(6):2614-23.
509. Babenko NA, Kharchenko VS. Modulation of Insulin Sensitivity of Hepatocytes by the Pharmacological Downregulation of Phospholipase D. *Int J Endocrinol.* 2015;2015:794838.
510. Zhang Y, Redina O, Altshuller YM, Yamazaki M, Ramos J, Chneiweiss H, et al. Regulation of expression of phospholipase D1 and D2 by PEA-15, a novel protein that interacts with them. *J Biol Chem.* 2000;275(45):35224-32.
511. Bandyopadhyay G, Standaert ML, Galloway L, Moscat J, Farese RV. Evidence for involvement of protein kinase C (PKC)-zeta and noninvolvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes. *Endocrinology.* 1997;138(11):4721-31.
512. Zhang C, Hwang G, Cooper DE, Grevenko TJ, Eaton JM, Natarajan V, et al. Inhibited insulin signaling in mouse hepatocytes is associated with increased phosphatidic acid but not diacylglycerol. *J Biol Chem.* 2015;290(6):3519-28.
513. Toschi A, Lee E, Xu L, Garcia A, Gadir N, Foster DA. Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. *Mol Cell Biol.* 2009;29(6):1411-20.

514. Padival AK, Hawkins KS, Huang C. High glucose-induced membrane translocation of PKC beta1 is associated with Arf6 in glomerular mesangial cells. *Mol Cell Biochem.* 2004;258(1-2):129-35.
515. Skafi N, Abdallah D, Soulage C, Reibel S, Vitale N, Hamade E, et al. Phospholipase D: A new mediator during high phosphate-induced vascular calcification associated with chronic kidney disease. *J Cell Physiol.* 2019;234(4):4825-39.
516. Wu CY, Hu HY, Chou YJ, Huang N, Chou YC, Li CP. High Blood Pressure and All-Cause and Cardiovascular Disease Mortalities in Community-Dwelling Older Adults. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(47):e2160.
517. Du G, Huang P, Liang BT, Frohman MA. Phospholipase D2 localizes to the plasma membrane and regulates angiotensin II receptor endocytosis. *Mol Biol Cell.* 2004;15(3):1024-30.
518. Qin H, Frohman MA, Bollag WB. Phospholipase D2 mediates acute aldosterone secretion in response to angiotensin II in adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology.* 2010;151(5):2162-70.
519. Tsai YY, Rainey WE, Pan ZQ, Frohman MA, Choudhary V, Bollag WB. Phospholipase D activity underlies very-low-density lipoprotein (VLDL)-induced aldosterone production in adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology.* 2014;155(9):3550-60.
520. Rasmussen H, Isales CM, Calle R, Throckmorton D, Anderson M, Gasalla-Herraiz J, et al. Diacylglycerol production, Ca²⁺ influx, and protein kinase C activation in sustained cellular responses. *Endocr Rev.* 1995;16(5):649-81.
521. Hong KW, Jin HS, Lim JE, Cho YS, Go MJ, Jung J, et al. Non-synonymous single-nucleotide polymorphisms associated with blood pressure and hypertension. *J Hum Hypertens.* 2010;24(11):763-74.
522. Kundu A, Ramakrishnan P, Rajendran A, Dharwar NV, Anbarasu A. Analysis of non-synonymous single-nucleotide polymorphisms and population variability of PLD2 gene associated with hypertension. *Int J Bioinform Res Appl.* 2013;9(3):227-41.
523. Giammanco A, Cefalu AB, Noto D, Aversa MR. The pathophysiology of intestinal lipoprotein production. *Front Physiol.* 2015;6:61.
524. Castro Cabezas M, Botham KM, Mamo JC, Proctor SD. Novel Aspects of Nonfasting Lipemia in relation to Vascular Biology. *Int J Vasc Med.* 2012;2012:419015.

525. Donaldson JG. Phospholipase D in endocytosis and endosomal recycling pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791(9):845-9.
526. Zanoni P, Velagapudi S, Yalcinkaya M, Rohrer L, von Eckardstein A. Endocytosis of lipoproteins. *Atherosclerosis*. 2018;275:273-95.
527. Stieglitz KA. Structural Insights for Drugs Developed for Phospholipase D Enzymes. *Curr Drug Discov Technol*. 2018;15(2):81-93.
528. Roy CC, Levy E, Green PH, Sniderman A, Letarte J, Buts JP, et al. Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology*. 1987;92(2):390-9.
529. Blanco-Vaca F, Martin-Campos JM, Beteta-Vicente A, Canyelles M, Martinez S, Roig R, et al. Molecular analysis of APOB, SAR1B, ANGPTL3, and MTTP in patients with primary hypocholesterolemia in a clinical laboratory setting: Evidence supporting polygenicity in mutation-negative patients. *Atherosclerosis*. 2019;283:52-60.
530. Asp L, Magnusson B, Rutberg M, Li L, Boren J, Olofsson SO. Role of ADP ribosylation factor 1 in the assembly and secretion of ApoB-100-containing lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(3):566-70.
531. Sarri E, Pardo R, Fensome-Green A, Cockcroft S. Endogenous phospholipase D2 localizes to the plasma membrane of RBL-2H3 mast cells and can be distinguished from ADP ribosylation factor-stimulated phospholipase D1 activity by its specific sensitivity to oleic acid. *Biochem J*. 2003;369(Pt 2):319-29.
532. Kim JH, Kim Y, Lee SD, Lopez I, Arnold RS, Lambeth JD, et al. Selective activation of phospholipase D2 by unsaturated fatty acid. *FEBS Lett*. 1999;454(1-2):42-6.
533. Mukhopadhyay S, Saqcena M, Chatterjee A, Garcia A, Frias MA, Foster DA. Reciprocal regulation of AMP-activated protein kinase and phospholipase D. *J Biol Chem*. 2015;290(11):6986-93.
534. Levy E, Harmel E, Laville M, Sanchez R, Emonnot L, Sinnott D, et al. Expression of Sar1b enhances chylomicron assembly and key components of the coat protein complex II system driving vesicle budding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(11):2692-9.

535. Sane A, Seidman E, Spahis S, Lamantia V, Garofalo C, Montoudis A, et al. New Insights In Intestinal Sar1B GTPase Regulation and Role in Cholesterol Homeostasis. *J Cell Biochem.* 2015;116(10):2270-82.
536. Kuge O, Dascher C, Orci L, Rowe T, Amherdt M, Plutner H, et al. Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments. *J Cell Biol.* 1994;125(1):51-65.
537. Levy E, Mehran M, Seidman E. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J.* 1995;9(8):626-35.
538. Marcil V, Delvin E, Garofalo C, Levy E. Butyrate impairs lipid transport by inhibiting microsomal triglyceride transfer protein in Caco-2 cells. *J Nutr.* 2003;133(7):2180-3.
539. Mailhot G, Ravid Z, Barchi S, Moreau A, Rabasa-Lhoret R, Levy E. CFTR knockdown stimulates lipid synthesis and transport in intestinal Caco-2/15 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;297(6):G1239-49.
540. Lewis JA, Scott SA, Lavieri R, Buck JR, Selvy PE, Stoops SL, et al. Design and synthesis of isoform-selective phospholipase D (PLD) inhibitors. Part I: Impact of alternative halogenated privileged structures for PLD1 specificity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009;19(7):1916-20.
541. Yin H, Gui Y, Du G, Frohman MA, Zheng XL. Dependence of phospholipase D1 multi-monoubiquitination on its enzymatic activity and palmitoylation. *J Biol Chem.* 2010;285(18):13580-8.
542. Kang DW, Park MH, Lee YJ, Kim HS, Lindsley CW, Alex Brown H, et al. Autoregulation of phospholipase D activity is coupled to selective induction of phospholipase D1 expression to promote invasion of breast cancer cells. *Int J Cancer.* 2011;128(4):805-16.
543. Jaafar R, De Larichaudy J, Chanon S, Euthine V, Durand C, Naro F, et al. Phospholipase D regulates the size of skeletal muscle cells through the activation of mTOR signaling. *Cell Commun Signal.* 2013;11:55.
544. Kim HS, Park MY, Yun NJ, Go HS, Kim MY, Seong JK, et al. Targeting PLD2 in adipocytes augments adaptive thermogenesis by improving mitochondrial quality and quantity in mice. *J Exp Med.* 2022;219(2).

545. Brown HA, Thomas PG, Lindsley CW. Targeting phospholipase D in cancer, infection and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(5):351-67.
546. Dinh TT, Kennerly DA. Assessment of receptor-dependent activation of phosphatidylcholine hydrolysis by both phospholipase D and phospholipase C. *Cell Regul.* 1991;2(4):299-309.
547. Onono FO, Morris AJ. Phospholipase D and Choline Metabolism. *Handb Exp Pharmacol.* 2020;259:205-18.
548. Rydzewska G, Rossignol B, Morisset J. Involvement of phospholipase D in caerulein-induced phosphatidylcholine hydrolysis in rat pancreatic acini. *Am J Physiol.* 1993;265(4 Pt 1):G725-34.
549. Vance JE. Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells. *Traffic.* 2015;16(1):1-18.
550. Cai M, He J, Xiong J, Tay LW, Wang Z, Rog C, et al. Phospholipase D1-regulated autophagy supplies free fatty acids to counter nutrient stress in cancer cells. *Cell Death Dis.* 2016;7(11):e2448.
551. Akiba S, Yoneda Y, Ohno S, Nemoto M, Sato T. Oxidized LDL activates phospholipase A2 to supply fatty acids required for cholesterol esterification. *J Lipid Res.* 2003;44(9):1676-85.
552. Jin S, Schatter B, Weichel O, Walev I, Ryu S, Klein J. Stability of phospholipase D in primary astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;297(3):545-51.
553. Zhao D, Frohman MA, Blusztajn JK. Generation of choline for acetylcholine synthesis by phospholipase D isoforms. *BMC Neurosci.* 2001;2:16.
554. Klein J. Functions and pathophysiological roles of phospholipase D in the brain. *J Neurochem.* 2005;94(6):1473-87.
555. Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y, Standaert ML, Quon MJ, Reed BC, et al. Glucose activates protein kinase C-zeta /lambda through proline-rich tyrosine kinase-2, extracellular signal-regulated kinase, and phospholipase D: a novel mechanism for activating glucose transporter translocation. *J Biol Chem.* 2001;276(38):35537-45.

556. Stremmel W, Staffer S, Wannhoff A, Pathil A. The overall fatty acid absorption controlled by basolateral chylomicron excretion under regulation of p-JNK1. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862(9):917-28.
557. Oh CH, Park SY, Han JS. Phospholipase D1 is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α expression and production through S6K1/JNK/c-Jun pathway in Raw 264.7 cells. *Cytokine*. 2014;66(1):69-77.
558. Kim JH, Choi HJ, Oh CH, Oh JW, Han JS. PLD1 activation mediates Amb a 1-induced Th2-associated cytokine expression via the JNK/ATF-2 pathway in BEAS-2B cells. *Cell Immunol*. 2015;298(1-2):9-17.
559. Lee SK, Kim YS, Bae GH, Lee HY, Bae YS. VU0155069 inhibits inflammasome activation independent of phospholipase D1 activity. *Sci Rep*. 2019;9(1):14349.
560. Feingold KR, Grunfeld C. The Effect of Inflammation and Infection on Lipids and Lipoproteins. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
561. Kleme ML, Levy E. Cystic fibrosis-related oxidative stress and intestinal lipid disorders. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(7):614-31.
562. van Diepen JA, Berbee JF, Havekes LM, Rensen PC. Interactions between inflammation and lipid metabolism: relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2013;228(2):306-15.
563. Morris AJ. Phospholipases D: making sense of redundancy and duplication. *Biosci Rep*. 2019;39(6).
564. Antonescu CN, Danuser G, Schmid SL. Phosphatidic acid plays a regulatory role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell*. 2010;21(16):2944-52.
565. Scott SA, Xiang Y, Mathews TP, Cho HP, Myers DS, Armstrong MD, et al. Regulation of phospholipase D activity and phosphatidic acid production after purinergic (P2Y₆) receptor stimulation. *J Biol Chem*. 2013;288(28):20477-87.
566. Letteron P, Sutton A, Mansouri A, Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology*. 2003;38(1):133-40.

567. Bougarne N, Weyers B, Desmet SJ, Deckers J, Ray DW, Staels B, et al. Molecular Actions of PPARalpha in Lipid Metabolism and Inflammation. *Endocr Rev.* 2018;39(5):760-802.
568. Lamming DW, Sabatini DM. A Central role for mTOR in lipid homeostasis. *Cell Metab.* 2013;18(4):465-9.
569. Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature.* 2007;450(7170):736-40.
570. Tsukahara T, Tsukahara R, Fujiwara Y, Yue J, Cheng Y, Guo H, et al. Phospholipase D2-dependent inhibition of the nuclear hormone receptor PPARgamma by cyclic phosphatidic acid. *Mol Cell.* 2010;39(3):421-32.
571. Kang DW, Hwang WC, Noh YN, Che X, Lee SH, Jang Y, et al. Deletion of phospholipase D1 decreases bone mass and increases fat mass via modulation of Runx2, beta-catenin-osteoprotegerin, PPAR-gamma and C/EBPalpha signaling axis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2021;1867(5):166084.
572. Fryer LG, Jones B, Duncan EJ, Hutchison CE, Ozkan T, Williams PA, et al. The endoplasmic reticulum coat protein II transport machinery coordinates cellular lipid secretion and cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem.* 2014;289(7):4244-61.
573. Huang M, Wang Y. Targeted Quantitative Proteomic Approach for Probing Altered Protein Expression of Small GTPases Associated with Colorectal Cancer Metastasis. *Anal Chem.* 2019;91(9):6233-41.
574. Palmieri VO, Grattagliano I, Portincasa P, Palasciano G. Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome. *J Nutr.* 2006;136(12):3022-6.
575. Wada T, Ichihashi Y, Suzuki E, Kosuge Y, Ishige K, Uchiyama T, et al. Deletion of Bmal1 Prevents Diet-Induced Ectopic Fat Accumulation by Controlling Oxidative Capacity in the Skeletal Muscle. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9).
576. Malaguarnera M, Di Rosa M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J Mol Med (Berl).* 2009;87(7):679-95.

577. Vitale G, Salvioli S, Franceschi C. Oxidative stress and the ageing endocrine system. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(4):228-40.
578. Muoio DM, Way JM, Tanner CJ, Winegar DA, Kliewer SA, Houmard JA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha regulates fatty acid utilization in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes*. 2002;51(4):901-9.
579. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 2002;418(6899):797-801.
580. Ben Djoudi Ouadda A, Levy E, Ziv E, Lalonde G, Sane AT, Delvin E, et al. Increased hepatic lipogenesis in insulin resistance and Type 2 diabetes is associated with AMPK signalling pathway up-regulation in *Psammomys obesus*. *Biosci Rep*. 2009;29(5):283-92.
581. Fernandez-Alvarez A, Alvarez MS, Gonzalez R, Cucarella C, Muntane J, Casado M. Human SREBP1c expression in liver is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem*. 2011;286(24):21466-77.
582. Cherkaoui-Malki M, Meyer K, Cao WQ, Latruffe N, Yeldandi AV, Rao MS, et al. Identification of novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) target genes in mouse liver using cDNA microarray analysis. *Gene Expr*. 2001;9(6):291-304.
583. Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*. 2001;21:193-230.
584. Prasun P, Pradhan M, Agarwal S. One gene, many phenotypes. *J Postgrad Med*. 2007;53(4):257-61.
585. El-Brolosy MA, Stainier DYR. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet*. 2017;13(7):e1006780.
586. Oliver PL, Davies KE. New insights into behaviour using mouse ENU mutagenesis. *Hum Mol Genet*. 2012;21(R1):R72-81.
587. Barbaric I, Miller G, Dear TN. Appearances can be deceiving: phenotypes of knockout mice. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2007;6(2):91-103.
588. Elsea SH, Lucas RE. The mousetrap: what we can learn when the mouse model does not mimic the human disease. *ILAR J*. 2002;43(2):66-79.

589. Farese RV, Jr., Ruland SL, Flynn LM, Stokowski RP, Young SG. Knockout of the mouse apolipoprotein B gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(5):1774-8.
590. Raabe M, Flynn LM, Zlot CH, Wong JS, Veniant MM, Hamilton RL, et al. Knockout of the abetalipoproteinemia gene in mice: reduced lipoprotein secretion in heterozygotes and embryonic lethality in homozygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(15):8686-91.
591. Levic DS, Minkel JR, Wang WD, Rybski WM, Melville DB, Knapik EW. Animal model of Sar1b deficiency presents lipid absorption deficits similar to Anderson disease. *J Mol Med (Berl).* 2015;93(2):165-76.
592. Li X, Yan M, Guo Z, Yan L, Feng R, Zhu H, et al. Inhibition of Sar1b, the Gene Implicated in Chylomicron Retention Disease, Impairs Migration and Morphogenesis of Developing Cortical Neurons. *Neuroscience.* 2020;449:228-40.
593. Tutukova S, Tarabykin V, Hernandez-Miranda LR. The Role of Neurod Genes in Brain Development, Function, and Disease. *Front Mol Neurosci.* 2021;14:662774.
594. Panja S, Paria BC. Development of the Mouse Placenta. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2021;234:205-21.
595. Watson ED, Cross JC. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology (Bethesda).* 2005;20:180-93.
596. Marcil V, Seidman E, Sinnett D, Sanchez R, Spahis S, Sane A, et al. Tissue distribution and regulation of the small Sar1b GTPase in mice. *Cell Physiol Biochem.* 2014;33(6):1815-26.
597. Turgeon B, Meloche S. Interpreting neonatal lethal phenotypes in mouse mutants: insights into gene function and human diseases. *Physiol Rev.* 2009;89(1):1-26.
598. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature.* 2004;432(7020):1032-6.
599. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol.* 2005;169(3):425-34.
600. Kotoulas OB, Kalamidas SA, Kondomerkos DJ. Glycogen autophagy in glucose homeostasis. *Pathol Res Pract.* 2006;202(9):631-8.

601. Lee HY, Lee GH, Bhattarai KR, Park BH, Koo SH, Kim HR, et al. Bax Inhibitor-1 regulates hepatic lipid accumulation via ApoB secretion. *Sci Rep.* 2016;6:27799.
602. Hebert DN, Molinari M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev.* 2007;87(4):1377-408.
603. Levy E, Marcel Y, Deckelbaum RJ, Milne R, Lepage G, Seidman E, et al. Intestinal apoB synthesis, lipids, and lipoproteins in chylomicron retention disease. *J Lipid Res.* 1987;28(11):1263-74.
604. Elias N, Patterson BW, Schonfeld G. In vivo metabolism of ApoB, ApoA-I, and VLDL triglycerides in a form of hypobetalipoproteinemia not linked to the ApoB gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(5):1309-15.
605. Ikewaki K, Rader DJ, Zech LA, Brewer HB, Jr. In vivo metabolism of apolipoproteins A-I and E in patients with abetalipoproteinemia: implications for the roles of apolipoproteins B and E in HDL metabolism. *J Lipid Res.* 1994;35(10):1809-19.
606. Field FJ, Watt K, Mathur SN. Origins of intestinal ABCA1-mediated HDL-cholesterol. *J Lipid Res.* 2008;49(12):2605-19.
607. Yu X, Ding X, Feng H, Bi Y, Li Y, Shan J, et al. Excessive exogenous cholesterol activating intestinal LXRA-ABCA1/G5/G8 signaling pathway can not reverse atherosclerosis in ApoE(-/-) mice. *Lipids Health Dis.* 2023;22(1):51.
608. Levy E, Lepage G, Bendayan M, Ronco N, Thibault L, Galeano N, et al. Relationship of decreased hepatic lipase activity and lipoprotein abnormalities to essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patients. *J Lipid Res.* 1989;30(8):1197-209.
609. Lepage G, Levy E, Ronco N, Smith L, Galeano N, Roy CC. Direct transesterification of plasma fatty acids for the diagnosis of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis. *J Lipid Res.* 1989;30(10):1483-90.
610. Auclair N, Sane AT, Ahmarani L, Patey N, Beaulieu JF, Peretti N, et al. Sar1b mutant mice recapitulate gastrointestinal abnormalities associated with chylomicron retention disease. *J Lipid Res.* 2021;62:100085.
611. Saini RK, Keum YS. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance - A review. *Life Sci.* 2018;203:255-67.

612. Metherel AH, Lacombe RJS, Chouinard-Watkins R, Hopperton KE, Bazinet RP. Complete assessment of whole-body n-3 and n-6 PUFA synthesis-secretion kinetics and DHA turnover in a rodent model. *J Lipid Res.* 2018;59(2):357-67.
613. Burdge GC, Finnegan YE, Minihane AM, Williams CM, Wootton SA. Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [¹³C]alpha-linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards beta-oxidation in older men. *Br J Nutr.* 2003;90(2):311-21.
614. Emken EA, Adlof RO, Gulley RM. Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism.* 1994;1213(3):277-88.
615. Flowers MT, Ntambi JM. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2008;19(3):248-56.
616. Tao G, Wang H, Shen Y, Zhai L, Liu B, Wang B, et al. Surf4 (Surfeit Locus Protein 4) Deficiency Reduces Intestinal Lipid Absorption and Secretion and Decreases Metabolism in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2023;43(4):562-80.
617. Levy E, Roy CC, Thibault L, Bonin A, Brochu P, Seidman EG. Variable expression of familial heterozygous hypobetalipoproteinemia: transient malabsorption during infancy. *J Lipid Res.* 1994;35(12):2170-7.
618. Heintz MM, McRee R, Kumar R, Baldwin WS. Gender differences in diet-induced steatotic disease in Cyp2b-null mice. *PLoS One.* 2020;15(3):e0229896.
619. Bachmann AM, Morel JD, El Alam G, Rodriguez-Lopez S, Imamura de Lima T, Goeminne LJE, et al. Genetic background and sex control the outcome of high-fat diet feeding in mice. *iScience.* 2022;25(6):104468.
620. Toth ME, Dukay B, Peter M, Balogh G, Szucs G, Zvara A, et al. Male and Female Animals Respond Differently to High-Fat Diet and Regular Exercise Training in a Mouse Model of Hyperlipidemia. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8).
621. Maric I, Krieger JP, van der Velden P, Borchers S, Asker M, Vujicic M, et al. Sex and Species Differences in the Development of Diet-Induced Obesity and Metabolic Disturbances in Rodents. *Front Nutr.* 2022;9:828522.

622. Palmisano BT, Zhu L, Eckel RH, Stafford JM. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism. *Mol Metab.* 2018;15:45-55.
623. Varlamov O, Bethea CL, Roberts CT, Jr. Sex-specific differences in lipid and glucose metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:241.
624. Zhu R, Li X, Xu J, Barrabi C, Kekulandara D, Woods J, et al. Defective endoplasmic reticulum export causes proinsulin misfolding in pancreatic beta cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2019;493:110470.

Annexes

Article 1 de l'annexe

Phospholipase D as a Potential Modulator of Metabolic Syndrome: Impact of Functional Foods

Nickolas Auclair, Alain Sané, Edgard Delvin, Schohraya Spahis et Emile Levy

Article publié dans la revue *Antioxidants and Redox Signaling* en janvier 2021

Cet article répond à l'objectif spécifique 1.1

Contributions :

Nickolas Auclair : A préparé le plan de l'article, effectué la recherche documentaire et rédigé l'article.

Alain T Sané et Edgard Delvin : Ont relu l'article.

Schohraya Spahis : Ont relu l'article et l'ont modifié pour le soumettre à la revue.

Emile Levy : a élaboré le plan de l'article avec l'étudiant, a rédigé certaines sections, et a finalement révisé et édité l'article avant de le soumettre.

5.1.1 MAIN TEXT OF THE ARTICLE

Forum Review Article

PHOSPHOLIPASE D AS A POTENTIAL MODULATOR OF METABOLIC SYNDROME: IMPACT OF FUNCTIONAL FOODS

Nickolas Auclair^{1,2}, Alain T. Sané¹, Edgard Delvin¹, Schohraya spahis^{1,3} and Emile Levy^{1,2,3*}

¹Research Center, CHU Ste-Justine and Departments of ²Pharmacology & physiology and

³Nutrition, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada

Running Title: PLD role and regulation

Keywords: Oxidative stress, Inflammation, Insulin resistance, dyslipidemia, metabolic pathway, bioactive nutrients.

Word count: 6400

Reference numbers: 269

Illustrations: 6 Figures in BW and 5 Tables

Address for correspondence:

*Dr. Emile Levy

GI-Nutrition Unit

CHU Sainte-Justine

3175 Ste-Catherine Road #4.17.005

Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5

Tel.: (514) 345-7783

ABSTRACT

Significance: Cardiometabolic disorders (CMD) are composed of a plethora of metabolic dysfunctions such as dyslipidemia, NAFLD, insulin resistance and hypertension. The development of these disorders is highly linked to inflammation and oxidative stress (OxS), two metabolic states closely related to physiological and pathological conditions. Given the drastically rising CMD prevalence, the discovery of new therapeutic targets/novel nutritional approaches is of utmost importance. **Recent Advances:** The tremendous progress in methods/technologies and animal modeling has allowed the clarification of phospholipase D (PLD) critical roles in multiple cellular processes, whether directly or indirectly via phosphatidic acid, the lipid product mediating signaling functions. In view of its multiple features and implications in various diseases, PLD has emerged as a drug target. **Critical issues:** Although insulin stimulates PLD activity and, in turn, PLD regulates insulin signaling, the impact of the two important PLD isoforms on the metabolic syndrome components remains vague. Therefore, after outlining PLD1/PLD2 characteristics and functions, their role in inflammation, OxS and CMD have been analyzed and critically reported in the present exhaustive review. The influence of functional foods and nutrients in the regulation of PLD has also been examined. **Future Directions:** Available evidence supports the implication of PLD in CMD, but only few studies emphasize its mechanisms of action and specific regulation by nutraceutical compounds. Therefore, additional investigations are first needed to clarify the functional role of nutraceuticals and, second, to elucidate whether targeting PLDs with food compounds represents an appropriate therapeutic strategy to treat CMD.

1. INTRODUCTION

The increase in the incidence of obesity is now considered as a major world health problem. Obesity is most of the time accompanied by multiple cardiometabolic disorders (CMD) such as dyslipidemia, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and type 2 diabetes (T2D) (89). Even though several of these problems can be averted or at least attenuated by exercising and adopting healthy eating habits, the development of appropriate therapeutic strategies is of prime importance provided significant progress is made in understanding the mechanisms of action. In this context, growing awareness is devoted to phospholipase D (PLD), a signal transduction-activated enzyme, which generates phosphatidic acid (PA), a significant lipid-derived second messenger. Indeed, PLD is a regulator of numerous signaling processes such as endocytosis, exocytosis and cytoskeletal reorganization, as well as vesicular trafficking and fusion. Moreover, PLD is involved in cell proliferation, inflammation, survival, redox signaling, mitochondrial function and many pathophysiological actions along with appreciated connections to neuronal ailments, cancer, thrombotic events, and infectious diseases.

In this review, we will discuss the role of PLD in CMD after outlining its main biochemical characteristics and functions. The comparative analysis of the two isoforms PLD1 and PLD2 will also be presented. Attempts will be made to shed light on the mechanisms triggered in the development of CMD such as obesity, NAFLD, dyslipidemia and T2D. Finally, we will examine whether nutrients constitute suitable means to treat CMD by targeting PLD activity.

2. PHOSPHOLIPASE D: GENERAL INFORMATION

PLD isoforms are impressive proteins in view of their structural, biochemical and biological features, which will be developed in the following sections.

2.1 Physicochemical proprieties and structure domain roles

The PLD family is composed of two classic isoforms: PLD1 and PLD2 (216). The two isoenzymes are expressed in nearly every mammalian tissue and are found in various organisms such as viruses, bacteria, yeast, plants, animals and humans (216). Other family members have been reported, including PLD3, PLD4 and PLD6 (86,177,178). This review will mostly focus on

mammalian PLD1 and PLD2 as they represent the predominant forms with unique functions and regulation. By contrast, PLD3 and PLD4 are not endowed with phospholipase activity and properly defined functions (177,261). On its side, PLD6 possesses a single strand-specific nuclease activity (109). PLD1 and PLD2 catalyze the same reaction and use mostly the same abundant membrane phospholipid, phosphatidylcholine (PC), as a substrate (86,177,178). They can also hydrolyze phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine and phosphatidylglycerol (216), but their key catalytic activity consists in hydrolyzing PC to produce membrane-bound PA and soluble choline. The members of this enzymatic family are transphosphatidylases, underscoring their ability to exchange the PA headgroup at the terminal phosphodiester bond (189). In this reaction, water is used as the nucleophile, but primary alcohol can also be used (216). **Figure 1** exhibits all the PLD reaction components, including enzymes, substrates and products.

The most used alcohols are butanol and ethanol, yielding phosphatidylbutanol and phosphatidylethanol, respectively. In fact, transphosphatidylases are even more attracted to alcohol as a nucleophile than water. For this reason, researchers were accustomed to employing ethanol or 1-butanol as a PLD inhibitor. However, it has recently been found that phosphatidylethanol can also activate downstream signaling pathways, implying that the studies using these inhibitors might not be highly specific. The transphosphorylation process depends on the chemical composition of the H(X)K(X)₄D motifs, which represents the catalytic domain of PLD (216). Although PLD1 and PLD2 have only 56% homology in their amino acid sequence, they possess the characteristic catalytic domain. Their molecular weights are 120 and 106 kDa, respectively. Their structure is composed of additional domains holding different potential roles. As described in **Figure 2**, PLD1 and PLD2 contain PX, PH and lipid binding domains, which are able to interact with substrates depending on the type of isoform. Their similarities and divergences are summarized below.

PLD1 and PLD2 contain a lipid binding sequence, absolutely essential for the activation of their activity, which heavily depends on lipid phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, but the two family PLD members have also secondary cofactors such as phosphoinositides (179). Nevertheless, phosphatidylinositol 4,5-biphosphate specifically causes the translocation of PLD1 to the plasma membrane where it is activated by signaling factors (53). It should be remembered that PA

directly promotes the activation of type I and type II phosphatidylinositol kinases, thereby generating PI(4,5)P₂ (214). In this way, PA and the two phosphatidylinositol kinases enable a feed forward regulation loop that is key in the production of signaling lipids.

The PX domain at the N-terminal domain is as well advantageous for PLD activities. PLD1 binds to phosphoinositides allowing the enzyme translocation to vesicle membranes to culminate in endocytosis (53). As to PLD2, the binding of its PX domain to specific enzymes (e.g. phospholipases, tyrosine or protein kinases) is necessary for their activation (114,139). For example, the formation of the PLD2-phospholipase C- γ 1 complex activates the enzymatic activity of phospholipase C- γ 1, in turn triggering epidermal growth factor that is implicated in cytoskeletal reorganization and cell proliferation (114). Also, the formation of the PLD2-Protein Kinase C (PKC) ζ complex enhances the activity of PKC ζ , allowing downstream PKC ζ protein activation (e.g. P70S6 kinase phosphorylation), which in turn detonates on mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway (114). For both PLD isoforms, the PX domain plays the role of dynamin GTPase (141). Indeed, PLD interacts directly with dynamin and activates its GTPase domain, thus causing the endocytosis of epidermal growth factor receptor at the plasma membrane. The PH domain in the C-terminus of the PX domain binds to the phosphoinositides playing a similar role for PLD1 and PLD2 (97). Although mutations or deletions of PLD1 and PLD2 do not modify their activity *in vitro*, inactivation is possible *in vivo* given fairly large modifications in their translocation to membranes and final intracellular compartmentalisation (54,214).

The biggest difference in PLD1 and PLD2 structure is that the former is equipped with a loop-shaped domain of 116 amino acids necessary for negative regulation (235). This specific domain could explain why PLD1 has a low basal activity compared to PLD2.

The structure and functions of all these different domains constitute important factors for PLD activity. Impeding the integrity of these domains by pharmacological inhibitors disturbs PLD activity, which actually represents a useful strategy to treat PLD-mediated several diseases (listed in **Table 1**). As seen in this Table, PLD acts on a plethora of signaling events, which subsequently exerts an influence on various diseases such as arthritis, Alzheimer, cancer, cardiovascular events, inflammatory bowel disease and others. Noteworthy, most chemical inhibitors have the

possibility to target the H(X)K(X)₄D domain as demonstrated in **Table 2**. The latter contains a non-exhaustive list of some direct or indirect PLD inhibitors (216). As previously reported, these inhibitors can be synthetic or natural molecules (215,259). In low concentrations, synthetic PLD inhibitors display higher specificity and affinity than natural molecules, but various nutraceuticals clearly exhibit a significant number of beneficial effects (96,168,199) as well described in the last section of this review.

2.2 Biological proprieties

2.2.1 Molecular biology of PLD1 and PLD2

First stimulated by their achievement in isolating and cloning the first eukaryotic PLD derived from plants (250), investigators succeeded in cloning yeast and mammals PLD isoforms (135,251). Although these genes display differences, they have common characteristics and highly conserved sequence motifs such as the catalytic HKD domain, N-terminal PX/PH and C2 domain (166). The identification of the PLD genes in the various species, including bacteria and viruses (42,55), led to the definition of PLD superfamily garnished with the sequence motif HxK(x)₄D(x)₆GSxN (x for amino acid residue) (194). Noteworthy, the same PLD superfamily contains non-PLD enzymes equipped with the HxKx₄Dx₆G(G/S) consensus sequence, e.g. endonucleases (193), cardiolipin synthase (111) and phosphatidylserine synthase (49). It should also be stressed that the superfamily members express little homology but they show a comparable catalytic HKD sequence, which consists of the domains I-IV, dictating similar reaction mechanisms (166). Nevertheless, there are some species (e.g. *Streptomyces*) that contain only domains I, II and IV, while bacterial endonucleases exhibit only the domains I and IV (166). To highlight some concrete examples, **Table 3** indicates the amino acids homology of PLDs from selected species (from viruses to mammals). Most of these data were produced by BLAST of selected amino acid sequences.

Available evidence suggests an ancient common precursor for eukaryotic *PLD* genes in view of the comparable sequence between the domains I & II and III & IV (146). Possibly, the *PLD* genes underwent duplication and fusion events, suggesting that they might be bilobed enzymes with two putative HKD motifs (194). A second proposal estimates that it is rather a gene duplication

giving rise to mammalian PLD1 and PLD2, which happened during the evolution of chordates (181). Finally, there was merit that every PLD is unique in its eukaryotic species (256) and, of course, different from prokaryotes. Despite significant progress in this area, the first crystal structure of PLD has been reported only in 2000 for *Streptomyces* (27) followed by that of the human in 2020 (233). The scientific community currently faces difficulty in unravelling the human crystal structure of PLD2 and engineering mammalian PLD recombinant compared to plant and prokaryote PLD. As of now, both isoforms of mammalian and human PLD have been expressed in eukaryotic systems (e.g. insect cells and yeasts) (29,124,226) concurring with the need of eukaryotic chaperones for the enzyme folding (257).

The first detailed kinetics of regulated PLD activity toward PC substrate was described in 2006 (93). At low substrate concentrations, initial velocity of PLD-catalyzed reaction is proportional to initial substrate concentration. At elevated substrate concentrations, the reaction approaches maximal velocity. Pointing out the differences in gene structure and localization between PLD1 and PLD2 in humans and mice may enhance the different patterns in their regulation and mechanisms of action. First of all, human PLD1 is localized in the chromosome 3 (3q26.31) while PLD2 is localized in the chromosome 17 (17p13.2) (51). If mouse PLD1 is also localized in chromosome 3 (3 A3; 3 11.15 cM), PLD2 belongs to chromosome 11 (11 B3; 11 42.99 cM) (202). Human *PLD1* gene spans 210 kb and is composed of 31 exons, the majority of them (27 exons) express 4 spliced transcripts (PLD1a, PLD1b, PLD1a2, PLD1b2) (51). However, *PLD2* gene is smaller and spans only 16.3 kb with 25 known exons. Mouse *PLD1* gene (147 kb) contains 28 exons whereas PLD2 (17.1 kb) has only 25 exons (202). The variance noted in the two isoforms is due to a rapid 20-fold extension/contraction occurring in the sets of introns (202).

2.2.2 Regulation of PLD1/PLD2 activities and PA production

As mentioned before, PLD1 and PLD2 play an important role in various biological pathways, indicating that their regulation is extremely significant. These two isoforms contribute to the formation of ~1–4 % of lipids found in cells, but their localization and activities are different (50). Under basal activity, PLD1 is mostly found in perinuclear membranes such as lysosomes, endosomes, Golgi apparatus and secretory granules (43,107). PLD1 has a low intrinsic activity and

needs to be activated by various proteins such as G protein-coupled receptors, PKC, Rac, Rho, ADP-ribosylation factors family members and receptor tyrosine kinase agonists in order to transduce an extracellular signal. All these proteins can directly interact with specific PLD1 sequences to increase its activity. Once PLD1 is activated, it is translocated to the plasma membrane or endosomes to hydrolyze PC into PA. Thereafter, PLD1 is recycled, with the assistance of its PX and PH domains, to resettle in specific intracellular membranes such as those of the Golgi and endoplasmic reticulum (ER) (53). Notably, for its biological activity, PLD1 does not need to be phosphorylated compared to PLD2 (1). On the other hand, PLD2 is mostly found in the plasma membrane under basal activity (43). It has a high catalytic activity and is usually activated by G protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinase through direct interaction (148). Similarly to PLD1, PLD2 cycles between plasma membrane and subcellular vesicles during an alteration of one of its motifs (53). It can be translocated to recycled vesicles with desensitized receptors but, compared to PLD1, its activity and protein interaction are modulated by phosphorylation (43). PLD2 has many phosphorylation sites at the PX domain and can be phosphorylated by Janus Kinase 3 at Tyr415 and C-Src, epidermal growth factor at Tyr296 (95).

Depending on the signaling pathway and on different settings, both PLD isoforms can be non-, partially- or highly redundant. With total inhibition of PLD activity, possible compensatory mechanisms take place (70,165). In these circumstances, cells or animals with a PLD deletion could still produce PA via additional pathways given the ultimate need to have an operational signaling (59,66). This could explain the absence of lethality of mice with PLD1 or PLD2 ablation (47,175,267). To mention only one example, long-term loss activities of both PLD isoforms or the constant use of their specific inhibitors results in an upregulation of diacylglycerol kinases or lyso-PA acyltransferases allowing PA production (66,70). In fact, diacylglycerol and lyso-PA can be transformed into PA (80).

Most studies focus on PA, as the PLD substrate, to understand downstream regulation of many processes, but the proper role of the PLD protein has often been omitted. Even if numerous events are controlled by PA, PLD protein is endowed with its own functions. Actually, PLD1 and PLD2 were found to physically interact with 30 different proteins (115). More precisely, as mentioned in the previous section, the interaction of the PLD2-PX domain with phospholipases,

tyrosine and protein kinases is necessary for their activation (114,130,141). PLD2 was also shown to be a guanine nucleotide exchange factor for the Rac2 GTPase (152). As for PLD1, it is the direct interaction (not the enzymatic activity) that is able to regulate the activation of Ped/Pea-15, an important regulator of insulin resistance (IR) (264). Also, the deletion of PLD1 regulates tumor necrosis factor (TNF) α production, while the inhibition of its enzymatic activity had no effect (134).

Therefore, one should take into account the impact of each of the respective assumed parameters when assessing PLD biological merit, either by employing PLD activity inhibitors or by genetic manipulations. The next section will cover the involvement of PLD in the regulation and amplification of many cellular signaling pathways and functions.

2.2.3 Role of PLD1 and PLD2 in endocytosis, exocytosis and vesicular trafficking

The transport of components between different cell compartments, performed by endocytosis or exocytosis of vesicles from an organelle to another, is an essential mechanism for proper cellular function, and PLD (mostly PA in this case) is a major player in these intracellular processes. One plausible explanation is the negative PA charged state and the local accumulation of its negative headgroup, known to promote the formation of a curved membrane in the lipid bilayer, necessary for the formation of vesicles (230). More recently, some mechanisms have been proposed for vesicle genesis and budding mediated by PA. The findings were mostly related to trafficking between the ER and the Golgi apparatus. Proteins synthesized in the ER are transported outside of the organelle by COPII vesicles (236). In a such process, PA was found to initiate the formation of these vesicles through the activation of Sar1b GTPase and the recruitment of Sec23/24 and Sec13/31 to the ER membranes (187). **Figure 3** summarizes this concept in the formation of COPI and COPII vesicles. Support for this mechanism was obtained via the inhibition of PLD1 activity that resulted in the accumulation of proteins in the ER, favouring the development of an ER stress (41). Generally, the vesicles move from the ER to the trans-Golgi apparatus for the maturation of proteins (236). Even if PA increases the fusion of COPII vesicles with the trans-Golgi, further efforts should shed more light on the mechanisms. The same relate to the transport of the COPI vesicles from the cis-Golgi apparatus back to the ER (22). Interestingly, ethanol and butanol inhibited PLD

activity and blocked the secretion of vesicles through the budding network (38,225). Furthermore, the removal of PLD in *Drosophila* led to Golgi disorganization and defective vesicular trafficking due to the reduction of the fission process in the trans-Golgi (138). Altogether, these results suggest that PLD is an essential actor in the accountable mechanisms. Collectively, these data also indicate that PLD and its PA product play a significant role in the membrane structure and membrane transport regulation. However, additional work is needed to complete our understanding of the basic mechanisms of action.

2.2.4 Role of PLD1 and PLD2 in major signaling processes

Other than its essential function in vesicular trafficking, PLD also regulates a plethora of different signaling events involved in cell proliferation (67), metastasis (210), cell movement (269), apoptosis (116) and platelet aggregation (149). Abnormal control of these processes by both PLD isoforms can trigger the development of several diseases such as Alzheimer, cancer, infections, thrombosis, arthritis and chronic inflammation. PLD may therefore represent a potent pharmaceutical target to treat specific diseases. Unfortunately, although chemical inhibitors were designed (215), clinical trials have not been carried out. This is especially true for different human cancers as PLD1 and PLD2 remain the most up-regulated genes in the brain (176), breast (94), colon (121), lung (102) and prostate (171). Supporting evidence was observed with PA that directly interacts with the domain of mammalian mTOR target for its activation, which in turn stimulates downstream effectors responsible for cell growth and proliferation, including P70S6 kinase (62). It is also important to note that PLD can even elicit signaling associated with cell receptors localized in the plasma membrane, including G protein-coupled receptors, receptor tyrosine kinases and integrins (105,207). Importantly, PLD mediates the internalization of these receptors by activating PI(4,5)P₂ kinases capable of phosphorylating phosphatidylinositol-4-phosphate, thereby inducing the translocation of proteins (e.g. coatamer proteins) and receptor budding from the membrane (e.g. dynamin and AP180) (115,167).

3. PLD AND METABOLIC STATES

IR results from a complex interplay between inflammation and oxidative stress (OxS). At the molecular level, inflammatory components and reactive oxygen species (ROS) activate several

serine/threonine kinases, which represent important negative modulators of the insulin-signaling pathway. Above all, inflammation and OxS are indivisibly linked in physiological and disease states: inflammation elicits cellular side effects principally via continuous and excessive production of free radicals and depletion of antioxidants, whereas OxS also increases inflammation by activating certain stress-activated kinases (64,98). IR, promoted by inflammation and OxS, may contribute to the development and progression of metabolic syndrome, T2D and CMD (63,69,79,204). Therefore, the next section will mainly underscore the role of PLD in inflammation and OxS as illustrated in **Figure 4**.

3.1 Inflammation

Inflammation is a common factor in the pathogenesis of multiple diseases. There is evidence that PLD1 and PLD2 are implicated in the modulation of inflammatory factors in various tissues and conditions. For example, in synovial organ culture and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, PLD isoforms positively modulated the transcriptional expression of interleukin (IL)-17 and TNF α -evoked expression of IL-6, IL-8 and CCL20 (68). Noteworthy, a more prominent pro-inflammatory role was shown for PLD1 in response to IL-1 β (123). Blocking PLD1 in a rodent model of peritonitis lessens TNF α -driven inflammation (219). Furthermore, PLDs participate in the bacterial cell wall component lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory process in retinal pigment epithelium cells through extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) activation and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression/prostaglandin E2 production (157). Damage to retinal pigment epithelium cells may be provoked by PLD-dependent activation of ERK1/2 and COX-2 induction in response to LPS. Interestingly, although the two PLD isoforms were activated by LPS, there was also a cellular PKC signaling elicited by LPS, which was found to be modulated only by the PLD1 pathway (157). Other studies report that PLD-derived PA is tightly implicated in thrombin-induced IL-6 synthesis in osteoblasts (136) and in TNF α -induced nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation in a myeloblastic cell line (192). Not only is PLD involved in NF- κ B activation in fibroblasts (192), but it also participates as an activator protein-1-mediated activation in Jurkat T cells (163). Using airway cells, it could be demonstrated that PLD-induced cytokine inflammation is dependent on the upstream recognition of sphingosine 1-phosphate to its receptor on the cell surface, which

stimulates Gi protein-coupled signaling cascades with the involvement of Rho (46). A second mechanism may explain PLD-induced inflammation in macrophages: the key PA signaling molecule induces Akt and mTOR-p70S6K1, which enhances the formation of pro-inflammatory cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6) and the mediators (nitric oxide, prostaglandin E2) (145). Moreover, there is a close connection between PLD and the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) that induce the expression of pro-inflammatory genes. Among the MAPKs, JNK is particularly critical for the pro-inflammatory gene expression (52). Activated JNK is able to phosphorylate both Ser63/Ser73 within the transactivation domain of the transcription factor c-Jun (84), which regulates a variety of genes by binding to their promoter and enhancer regions (220). In this context, LPS-induced stimulation of PLD1 intensified TNF α expression through activation of JNK/c-Jun pathway in Raw murine macrophages (174). Conversely, p38 MAPK phosphorylates PLD1 at Thr147 and increases the activity of the enzyme, thereby stimulating the binding of Rho-associated protein kinase 1 to ATF-2, culminating in an increased IL-13 production. Some groups have also reported the pro-inflammatory action of PLD2 in microglial cells via toll-like receptor 4 internalization (144). Similarly, PA elevation in neutrophils through activation of PC-hydrolyzing PLD enhances degranulation, i.e. the release of granule enzymes for killing invading bacteria (120). From there, it proceeds to mention that inhibiting the hydrolysis of the most abundant membrane phospholipid PC and PA generation by PLD constitutes a strategy to fight inflammation. Nevertheless, caution is appropriate since PLD1 and PLD2 also function to coordinately regulate macrophage phagocytosis (112), a central response of innate immunity which is requisite to host defence against infection and tissue remodeling (82,159).

3.2 Oxidative stress

In addition to their role in DNA damage, pro-oxidants and ROS may serve as intracellular signaling molecules with the ability to directly regulate the activity of various proteins and enzymes. Mammalian PLD is likely to play an important role in the formation of ROS. For their part, as described below, ROS can directly or indirectly modulate PLD activity, implying the significant impact of PLD on redox signaling.

It has previously been demonstrated that PLD signaling is activated by the synaptic response to OxS (156). For example, development of iron-induced OxS, one common characteristic of neurodegenerative diseases in synaptic endings of the cerebral cortex, is mediated especially by the activation of PLD1 (156). These observations are not surprising since PA produced by PLD has been noted as a key regulator of synaptic vesicle trafficking and neurotransmission (198). Importantly, several groups have emphasized the crosstalk between PLD and PKC during oxidative injury (129).

Earlier investigations reported the stimulation of PLD in smooth muscle cells, vascular endothelial cells and fibroblasts using prooxidants and ROS such as hydrogen peroxide, fatty acid hydroperoxides, and 4-hydroxynonenal (162,169). It was discovered that PLD activation is implicated in OxS- induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells, which can contribute to vascular pathology, including wound healing defectiveness, restenosis in grafted and injured vessels, and formation of the atherosclerotic lesion.

In endothelial cells forming the inner monolayer lining of blood vessels, prooxidants and free radicals activate PLD under the upstream modulation of phospholipase A₂ along with eicosanoids generated by COX-2 and lipoxygenases (170,221). They are capable of catalyzing the production of bioactive eicosanoids, including prostaglandins and leukotrienes (32), with potential cytotoxicity. Likewise, exposure of lung microvascular endothelial cells to bleomycin-mediated ROS resulted in loss of glutathione antioxidants, together with activation of PLD and formation of PA, which may produce cell cytotoxicity and drive the initiation of idiopathic pulmonary fibrosis (186). Attenuation was observed with antioxidants or PLD-specific inhibitors. Thus, oxidant-mediated lung microvascular endothelial PLD signaling likely participates in chronic, degenerative and progressive fibrosing lung disorders. It is worth mentioning that components with a thiol group, such as N-acetyl-L-cysteine and 2-mercaptopyrionylglycine, increase the formation of glutathione while attenuating ROS-mediated PLD activation (182). This is supported by studies using mercury (87). In fact, the latter raised ROS-mediated PLD activation while reducing the cellular content of thiols. These results indicate that PLD in endothelial cells is redox dependant as PLD is either activated in the presence of ROS or reduced in the presence of antioxidant thiols.

The precise signaling pathway for pro-oxidant-induced and thiol-regulated activation of PLD requires additional efforts in order to delineate the mechanisms of action in lung microvascular endothelial cells in view of the complex regulation by different effectors, including intracellular calcium, PKC, heterotrimeric/small molecular weight G proteins and protein tyrosine kinases/protein tyrosine phosphatases (182,188,245). This is all the true given the paradoxical PLD activation by vitamin C, a powerful antioxidant, reported in vasculature endothelial cells (232). Is it due to the presence of pharmacological doses of vitamin C employed in this study? Does vitamin C at supra-physiological doses behave as a pro-oxidant that induces OxS, thereby activating PLD? Is this because of calcium signaling or the crosstalk among the lipid signaling enzymes such as phospholipase A₂, COX-2 and lipoxygenases in the regulation of agonist (vitamin C)-induced activation of PLD? Definitely, these issues still require clarification. In further exploration, it is mandatory to elucidate the link between PLD and NADH/NADPH oxidase as PLD-derived PA upregulates the activity of this enzyme in many studies and different cell types, thereby enhancing the formation of ROS (20,23,26,209,218,242,249). In response to PLD, NADPH oxidase generates superoxide, which is transformed into hydrogen peroxide, a molecule involved in regulation of cell signaling pathways leading to the modulation of enzyme activities or alteration in gene expression (90). At present, two roles are proposed for PLD in the activation of NADPH oxidase: (i) NADPH oxidase uses cytochrome b in neutrophils at the plasma membrane level for its own activation (PLD-independent process) (253). However, once the complex is inactivated, PLD is necessary for the translocation of new cytochrome b molecules from cellular stores to the plasma membrane, thereby heightening NADPH oxidase. (ii) PA produced by PLD activity in neutrophils activates protein kinase, which further phosphorylates the subunit p22^{phox} found in cytochrome b (203). Once phosphorylated, it activates NADPH oxidase, indicating that PA accumulation markedly raises NADPH oxidase activity. Furthermore, the role of PLD activation in hydrogen peroxide-induced signal transduction and cellular responses was also examined in the PC12 cell line derived from a pheochromocytoma of the rat adrenal medulla (18). PLD2 activation was implicated in Src-dependent phosphorylation of calcium-dependent tyrosine kinase, Pyk2 (Tyr⁵⁸⁰ and Tyr⁸⁸¹) by promoting the complex formation between Pyk2 and activated Src in PC12 cells exposed to hydrogen peroxide, thereby resulting in activation of phosphatidylinositol 3-kinase

(PI3K)/Akt/p70S6K. Thus, these observations indicate a contribution of PLD2 to the Pyk2/PI3K/Akt pathway that acts as a survival signaling in response to H₂O₂.

In summary of this section, PLDs and their metabolic products function as critical signaling molecules in various types of tissues. In particular, they appear as central players in inflammation and ROS-induced cellular disorders in view of their intricate implication in key signaling pathways required for the modulation of epithelial and endothelial functions. The crosstalk between PLDs and noxious inflammatory and oxidative processes may trigger the development and progression not only of IR, but also of the multifactorial MetS condition (obesity, impaired glucose metabolism, dyslipidemia and hypertension), T2D and NAFLD, as summarized in **Table 4**.

4. PLD AND CARDIOMETABOLIC DISEASES

The high uptake of nutrients causes ROS accumulation (206,239). As a consequence, many serine/threonine kinases, like specific MAPKs, are activated and culminate in insulin receptor substrate-1 phosphorylation, further reducing glucose transport, causing the development of IR, and finally increasing the development of CMD (224). Many groups propose that ROS-mediated PLD stimulation constitutes the mechanism behind the etiopathogenesis of CMD and related complications. This assumption has prompted further exploration and is discussed in the light of available data linking metabolic syndrome components to PLD.

4.1 PLD and obesity

The role of PLD1 and PLD2 in metabolic homeostasis was investigated in knockout mice and it was noted that the absence of PLD2 lead to overweight (243). This observation was an age-dependent process since old mice developed a more obesogenic phenotype. Weight gain and elevated adipose tissue content were associated with increased food intake and reduced energy expenditure in mice deficient in PLD1 and PLD2 (243). Although PLD2 and PLD1 in this work were highly expressed in hypothalamus (the major site for satiety and hunger coordination), and each of them modulates a distinct set of neuropeptide genes involved in the control of food intake, the distribution of orexigenic and anorexigenic neuropeptides did not offer a clear picture in mice deficient in PLD1 or in PLD2 (243). The authors suggest that PLD-dependent inhibition of food

intake may originate from changes outside of the central nervous system. Their assumption is that elevation of peroxisome proliferator-activated receptor γ and mTOR activity in the absence of PLD1 and PLD2 takes place in the adipocytes, which may also contribute to the increase in body weight. However, supportive data were not presented. Validation of the results was brought by Song and Yoon who found that treatment with both PA and PLD1 overexpression caused a decrease in adipogenic differentiation through activation of mTORC1 (228). In fact, this group of investigators confirmed the negative roles of PLD1 and PA in adipogenic differentiation, with the indication that PLD1 reduces the formation of lipid droplets during adipogenic differentiation. Confirmation was obtained in experimental animal models of obesity: PLD activity was decreased in high-fat diet-induced obese mice and ob/ob mice, indicating a correlation between PLD activity and obesity state (228). However, further work is needed not only to clarify the role of PLD and PA in the control of adipogenesis, but also to ensure the implication of different pathways, including lipin1 β localization, cAMP formation, peroxisome proliferator-activated receptor, C/EBP β/α and mTOR signaling through DEP domain-containing mTOR-interacting protein, which will help design the strategy to prevent excessive differentiation.

It is important to stress that ambivalent information has left some doubt about the role of PLD in obesity. For example, the enzymatic activity of PLD was shown to be essential for the formation of lipid droplets (6,153), whose number and size are correlated with growth/expansion of adipose tissue and obesity (60). Similarly, PA is converted to diacylglycerol, which is further metabolized into either triglyceride (TG) or PC, followed by enhanced lipid accumulation in adipose tissue (205). Finally, in the early stages of adipogenesis, the expression of PLD1 and PLD2 was mildly increased during adipogenic differentiation (228).

4.2 PLD and insulin resistance

In PLD1 and PLD2 knockout mice, blood samples showed a significant elevation of free fatty acid concentrations (228), which generally promote IR (211). Accordingly, insulin and glucose tolerance test documented IR and impairment in insulin-stimulated glucose uptake in animals with PLD1 or PLD2 deletion (243). Other workers showed that human PLD1 overexpression enables the intracellular insulin-stimulated glucose transporter 4 trafficking and glucose uptake,

whereas disruption of PLD1 function by genetic modifications results in IR (103). In hepatocytes, inhibiting PLD with halopemide and/or n-butanol was also found to reduce glucose uptake (13). On the basis of these findings, the presence of PLD1 and PLD2 seems necessary to maintain insulin sensitivity and glucose homeostasis.

Inconsistent results were observed by focusing on the PED/PEA-15 protein, involved in the regulation of proliferation and apoptosis (65) and whose gene overexpression impairs glucose tolerance and promotes IR, ultimately leading to T2D-associated comorbidities (247). In line with these findings, *PED/PEA-15* protein levels are highly expressed in skeletal muscle and adipose tissues from individuals with T2D (44). The gluco-regulatory disorders generated by PED/PEA-15 are supposedly caused by direct PLD1 activation (264). In fact, PED/PEA-15 functions as a chaperone that interacts with the PLD1 D4 domain, thus promoting PLD1 activity and lengthening PLD1 protein stability unduly (264). Therefore, PA accumulates and is converted to other mediators, including diacylglycerol that markedly activates PKC α , a negative regulator of PKC ζ isoform (45). Conversely, upsetting or preventing PED/PEA-15-PLD1 interaction with cell-penetrating agents reduced basal PKC α activity and restored PKC ζ dependent insulin-stimulated glucose disposal (248). As established, PKC α and PKC ζ display a divergent impact on the regulation of insulin signal transduction, since activation of PKC ζ by insulin is required for the modulation of glucose uptake in adipocytes and skeletal muscle cells (16,17), whereas PKC α behaves as an endogenous negative feedback inhibitor of insulin signaling by modulating insulin receptor substrate 1, PI3K and PKC ζ / λ (143). As blocking PKC α with specific antisense or inhibiting PLD1 by pharmacological agents permitted recovery of the glucose uptake into muscle and fat cells over-expressing PED/PEA-15 (248), it is reasonable to suggest that PLD1 has deleterious effect on insulin sensitivity. Therefore, generating novel strategies to interfere with PED/PEA-15 and/or PLD1 functions may represent an innovative and highly selective approach to improve both insulin sensitivity. Confirmation of the positive effects of PLD on the development and progression of IR was obtained in primary mouse hepatocytes (263). PLD1 or PLD2 overexpression significantly increased the content of PA containing palmitic fatty acid and hampered insulin signaling. Accordingly, PLD-mediated hydrolysis of PC produced PA that promoted mTOR-raptor assembly,

thereby activating mTORC1, which generally inhibits insulin signaling by enhancing insulin receptor substrate 1 phosphorylation at serine sites (62,240).

Although PLD appears clearly involved in insulin signaling, glucose transport and, particularly, the translocation of glucose transporters from the ER into the plasma membrane, significant doubts persist as to its true impact on insulin sensitivity and glucose metabolism. Probably, a great deal of confusion is due to the various sources and quantitative supply of PA, presence of ceramide towards which PLD is very sensitive (12), cell and tissue origin, and intracellular localization (e.g. endosomes, lysosomes, secretory granules, plasma membrane, Golgi apparatus). In the next few years, the increase in our understanding will help meet the challenge how PLD1, PLD2 and PLD-derived PA regulate insulin signaling and contribute to glucose metabolism.

4.3 PLD and type 2 diabetes

We have already mentioned the decreased insulin sensitivity caused by the interaction of PED/PEA-15 with PLD. The administration of high-fat diet to PED/PEA-15 transgenic mice led to T2D (247). However, inhibition of PLD activity rescued insulin sensitivity and primed glucose transport, thereby documenting the critical role of PLD in IR and T2D (247). Upregulation of PLD in T2D leads to various complications. For example, PLD activation by ADP-ribosylation factor 6 under high glucose condition may alter mesangial cell phenotype associated with diabetic nephropathy (180). Moreover, PLD is implicated in severe vascular calcification observed in subjects with T2D and chronic kidney disease (227). Conversely, inhibition of PLD1 by selective inhibitors prevented calcification. Furthermore, PLD-mediated PA signaling pathway is implicated in thrombosis (99), a disorder frequently met in T2D. Therefore, PLD inhibitors may prevent the onset and progression of diabetic complications such as CVD.

4.4 PLD and dyslipidemia

Little information is available regarding the association between PLD and dyslipidemia. However, the activation of PLD by ADP-ribosylation factors and the formation of PA are known to be critical for the formation of very-low-density lipoprotein (VLDL) by the liver (10,11). For example, PA as a significant substrate for TG biosynthesis (255) may influence VLDL assembly and output. In line with these observations, 1-butanol inhibited the production of PA and inhibited VLDL assembly

(10). Therefore, PLD-mediated production of PA was a prerequisite for the assembly of VLDL. A recent study has shown that PLD is directly implicated in VLDL-induced aldosterone production (244), aldosterone being a major mineralocorticoid hormone responsible for increased blood pressure. The actions of aldosterone include damage to the heart, kidneys and vasculature (28). The VLDL response to PLD was mediated by steroidogenic acute regulatory protein and aldosterone synthase expression through the phosphorylation of transcription factors factors (244). **Figure 5** proposes a schematic representation of aldosterone production in response to PLD activation.

Moreover, incongruous aldosterone elevation has been associated not only with hypertension but also with impaired glucose metabolism, IR and dyslipidemia (61,190). Therefore, PLD may indirectly trigger aldosterone synthesis via VLDL output, in combination with CMD, including hyperlipidemia. Noteworthy, a positive correlation between TG levels and serum aldosterone was observed in subjects with MetS (71) along with the progression of atherosclerosis in animal models (72,158). Further efforts are necessary to specify the precise contribution of PLD to lipoprotein formation in physiological and pathophysiological states.

4.5 PLD and hypertension

PLD2 is activated by angiotensin II type 1 receptor and is the most predominant isoform in the regulation of blood pressure (7). Overexpression of PLD2 increases the internalization of the receptor while the use of negative mutant reduces the vesicle budding (54). There are now many evidences that AT1R, once endocytosed, regulates specific intracellular signaling pathways, indicating that PLD2 is necessary for this regulation (242). Besides, PLD2 is equally important in the control of aldosterone production (196,244). Once activated by angiotensin II, PLD2 increases the production of PA. PA can be transformed into diacylglycerol. The latter stimulates PKC activity, which controls aldosterone secretion from glomerulosa cells (201). These studies are in line with a genome-wide analysis that identified PLD2 polymorphisms contributing to hypertension (100,137). Given the involvement of PLD2 in angiotensin II-induced steroidogenesis, PLD activation seen in various cells producing aldosterone could account for an enhanced PLD2

expression. At this point in time, it can be stated that PLD regulates aldosterone synthesis and blood pressure and plays a role in hypertension pathogenesis.

4.6 PLD and NAFLD

NAFLD appears most of the time as a hepatic manifestation of the MetS. The prevalence of NAFLD rises with increasing rates of obesity, IR and T2D. Surprisingly, the role of PLD has hardly been investigated, except in a mouse model (108). Although activation of PLD induced various CMD, PLD elimination intriguingly resulted in NAFLD pathogenesis. *Pld1*^{-/-} mice exhibited an increase in hepatic TG and liver weight in parallel with reduced β -oxidation rate, and consequently mitochondria dysfunction. To explain NAFLD etiology, the investigators proposed a defect in autophagy as a consequence of the absent fusion between autophagosomes and lysosomes (108). To support these results, pharmacological inhibitors of PLD1 were found to reduce autophagy (47). On the other hand, another group reported that PLD1 negatively regulates autophagy via the coordination of important molecules in the autophagic pathway (AMP-activated protein kinase-mTOR-ULK1 and Vps34/Beclin 1) (117). Additionally, PLD1 was noted to play a role in the development and progression of rat liver fibrosis (217,268). For these reasons, the results of this single study should be interpreted with caution pending further investigation.

5. THE ROLE OF ACTIVE FOOD COMPOUNDS/NUTRACEUTICALS IN PLD REGULATION

Nutraceuticals are natural products (119), which can be used as supplements especially for health and medical purposes (262). Most of these active food compounds have many therapeutic properties and have been shown to exert beneficial effects on several complications such as CMD (127), cancer (223) and neurological diseases (2). The majority of nutraceuticals have also a significant anti-oxidative and/or anti-inflammatory feature (125,185). As most of these complex diseases result in a redox state imbalance and in a pro-inflammatory condition, as documented in the previous sections, nutraceuticals are recommended as part of self-care to improve these disorders (31,229). In some cases, the nutraceuticals are consumed as safe pharmaceutical alternatives or food supplements (15,168,212). However, even though they unequivocally exert multiple healthful actions, their inordinate consumption is not without adverse consequences. Unfortunately, only few studies have focused on their toxicity or safety as a function of very high

consumption and excessive doses, and the same for their interaction with drugs and mechanisms of action (5,15,91,208). Considering that PLD plays a role in redox signaling and inflammation, while being associated with the development of several complications (e.g. CMD and cancer), it is possible that many nutraceuticals are able to efficiently target PLD to occasion beneficial effects. Although the development of pharmaceutical PLD inhibitors represents a potential way to tackle related cardiometabolic conditions (36,164,231), active food nutrients and foodborne compounds represent a combined strategy to handle more competently PLD-associated diseases. Therefore, the following section is devoted to discuss the role and effectiveness of nutraceuticals such as polyphenols, Chinese medicines and nutrients in PLD regulation. **Figure 6** illustrates the impact of nutraceuticals on PLD modulation, and **Table 5** summarizes available literature information.

One of the promising food compounds that could be used for the inhibition of PLD is polyphenolic compounds such as resveratrol, which is contained in specific fruits such as grapes and blackberries (110). Incubation of human neutrophils with resveratrol was found to greatly reduce PLD activity and limit inflammation by lessening protein expression of the transcription factor NF- κ B and the production of inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β and TNF α (110). This was supported by reduction of chemotaxis, degranulation and oxidative burst. Noteworthy, when Balb/c mice with acute peritonitis were intraperitoneally injected with resveratrol, this phenolic nutrient highly ameliorated the disorder phenotype, while reducing inflammation (110). For the first time, the impact on PLD was suggested even if investigations have previously demonstrated the ability of resveratrol to attenuate inflammation and OxS without focusing on PLD involvement (25,48,154,191).

Curcumin is another polyphenol displaying the potential to affect PLD activity (33,259). Curcumin lessened PLD activity in mouse macrophages, and it was assumed that the anti-inflammatory -oxidative and -carcinogenic effects of curcumin might be caused by PLD inhibition (56,161). These findings were supported by the reduction of PLD activity in response to the administration of curcumin to pulmonary artery smooth muscle cells (33). In the same experimental conditions, a reduction of NADPH oxidase derived superoxide production was detected in response to

curcumin, suggesting an inhibition of PLD-mediated OxS by curcumin. In the field of blood pressure, curcumin exerted an antihypertensive effect by down-regulating the AT₁ receptor in vascular smooth muscle cells (260). PLD2 has also been reported to regulate blood pressure through the endocytosis of AT₁ receptor, making this enzyme the possible mechanism for curcumin antihypertensive actions (54). The same may apply to hyperlipidemia. Many clinical trials have demonstrated the ability of curcumin to lower plasma TG and low-density lipoprotein cholesterol (4,197), but the potential causal mechanism has not been defined. Since PLD activity influences VLDL secretion (10), additional work is needed to determine whether PLD plays a role in curcumin-mediated anti-dyslipidemic effects.

Quercetin, a flavonoid found in many medical plants, has been demonstrated to abolish PLD1 protein expression and activity in glioma cells, along with the down regulation of NF- κ B and metalloproteinase-2 (184). These results suggest that the anti-proliferative and anti-inflammatory effects of quercetin are caused by PLD1 downstream regulation. As with the above-mentioned polyphenols, quercetin shows an ability to attenuate CMD such as IR, hypertension, dyslipidemia and obesity (37,118). Again, whether PLD1 is a key factor in the influence of quercetin on CMD requires further evidence.

Many traditional Chinese medicines were found to regulate PLD activity. The first one is honokiol, a natural product extracted from seed cones of *Magnolia grandiflora*. At first, it was mostly used as an anti-microbial product (41), but later it was found to reduce tumour growth *in vivo* (14). It has been suggested that the beneficial effect may be caused by PLD inhibition (76). Indeed, treatment with honokiol in different cancer cell lines raised apoptosis and limited cell viability via reduced PLD activity. These observations were supported by a reduction of Ras activation, followed by decreased S6K, eukaryotic initiation factor 4E and binding protein 1, all implicated in transmitting proliferative signals. As PLD is a downstream activator of Ras, targeting its activity may play a role in tumour growth and apoptosis (222). Regarding CMD, honokiol has been found to highly improve IR in T2D mice (133,234). Honokiol is also considered as an antioxidant and anti-inflammatory molecule capable of inhibiting JNK and ERK1/2 in macrophages in response to LPS (34,157,174). Studies should be carried out to determine whether honokiol could be used to improve IR.

Triptolide, an epoxide from the vine *Tripterygium wilfordii*, was also able to reduce PLD activity in cancer cells (122). Although the mechanisms are not well established, PLD is likely an important downstream factor causing the anti-cancer effects of triptolide (104,160,246). If triptolide has been mostly studied for its anti-cancer activity, it was also found to improve diabetes complications by attenuating inflammation and OxS (74,150). The mechanisms implicated *transforming growth factor beta 1*, osteopontin, hydroxynonenal and monocyte chemoattractant protein-1, but the role of PLD1 in these mechanisms has not been studied. However, triptolide has been found to attenuate LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6 (252) and OxS markers (265), which are all implicated in CMD etiology.

Many nutrients such as certain fatty acids, vitamins and dietary fibers are able to regulate PLD activity (24,254,258). The unsaturated fatty acids such as linoleic, linolenic, arachidonic, docosahexaenoic and eicosapentaenoic and oleic acids modulate PLD activity (9,19,21,77). For example, in C2 mast cells, all the classes of the above-mentioned polyunsaturated fatty acids, apart from arachidonic acid, abolish the translocation of PLD1 to the plasma membrane, which is absolutely necessary for the hydrolysis of PC into PA. As most of the polyunsaturated fatty acids (except arachidonic acid) display important anti-inflammatory and anti-oxidative properties (200), while mitigating several pathological factors of the metabolic syndrome (85,113), the regulation of PLD1 may represent one of the mechanisms of action of polyunsaturated fatty acids for the control of a few MetS components.

Noteworthy, it is strange to observe the activation of PLD by vitamins C and D3, two molecules with many beneficial actions such as the attenuation of inflammation and CMD (58,75,128,245).

6. CONCLUSION AND PERSPECTIVES

PLD1 and PLD2 are the master regulators of various signaling pathways, giving rise to the development of a large spectrum of diseases. Both isoforms have their specific roles and implications, and it is important to study them separately. For example, PLD2 seems to be more implicated in Alzheimer's disease while PLD1 is more implicated in CMD. Also, it is important to highlight the mechanisms implicating PLD protein expression instead of its activity, to discriminate the properties of PLD versus PA. One of the conclusions of this manuscript is the lack

of uniformity in the role of PLD in all pathologies. Sometimes PLD seems to have a beneficial effect on certain diseases and sometimes a negative influence. Herein, we have highlighted the role of PLD in inflammation and OxS in CMD. It is clear that PLD has an essential role in these disorders, and in this case PLD may represent a bioactive, beneficial treatment. Targeting PLD with functional foods could also be an important way to treat CMD. As explained, many nutraceuticals, especially polyphenols, are found to exert their anti-inflammatory effect via PLD downregulation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research Grants (PJT 153113) and the J. A. DeSève Research Chair in Nutrition.

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

The funders had no role in study design, decision to publish, or preparation of the manuscript. Therefore, the authors have declared that no competing interests exist.

LIST OF ABBREVIATIONS

CMD: Cardiometabolic disorder

COX-2: Cyclooxygenase-2

ER: Endoplasmic reticulum

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

IL: Interleukin

IR: Insulin resistance

LPS: Lipopolysaccharide

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

MetS: Metabolic syndrome

mTOR: Mammalian target of rapamycin

NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease

NF- κ B: Nuclear factor- κ B

OxS: Oxidative stress

PA: Phosphatidic acid

PC: Phosphatidylcholine

PKC: protein kinase C

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase

PLD: Phospholipase D

ROS: Reactive oxygen species

TG: Triglycerides

T2D: Type 2 diabetes

TNF: Tumor necrosis factor

VLDL: Very low-density lipoprotein

REFERENCES

1. Ahn BH, Kim SY, Kim EH, Choi KS, Kwon TK, Lee YH, Chang JS, Kim MS, Jo YH, Min DS. Transmodulation between phospholipase D and c-Src enhances cell proliferation. *Mol Cell Biol* 23: 3103-15, 2003.
2. Akhlaghi M, Shabaniyan G, Rafieian-Kopaei M, Parvin N, Saadat M, Akhlaghi M. Citrus aurantium blossom and preoperative anxiety. *Rev Bras Anesthesiol* 61: 702-12, 2011.
3. Ali WH, Chen Q, Delgiorno KE, Su W, Hall JC, Hongu T, Tian H, Kanaho Y, Di Paolo G, Crawford HC, Frohman MA. Deficiencies of the lipid-signaling enzymes phospholipase D1 and D2 alter cytoskeletal organization, macrophage phagocytosis, and cytokine-stimulated neutrophil recruitment. *PLoS One* 8: e55325, 2013.
4. Alwi I, Santoso T, Suyono S, Sutrisna B, Suyatna FD, Kresno SB, Ernie S. The effect of curcumin on lipid level in patients with acute coronary syndrome. *Acta Med Indones* 40: 201-10, 2008.
5. Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Ares I, Martínez MA. Chapter 60 - Interactions between Nutraceuticals/Nutrients and Therapeutic Drugs. In: *Nutraceuticals*. edited by Gupta RC. Boston: Academic Press; 2016. pp. 855-874.
6. Andersson L, Bostrom P, Ericson J, Rutberg M, Magnusson B, Marchesan D, Ruiz M, Asp L, Huang P, Frohman MA, Boren J, Olofsson SO. PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation. *J Cell Sci* 119: 2246-57, 2006.
7. Andresen BT, Jackson EK, Romero GG. Angiotensin II signaling to phospholipase D in renal microvascular smooth muscle cells in SHR. *Hypertension* 37: 635-9, 2001.
8. Andrews B, Bond K, Lehman JA, Horn JM, Dugan A, Gomez-Cambronero J. Direct inhibition of in vitro PLD activity by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 302-11, 2000.
9. Arous C, Naimi M, Van Obberghen E. Oleate-mediated activation of phospholipase D and mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates proliferation and rapamycin sensitivity of hepatocarcinoma cells. *Diabetologia* 54: 954-64, 2011.

10. Asp L, Claesson C, Boren J, Olofsson SO. ADP-ribosylation factor 1 and its activation of phospholipase D are important for the assembly of very low density lipoproteins. *J Biol Chem* 275: 26285-92, 2000.
11. Asp L, Magnusson B, Rutberg M, Li L, Boren J, Olofsson SO. Role of ADP ribosylation factor 1 in the assembly and secretion of ApoB-100-containing lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 566-70, 2005.
12. Babenko NA, Kharchenko VS. Ceramides inhibit phospholipase D-dependent insulin signaling in liver cells of old rats. *Biochemistry (Mosc)* 77: 180-6, 2012.
13. Babenko NA, Kharchenko VS. Modulation of Insulin Sensitivity of Hepatocytes by the Pharmacological Downregulation of Phospholipase D. *Int J Endocrinol* 2015: 794838, 2015.
14. Bai X, Cerimele F, Ushio-Fukai M, Waqas M, Campbell PM, Govindarajan B, Der CJ, Battle T, Frank DA, Ye K, Murad E, Dubiel W, Soff G, Arbiser JL. Honokiol, a small molecular weight natural product, inhibits angiogenesis in vitro and tumor growth in vivo. *J Biol Chem* 278: 35501-7, 2003.
15. Banach M, Patti AM, Giglio RV, Cicero AFG, Atanasov AG, Bajraktari G, Bruckert E, Descamps O, Djuric DM, Ezhov M, Fras Z, von Haehling S, Katsiki N, Langlois M, Latkovskis G, Mancini GBJ, Mikhailidis DP, Mitchenko O, Moriarty PM, Muntner P, Nikolic D, Panagiotakos DB, Paragh G, Paulweber B, Pella D, Pitsavos C, Reiner Z, Rosano GMC, Rosenson RS, Rysz J, Sahebkar A, Serban MC, Vinereanu D, Vrablik M, Watts GF, Wong ND, Rizzo M, International Lipid Expert P. The Role of Nutraceuticals in Statin Intolerant Patients. *J Am Coll Cardiol* 72: 96-118, 2018.
16. Bandyopadhyay G, Standaert ML, Galloway L, Moscat J, Farese RV. Evidence for involvement of protein kinase C (PKC)-zeta and noninvolvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes. *Endocrinology* 138: 4721-31, 1997.
17. Bandyopadhyay G, Standaert ML, Kikkawa U, Ono Y, Moscat J, Farese RV. Effects of transiently expressed atypical (zeta, lambda), conventional (alpha, beta) and novel (delta, epsilon) protein kinase C isoforms on insulin-stimulated translocation of epitope-tagged

- GLUT4 glucose transporters in rat adipocytes: specific interchangeable effects of protein kinases C-zeta and C-lambda. *Biochem J* 337 (Pt 3): 461-70, 1999.
18. Banno Y, Ohguchi K, Matsumoto N, Koda M, Ueda M, Hara A, Dikic I, Nozawa Y. Implication of phospholipase D2 in oxidant-induced phosphoinositide 3-kinase signaling via Pyk2 activation in PC12 cells. *J Biol Chem* 280: 16319-24, 2005.
 19. Basiouni S, Fuhrmann H, Schumann J. The influence of polyunsaturated fatty acids on the phospholipase D isoforms trafficking and activity in mast cells. *Int J Mol Sci* 14: 9005-17, 2013.
 20. Bauldry SA, Bass DA, Cousart SL, McCall CE. Tumor necrosis factor alpha priming of phospholipase D in human neutrophils. Correlation between phosphatidic acid production and superoxide generation. *J Biol Chem* 266: 4173-9, 1991.
 21. Bechoua S, Dubois M, Nemoz G, Lagarde M, Prigent AF. Docosahexaenoic acid lowers phosphatidate level in human activated lymphocytes despite phospholipase D activation. *J Lipid Res* 39: 873-83, 1998.
 22. Beck R, Rawet M, Wieland FT, Cassel D. The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS Lett* 583: 2701-9, 2009.
 23. Bellavite P, Corso F, Dusi S, Grzeskowiak M, Della-Bianca V, Rossi F. Activation of NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane extracts of pig neutrophils by phosphatidic acid. *J Biol Chem* 263: 8210-4, 1988.
 24. Bernfeld E, Menon D, Vaghela V, Zerlin I, Faruque P, Frias MA, Foster DA. Phospholipase D-dependent mTOR complex 1 (mTORC1) activation by glutamine. *J Biol Chem* 293: 16390-16401, 2018.
 25. Bo S, Ciccone G, Castiglione A, Gambino R, De Michieli F, Villois P, Durazzo M, Cavallo-Perin P, Cassader M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of resveratrol in healthy smokers a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Curr Med Chem* 20: 1323-31, 2013.
 26. Bonser RW, Thompson NT, Randall RW, Garland LG. Phospholipase D activation is functionally linked to superoxide generation in the human neutrophil. *Biochem J* 264: 617-20, 1989.

27. Bowling FZ, Salazar CM, Bell JA, Huq TS, Frohman MA, Airola MV. Crystal structure of human PLD1 provides insight into activation by PI(4,5)P₂ and RhoA. *Nat Chem Biol* 16: 400-407, 2020.
28. Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 120: 893-901, 1992.
29. Brown HA, Henage LG, Preininger AM, Xiang Y, Exton JH. Biochemical analysis of phospholipase D. *Methods Enzymol* 434: 49-87, 2007.
30. Cai D, Zhong M, Wang R, Netzer WJ, Shields D, Zheng H, Sisodia SS, Foster DA, Gorelick FS, Xu H, Greengard P. Phospholipase D1 corrects impaired betaAPP trafficking and neurite outgrowth in familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutant neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1936-40, 2006.
31. Caliceti C, Urao N, Rizzo P, Giuliano M. New Trends in Antioxidant Compounds: A Precise Nutraceutical in Cardiometabolic Disorders. *Oxid Med Cell Longev* 2019: 4794563, 2019.
32. Chakraborti S. Phospholipase A(2) isoforms: a perspective. *Cell Signal* 15: 637-65, 2003.
33. Chakraborti S, Sarkar J, Bhuyan R, Chakraborti T. Role of curcumin in PLD activation by Arf6-cytohesin1 signaling axis in U46619-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem* 438: 97-109, 2018.
34. Chao LK, Liao PC, Ho CL, Wang EI, Chuang CC, Chiu HW, Hung LB, Hua KF. Anti-inflammatory bioactivities of honokiol through inhibition of protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, and the NF-kappaB pathway to reduce LPS-induced TNFalpha and NO expression. *J Agric Food Chem* 58: 3472-8, 2010.
35. Chelakkot C, Ghim J, Rajasekaran N, Choi JS, Kim JH, Jang MH, Shin YK, Suh PG, Ryu SH. Intestinal Epithelial Cell-Specific Deletion of PLD2 Alleviates DSS-Induced Colitis by Regulating Occludin. *Sci Rep* 7: 1573, 2017.
36. Chen Q, Hongu T, Sato T, Zhang Y, Ali W, Cavallo JA, van der Velden A, Tian H, Di Paolo G, Nieswandt B, Kanaho Y, Frohman MA. Key roles for the lipid signaling enzyme phospholipase d1 in the tumor microenvironment during tumor angiogenesis and metastasis. *Sci Signal* 5: ra79, 2012.

37. Chen S, Jiang H, Wu X, Fang J. Therapeutic Effects of Quercetin on Inflammation, Obesity, and Type 2 Diabetes. *Mediators Inflamm* 2016: 9340637, 2016.
38. Chen YG, Siddhanta A, Austin CD, Hammond SM, Sung TC, Frohman MA, Morris AJ, Shields D. Phospholipase D stimulates release of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 138: 495-504, 1997.
39. Chu M, Patel MG, Pai J-K, Das PR, Puar MS. Sch 53823 and Sch 53825, novel fungal metabolites with phospholipase D inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6: 579-584, 1996.
40. Chu M, Truumees I, Patel MG, Gullo VP, Pai J-K, Das PR, Puar MS. Two new phospholipase d inhibitors, sch 49211 and sch 49212, produced by the fungus *nattrasia mangirferae*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 4: 1539-1542, 1994.
41. Clark AM, El-Feraly FS, Li WS. Antimicrobial activity of phenolic constituents of *Magnolia grandiflora* L. *J Pharm Sci* 70: 951-2, 1981.
42. Cole R, Proulx P. Phospholipase D activity of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 124: 1148-52, 1975.
43. Colley WC, Sung TC, Roll R, Jenco J, Hammond SM, Altshuller Y, Bar-Sagi D, Morris AJ, Frohman MA. Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr Biol* 7: 191-201, 1997.
44. Condorelli G, Vigliotta G, Iavarone C, Caruso M, Tocchetti CG, Andreozzi F, Cafieri A, Tecce MF, Formisano P, Beguinot L, Beguinot F. PED/PEA-15 gene controls glucose transport and is overexpressed in type 2 diabetes mellitus. *EMBO J* 17: 3858-66, 1998.
45. Condorelli G, Vigliotta G, Trencia A, Maitan MA, Caruso M, Miele C, Oriente F, Santopietro S, Formisano P, Beguinot F. Protein kinase C (PKC)-alpha activation inhibits PKC-zeta and mediates the action of PED/PEA-15 on glucose transport in the L6 skeletal muscle cells. *Diabetes* 50: 1244-52, 2001.
46. Cummings RJ, Parinandi NL, Zaiman A, Wang L, Usatyuk PV, Garcia JG, Natarajan V. Phospholipase D activation by sphingosine 1-phosphate regulates interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem* 277: 30227-35, 2002.

47. Dall'Armi C, Hurtado-Lorenzo A, Tian H, Morel E, Nezu A, Chan RB, Yu WH, Robinson KS, Yeku O, Small SA, Duff K, Frohman MA, Wenk MR, Yamamoto A, Di Paolo G. The phospholipase D1 pathway modulates macroautophagy. *Nat Commun* 1: 142, 2010.
48. de Sa Coutinho D, Pacheco MT, Frozza RL, Bernardi A. Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol: Mechanistic Insights. *Int J Mol Sci* 19, 2018.
49. DeChavigny A, Heacock PN, Dowhan W. Sequence and inactivation of the pss gene of Escherichia coli. Phosphatidylethanolamine may not be essential for cell viability. *J Biol Chem* 266: 5323-32, 1991.
50. Dennis EA, Deems RA, Harkewicz R, Quehenberger O, Brown HA, Milne SB, Myers DS, Glass CK, Hardiman G, Reichart D, Merrill AH, Jr., Sullards MC, Wang E, Murphy RC, Raetz CR, Garrett TA, Guan Z, Ryan AC, Russell DW, McDonald JG, Thompson BM, Shaw WA, Sud M, Zhao Y, Gupta S, Maurya MR, Fahy E, Subramaniam S. A mouse macrophage lipidome. *J Biol Chem* 285: 39976-85, 2010.
51. Di Fulvio M, Gomez-Cambronero J. Phospholipase D (PLD) gene expression in human neutrophils and HL-60 differentiation. *J Leukoc Biol* 77: 999-1007, 2005.
52. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20: 55-72, 2002.
53. Du G, Altshuler YM, Vitale N, Huang P, Chasserot-Golaz S, Morris AJ, Bader MF, Frohman MA. Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. *J Cell Biol* 162: 305-15, 2003.
54. Du G, Huang P, Liang BT, Frohman MA. Phospholipase D2 localizes to the plasma membrane and regulates angiotensin II receptor endocytosis. *Mol Biol Cell* 15: 1024-30, 2004.
55. Eckert D, Williams O, Meseda CA, Merchlinsky M. Vaccinia virus nicking-joining enzyme is encoded by K4L (VACWR035). *J Virol* 79: 15084-90, 2005.
56. Edwards RL, Luis PB, Varuzza PV, Joseph AI, Presley SH, Chaturvedi R, Schneider C. The anti-inflammatory activity of curcumin is mediated by its oxidative metabolites. *J Biol Chem* 292: 21243-21252, 2017.

57. Eisen SF, Brown HA. Selective estrogen receptor (ER) modulators differentially regulate phospholipase D catalytic activity in ER-negative breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 62: 911-20, 2002.
58. Ellulu MS, Rahmat A, Patimah I, Khaza'ai H, Abed Y. Effect of vitamin C on inflammation and metabolic markers in hypertensive and/or diabetic obese adults: a randomized controlled trial. *Drug Des Devel Ther* 9: 3405-12, 2015.
59. Elvers M, Stegner D, Hagedorn I, Kleinschnitz C, Braun A, Kuijpers ME, Boesl M, Chen Q, Heemskerk JW, Stoll G, Frohman MA, Nieswandt B. Impaired alpha(IIb)beta(3) integrin activation and shear-dependent thrombus formation in mice lacking phospholipase D1. *Sci Signal* 3: ra1, 2010.
60. Engin A. Fat Cell and Fatty Acid Turnover in Obesity. *Adv Exp Med Biol* 960: 135-160, 2017.
61. Fallo F, Federspil G, Veglio F, Mulatero P. The metabolic syndrome in primary aldosteronism. *Curr Diab Rep* 8: 42-7, 2008.
62. Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, Chen J. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294: 1942-5, 2001.
63. Festa A, D'Agostino R, Jr., Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 102: 42-7, 2000.
64. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 42: 153-64, 2007.
65. Fiory F, Formisano P, Perruolo G, Beguinot F. Frontiers: PED/PEA-15, a multifunctional protein controlling cell survival and glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E592-601, 2009.
66. Foster DA, Salloum D, Menon D, Frias MA. Phospholipase D and the maintenance of phosphatidic acid levels for regulation of mammalian target of rapamycin (mTOR). *J Biol Chem* 289: 22583-8, 2014.
67. Foster DA, Xu L. Phospholipase D in cell proliferation and cancer. *Mol Cancer Res* 1: 789-800, 2003.

68. Friday SC, Fox DA. Phospholipase D enzymes facilitate IL-17- and TNF α -induced expression of proinflammatory genes in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (RASf). *Immunol Lett* 174: 9-18, 2016.
69. Frohlich M, Imhof A, Berg G, Hutchinson WL, Pepys MB, Boeing H, Muche R, Brenner H, Koenig W. Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. *Diabetes Care* 23: 1835-9, 2000.
70. Frohman MA. The phospholipase D superfamily as therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* 36: 137-44, 2015.
71. Fujita T. Aldosterone in salt-sensitive hypertension and metabolic syndrome. *J Mol Med (Berl)* 86: 729-34, 2008.
72. Gamliel-Lazarovich A, Gantman A, Coleman R, Jeng AY, Kaplan M, Keidar S. FAD286, an aldosterone synthase inhibitor, reduced atherosclerosis and inflammation in apolipoprotein E-deficient mice. *J Hypertens* 28: 1900-7, 2010.
73. Ganesan R, Mahankali M, Alter G, Gomez-Cambronero J. Two sites of action for PLD2 inhibitors: The enzyme catalytic center and an allosteric, phosphoinositide binding pocket. *Biochim Biophys Acta* 1851: 261-72, 2015.
74. Gao Q, Shen W, Qin W, Zheng C, Zhang M, Zeng C, Wang S, Wang J, Zhu X, Liu Z. Treatment of db/db diabetic mice with triptolide: a novel therapy for diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 25: 3539-47, 2010.
75. Garbossa SG, Folli F. Vitamin D, sub-inflammation and insulin resistance. A window on a potential role for the interaction between bone and glucose metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 18: 243-258, 2017.
76. Garcia A, Zheng Y, Zhao C, Toschi A, Fan J, Shraibman N, Brown HA, Bar-Sagi D, Foster DA, Arbiser JL. Honokiol suppresses survival signals mediated by Ras-dependent phospholipase D activity in human cancer cells. *Clin Cancer Res* 14: 4267-74, 2008.
77. Gemeinhardt A, Alfalah M, Guck T, Naim HY, Fuhrmann H. The influence of linoleic and linolenic acid on the activity and intracellular localisation of phospholipase D in COS-1 cells. *Biol Chem* 390: 253-8, 2009.

78. Ghim J, Moon JS, Lee CS, Lee J, Song P, Lee A, Jang JH, Kim D, Yoon JH, Koh YJ, Chelakkot C, Kang BJ, Kim JM, Kim KL, Yang YR, Kim Y, Kim SH, Hwang D, Suh PG, Koh GY, Kong YY, Ryu SH. Endothelial deletion of phospholipase D2 reduces hypoxic response and pathological angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34: 1697-703, 2014.
79. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 107: 1058-70, 2010.
80. Goto K, Hozumi Y, Kondo H. Diacylglycerol, phosphatidic acid, and the converting enzyme, diacylglycerol kinase, in the nucleus. *Biochim Biophys Acta* 1761: 535-41, 2006.
81. Gratas C, Powis G. Inhibition of phospholipase D by agents that inhibit cell growth.
82. Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14: 136-45, 2002.
83. Griner RD, Qin F, Jung E, Sue-Ling CK, Crawford KB, Mann-Blakeney R, Bollag RJ, Bollag WB. 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces phospholipase D-1 expression in primary mouse epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 274: 4663-70, 1999.
84. Guma M, Firestein GS. c-Jun N-Terminal Kinase in Inflammation and Rheumatic Diseases. *Open Rheumatol J* 6: 220-31, 2012.
85. Guo XF, Li X, Shi M, Li D. n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Metabolic Syndrome Risk: A Meta-Analysis. *Nutrients* 9, 2017.
86. Ha EE, Frohman MA. Regulation of mitochondrial morphology by lipids. *Biofactors* 40: 419-24, 2014.
87. Hagele TJ, Mazerik JN, Gregory A, Kaufman B, Magalang U, Kuppusamy ML, Marsh CB, Kuppusamy P, Parinandi NL. Mercury activates vascular endothelial cell phospholipase D through thiols and oxidative stress. *Int J Toxicol* 26: 57-69, 2007.
88. Han S, Huh J, Kim W, Jeong S, Min do S, Jung Y. Phospholipase D activates HIF-1-VEGF pathway via phosphatidic acid. *Exp Mol Med* 46: e126, 2014.
89. Han TS, Lean ME. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *JRSM Cardiovasc Dis* 5: 2048004016633371, 2016.
90. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *Biochem Soc Trans* 29: 345-50, 2001.

91. Hardy G. Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. *Nutrition* 16: 688-9, 2000.
92. Hegde VR, Silver J Fau - Patel MG, Patel Mg Fau - Bryant R, Bryant R Fau - Pai J, Pai J Fau - Das PR, Das Pr Fau - Puar MS, Puar Ms Fau - Cox PA, Cox PA. Phospholipase D inhibitors from a Myrsine species.
93. Henage LG, Exton JH, Brown HA. Kinetic analysis of a mammalian phospholipase D: allosteric modulation by monomeric GTPases, protein kinase C, and polyphosphoinositides. *J Biol Chem* 281: 3408-17, 2006.
94. Henkels KM, Boivin GP, Dudley ES, Berberich SJ, Gomez-Cambronero J. Phospholipase D (PLD) drives cell invasion, tumor growth and metastasis in a human breast cancer xenograph model. *Oncogene* 32: 5551-62, 2013.
95. Henkels KM, Peng HJ, Frondorf K, Gomez-Cambronero J. A comprehensive model that explains the regulation of phospholipase D2 activity by phosphorylation-dephosphorylation. *Mol Cell Biol* 30: 2251-63, 2010.
96. Hewlings SJ, Kalman DS. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. *Foods* 6, 2017.
97. Hodgkin MN, Masson MR, Powner D, Saqib KM, Ponting CP, Wakelam MJ. Phospholipase D regulation and localisation is dependent upon a phosphatidylinositol 4,5-biphosphate-specific PH domain. *Curr Biol* 10: 43-6, 2000.
98. Hold GL, El-Omar EM. Genetic aspects of inflammation and cancer. *Biochem J* 410: 225-35, 2008.
99. Holinstat M, Voss B, Bilodeau ML, Hamm HE. Protease-activated receptors differentially regulate human platelet activation through a phosphatidic acid-dependent pathway. *Mol Pharmacol* 71: 686-94, 2007.
100. Hong KW, Jin HS, Lim JE, Cho YS, Go MJ, Jung J, Lee JE, Choi J, Shin C, Hwang SY, Lee SH, Park HK, Oh B. Non-synonymous single-nucleotide polymorphisms associated with blood pressure and hypertension. *J Hum Hypertens* 24: 763-74, 2010.

101. Horvath PJ, Shuhaiber HH, Fink CS, Awad AB. Type of dietary fiber, not fat, alters phospholipase D and ornithine decarboxylase activities in the rat large intestine. *Nutr Cancer* 27: 143-9, 1997.
102. Hsu YL, Hung JY, Ko YC, Hung CH, Huang MS, Kuo PL. Phospholipase D signaling pathway is involved in lung cancer-derived IL-8 increased osteoclastogenesis. *Carcinogenesis* 31: 587-96, 2010.
103. Huang P, Altshuller YM, Hou JC, Pessin JE, Frohman MA. Insulin-stimulated plasma membrane fusion of Glut4 glucose transporter-containing vesicles is regulated by phospholipase D1. *Mol Biol Cell* 16: 2614-23, 2005.
104. Huang W, He T, Chai C, Yang Y, Zheng Y, Zhou P, Qiao X, Zhang B, Liu Z, Wang J, Shi C, Lei L, Gao K, Li H, Zhong S, Yao L, Huang ME, Lei M. Triptolide inhibits the proliferation of prostate cancer cells and down-regulates SUMO-specific protease 1 expression. *PLoS One* 7: e37693, 2012.
105. Hubbard SR. EGF receptor activation: push comes to shove. *Cell* 125: 1029-31, 2006.
106. Hughes WE, Elgundi Z, Huang P, Frohman MA, Biden TJ. Phospholipase D1 regulates secretagogue-stimulated insulin release in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 279: 27534-41, 2004.
107. Hughes WE, Parker PJ. Endosomal localization of phospholipase D 1a and 1b is defined by the C-termini of the proteins, and is independent of activity. *Biochem J* 356: 727-36, 2001.
108. Hur JH, Park SY, Dall'Armi C, Lee JS, Di Paolo G, Lee HY, Yoon MS, Min DS, Choi CS. Phospholipase D1 deficiency in mice causes nonalcoholic fatty liver disease via an autophagy defect. *Sci Rep* 6: 39170, 2016.
109. Ipsaro JJ, Haase AD, Knott SR, Joshua-Tor L, Hannon GJ. The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. *Nature* 491: 279-83, 2012.
110. Issuree PD, Pushparaj PN, Pervaiz S, Melendez AJ. Resveratrol attenuates C5a-induced inflammatory responses in vitro and in vivo by inhibiting phospholipase D and sphingosine kinase activities. *FASEB J* 23: 2412-24, 2009.
111. Ivanisevic R, Milic M, Ajdic D, Rakonjac J, Savic DJ. Nucleotide sequence, mutational analysis, transcriptional start site, and product analysis of nov, the gene which affects

- Escherichia coli K-12 resistance to the gyrase inhibitor novobiocin. *J Bacteriol* 177: 1766-71, 1995.
112. Iyer SS, Barton JA, Bourgoin S, Kusner DJ. Phospholipases D1 and D2 coordinately regulate macrophage phagocytosis. *J Immunol* 173: 2615-23, 2004.
 113. Jang H, Park K. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr*, 2019.
 114. Jang IH, Lee S, Park JB, Kim JH, Lee CS, Hur EM, Kim IS, Kim KT, Yagisawa H, Suh PG, Ryu SH. The direct interaction of phospholipase C-gamma 1 with phospholipase D2 is important for epidermal growth factor signaling. *J Biol Chem* 278: 18184-90, 2003.
 115. Jang JH, Lee CS, Hwang D, Ryu SH. Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. *Prog Lipid Res* 51: 71-81, 2012.
 116. Jang YH, Ahn BH, Namkoong S, Kim YM, Jin JK, Kim YS, Min do S. Differential regulation of apoptosis by caspase-mediated cleavage of phospholipase D isozymes. *Cell Signal* 20: 2198-207, 2008.
 117. Jang YH, Choi KY, Min DS. Phospholipase D-mediated autophagic regulation is a potential target for cancer therapy. *Cell Death Differ* 21: 533-46, 2014.
 118. Jiang X, Yu J, Wang X, Ge J, Li N. Quercetin improves lipid metabolism via SCAP-SREBP2-LDLr signaling pathway in early stage diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Syndr Obes* 12: 827-839, 2019.
 119. Kalra EK. Nutraceutical--definition and introduction. *AAPS PharmSci* 5: E25, 2003.
 120. Kanaho Y, Kanoh H, Saitoh K, Nozawa Y. Phospholipase D activation by platelet-activating factor, leukotriene B4, and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in rabbit neutrophils. Phospholipase D activation is involved in enzyme release. *J Immunol* 146: 3536-41, 1991.
 121. Kang DW, Choi CY, Cho YH, Tian H, Di Paolo G, Choi KY, Min do S. Targeting phospholipase D1 attenuates intestinal tumorigenesis by controlling beta-catenin signaling in cancer-initiating cells. *J Exp Med* 212: 1219-37, 2015.
 122. Kang DW, Lee JY, Oh DH, Park SY, Woo TM, Kim MK, Park MH, Jang YH, Min do S. Triptolide-induced suppression of phospholipase D expression inhibits proliferation of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Exp Mol Med* 41: 678-85, 2009.

123. Kang DW, Park MK, Oh HJ, Lee DG, Park SH, Choi KY, Cho ML, Min do S. Phospholipase D1 has a pivotal role in interleukin-1beta-driven chronic autoimmune arthritis through regulation of NF-kappaB, hypoxia-inducible factor 1alpha, and FoxO3a. *Mol Cell Biol* 33: 2760-72, 2013.
124. Katayama K, Kodaki T, Nagamachi Y, Yamashita S. Cloning, differential regulation and tissue distribution of alternatively spliced isoforms of ADP-ribosylation-factor-dependent phospholipase D from rat liver. *Biochem J* 329 (Pt 3): 647-52, 1998.
125. Kelsey NA, Wilkins HM, Linseman DA. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules* 15: 7792-814, 2010.
126. Khare S, Bissonnette M, Scaglione-Sewell B, Wali RK, Sitrin MD, Brasitus TA. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and TPA activate phospholipase D in Caco-2 cells: role of PKC-alpha. *Am J Physiol* 276: G993-G1004, 1999.
127. Khosravi-Boroujeni H, Sarrafzadegan N, Mohammadifard N, Sajjadi F, Maghroun M, Asgari S, Rafieian-Kopaei M, Azadbakht L. White rice consumption and CVD risk factors among Iranian population. *J Health Popul Nutr* 31: 252-61, 2013.
128. Kikuchi R, Sobue S, Murakami M, Ito H, Kimura A, Iwasaki T, Shibayama S, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T. Mechanism of vitamin D3-induced transcription of phospholipase D1 in HaCat human keratinocytes. *FEBS Lett* 581: 1800-4, 2007.
129. Kim J, Min G, Bae YS, Min DS. Phospholipase D is involved in oxidative stress-induced migration of vascular smooth muscle cells via tyrosine phosphorylation and protein kinase C. *Exp Mol Med* 36: 103-9, 2004.
130. Kim JH, Kim JH, Ohba M, Suh PG, Ryu SH. Novel functions of the phospholipase D2-Phox homology domain in protein kinase Czeta activation. *Mol Cell Biol* 25: 3194-208, 2005.
131. Kim JH, Kim Y, Lee SD, Lopez I, Arnold RS, Lambeth JD, Suh PG, Ryu SH. Selective activation of phospholipase D2 by unsaturated fatty acid. *FEBS Lett* 454: 42-6, 1999.
132. Kim JH, Lee S, Kim JH, Lee TG, Hirata M, Suh PG, Ryu SH. Phospholipase D2 directly interacts with aldolase via its PH domain. *Biochemistry* 41: 3414-21, 2002.

133. Kim YJ, Jung UJ. Honokiol Improves Insulin Resistance, Hepatic Steatosis, and Inflammation in Type 2 Diabetic db/db Mice. *Int J Mol Sci* 20, 2019.
134. Klier M, Gorressen S, Urbahn MA, Barbosa D, Ouwens M, Fischer JW, Elvers M. Enzymatic Activity Is Not Required for Phospholipase D Mediated TNF-alpha Regulation and Myocardial Healing. *Front Physiol* 9: 1698, 2018.
135. Kodaki T, Yamashita S. Cloning, expression, and characterization of a novel phospholipase D complementary DNA from rat brain. *J Biol Chem* 272: 11408-13, 1997.
136. Kozawa O, Tokuda H, Kaida T, Matsuno H, Uematsu T. Thrombin regulates interleukin-6 synthesis through phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D in osteoblasts. *Arch Biochem Biophys* 345: 10-5, 1997.
137. Kundu A, Ramakrishnan P, Rajendran A, Dharwar NV, Anbarasu A. Analysis of non-synonymous single-nucleotide polymorphisms and population variability of PLD2 gene associated with hypertension. *Int J Bioinform Res Appl* 9: 227-41, 2013.
138. LaLonde M, Janssens H, Yun S, Crosby J, Redina O, Olive V, Altshuller YM, Choi SY, Du G, Gergen JP, Frohman MA. A role for Phospholipase D in Drosophila embryonic cellularization. *BMC Dev Biol* 6: 60, 2006.
139. Lee CS, Kim IS, Park JB, Lee MN, Lee HY, Suh PG, Ryu SH. The phox homology domain of phospholipase D activates dynamin GTPase activity and accelerates EGFR endocytosis. *Nat Cell Biol* 8: 477-84, 2006.
140. Lee HY, Park JB, Jang IH, Chae YC, Kim JH, Kim IS, Suh PG, Ryu SH. Munc-18-1 inhibits phospholipase D activity by direct interaction in an epidermal growth factor-reversible manner. *J Biol Chem* 279: 16339-48, 2004.
141. Lee JH, Kim YM, Kim NW, Kim JW, Her E, Kim BK, Kim JH, Ryu SH, Park JW, Seo DW, Han JW, Beaven MA, Choi WS. Phospholipase D2 acts as an essential adaptor protein in the activation of Syk in antigen-stimulated mast cells. *Blood* 108: 956-64, 2006.
142. Lee S, Kim JH, Lee CS, Kim JH, Kim Y, Heo K, Ihara Y, Goshima Y, Suh PG, Ryu SH. Collapsin response mediator protein-2 inhibits neuronal phospholipase D(2) activity by direct interaction. *J Biol Chem* 277: 6542-9, 2002.

143. Leitges M, Plomann M, Standaert ML, Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y, Farese RV. Knockout of PKC alpha enhances insulin signaling through PI3K. *Mol Endocrinol* 16: 847-58, 2002.
144. Lentschat A, Karahashi H, Michelsen KS, Thomas LS, Zhang W, Vogel SN, Arditi M. Mastoparan, a G protein agonist peptide, differentially modulates TLR4- and TLR2-mediated signaling in human endothelial cells and murine macrophages. *J Immunol* 174: 4252-61, 2005.
145. Lim HK, Choi YA, Park W, Lee T, Ryu SH, Kim SY, Kim JR, Kim JH, Baek SH. Phosphatidic acid regulates systemic inflammatory responses by modulating the Akt-mammalian target of rapamycin-p70 S6 kinase 1 pathway. *J Biol Chem* 278: 45117-27, 2003.
146. Lisovitch M, Czarny M, Fiucci G, Tang X. Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J* 345 Pt 3: 401-15, 2000.
147. Liu Y, Kach A, Ziegler U, Ong AC, Wallace DP, Arcaro A, Serra AL. The role of phospholipase D in modulating the MTOR signaling pathway in polycystic kidney disease. *PLoS One* 8: e73173, 2013.
148. Lopez I, Arnold RS, Lambeth JD. Cloning and initial characterization of a human phospholipase D2 (hPLD2). ADP-ribosylation factor regulates hPLD2. *J Biol Chem* 273: 12846-52, 1998.
149. Lu WJ, Chung CL, Chen RJ, Huang LT, Lien LM, Chang CC, Lin KH, Sheu JR. An Antithrombotic Strategy by Targeting Phospholipase D in Human Platelets. *J Clin Med* 7, 2018.
150. Ma R, Liu L, Liu X, Wang Y, Jiang W, Xu L. Triptolide markedly attenuates albuminuria and podocyte injury in an animal model of diabetic nephropathy. *Exp Ther Med* 6: 649-656, 2013.
151. Ma WN, Park SY, Han JS. Role of phospholipase D1 in glucose-induced insulin secretion in pancreatic Beta cells. *Exp Mol Med* 42: 456-64, 2010.
152. Mahankali M, Henkels KM, Gomez-Cambronero J. A GEF-to-phospholipase molecular switch caused by phosphatidic acid, Rac and JAK tyrosine kinase that explains leukocyte cell migration. *J Cell Sci* 126: 1416-28, 2013.

153. Marchesan D, Rutberg M, Andersson L, Asp L, Larsson T, Boren J, Johansson BR, Olofsson SO. A phospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiation-related protein, and vimentin in a cell-free system. *J Biol Chem* 278: 27293-300, 2003.
154. Marouf BH, Hussain SA, Ali ZS, Ahmmad RS. Resveratrol Supplementation Reduces Pain and Inflammation in Knee Osteoarthritis Patients Treated with Meloxicam: A Randomized Placebo-Controlled Study. *J Med Food*, 2018.
155. Martelli AM, Bortul R, Bareggi R, Tabellini G, Grill V, Baldini G, Narducci P. The pro-apoptotic drug camptothecin stimulates phospholipase D activity and diacylglycerol production in the nucleus of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Res* 59: 3961-7, 1999.
156. Mateos MV, Giusto NM, Salvador GA. Distinctive roles of PLD signaling elicited by oxidative stress in synaptic endings from adult and aged rats. *Biochim Biophys Acta* 1823: 2136-48, 2012.
157. Mateos MV, Kamerbeek CB, Giusto NM, Salvador GA. The phospholipase D pathway mediates the inflammatory response of the retinal pigment epithelium. *Int J Biochem Cell Biol* 55: 119-28, 2014.
158. McGraw AP, Bagley J, Chen WS, Galayda C, Nickerson H, Armani A, Caprio M, Carmeliet P, Jaffe IZ. Aldosterone increases early atherosclerosis and promotes plaque inflammation through a placental growth factor-dependent mechanism. *J Am Heart Assoc* 2: e000018, 2013.
159. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 343: 338-44, 2000.
160. Meng C, Zhu H, Song H, Wang Z, Huang G, Li D, Ma Z, Ma J, Qin Q, Sun X, Ma J. Targets and molecular mechanisms of triptolide in cancer therapy. *Chin J Cancer Res* 26: 622-6, 2014.
161. Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595: 105-25, 2007.
162. Min DS, Kim EG, Exton JH. Involvement of tyrosine phosphorylation and protein kinase C in the activation of phospholipase D by H₂O₂ in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 273: 29986-94, 1998.

163. Mollinedo F, Gajate C, Flores I. Involvement of phospholipase D in the activation of transcription factor AP-1 in human T lymphoid Jurkat cells. *J Immunol* 153: 2457-69, 1994.
164. Monovich L, Mugrage B, Quadros E, Toscano K, Tommasi R, LaVoie S, Liu E, Du Z, LaSala D, Boyar W, Steed P. Optimization of halopemide for phospholipase D2 inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 2310-1, 2007.
165. Morris AJ. Phospholipases D: making sense of redundancy and duplication. *Biosci Rep* 39, 2019.
166. Morris AJ, Engebrecht J, Frohman MA. Structure and regulation of phospholipase D. *Trends Pharmacol Sci* 17: 182-5, 1996.
167. Nakanishi H, Morishita M, Schwartz CL, Coluccio A, Engebrecht J, Neiman AM. Phospholipase D and the SNARE Sso1p are necessary for vesicle fusion during sporulation in yeast. *J Cell Sci* 119: 1406-15, 2006.
168. Nasri H, Baradaran A, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M. New concepts in nutraceuticals as alternative for pharmaceuticals. *Int J Prev Med* 5: 1487-99, 2014.
169. Natarajan V, Scribner WM, Taher MM. 4-Hydroxynonenal, a metabolite of lipid peroxidation, activates phospholipase D in vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 15: 365-75, 1993.
170. Natarajan V, Taher MM, Roehm B, Parinandi NL, Schmid HH, Kiss Z, Garcia JG. Activation of endothelial cell phospholipase D by hydrogen peroxide and fatty acid hydroperoxide. *J Biol Chem* 268: 930-7, 1993.
171. Noble AR, Maitland NJ, Berney DM, Rumsby MG. Phospholipase D inhibitors reduce human prostate cancer cell proliferation and colony formation. *Br J Cancer* 118: 189-199, 2018.
172. O'Reilly MC, Scott SA, Brown KA, Oguin TH, 3rd, Thomas PG, Daniels JS, Morrison R, Brown HA, Lindsley CW. Development of dual PLD1/2 and PLD2 selective inhibitors from a common 1,3,8-Triazaspiro[4.5]decane Core: discovery of MI298 and MI299 that decrease invasive migration in U87-MG glioblastoma cells. *J Med Chem* 56: 2695-9, 2013.

173. Oguin TH, 3rd, Sharma S, Stuart AD, Duan S, Scott SA, Jones CK, Daniels JS, Lindsley CW, Thomas PG, Brown HA. Phospholipase D facilitates efficient entry of influenza virus, allowing escape from innate immune inhibition. *J Biol Chem* 289: 25405-17, 2014.
174. Oh CH, Park SY, Han JS. Phospholipase D1 is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α expression and production through S6K1/JNK/c-Jun pathway in Raw 264.7 cells. *Cytokine* 66: 69-77, 2014.
175. Oliveira TG, Chan RB, Tian H, Laredo M, Shui G, Staniszewski A, Zhang H, Wang L, Kim TW, Duff KE, Wenk MR, Arancio O, Di Paolo G. Phospholipase d2 ablation ameliorates Alzheimer's disease-linked synaptic dysfunction and cognitive deficits. *J Neurosci* 30: 16419-28, 2010.
176. Oliveira TG, Di Paolo G. Phospholipase D in brain function and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1801: 799-805, 2010.
177. Osisami M, Ali W, Frohman MA. A role for phospholipase D3 in myotube formation. *PLoS One* 7: e33341, 2012.
178. Otani Y, Yamaguchi Y, Sato Y, Furuichi T, Ikenaka K, Kitani H, Baba H. PLD δ is involved in phagocytosis of microglia: expression and localization changes of PLD4 are correlated with activation state of microglia. *PLoS One* 6: e27544, 2011.
179. Oude Weernink PA, Lopez de Jesus M, Schmidt M. Phospholipase D signaling: orchestration by PIP2 and small GTPases. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 374: 399-411, 2007.
180. Padival AK, Hawkins KS, Huang C. High glucose-induced membrane translocation of PKC β 1 is associated with Arf6 in glomerular mesangial cells. *Mol Cell Biochem* 258: 129-35, 2004.
181. Panda A, Thakur R, Krishnan H, Naik A, Shinde D, Raghu P. Functional analysis of mammalian phospholipase D enzymes. *Biosci Rep* 38, 2018.
182. Parinandi NL, Scribner WM, Vepa S, Shi S, Natarajan V. Phospholipase D activation in endothelial cells is redox sensitive. *Antioxid Redox Signal* 1: 193-210, 1999.

183. Park MH, Ahn BH, Hong YK, Min do S. Overexpression of phospholipase D enhances matrix metalloproteinase-2 expression and glioma cell invasion via protein kinase C and protein kinase A/NF-kappaB/Sp1-mediated signaling pathways. *Carcinogenesis* 30: 356-65, 2009.
184. Park MH, Min do S. Quercetin-induced downregulation of phospholipase D1 inhibits proliferation and invasion in U87 glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 412: 710-5, 2011.
185. Parsaei P, Karimi M, Asadi SY, Rafieian-Kopaei M. Bioactive components and preventive effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract on post-laparotomy intra-abdominal adhesion in rats. *Int J Surg* 11: 811-5, 2013.
186. Patel RB, Kotha SR, Sherwani SI, Sliman SM, Gurney TO, Loar B, Butler SO, Morris AJ, Marsh CB, Parinandi NL. Pulmonary fibrosis inducer, bleomycin, causes redox-sensitive activation of phospholipase D and cytotoxicity through formation of bioactive lipid signal mediator, phosphatidic acid, in lung microvascular endothelial cells. *Int J Toxicol* 30: 69-90, 2011.
187. Pathre P, Shome K, Blumental-Perry A, Bielli A, Haney CJ, Alber S, Watkins SC, Romero G, Aridor M. Activation of phospholipase D by the small GTPase Sar1p is required to support COPII assembly and ER export. *EMBO J* 22: 4059-69, 2003.
188. Peltz A, Sherwani SI, Kotha SR, Mazerik JN, O'Connor Butler ES, Kuppusamy ML, Hagele T, Magalang UJ, Kuppusamy P, Marsh CB, Parinandi NL. Calcium and calmodulin regulate mercury-induced phospholipase D activation in vascular endothelial cells. *Int J Toxicol* 28: 190-206, 2009.
189. Peng X, Frohman MA. Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles. *Acta Physiol (Oxf)* 204: 219-26, 2012.
190. Pimenta E, Gordon RD, Stowasser M. Salt, aldosterone and hypertension. *J Hum Hypertens* 27: 1-6, 2013.
191. Pinheiro DML, de Oliveira AHS, Coutinho LG, Fontes FL, de Medeiros Oliveira RK, Oliveira TT, Faustino ALF, Lira da Silva V, de Melo Campos JTA, Lajus TBP, de Souza SJ, Agnez-Lima LF. Resveratrol decreases the expression of genes involved in inflammation through transcriptional regulation. *Free Radic Biol Med* 130: 8-22, 2019.

192. Plo I, Lautier D, Levade T, Sekouri H, Jaffrezou JP, Laurent G, Bettaieb A. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and phospholipase D are respectively implicated in mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB activation in tumour-necrosis-factor-alpha-treated immature acute-myeloid-leukaemia cells. *Biochem J* 351 Pt 2: 459-67, 2000.
193. Pohlman RF, Liu F, Wang L, More MI, Winans SC. Genetic and biochemical analysis of an endonuclease encoded by the IncN plasmid pKM101. *Nucleic Acids Res* 21: 4867-72, 1993.
194. Ponting CP, Kerr ID. A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Sci* 5: 914-22, 1996.
195. Preininger AM, Henage LG, Oldham WM, Yoon EJ, Hamm HE, Brown HA. Direct modulation of phospholipase D activity by Gbetagamma. *Mol Pharmacol* 70: 311-8, 2006.
196. Qin H, Frohman MA, Bollag WB. Phospholipase D2 mediates acute aldosterone secretion in response to angiotensin II in adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 151: 2162-70, 2010.
197. Qin S, Huang L, Gong J, Shen S, Huang J, Ren H, Hu H. Efficacy and safety of turmeric and curcumin in lowering blood lipid levels in patients with cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr J* 16: 68, 2017.
198. Raben DM, Barber CN. Phosphatidic acid and neurotransmission. *Adv Biol Regul* 63: 15-21, 2017.
199. Ramirez-Garza SL, Laveriano-Santos EP, Marhuenda-Munoz M, Storniolo CE, Tresserra-Rimbau A, Vallverdu-Queralt A, Lamuela-Raventos RM. Health Effects of Resveratrol: Results from Human Intervention Trials. *Nutrients* 10, 2018.
200. Raphael W, Sordillo LM. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammation: the role of phospholipid biosynthesis. *Int J Mol Sci* 14: 21167-88, 2013.
201. Rasmussen H, Isales CM, Calle R, Throckmorton D, Anderson M, Gasalla-Herraiz J, McCarthy R. Diacylglycerol production, Ca²⁺ influx, and protein kinase C activation in sustained cellular responses. *Endocr Rev* 16: 649-81, 1995.

202. Redina OE, Frohman MA. Genomic analysis of murine phospholipase D1 and comparison to phospholipase D2 reveals an unusual difference in gene size. *Gene* 222: 53-60, 1998.
203. Regier DS, Greene DG, Sergeant S, Jesaitis AJ, McPhail LC. Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. Correlation of NADPH oxidase activity and p22phox phosphorylation. *J Biol Chem* 275: 28406-12, 2000.
204. Rehman K, Akash MSH. Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked? *J Cell Biochem* 118: 3577-3585, 2017.
205. Ren H, Federico L, Huang H, Sunkara M, Drennan T, Frohman MA, Smyth SS, Morris AJ. A phosphatidic acid binding/nuclear localization motif determines lipin1 function in lipid metabolism and adipogenesis. *Mol Biol Cell* 21: 3171-81, 2010.
206. Riemer J, Bulleid N, Herrmann JM. Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process. *Science* 324: 1284-7, 2009.
207. Riese DJ, 2nd, Gallo RM, Settleman J. Mutational activation of ErbB family receptor tyrosine kinases: insights into mechanisms of signal transduction and tumorigenesis. *Bioessays* 29: 558-65, 2007.
208. Ronis MJJ, Pedersen KB, Watt J. Adverse Effects of Nutraceuticals and Dietary Supplements. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 58: 583-601, 2018.
209. Rossi F, Grzeskowiak M, Della Bianca V, Calzetti F, Gandini G. Phosphatidic acid and not diacylglycerol generated by phospholipase D is functionally linked to the activation of the NADPH oxidase by FMLP in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 320-7, 1990.
210. Roth E, Frohman MA. Proliferative and metastatic roles for Phospholipase D in mouse models of cancer. *Adv Biol Regul* 67: 134-140, 2018.
211. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest* 126: 12-22, 2016.
212. Santini A, Novellino E. Nutraceuticals - shedding light on the grey area between pharmaceuticals and food. *Expert Rev Clin Pharmacol* 11: 545-547, 2018.

213. Schonberger T, Jurgens T, Muller J, Armbruster N, Niermann C, Gorressen S, Sommer J, Tian H, di Paolo G, Scheller J, Fischer JW, Gawaz M, Elvers M. Pivotal role of phospholipase D1 in tumor necrosis factor-alpha-mediated inflammation and scar formation after myocardial ischemia and reperfusion in mice. *Am J Pathol* 184: 2450-64, 2014.
214. Sciorra VA, Rudge SA, Wang J, McLaughlin S, Engebrecht J, Morris AJ. Dual role for phosphoinositides in regulation of yeast and mammalian phospholipase D enzymes. *J Cell Biol* 159: 1039-49, 2002.
215. Scott SA, Selvy PE, Buck JR, Cho HP, Criswell TL, Thomas AL, Armstrong MD, Arteaga CL, Lindsley CW, Brown HA. Design of isoform-selective phospholipase D inhibitors that modulate cancer cell invasiveness. *Nat Chem Biol* 5: 108-17, 2009.
216. Selvy PE, Lavieri RR, Lindsley CW, Brown HA. Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem Rev* 111: 6064-119, 2011.
217. Seo HY, Jang BK, Jung YA, Lee EJ, Kim HS, Jeon JH, Kim JG, Lee IK, Kim MK, Park KG. Phospholipase D1 decreases type I collagen levels in hepatic stellate cells via induction of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun* 449: 38-43, 2014.
218. Sergeant S, Waite KA, Heravi J, McPhail LC. Phosphatidic acid regulates tyrosine phosphorylating activity in human neutrophils: enhancement of Fgr activity. *J Biol Chem* 276: 4737-46, 2001.
219. Sethu S, Pushparaj PN, Melendez AJ. Phospholipase D1 mediates TNFalpha-induced inflammation in a murine model of TNFalpha-induced peritonitis. *PLoS One* 5: e10506, 2010.
220. Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20: 2390-400, 2001.
221. Sherwani SI, Pabon S, Patel RB, Sayyid MM, Hagele T, Kotha SR, Magalang UJ, Maddipati KR, Parinandi NL. Eicosanoid signaling and vascular dysfunction: methylmercury-induced phospholipase D activation in vascular endothelial cells. *Cell Biochem Biophys* 67: 317-29, 2013.
222. Shi M, Zheng Y, Garcia A, Xu L, Foster DA. Phospholipase D provides a survival signal in human cancer cells with activated H-Ras or K-Ras. *Cancer Lett* 258: 268-75, 2007.

223. Shirzad H, Burton RC, Smart YC, Rafieian-kopaei M, Shirzad M. Natural cytotoxicity of NC-2+ cells against the growth and metastasis of WEHI-164 fibrosarcoma. *Scand J Immunol* 73: 85-90, 2011.
224. Sidarala V, Kowluru A. The Regulatory Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathways in Health and Diabetes: Lessons Learned from the Pancreatic beta-Cell. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 10: 76-84, 2017.
225. Siddhanta A, Shields D. Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. *J Biol Chem* 273: 17995-8, 1998.
226. Siddiqi AR, Srajer GE, Leslie CC. Regulation of human PLD1 and PLD2 by calcium and protein kinase C. *Biochim Biophys Acta* 1497: 103-14, 2000.
227. Skafi N, Abdallah D, Soulage C, Reibel S, Vitale N, Hamade E, Faour W, Magne D, Badran B, Hussein N, Buchet R, Brizuela L, Mebarek S. Phospholipase D: A new mediator during high phosphate-induced vascular calcification associated with chronic kidney disease. *J Cell Physiol* 234: 4825-4839, 2019.
228. Song HI, Yoon MS. PLD1 regulates adipogenic differentiation through mTOR - IRS-1 phosphorylation at serine 636/639. *Sci Rep* 6: 36968, 2016.
229. Soory M. Nutritional antioxidants and their applications in cardiometabolic diseases. *Infect Disord Drug Targets* 12: 388-401, 2012.
230. Stace CL, Ktistakis NT. Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1761: 913-26, 2006.
231. Stegner D, Thielmann I, Kraft P, Frohman MA, Stoll G, Nieswandt B. Pharmacological inhibition of phospholipase D protects mice from occlusive thrombus formation and ischemic stroke--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 2212-7, 2013.
232. Steinhour E, Sherwani SI, Mazerik JN, Ciapala V, O'Connor Butler E, Cruff JP, Magalang U, Parthasarathy S, Sen CK, Marsh CB, Kuppusamy P, Parinandi NL. Redox-active antioxidant modulation of lipid signaling in vascular endothelial cells: vitamin C induces activation of phospholipase D through phospholipase A2, lipoxygenase, and cyclooxygenase. *Mol Cell Biochem* 315: 97-112, 2008.

233. Stuckey JA, Dixon JE. Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nat Struct Biol* 6: 278-84, 1999.
234. Sun J, Fu X, Liu Y, Wang Y, Huo B, Guo Y, Gao X, Li W, Hu X. Hypoglycemic effect and mechanism of honokiol on type 2 diabetic mice. *Drug Des Devel Ther* 9: 6327-42, 2015.
235. Sung TC, Zhang Y, Morris AJ, Frohman MA. Structural analysis of human phospholipase D1. *J Biol Chem* 274: 3659-66, 1999.
236. Tang BL, Wang Y, Ong YS, Hong W. COPII and exit from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1744: 293-303, 2005.
237. Taylor HE, Simmons GE, Jr., Mathews TP, Khatua AK, Popik W, Lindsley CW, D'Aquila RT, Brown HA. Phospholipase D1 Couples CD4+ T Cell Activation to c-Myc-Dependent Deoxyribonucleotide Pool Expansion and HIV-1 Replication. *PLoS Pathog* 11: e1004864, 2015.
238. Thielmann I, Stegner D, Kraft P, Hagedorn I, Krohne G, Kleinschnitz C, Stoll G, Nieswandt B. Redundant functions of phospholipases D1 and D2 in platelet alpha-granule release. *J Thromb Haemost* 10: 2361-72, 2012.
239. Tiganis T. Reactive oxygen species and insulin resistance: the good, the bad and the ugly. *Trends Pharmacol Sci* 32: 82-9, 2011.
240. Toschi A, Lee E, Xu L, Garcia A, Gadir N, Foster DA. Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. *Mol Cell Biol* 29: 1411-20, 2009.
241. Tou J, Urbizo C. Resveratrol inhibits the formation of phosphatidic acid and diglyceride in chemotactic peptide- or phorbol ester-stimulated human neutrophils. *Cell Signal* 13: 191-7, 2001.
242. Touyz RM, Schiffrin EL. Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 34: 976-82, 1999.
243. Trujillo Viera J, El-Merahbi R, Nieswandt B, Stegner D, Sumara G. Phospholipases D1 and D2 Suppress Appetite and Protect against Overweight. *PLoS One* 11: e0157607, 2016.

244. Tsai YY, Rainey WE, Pan ZQ, Frohman MA, Choudhary V, Bollag WB. Phospholipase D activity underlies very-low-density lipoprotein (VLDL)-induced aldosterone production in adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 155: 3550-60, 2014.
245. Varadharaj S, Steinhour E, Hunter MG, Watkins T, Baran CP, Magalang U, Kuppusamy P, Zweier JL, Marsh CB, Natarajan V, Parinandi NL. Vitamin C-induced activation of phospholipase D in lung microvascular endothelial cells: regulation by MAP kinases. *Cell Signal* 18: 1396-407, 2006.
246. Varghese E, Samuel SM, Varghese S, Cheema S, Mamtani R, Busselberg D. Triptolide Decreases Cell Proliferation and Induces Cell Death in Triple Negative MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Biomolecules* 8, 2018.
247. Vigliotta G, Miele C, Santopietro S, Portella G, Perfetti A, Maitan MA, Cassese A, Oriente F, Trecia A, Fiory F, Romano C, Tiveron C, Tatangelo L, Troncone G, Formisano P, Beguinot F. Overexpression of the ped/pea-15 gene causes diabetes by impairing glucose-stimulated insulin secretion in addition to insulin action. *Mol Cell Biol* 24: 5005-15, 2004.
248. Viparelli F, Cassese A, Doti N, Paturzo F, Marasco D, Dathan NA, Monti SM, Basile G, Ungaro P, Sabatella M, Miele C, Teperino R, Consiglio E, Pedone C, Beguinot F, Formisano P, Ruvo M. Targeting of PED/PEA-15 molecular interaction with phospholipase D1 enhances insulin sensitivity in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 283: 21769-78, 2008.
249. Waite KA, Wallin R, Qualliotine-Mann D, McPhail LC. Phosphatidic acid-mediated phosphorylation of the NADPH oxidase component p47-phox. Evidence that phosphatidic acid may activate a novel protein kinase. *J Biol Chem* 272: 15569-78, 1997.
250. Wang X, Dyer JH, Zheng L. Purification and immunological analysis of phospholipase D from castor bean endosperm. *Arch Biochem Biophys* 306: 486-94, 1993.
251. Wang X, Xu L, Zheng L. Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L. *J Biol Chem* 269: 20312-7, 1994.
252. Wang X, Zhang L, Duan W, Liu B, Gong P, Ding Y, Wu X. Anti-inflammatory effects of triptolide by inhibiting the NF-kappaB signaling pathway in LPS-induced acute lung injury in a murine model. *Mol Med Rep* 10: 447-52, 2014.

253. Watson F, Lowe GM, Robinson JJ, Galvani DW, Edwards SW. Phospholipase D-dependent and -independent activation of the neutrophil NADPH oxidase. *Biosci Rep* 14: 91-102, 1994.
254. Wiczner BM, Thomas G. Phospholipase D and mTORC1: nutrients are what bring them together. *Sci Signal* 5: pe13, 2012.
255. Wiggins D, Gibbons GF. Origin of hepatic very-low-density lipoprotein triacylglycerol: the contribution of cellular phospholipid. *Biochem J* 320 (Pt 2): 673-9, 1996.
256. Wilderman PJ, Vasil AI, Johnson Z, Vasil ML. Genetic and biochemical analyses of a eukaryotic-like phospholipase D of *Pseudomonas aeruginosa* suggest horizontal acquisition and a role for persistence in a chronic pulmonary infection model. *Mol Microbiol* 39: 291-303, 2001.
257. Xie Z, Ho WT, Exton JH. Association of N- and C-terminal domains of phospholipase D is required for catalytic activity. *J Biol Chem* 273: 34679-82, 1998.
258. Xu L, Salloum D, Medlin PS, Saqcena M, Yellen P, Perrella B, Foster DA. Phospholipase D mediates nutrient input to mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem* 286: 25477-86, 2011.
259. Yamamoto H, Hanada K, Kawasaki K, Nishijima M. Inhibitory effect on curcumin on mammalian phospholipase D activity. *FEBS Lett* 417: 196-8, 1997.
260. Yao Y, Wang W, Li M, Ren H, Chen C, Wang J, Wang WE, Yang J, Zeng C. Curcumin Exerts its Anti-hypertensive Effect by Down-regulating the AT1 Receptor in Vascular Smooth Muscle Cells. *Sci Rep* 6: 25579, 2016.
261. Yoshikawa F, Banno Y, Otani Y, Yamaguchi Y, Nagakura-Takagi Y, Morita N, Sato Y, Saruta C, Nishibe H, Sadakata T, Shinoda Y, Hayashi K, Mishima Y, Baba H, Furuichi T. Phospholipase D family member 4, a transmembrane glycoprotein with no phospholipase D activity, expression in spleen and early postnatal microglia. *PLoS One* 5: e13932, 2010.
262. Zeisel SH. Regulation of "nutraceuticals". *Science* 285: 1853-5, 1999.
263. Zhang C, Hwang G, Cooper DE, Grevenko TJ, Eaton JM, Natarajan V, Harris TE, Coleman RA. Inhibited insulin signaling in mouse hepatocytes is associated with increased phosphatidic acid but not diacylglycerol. *J Biol Chem* 290: 3519-28, 2015.

264. Zhang Y, Redina O, Altshuller YM, Yamazaki M, Ramos J, Chneiweiss H, Kanaho Y, Frohman MA. Regulation of expression of phospholipase D1 and D2 by PEA-15, a novel protein that interacts with them. *J Biol Chem* 275: 35224-32, 2000.
265. Zhou G, Yu L, Yang W, Wu W, Fang L, Liu Z. Blockade of PLD2 Ameliorates Intestinal Mucosal Inflammation of Inflammatory Bowel Disease. *Mediators Inflamm* 2016: 2543070, 2016.
266. Zhou Y, Hong Y, Huang H. Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous Glomerulo-Nephritis Rat via Downregulation of NF-kappaB Signaling Pathway. *Kidney Blood Press Res* 41: 901-910, 2016.
267. Zhu M, Foreman DP, O'Brien SA, Jin Y, Zhang W. Phospholipase D in TCR-Mediated Signaling and T Cell Activation. *J Immunol* 200: 2165-2173, 2018.
268. Zhu X, Liu R, Kuang D, Liu J, Shi X, Zhang T, Zeng Y, Sun X, Zhang Y, Yang W. The role of phospholipase D1 in liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine in vivo. *Dig Dis Sci* 59: 1779-88, 2014.
269. Zouwail S, Pettitt TR, Dove SK, Chibalina MV, Powner DJ, Haynes L, Wakelam MJ, Insall RH. Phospholipase D activity is essential for actin localization and actin-based motility in Dictyostelium. *Biochem J* 389: 207-14, 2005.

5.1.2 TABLES

Table 1. Roles of PLD1 and PLD2 in the progression of several diseases

Disease	Model	Isoform	Dose of inhibitors	Duration	General effects	Outcomes	Ref
Arthritis	IL-1Ra ^{-/-} mice	PLD1	VU015506:10 mg/kg	4 weeks	↓Autoimmune arthritis	↓IL-1β activity ↓NF-κB and HIF-1α	(123)
Alzheimer	PC12 expressing PLD2 PLD2 ^{-/-} swAPP mice	PLD2	N.A.	N.A.	↑Dysfunctions and deficits in Alzheimer's disease	↑Synaptotoxic action of amyloid β-peptide ↓Memory deficits ↑Synaptic protection	(175)
	PS1-FAD overexpressing PLD1	PLD1	N.A.	N.A.	↓Development of Alzheimer's disease	↑Budding of Amyloid β-precursor protein-containing vesicles ↑Surface delivery	(30)
	PS1 and PS1 ^{-/-} cells	PLD1/2	0,3% 1-butanol	15–90mins		↓Amyloid β-precursor protein	

Cancer	Human glioma cells U87 overexpressing PLD1 or PLD2	PLD1/2	N.A.	N.A.	↑Tumour invasion	cells	↑MMP-2	(183)
	C57BL6	PLD1/2	FIPI: Twice daily (1 mg/kg first and second 3 mg/kg)	10 days	↓Cancer metastasis	and	↓Microvessels tumour	in (36)
	PLD1 ^{-/-} mice	PLD1	N.A.	N.A.			↓Akt activation ↓Tumour angiogenesis ↓Migration ↓Adhesion ↓Tumour cell platelet interactions by impaired allbb3 integrin	

Cancer	PLD2 ^{-/-} mouse endothelial cells	lung	PLD2	N.A.	N.A.	↓Angiogenesis, tumour growth ↓Vascular regeneration ↓Tumour growth ↓HIF-1α genes ↓VEGF-A, PFKFB3, NTRK2, HMOX1, and NOX2 genes	(78)
	Human glioma U87 cells transfected with PLD1/2		PLD1/2	N.A.	N.A.	↑Cell proliferation and survival ↑HIF-1a ↑Secretion of VEGF	(88)
Cardiovascular events	PLD1 ^{-/-} mice		PLD1	N.A.	N.A.	↓Thrombus formation ↓Arterial thrombosis and ↓Shear dependent αIIbβ3 integrin ↓Platelet aggregation formation	(59)

				ischemic brain infarction		
PLD1 ^{-/-} mice	PLD1	N.A.	N.A.	↑Protection of arterial thrombosis	of ↓Reduction of α-granule release	(238)
C57BL6	PLD1/2	FIPI: 3 mg/kg or 6 mg/kg	13 h/1h, or 8 h after reperfusion	↓Thrombotic events	↓α-granule release ↓Integrin activation ↓Thrombus formation ↓Infarct sizes	(231)
PLD1/2 ^{-/-} mice	PLD1/2	N.A.	N.A.		↓Alpha-granule release ↓Integrin activation ↓Thrombus formation	

Cardiovascular events	PLD1 ^{-/-} mice	PLD1	N.A.	N.A.	↑Cardiac function after ischemia	↓Cell adhesion ↓Migration of inflammatory cells ↓TNF-α Impair NF-κβ expression Il-1 releases	(213)
Fibrosis	Hepatic stellate cells overexpressing PLD1	PLD1	N.A.	N.A.	↓Type 1 collagen level	↑Autophagy ↓p62 ↑LC3	(217)

	Wistar rats	PLD1/2	<i>N</i> -methylethanolamine: 200 mg/kg	28 days		↓TIMP1 ↓Progression of liver fibrosis	↓COL1A1 ↑MMPs	(268)
HIV-1	Quiescent CD4 ⁺ T cells	PLD1	VU0359595:10 or 5 μm	24h/48h	↓HIV-1 infection	↓C-Myc		(237)
Immunity	PLD1 ^{-/-} and macrophages	PLD2 ^{-/-} mice PLD1 and PLD2	N.A.	N.A.	↓Immunity	↓Macrophage integrity phagocytosis ↓Neutrophil migration and extravasation ↓Macrophage transmigration	(3)	

Inflammatory bowel disease	C57BL/6	PLD2	CAY10594: 4 mg/kg	10 days	↓Intestinal mucosal inflammation	↑Neutrophil recruitment by CXCR2	(266)
Influenza	A549 cells	PLD2	VU0364739: 10 μM	1h	Influenza stimulates and PLD co-locates with influenza	↑Viral entry ↓Viral titers ↓RIG-1, IRF3 and MxA	(173)
Peritonitis	siRNA-PLD1 of BALB/c mice	PLD1	N.A.	N.A.	↑Inflammation of the peritoneum	↑Protection against TNF-α induction	(219)

						↓IL-6, MIP-1α and MIP-1β	
						↓Vascular permeability and neutrophil/monocytes influx	
Polycystic kidney disease	Polycystic kidney disease cells	PLD1	PLD1 inhibitor: 0, 10 and 20 μM	48h	↓Polycystic kidney disease progression	↓Cell proliferation ↓mTOR signaling ↑Autophagy	(147)
		PLD2	PLD2 inhibitor: 0, 10 and 20 μM (Inhibitor name not indicated)	48h		↓Cell proliferation ↓mTOR signaling ↑Autophagy	

Ulcerative colitis	PLD2 IEC KO mice	PLD2	N.A.	10 days	↑Protection against the development of colitis	↑Phosphorylation of occludin ↑Proteosomal degradation by the c-Src pathway
	C57BL6	PLD2	10 mg/kg VU0364739			

COLIA1: Collagen type I alpha1; CXCR2: C-X-C Motif Chemokine Receptor 2; DSS: Dextran Sodium Sulfate; HIF-1 α : *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*; HMOX1: Heme oxygenase (decycling) 1; HIV-1: Human immunodeficiency virus 1; IL-1: *Interleukin-1*; IRF3: *Interferon regulatory factor 3*; MIP: Macrophage Inflammatory Proteins; MMP: *Matrix metalloproteinase*; mTOR: *mammalian target of rapamycin*; NF- κ B: Nuclear factor-kappa B; N.A: Not Applicable; NOX2: NADPH oxidase 2; NTRK2: Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 2; PFKFB3: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3; PLD: Phospholipase D; PS: Presenilin; RIG-1: Retinoic acid-inducible gene-1; TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*; VEGF: Vascular endothelial growth factor; ↑: Increase; ↓: Decrease

Table 2. Molecules involved in phospholipase D inhibition

Inhibitors	Isoform	<i>In vitro or In vivo/studies</i>	Dose or IC50	Molecular interaction or mechanism	Ref
Indirect inhibitors					
Resveratrol	NS	<i>In vivo</i> : Human neutrophils	50µM	No data	(241)
Fungal metabolites	NS	<i>In vivo</i> : HL-60 cells	IC50 11 µM	No data	(39,40)
SCH49211			12 µM		
SCH49212			24 µM		
SCH53823			19 µM		
SCH53825					
Leaves extracts	NS	<i>In vivo</i> : HL-60 cells	IC50: 3 µM	No data	(92)
Saponin 1			2 µM		

Saponin 2

Anti-tumour drugs	NS	<i>In vitro</i> : Rat brain PLD	IC50: 15 μ M	No data	(81)
Suramin			820 μ M		
Xanthogenate			78 μ M		
U-73					
Primary alcohols	NS	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	N.A.	Trans esterification	(216)

Direct and not specific inhibitors

AEBSF	NS	<i>In vitro</i> : Purified plant PLD	IC50: 75 μ M	No data	(8)
Raloxifen	PLD1	<i>In vivo</i> : MCF-12A/MDA-MB-231 cells	IC50: 5–10 μ M	No data	(57,215)
	PLD2	<i>In vivo</i> : MCF-12A/MDA-MB-231 cells	5-10 μ M		
Curcumin	NS	<i>In vivo</i> : J774.1 cells	IC50: 10 μ M	No data	(259)

<i>Gβγ</i> subunit from GPCR	PLD1/2	<i>In vivo</i> : MDA-MB-231 cells	Dose: 5 μM	PH domain interaction	(195)
Munc-18-1	PLD1/2	<i>In vivo</i> : COS-7 cells	IC50: 2-5 μM	PX domain interaction	(140)
Aldolase	PLD2	<i>In vivo</i> : COS-7 cells	IC50: 1 μM	PH domain interaction	(132)
CRMP-2	PLD2	<i>In vivo</i> : COS-7 cells	IC50: 30 μM	Interaction with the n-terminal domain	(142)

Direct and specific inhibitors

Halopemide			IC50	HKD domain interaction	(215)
	PLD1	<i>In vitro</i> : Mammalian PLD	21 nM		
		<i>In vivo</i> : Calu-1 cells	220 nM		
	PLD2	<i>In vitro</i> : Mammalian PLD	300 nM		
		<i>In vivo</i> : HEK293-gfp-PLD2 cells	310 nM		
FIPI			IC50:	HKD domain interaction	(73,215)

	PLD1	<i>In vitro</i> : Mammalian PLD	1 nM		
		<i>In vivo</i> : HEK293-gfp-PLD2 cells	9.5 nM		
	PLD2	<i>In vitro</i> : Mammalian PLD	44 nM		
		<i>In vivo</i> : Calu-1293-PLD2	17 nM		
ML299			IC50:	HKD domain interaction	(172)
	PLD1	<i>In vivo</i> : Calu-1 cells	6 nM		
	PLD2	<i>In vivo</i> : HEK293-gfp-PLD2 cells	20 nM		
			IC50:	HKD domain interaction	(215)
VU0155069	PLD1	<i>In vitro</i> : Mammalian PLD	11 nM		
VU0359595	PLD1	<i>In vitro</i> : Mammalian PLD	46 nM		
		<i>In vivo</i> : Calu-1 cells	3.7 nM		
			IC50:	HKD domain interaction	
VU0364739	PLD2	<i>In vitro</i> : Mammalian PLD	20 nM		(215)
ML298	PLD2	<i>In vivo</i> : HEK293-gfp-PLD2 cells	355 nM		(172)

AEBSF: 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl; *CRMP-2*: Collapsin Response Mediator Protein-2; FIPI: 5-fluoro-2-indolyldes-chlorohalopemide; GPCR: *G protein-coupled receptors*; HKD: (H(X)K(X)₄D; *NS*: Not specified; *PLD*: *Phospholipase D*

Table 3. Degree of amino acid homology of PLD from selected species

Species	Enzyme	% homology with human PLD1
<i>Homo sapiens</i>	PLD2	56.57%
<i>Pan troglodytes</i>	PLD1	99.72%
<i>Mus musculus</i>	PLD1	91.06%
<i>Columba livia</i>	PLD1	78.57%
<i>Danio rerio</i>	PLD1	67.29%
<i>Drosophila melanogaster</i>	PLD	46.52%
<i>Caenorhabditis elegans</i>	PLD from F09G2.8 gene	34.43%
<i>Ricinus communis</i>	PLD α 1	30.14%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PLD α 1	30.77%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PLD γ 1	30.41%
<i>Physcomitrella patens</i>	PLD	31.35%
<i>Oryza sativa subsp</i>	PLD α 1	29.28%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SPO14	45.15%

<i>Rickettsia conorii</i>	PLD	34.78%
<i>Streptomyces antibioticus</i>	PLD	30.56%
<i>Vaccinia virus</i>	P37	55%
<i>Vaccinia virus</i>	K4L	31.43%

K4L: Phospholipase-D-like protein K4, PLD: Phospholipase D.

Table 4. Roles of PLD1 and PLD2 in the progression of cardiometabolic disorders

Disease	Model	Isoform	Inhibitor dose	Time	Effect	Mechanisms	Ref
Dyslipidemia	McA-RH7777 cells transfected with arf-1 GPD restrictive mutant	Pld1/2	1- or 2-butanol: 0 to 2%	0 30 mins	↓VLDL-induced dyslipidemia	↓VLDL production (Arf-1 activates PLD that is necessary for VLDL production)	(10)
Insulin resistance	L6 _{PEP/PEA-15} cells	PLD1/2	N.A.	N.A.	↓Insulin sensitivity	Impairment of PLD1/PEP/PEA-15 interaction reduces PKC activity, which restores insulin sensitivity	(248)

	Primary hepatocytes	PLD1/2	Halopemide: 200 nM or 300 nM	90 mins	↓Insulin sensitivity	↓Glucose uptake	(13)
	Primary hepatocytes overexpressing PLD1	PLD1	N.A.	N.A.	↓Insulin signaling	↓mTORC2 ↓mTOR-ricor association	(263)
	Primary hepatocytes overexpressing PLD2	PLD2	N.A.	N.A.		↓mTORC2 ↓mTOR-ricor association	
Hypertension	HAC15 cells	PLD1/2	FIPI CAY10593 CAY10594	30 mins	↑aldosterone production induced by VLDL	↑Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory, aldosterone synthase	(244)

Non-alcoholic fatty liver diseases	PLD1 ^{-/-} mice	PLD1	N.A.	N.A.	↓Development of hepatic steatosis	↓CPT1a, PPAR γ , ACAT1, ACADVL	(108)
						↓ β -oxidation rates ↓Autophagosomes and lysosomes fusion	
	Primary hepatocytes	mice PLD1	VU0155069: 5 μ M	24 hours		↓Autophagosomes and lysosomes fusion	
Obesity	3T3-L1 preadipocytes	PLD1	VU0155069: 5 μ m	4/8 days	↑Adipogenic differentiation	↓Displacement of DEPTOR from mTORC1 ↓Phosphorylation of IRS-1	(228)

NIH surexpressing PLD1	3T3	PLD1	N.A.	N.A.	↑Cytosolic lipid droplet formation	↑ADRP ↑ERK	(6)
PLD1 ^{-/-} mice		PLD1	N.A.	N.A.	↑obesity	↑Food intake ↑Body weight gain and adipose tissue ↑Plasma FFA	(243)
PLD2 ^{-/-} mice		PLD2	N.A.	N.A.		↑Food intake ↑Body weight gain and adipose tissue ↑Plasma FFA	

Pancreatic insulin secretion	Min6 cells ^{+/-} PLD1	catatically inactive	PLD1	N.A.	N.A.	↓Insulin secretion	↓Recruitment of insulin granules	(106)
	PLD1						↓Fusion of insulin granules with the plasma membrane	
	Min6N8 cells		PLD1	PLD1 siRNA	24 hours	↓Insulin secretion	↓mTOR ↓p70S6K ↓Beta-2	(151)

ACADVL: Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase; ACAT1: Acetyl-CoA acetyltransferase; ADRP: Adipose differentiation-related *protein*; Arf: ADP-ribosylation factors; CPT1a: Carnitine palmitoyltransferase 1a; *DEPTOR*: DEP domain-containing mTOR-interacting protein; *ERK*: Extracellular signal-regulated kinases; FFA: Free Fatty Acid; IRS-1: Insulin receptor substrate-1; mTOR:

Mammalian target of rapamycin; mTORC1: Mammalian target of rapamycin complex 1; N.A.: Not Applicable; PKC: Protein kinase C; PLD: Phospholipase D; PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptors gamma; P70S6S: Ribosomal protein S6 kinase beta-1; VLDL: Very Low Density Lipoprotein; \uparrow : Increase; \downarrow : Decrease

Table 5. Roles of nutrients and active food compounds in PLD activity regulation

Functional food or nutrients	Model	PLD Isoform	Dose	Duration	Outcomes	PLD activity	Ref
Resveratrol	Human neutrophils	Not indicated	25 to 200 μ M	10 mins	Not indicated	↓	(241)
			40 μ M	30 mins	↓NF- κ B		
				10 mins	↓SphK activity		(110)
				30 mins	↓Chemotaxis, degranulation and oxidative burst		
			40 μ M	2 or 6 hours	↓IL-6, IL-1 β , TNF- α , MIP-1 α		

	BALB/c mic			Intraperitoneal injection 10 mg/kg		↓Acute peritonitis ↓IL-6, IL-1, TNF- α , MIP-1 α β		
Quercetin	Human glioma cells	U87MG	PLD1	20 μ M	24 hours	↓NF- κ β ↓MMP-2	↓	(184)
Honokiol	Human cells: <i>MDA-MB-231</i> <i>Calu1</i> <i>T24 bladder</i>	cancer	Not indicated	50 μ M	2 or 4 hours	↓Ras activation ↓S6K, 4E-BP1 ↑Apoptosis induction ↑Cell viability	↓	(76)

↑PARP cleavage

Triptolide		MDA-MB-231 cells	PLD1 and PLD2	0–500nM	24 hours	↓Cell proliferation	↓	(122)
Saponin from <i>Myrsine australis</i>		HL-60 cells	Not indicated	2 or 3 μM	30 mins	Not indicated	↓	(92)
Fungal metabolites:		HL-60 cells		IC50:	30 mins	Not indicated	↓	(39,40)
SCH49211				11 μM				
SCH49212				12 μM				
SCH53823				24 μM				
SCH53825				19 μM				

Curcumin	J774.1 cells		Not indicated	IC50: 10 μ M	30 mins	Not indicated	↓	(259)
	Pulmonary artery smooth muscle cells		Not indicated	20 μ M	30 mins	↓NADPH oxidase derived superoxide production	↓	(33)
Unsaturated fatty acid:	C2 mass cell		PLD1/D2	20 μ M	8 days	Not indicated	↑	(19)
Arachidonic acid	Purified PLD2	human	PLD2	20 μ M	1 hour	Not indicated	↑	(131)
Oleate Linoleic and arachidonic	Cos-1 cells		PLD1/2	20 μ M	4 days	Not indicated	↑	(77)

Linoleic and linolenic Oleate	HEPG2 cells	Not indicated	50 μ M	24 hours	\uparrow mTORC1 \uparrow Cell proliferation \uparrow Ccyclin A, E and pRB/RB)	\uparrow	(9)
Camptothecin	HL-60 cells	Not indicated	0.1 μ g/ml	0–180mins	\uparrow Apoptosis	\uparrow	(155)
Vitamin C	BLMVECs	Not indicated	5 mM	0–120mins	\uparrow Erk1/2, p38	\uparrow	(245)
Vitamin D3	HEK293 cells and HaCaT cells	PLD1	250 nM	48 hours	Not indicated	\uparrow	(128)
	Primary mouse keratinocytes	PLD1	250 nM	24 hours	Not indicated	\uparrow	(83)

	Caco-2 cells	Not indicated	100 nM	20 mins	Not indicated	↑	(126)
Dietary fiber (guar gum)	Sprague-Dawley	Not indicated	10% of the diet	4 weeks	Not indicated	↑	(101)

ERK: Extracellular signal-regulated kinases; *IL-1*: *Interleukin*; *MIP*: Macrophage Inflammatory Proteins; mTORC1: Mammalian target of rapamycin complex 1; MAPK: Mitogen-activated protein kinases; *MMP-1*: *Matrix metalloproteinase-1*; NF-κβ: Nuclear factor-kappa B; PARP: Poly ADP ribose polymerase; PLD: Phospholipase D; SphK: Sphingosine kinase; S6K: S6 Kinase; TNF-α: *Tumor necrosis factor alpha*; 4E-BP1: Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; ↑: Increase; ↓: Decrease

5.1.3 FIGURES

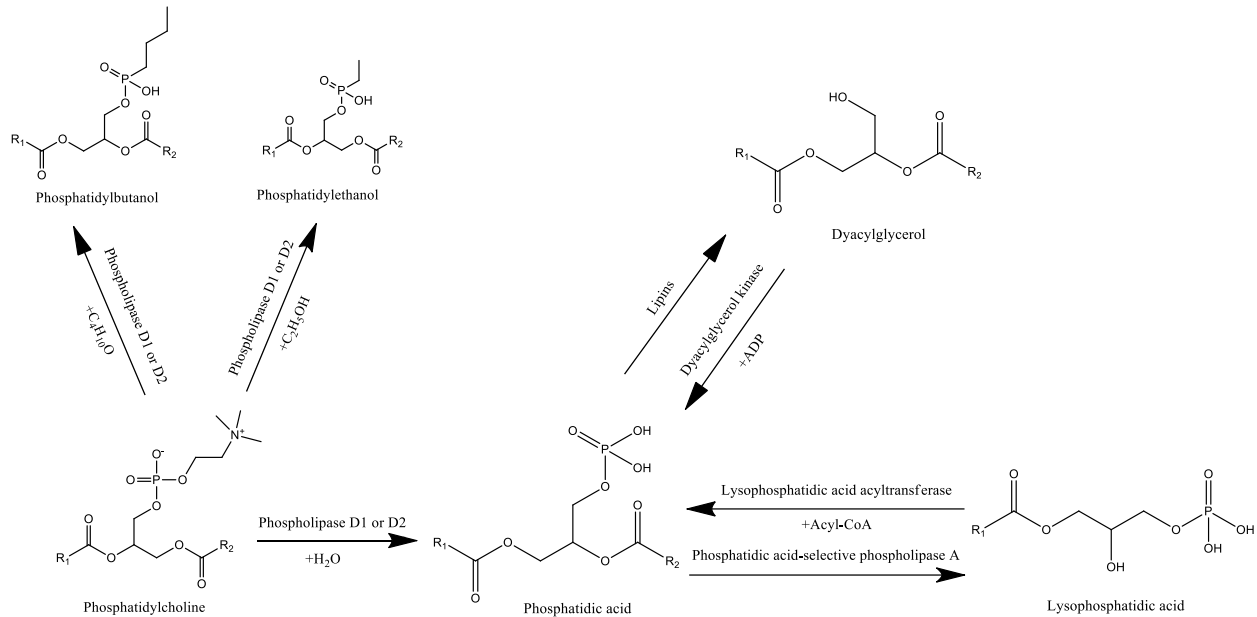


Figure 1 Phosphatidylcholine transesterification and phosphatidic acid synthesis

Phospholipase D1 and D2 are enzymes capable of hydrolyzing phosphatidylcholine to produce choline and phosphatidic acid. This is carried out by exchanging the headgroup of phosphatidic acid (PA) by a nucleophile such as H_2O . The PLD enzymes are also capable of transesterification using a primary alcohol such as ethanol or n-butanol as a nucleophile. PA can also be produced by other intracellular pathways. Diacylglycerol can yield PA with the addition of an adenosine diphosphate in response to diacylglycerol kinase action, while lysophosphatidic acid transferase produces PA by the addition of an Acyl-CoA to lysophosphatidic acid. On the other hand, PA is converted to diacylglycerol in the presence of lipins, lysophosphatidic acid and phosphatidic acid-selective phospholipase A.

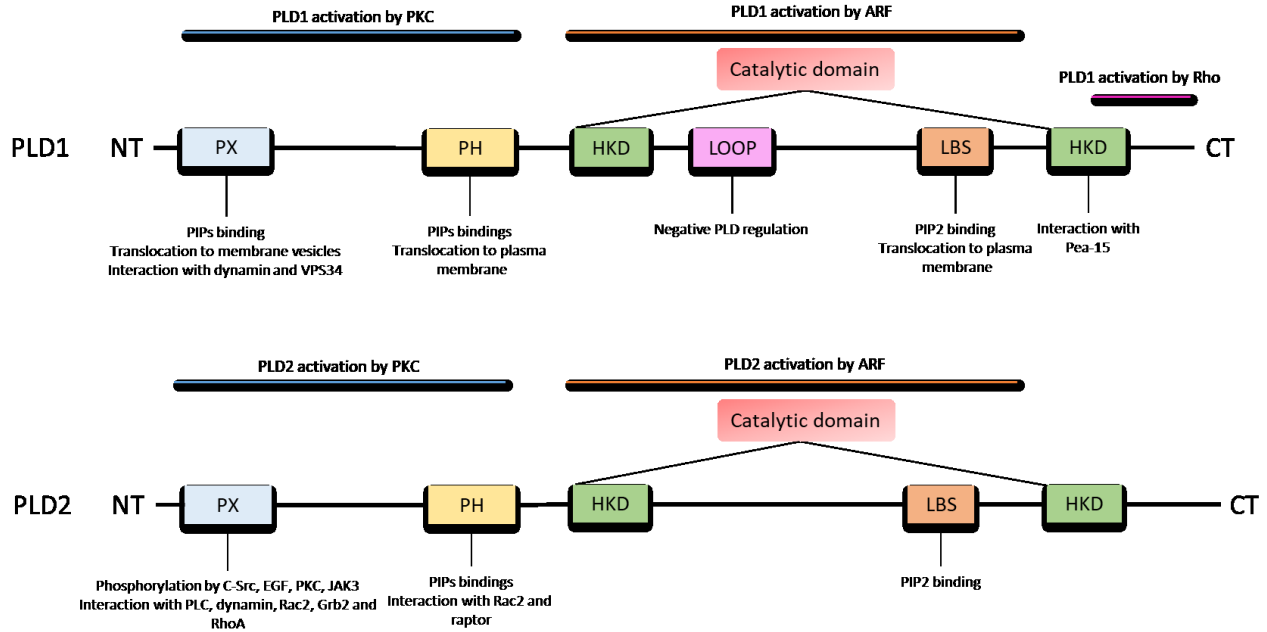


Figure 2 Differences between PLD1 and PLD2 structural domains Phospholipase D1 (PLD1) and phospholipase D2 (PLD2) have multiple domains with specific roles. They are characterized by catalytic sequences called HKD. The PX domain, PH domain and lipid binding sequences (LBS) are necessary for the translocation of PLD1 to the plasma membrane. Likewise, PLD1, but not PLD2, possesses a loop-shaped domain responsible for its negative regulation. For PLD1 and PLD2, the PX, PH and LBS are able to bind to specific phosphatidylinositides (PIP). For its part, PLD2 interacts directly with phospholipase C (PLC), dynamin, Rac2, growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) and Ras homolog family member A (RhoA) in PX domain, and with Rac2 and Raptor in the PH domain. As for PLD1, PLD2 interacts with dynamin and class III PI3K Vacuolar protein sorting 34 (VPS34) at the PX domain while its C-terminal HKD domain interacts with phosphoprotein (PEA-15) enriched in astrocytes. PLD2, but not PLD1, is phosphorylated at its PX domain by several proteins, including C-Src, epidermal growth factor (EGF), protein kinase C (PKC) and janus kinase 3 (JAK3) for efficient activation. Finally, the interaction of PKC and Arf at specific sequences can activate PLD1 and PLD2, while Rho activates only PLD1 at its C-terminus. The differences between PLD1 and PLD2 are in bold characters or framed.

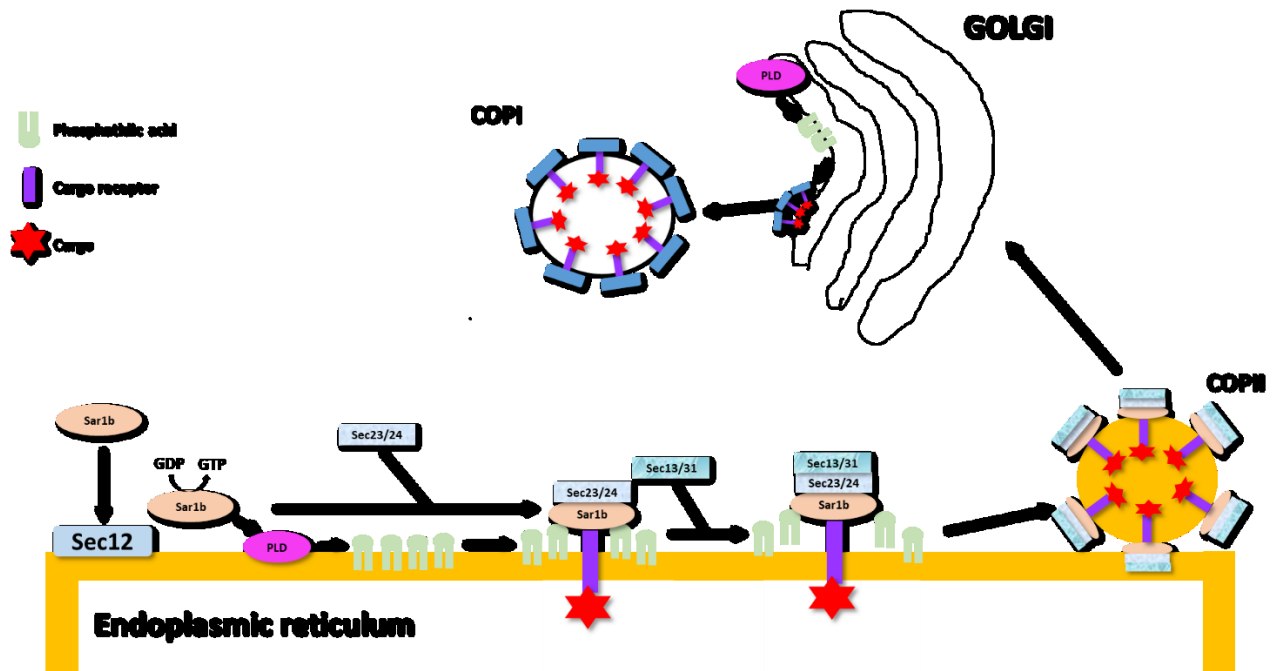


Figure 3 The important role of phospholipase D activity in the formation of COPII and COPI vesicles. The recruitment of the Sar1b GTPase at the surface of the endoplasmic reticulum (ER) by the Sec12, a guanine exchange factor (GEF), allows the conversion of GDP to GTP, which activates the Sar1b GTPase enzyme. Once activated, Sar1b GTPase stimulates phospholipase D (PLD) activity, thereby increasing the quantity of phosphatidic acid (PA) found at the surface of the ER. PA accumulation is necessary for the tubulation of the membrane, allowing the recruitment of sec23/24 and t sec 13/31 by the Sar1b GTPase. When sec23/24 and sec 13/31 are recruited and coat the pre-budding complex, the COPII vesicle is detached from the ER and moves to the trans-Golgi in order to deliver its cargo. Similarly to COPII, the accumulation of PA in the cis-Golgi by PLD can also facilitate the fission of the COPI vesicles by inducing a negative membrane curvature. Finally, the COPI vesicle returns to the ER to deliver their protein cargo.

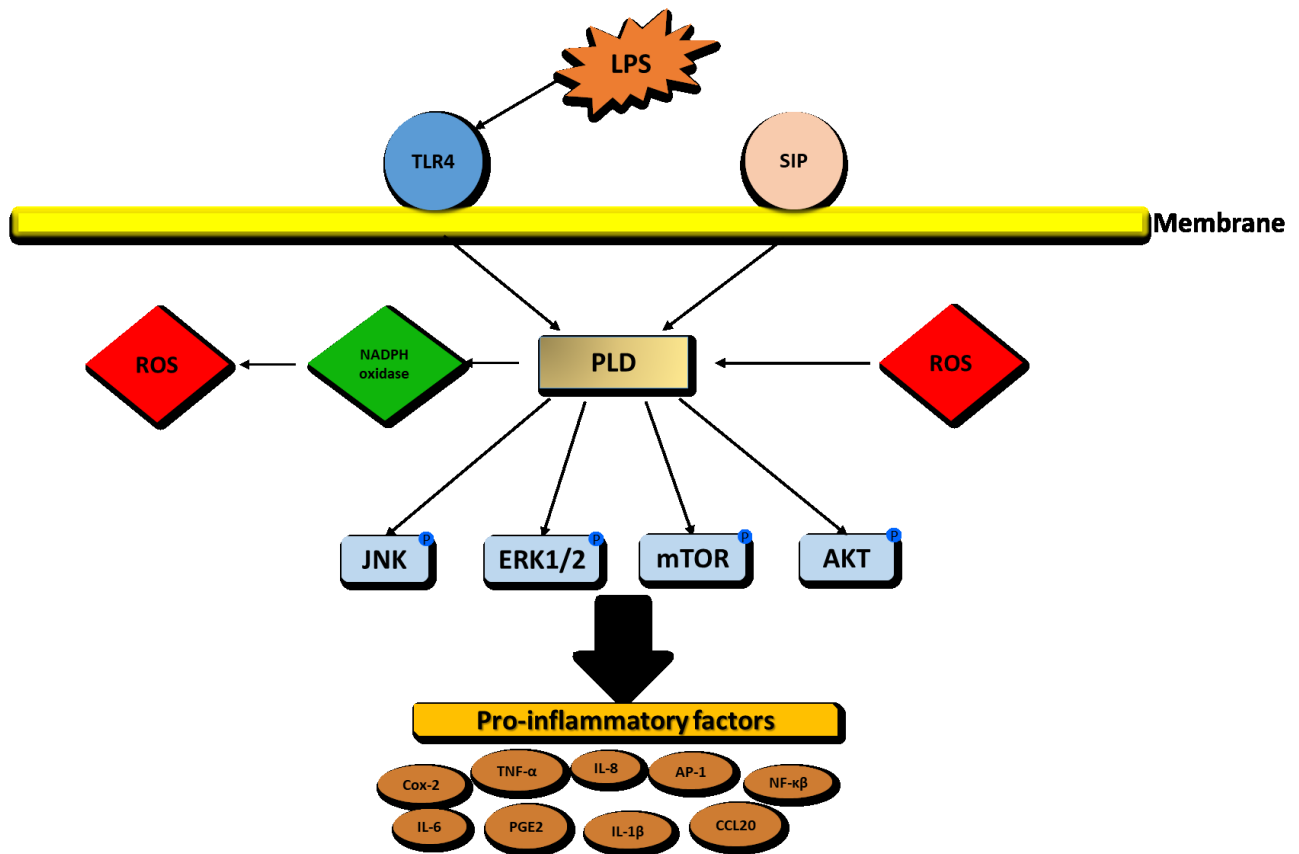


Figure 4 PLD1 and PLD2 as central players in inflammatory and oxidative pathways. Lipopolysaccharide (LPS) produced by bacteria binds to the toll like receptor 4 (TLR4), which then activates phospholipase (PLD). PLD is also activated by the sphingosine-1-phosphate (SIP) receptor and reactive oxygen species (ROS). Once activated, PLD stimulates the phosphorylation of c-Jun N-terminal kinases (JNK), extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2, mammalian target of rapamycin (mTOR) and Akt. These proteins enhance the formation of pro-inflammatory factors such as cyclooxygenase-2 (COX2), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL) -8, IL-6, IL-1 β , activator protein 1 (AP-1), nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa\beta$), prostaglandin E2 (PGE2) and chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20). Regarding the oxidative pathway, PLD activation triggers the NADPH oxidase, thereby enhancing the production of superoxide O_2^- .

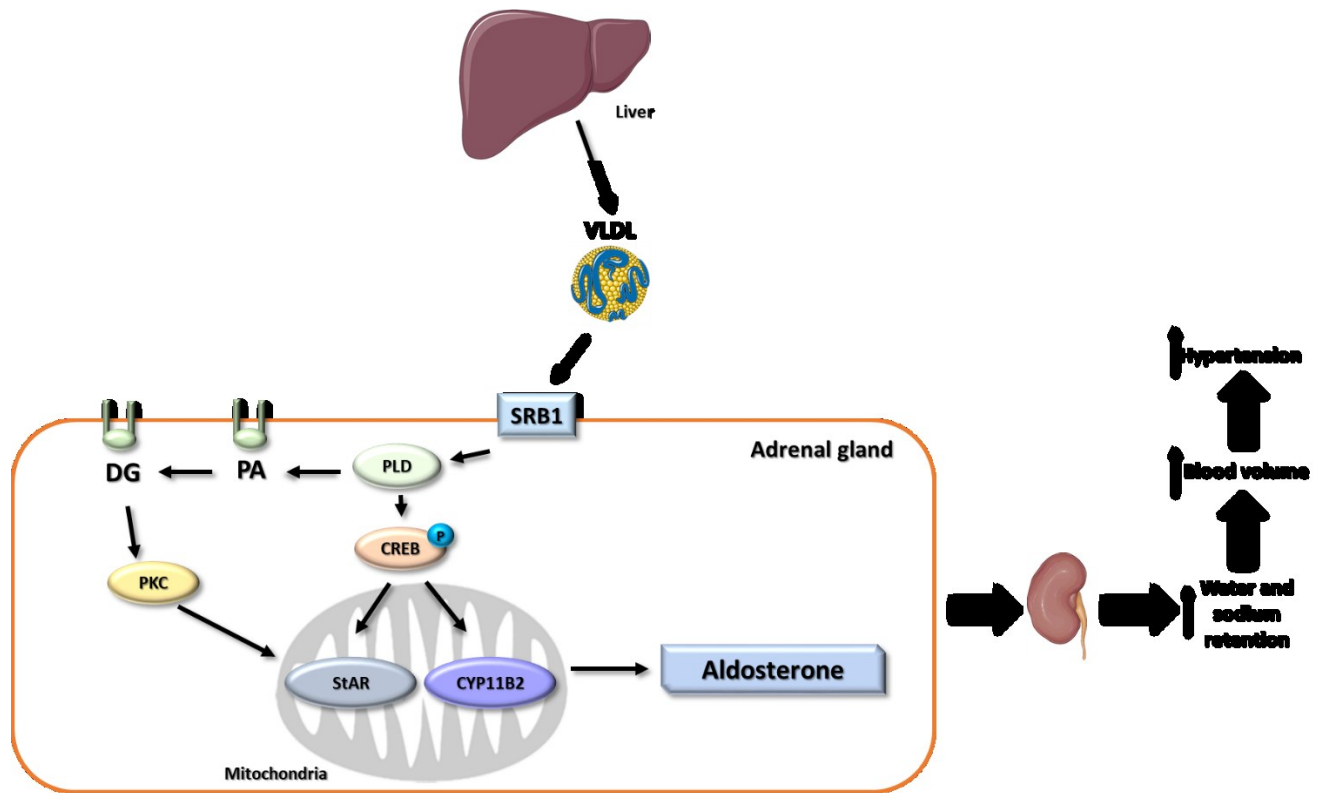


Figure 5 PLD is necessary for VLDL-induced aldosterone production in adrenal glands.

Very-low-density lipoproteins (VLDL) secreted by the liver bind to the scavenger receptor class b type 1 (SR-B1) at the surface of the adrenal gland. The binding stimulates phospholipase D (PLD) activity, which raises the production of phosphatidic acid (PA) and/or triggers the phosphorylation of c-AMP response element-binding protein (CREB). This phosphorylation increases the expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and CYP11B2, two important markers capable of raising aldosterone production. PA can also yield diacylglycerol (DG), a lipid signaling messenger that enhances protein kinase C (PKC) expression, followed by increased StAR protein expression. Aldosterone finally moves to the kidney to stimulate the retention of sodium and water, amplify blood volume, and give rise to hypertension.

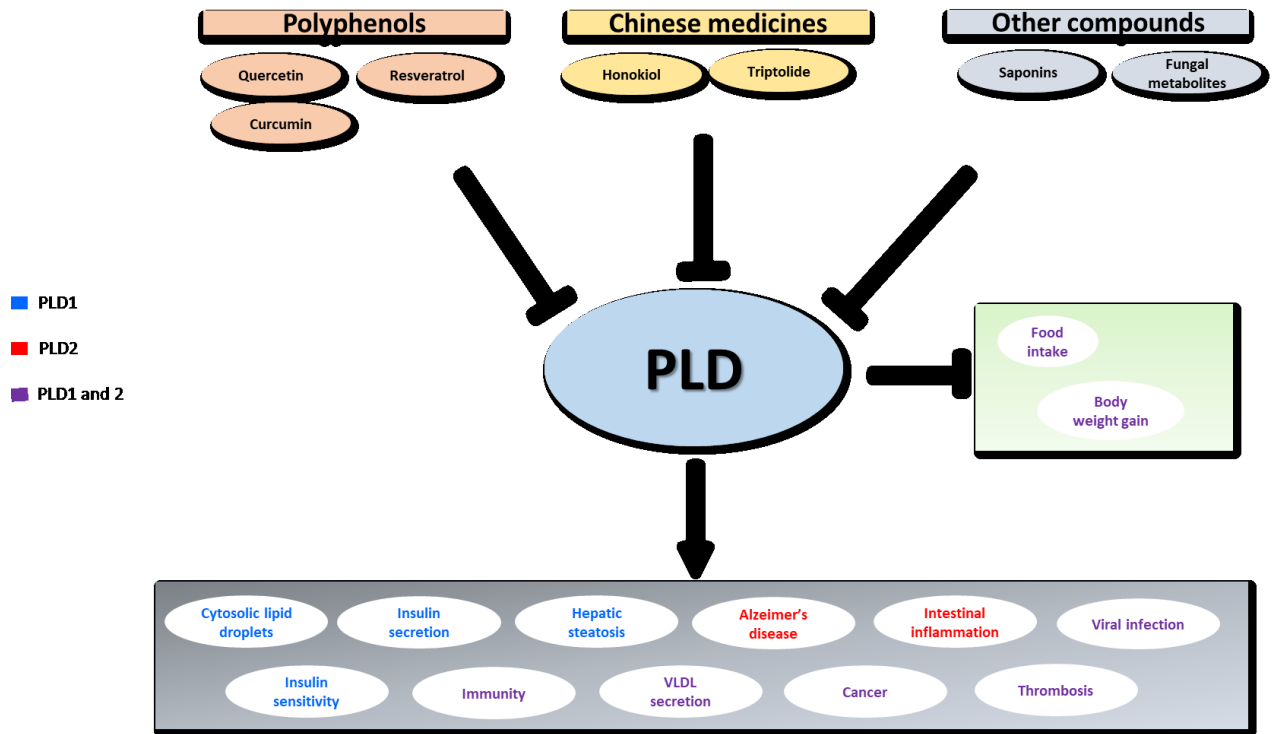


Figure 6 Targeting PLD1 and PLD2 with active food components to treat several disorders. Numerous polyphenols, Chinese medicines and other compounds were found to inhibit phospholipase D (PLD) activity. Thus, these compounds could target PLD1 and PLD2, which will help treat several disorders.

Article 2 de l'annexe

Sar1b GTPase is necessary to protect intestinal cells from disorders of lipid homeostatis, oxidative stress, and inflammation

Alain Sané, Lena Ahmarani, Edgard Delvin, Nickolas Auclair, Schohraya Spahis et Emile Levy

Article publié dans la revue *Journal of Lipid Research* en octobre 2019

Contributions :

Nickolas Auclair : A participé à la rédaction de l'article, à sa révision, à l'obtention de certains résultats et à leur interprétation pour répondre aux questions reçues par les reviewers suite à la première soumission.

Alain Sané : A planifié et réalisé la plupart des expériences, obtenu la plupart des résultats et effectué l'analyse statistique, et rédigé l'article.

Léna Ahmarani : A aidé à la réalisation de certaines expériences et à la rédaction de l'article.

Edgard Delvin : A révisé l'article.

Schohraya Spahis : A édité l'article et l'a préparé pour sa soumission à la revue.

Emile Levy : A travaillé avec Alain Sané pour planifier les expériences et a édité et révisé l'article avant soumission.

5.3.1 MAIN TEXT OF THE ARTICLE

SAR1B GTPASE IS NECESSARY TO PROTECT INTESTINAL CELLS FROM DISORDERS OF LIPID HOMEOSTASIS, OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION

Alain Théophile Sané¹, Lena Ahmarani¹, Edgard Delvin¹, Nickolas Auclair, Schohraya Spahis^{1,2}
and Emile Levy^{1,2,4*}

¹Research Centre, CHU-Sainte-Justine and Departments of ²Nutrition and ⁴Pediatrics, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Running title: *SAR1B* deletion disturbs enterocyte lipid homeostasis

Corresponding author: *Dr. Emile Levy

GI-Nutrition Unit

CHU Sainte-Justine

3175 Ste-Catherine Road #4.17.005

Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5

Tel.: (514) 345-7783

ABSTRACT

Genetic defects in *SAR1B GTPase* inhibit the step of chylomicron (CM) trafficking to the Golgi and result in a huge intra-enterocyte lipid accumulation with a failure to release CMs and liposoluble vitamins into the blood circulation. The central aim of this study is to test the hypothesis that *SAR1B* deletion (*SAR1B*^{-/-}) disturbs enterocyte lipid homeostasis (e.g. FA β -oxidation and lipogenesis) while it promotes oxidative stress and inflammation. Another issue is to compare the impact of *SAR1B*^{-/-} to that of its paralog *SAR1A*^{-/-} and combined *SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-}. To address these critical issues, we have generated Caco-2/15 cells with a knockout of *SAR1A*, *SAR1B* or *SAR1A/B* genes. *SAR1B*^{-/-} results in lipid homeostasis disruption, reflected by enhanced mitochondrial FA β -oxidation and diminished lipogenesis in intestinal absorptive cells via the implication of PPAR α and PGC1 α transcription factors. Additionally, *SAR1B*^{-/-} cells, which mimicked enterocytes of chylomicron retention disease, spontaneously disclosed inflammatory and oxidative characteristics via the implication of NF- κ B and NRF2. In most conditions, *SAR1A*^{-/-} cells showed a similar trend, albeit less dramatic, but synergetic effects were observed with the combined defects of the two *SAR1* paralogs. In conclusion, *SAR1B* and its paralog are needed not only for CM trafficking, but also for lipid homeostasis, pro-oxidant/antioxidant balance and protection against inflammatory processes.

Keywords: Gene silencing, SAR1 paralogs, TG-rich lipoproteins, lipid metabolism, mitochondria, oxidative stress, inflammation, intestine, transcription factors

1. INTRODUCTION

The small intestine is the essential site for the transport of alimentary fat in the form of lipoproteins. After the digestive phase, the lipolytic products in the lumen are absorbed by enterocytes that possess the unique ability to elaborate chylomicrons (CM), the largest triglyceride (TG)-rich lipoprotein and dietary lipid vehicle (1, 2). CM assembly within epithelial absorptive cells is a multistep pathway, including the translocation of lipolytic products from the apical membrane to the endoplasmic reticulum (ER) by cytosolic fatty acid-binding proteins (FABPs), lipid esterification, synthesis and post-translational modification of different apolipoproteins, especially B-48, as well as the packaging of lipid and apolipoprotein components into pre-CM particles (3-5). It is only under these specific conditions that CM particles move huge amounts of dietary fat into blood circulation via the lymphatic system.

Accidents of nature reveal the intracellular roles of key proteins in CM assembly and secretion (6). For example, deciphering chylomicron retention disease (CRD) afforded new insight into the crucial functions of SAR1B GTPase, the defects of which lead to severe fat malabsorption, hypocholesterolemia, extensive steatorrhea and significant failure to thrive in children (7-8) with developmental abnormalities in various organs (9). It is now well established that mutations in *SAR1B* (*SARA2*) gene encoding the SAR1B GTPase protein prevent the coat protein complex II (COPII) from producing mature CM-contained vesicles endowed with the ability to bud from the ER and reach the Golgi apparatus (6, 10-11). Therefore, the genetic defects in *SAR1B* inhibit the step of CM trafficking to the Golgi and result in a huge accumulation of intra-enterocyte TG with a failure to release CM and liposoluble vitamins into the blood circulation (2, 12).

Recently, we have shown that total silencing of *SAR1B* (*SAR1B*^{-/-}) lessens but does not extinguish the output of TG-rich lipoproteins (13) in intestinal cells, as is the case for patients with CRD (6, 10, 14). It is only through the combined depletion of *SAR1B* and *SAR1A* that CM delivery is fully eliminated. Additionally, *SAR1B*^{-/-} modulates the protein expression of intestinal FABP, hepatic - FABP and microsomal triglyceride transfer protein while decreasing ATP-binding cassette transporter A1, thereby affecting enterocyte cholesterol efflux and high-density lipoprotein generation (13). However, how the absence of CM mobilization and secretion, due to *SAR1B*

defects, influences lipid homeostasis in enterocytes remains an intriguing issue. Specifically, we have no information as to the impact of overwhelming lipid accumulation on intracellular FA β -oxidation on the one hand, and on lipogenesis on the other hand. Furthermore, another question posed in the current study is the extent of intracellular oxidative stress (OxS) and inflammation provoked by *SAR1B* defects-derived steatosis. Finally, the contribution of or the complementarity between the distinct SAR1 paralogs, *SAR1A* and *SAR1B*, in the enterocyte lipid homeostasis, remains an open question.

Therefore, the major aim of the present study is to test the hypothesis that *Sar1b*^{-/-}-mediated lipid accumulation influences intracellular lipid metabolic pathways (β –oxidation and lipogenesis) and impacts on oxidative stress and inflammation via the modulation of major transcription factors. To address these critical issues, we have generated Caco-2/15 cells with a disruption of *SAR1A* (*SAR1A*^{-/-}), *SAR1B*^{-/-} or combined *SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-} genes. In these engineered cells, we examined mitochondrial oxidative flux with a focus on critical factors (carnitine palmitoyltransferase 1 and acyl CoA dehydrogenase), lipogenesis with a particular emphasis on regulatory enzymes (acetyl CoA carboxylase and fatty acid synthase), lipophagy by stressing perilipin 2 protein expression, and mechanisms by punctuating the mass of transcription factors.

2. MATERIALS AND METHODS

Generation of *SAR1* knockout cells

This procedure was carried out as described previously (13). In short, Zinc Finger Nucleases (ZFNs) constructs against human *SAR1B* (CKOZFN18849) were transduced in proliferating Caco-2/15 cells according to manufacturer's guidelines to generate a *SAR1B*^{-/-} clone. *SAR1A* Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) and CRISPR-associated protein (Cas9) knockout (KO) construct (sc-404190, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.) were also used in parallel to create *SAR1A*^{-/-} cells. *SAR1* double KO (*SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-}) was then established by transfecting *SAR1B*^{-/-} cells with the previous *SAR1A* CRISPR and Cas9 KO constructs. Cell viability was assessed via trypan blue staining. The clones for single (*SAR1B*^{-/-} or *SAR1A*^{-/-}) and double (*SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-}) KO were then assayed for ablation through qRT-PCR and immunoblotting. Non-transfected cells were used as controls.

Cell culture

Caco-2/15 cells were cultured as described previously (15). Briefly, they were grown at 37°C with 5% CO₂ in EMEM containing 1% penicillin/streptomycin, 1% MEM nonessential amino acids and 5% decompemented fetal bovine serum. For experiments, cells were plated at a density of 1X10⁶ cells/well on six-well polycarbonate plates (Costar, Cambridge, MA). Prior to any experiment, cells were cultured for 14 days to fully differentiate into a monolayer with typical properties of absorptive enterocytes.

Integrity of *SAR1* KO cells

Cell integrity was assessed by determining villin protein expression as a hallmark of cell differentiation (16). Transepithelial electric resistance was also measured to validate the monolayer regularity and the tight junction dynamics reliability (17).

Lipid synthesis

Caco-2/15 cells were pre-incubated overnight in serum-free medium supplemented with 1 μ mole of unlabelled oleic acid. The cells were then washed with PBS and incubated for 4 h in the presence of 5 μ Ci [14 C]-acetate. Following these incubation periods, the cells were washed and scraped with a rubber policeman in a PBS solution containing antiproteases [phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM), pepstatin (1mM) and Trasylol (1 mM)]. Cellular [14 C]-labeled FAs were separated by TLC using the solvent mixture of hexane, ether and acetic acid (80:20:3, vol/vol/vol). The area corresponding to FFAs was scratched off the TLC plates and the silica powder was placed in a scintillation vial with Ecolite counting fluid cocktail (MP Biomedicals). Radioactivity was then measured by scintillation counting with HIDEX 300 SL Automatic liquid scintillation counter (Southern Scientific, United Kingdom). Cell protein was quantified using the Bradford method and results were expressed as DPM per mg of cell protein.

FA β -oxidation measurement

Differentiated Caco-2/15 cells were pre-incubated overnight in serum-free medium containing 1 μ mole of unlabelled oleic acid. The cells were then trypsinized and washed in warm PBS prior to resuspension in 2 ml serum-free medium containing 0.6 μ Ci/ml [14 C(U)]-palmitic acid conjugated with 10% FA-free BSA, pH 7.5. Cell suspensions were transferred into Mini-Erlenmeyer where a piece of hyamine hydroxide-wetted Whatman paper was placed to trap CO₂ produced during the 2-hour incubation at 37⁰C under shaking. After the incubation, 300 μ l of HCl (1N) were added to the cells, which were incubated for an additional 0.5 h at 37⁰C with shaking to stop the reaction. At the end, the pieces of Whatman paper were transferred to scintillation vials for radioactivity counting. Cell suspensions were centrifuged and radioactivity in the supernatants was counted for evaluation of acid soluble metabolites.

Mitochondrial Imaging

Mitochondrial morphology was visualized utilizing Mitotracker CMXRos (Red) solution (Invitrogen) according to manufacturers' instructions. Briefly, after a 12-day incubation, Caco-2/15 cells were washed with warm PBS and the culture media was replaced with serum-free DMEM containing 50 nM MitoTrackerR probe (30 min at 37⁰C). Once again, Caco-2/15 cells were

washed and serum free DMEM was added for viewing with an inverted confocal microscope, Spinning Disk (Leica-DMI8) with 63X oil objective and CMOS select camera at laser emission 560 nm. Using Visiview software, live-cell imaging and z-stacks were generated. The 3D-cell intensities were measured from z-stacks with image J Software and z-projections of the average intensity.

Lipid peroxidation monitoring

The amount of free malondialdehyde (MDA), a lipid peroxidation marker, produced in Caco-2/15 cells following treatment with palmitate was measured in cell extracts by HPLC with fluorescence detection. The protein-free supernatants were obtained after protein precipitation with a 0.44 M phosphoric acid solution. They were then reacted with an equivalent volume of 0.5% (wt/vol) thiobarbituric acid solution (TBA; Sigma) at 95°C for 1h. After cooling to room temperature, the pink chromo gene [(TBA) 2-MDA] was extracted with 1-butanol and dried under a nitrogen stream at 37°C. The dry extract was finally dissolved in water before MDA determination with a reversed-phase HPLC method with a diode array detector set at 532 nm. In parallel, the antioxidant defense was evaluated in the same cell extracts by assessing the expression level of glutathione peroxidase1 (GPx1).

Western blot determination

Differentiated Caco-2/15 cells were incubated with 0.25 μ mole palmitate for 2h. Cells were then lysed in ice-cold buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na₂VO₄, 1 μ g/ml leupeptin and 1 mM PMSF. Aliquots of homogenates containing 40 μ g total proteins were subjected to 7.5% or 12% SDS-PAGE and electro blotted onto nitrocellulose membranes. These membranes were then incubated overnight at 4°C with the specific primary antibodies of SAR1A/B (1/1000, kindly provided by Dr Randy Schekman, University of California, Berkley); villin (1/1000, BD Transduction); tumor necrosis factor alpha (TNF α) (1/1000, Abcam); peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) (1/1000, Abcam); PPAR α (1/1000, Cayman Chemical); acyl CoA dehydrogenase long chain (ACADL) (1/1000, Thermofisher Scientific); carnitine palmitoyl transferase I A (CPT-1A) (1/1000, Cell Signaling Technology); sterol

regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1c) (1/1000, Abcam); uncoupling protein 2 (UCP-2) (1/1000, Novus Biologicals); nuclear factor kappa-B (NF- κ B) p65 subunit (1/5000, Santa Cruz Biotechnology); nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (NR-F2) (1/1000, Abcam); inhibitor kappa-B α (I- κ B α) (Cell Signaling Biotechnology); GPx1 (1/1000, Novus Biologicals); perilipin 2 (PLIN2) (1/250, Progen) and β -actin (1/250000, Sigma) used as an internal control. After incubation with the relative second antibody mouse IgG-POD/rabbit IgG-POD (1/10000, Roche Diagnostics), immune complexes were revealed using Clarity Max Western ECL substrate (BIO-RAD). Reactive bands were captured using a ChemiDoc MP Imaging System (BIO-RAD). All the data are expressed as the ratio of target protein to β -actin in the same sample.

RNA extraction and real-time quantitative PCR

RNA was extracted from the samples using PureLink RNA Mini Kit (Ambion). RNA concentration and purity were measured using a Biodrop Touch Duo spectrophotometer (Montreal Biotech Inc). All RNA samples had an A260/A280 ratio of 1.95-2.05. After DNase treatment (Invitrogen), cDNA was generated from 1 μ g aliquots of total RNA using SuperScript VILO Master Mix (Invitrogen). RT-qPCR was performed using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The thermal profile included an initial denaturation at 95°C for 30 s, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 3s, annealing and extension at 60°C for 30 s. Amplified genes were quantified by fluorescence using the PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Levels of expression of target gene mRNAs were calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Statistical analysis

All values are expressed as mean \pm SEM of at least two independent experiments carried out in triplicates. Data were analyzed by the one-way ANOVA using PRISM 6.0 (GraphPad Software). Differences were considered significant with $P < 0.05$.

RESULTS

SAR1 deletion and Caco-2/15 cell integrity

To dissect the impact of *SAR1* KO on FA metabolism, we generated Caco-2/15 cells with the ablation of *SAR1A*, *SAR1B* or the combined two paralogs (*SAR1A/B*) as previously described (13). qRT-PCR (**Figure 1A**) and Western blot analysis (**Figure 1B**) illustrate the total ablation of genes of interest in differentiated Caco-2/15 cells.

Moreover, we previously demonstrated that these genetic manipulations do not afflict cell integrity and viability nor the differentiation process as measured by trypan blue exclusion and trans-epithelial resistance assays (13). We confirmed that genetic manipulation does not affect villin protein expression, a biomarker of cell differentiation, in *SAR1*-defective cells compared to controls (**Figure 1B**). Trans-epithelial resistance measurements showed also no changes between controls and genetically modified Caco-2/15 cells (**Figure 1C**). Therefore, the different cellular models are well suitable to analyze the role of *SAR1* genes in intestinal lipid homeostasis.

Lipid peroxidation and antioxidant status in response to SAR1 KO

A significant augmentation of MDA in *SAR1B*^{-/-} cells, and a consistent two-fold raise magnitude in *SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-} cells compared to controls were clearly observed, indicating lipid peroxidation (**Figure 2A**). In view of these findings, we investigated the levels of expression of GPx, a protein whose role is to protect the organism from oxidative damage. GPx protein load was dramatically reduced in *SAR1*^{-/-} cells, down to 9% in *SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-} cells compared to controls (**Figure 2B**). Then, we turn to NRF2, a nuclear transcription factor that functions as the key controller of the redox homeostatic gene regulatory network. *SAR1*^{-/-} cells showed a deep decrease in NRF2 protein expression, which particularly collapses to 20% in *SAR1B*^{-/-} and *SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-} (**Figure 2C**). Concomitantly with the decline of NRF2, the observations support a breakdown of antioxidant defense in *SAR1*^{-/-} intestinal cells.

Modulation of inflammation by SAR1 deletion

In view of *SAR1*^{-/-}-derived lipid accumulation, it was necessary to evaluate inflammation. The TNF α was significantly more expressed in *SAR1*-disrupted cells at the gene (**Figure 3A**) and protein (**Figure 3B**) levels with more extended intensification in *SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-} cells. Since NF- κ B is a key regulator of pro-inflammatory cytokines, we examined its potential activation in Caco-2/15 intestinal cells. Genetically modified cells showed strong increase in NF- κ B p65 protein expression in *SAR1A*^{-/-} and *SAR1B*^{-/-} which culminates with almost four-fold increase in *SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-} cells (**Figure 3C**) without any significant change in I- κ B protein expression (**Figure 3D**). The marked elevation of NF- κ B/I- κ B ratio (**Figure 3E**) confirmed the activation of NF- κ B in *SAR1*^{-/-} cells.

Impact of *SAR1* deletion on FA β -oxidation

To test the impact of *SAR1*^{-/-} on mitochondrial oxidative flux, we incubated intestinal cells with [¹⁴C(U)]-palmitate and, at the end of the incubation period, ¹⁴CO₂ production was estimated. As shown in **Figure 4A**, the degradation of the labeled palmitate was significantly increased in response to *SAR1B*^{-/-}. While a similar trend of increased ¹⁴CO₂ was noted in Caco-2/15 cells with *SAR1A*^{-/-}, the results did not reach statistical significance. On the other hand, the double KO of *SAR1* paralogs led to a four-fold increase in ¹⁴CO₂ production compared to controls. Acid soluble metabolites, which are the so-called intermediates of FA β -oxidation, were also augmented (75%) particularly in *SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-} cells as compared to controls (**Figure 4B**). These results prompted us to appraise the mitochondrial expression of CPT-1 α and ACADL since these proteins are rate-controlling enzymes of the FA β -oxidation pathway. A higher level of gene and protein expression characterized CPT-1 α in response to *SAR1A*^{-/-}, *SAR1B*^{-/-} and *SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-} (**Figures 4C-4D**). Even if we did not succeed to estimate *ACADL* gene expression in Caco-2/15 cells, the assessment of *ACADL* protein expression disclosed elevated content in genetically modified Caco-2/15 cells relatively to control cells with *SAR1B*^{-/-} and *SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-}, reaching 120% and 186%, respectively (**Figure 4E**). Overall, these findings sustain a stimulation of FA catabolic process through promoting the activities of control enzymes, while underscoring poor lipogenesis.

A potent mechanism for *SAR1* deletion-mediated FA β -oxidation

We determined the protein mass of PPAR α and PGC-1 α since they represent two transcription factors necessary for the high-level expression of mitochondrial FA oxidation genes in conditions of *SAR1* deficiency. Clearly, Western blot analysis showed an upregulation of PGC-1 α (**Figure 4F**) and PPAR α (**Figure 4G**) protein expression with an increase of 80-175 % and 85-120%, respectively, in *SAR1*-deficient cells. We also determined the protein expression of SREBP-1c and the protein content was particularly low in *SAR1*-defective cells (**Figure 4H**). As PGC-1 α acts as a master regulator of mitochondrial function and biogenesis, it was interesting to examine mitochondrial content via assessment of fluorescence after MitoTracker Red CMXRos staining. Examination by laser scanning confocal microscope and analysis by ImageJ software (for processing images of individual three-dimensional Caco-2/15 cells) allowed us to note only a slight trend of increase in fluorescence intensity in *SAR1A*^{-/-} and *SAR1B*^{-/-}, which became significant in *SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-}.

FA synthesis and expression profiles of key enzymes of lipid synthesis

Cells were incubated with [¹⁴C]-acetate to estimate free FA synthesis in *SAR1*-depleted cells. As shown in **Figure 5A**, *de novo* cellular free FA synthesis was radically decreased to 30% in *SAR1B*^{-/-} and *SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-} cells without changes in *SAR1A*^{-/-} cells. Accordingly, an important decline was noticed in ACC and FAS mRNA (**Figures 5B-5C**). As AMPK represents a central regulator of lipogenesis, we investigated its gene expression, which was lower in genetically altered cells to an extent of 80% in *SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-} cells (**Figure 5D**). We also measured the protein expression of UCP-2 in genetically modified Caco-2/15 cells. As shown in **Figure 5E**, deletion of *SAR1* promoted UCP-2 protein expression to 3-folds relatively to controls.

Lipophagy and perilipin 2

As lipophagy plays a significant role in the modulation of intracellular lipid metabolism and storage, we examined the status of perilipin 2 (PLIN-2), controlling how cells accumulate, mobilize and utilize lipids. Western blot analysis revealed a decreased protein expression in *SAR1A*^{-/-} cells and an increased expression in *SAR1B*^{-/-} and *SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-} cells (**Figure 5F**).

DISCUSSION

As CRD is highly characterized by impaired intestinal fat transport due to the inability to assemble and secrete CM, we have hypothesized that the deficiency of SAR1B leads to disturbed lipid homeostasis in enterocytes. Indeed, our experiments revealed a significant enhancement of FA β -oxidation in association with upregulation of key mitochondrial enzymes such as CPT-1 and ACADL, driven by induced expression of the transcription factors PPAR α and PGC1 α . On the other hand, *SAR1* deletion lowered AMPK mRNA expression, a central regulator of cellular energy homeostasis, as well as NRF2 protein mass, which serves as a major modulator of cellular defense system against OxS. This caused a drop in GPx antioxidant protein and, consequently, an elevation of lipid peroxidation (MDA). Further, *SAR1* KO raised NF- κ B and promoted inflammation (TNF- α). Finally, lipogenesis diminished in response to *SAR1* deletion, as reflected by the low levels of ACC, FAS and SREBP-1c.

The critical issue before initiating the present study was to determine how the deletion of *Sar1b*, the gene responsible for CRD or Anderson's disease (18, 19), affects intracellular lipid metabolism pathways. Our previous studies, using patients' biopsies and genetically modified intestinal cells, clearly showed intracellular lipid retention and complete inability to secrete chylomicrons (13, 18, 19). In fact, the molecular basis of this defect prevents the coat protein complex II (COPII) to form a shell around the vesicles transporting CM cargo in the secretory pathway for their budding and fusion with Golgi, thereby impeding intestinal CM exocytosis (6). This is consistent with the longstanding severe deficiency of apo B-48 and circulating lipid-soluble vitamins even following a fat load (18, 19). Therefore, these earlier observations led us to the hypothesis that lipogenesis would be restricted while beta-oxidation would be stimulated, and this assumption turned out to be true. Many factors may explain cellular homeostasis infringement in response to the *Sar1b* deletion, including the accumulation of lipids, abnormalities of protein transport, defects in nascent vesicle formation and membrane bending, poor recruitment of coat components, irregularities of epithelial–mesenchymal transition, and alterations of cholesterol biogenesis (20-21). Evidently, reasonable efforts must continue to understand how *Sar1b*, which regulates the

formation and assembly of the ER-derived COPII vesicles and hence the trafficking of most of cellular proteins, is involved in the control of lipid metabolic pathways.

We also assessed the repercussions of Sar1b deletion on diverse processes (e.g. oxidative stress and inflammation) in order to better understand the metabolic events occurring in CRD patients. Currently, there is no genetic mouse model of intestinal CRD. The only way forward in this field was to undertake studies in the genetically modified cell line to introduce Sar1b abnormalities. These issues were tackled with Caco-2/15 cells, which spontaneously differentiate into polarized mature enterocytes under standard culture conditions. Importantly, the epithelial monolayer lends itself to the *in vitro* study of human gut (particularly the jejunum segment), which optimally absorbs lipids, in view of its efficient intestinal transport processes and several morphological and functional features. In fact, this remarkable intestinal model is regarded as the most appropriate for the investigation of gut absorption and interactions, nutrition, toxicology food microbiology, bioavailability tests, and screening of drug permeability in discovery programs. Multiple studies from our laboratory (22-39) and from other groups (40-44) have shown that Caco-2/15 monolayers are fully appropriate for the study of lipid/lipoprotein homeostasis. Furthermore, when seeded on porous filters (Transwell), Caco-2/15 cells permit access to both sides of the bipolar intestinal epithelium: apical and basolateral compartments corresponding to intestinal lumen or serosal circulation, respectively. However, it would be important to confirm our findings by developing a *Sar1b*^{-/-} animal model.

Lipid accumulation is generally one of the most important manifestation of oxidative stress. Various findings suggest that lipid accumulation are related to oxidative stress in liver steatosis (45-46). Another example is the ectopic lipid deposition in muscle, which has been shown to lead to oxidative stress generation (47). Therefore, we have measured intestinal redox balance in response to Sar1b ablation. Our results show a spontaneous and significant elevation of lipid peroxidation along with vulnerable low GPx, a thiol-based enzyme that catalyzes the breakdown of damaging H₂O₂ and hydroperoxides to H₂O and stable alcohols. The increased intracellular lipids resulting from *SAR1B* deletion, may overwhelm the antioxidant defense and raise OxS in intestinal cells, which is consistent with the relationship between lipid accumulation and

generation of reactive oxygen species documented in earlier studies (48). Additionally, OxS may be attributable to amplified mitochondrial combustion of FAs since excessive FA oxidation leads to OxS and reduced antioxidant defenses (49). It is now well accepted that mitochondria constitute the foremost source of intracellular reactive oxygen species as the electron transport consumes about 85% of the oxygen that the cell uses (50).

Moreover, we postulated that the *SAR1B*-defective intestinal cells spontaneously develop pro-inflammatory features in view of the elevated lipid content and OxS. Indeed, our results clearly demonstrate that *SAR1B* deficiency enhanced the production of TNF- α . It is likely that *SAR1B*^{-/-} exaggerated the production of cytokines through the transcription factor NF- κ B, a powerful mechanism of inflammation. Interestingly, in our studies, UCP-2 was found to be highly up-regulated, a strategy of survival in conditions of lipotoxicity and high OxS level (51). The rise of UCP-2 protein expression may be attributed to PPAR α upregulation, as UCP-2 is a target gene of PPAR α (52). Alternatively, UCP-2 may be activated by lipid content (53).

PPAR α is intrinsically involved in mitochondrial fuel oxidation and biogenesis (54). As an imposing transcription factor, it regulates the expression of genes responsible for mitochondrial FA uptake and β -oxidation. In conditions of *SAR1B* deletion, the protein expression of PPAR α had more than doubled, thus upregulating CPT-1 (critical for mitochondrial fatty acyl import) and ACADL (a rate-controlling enzyme of the β -oxidation pathway), which stimulated ¹⁴C₂ and acid-soluble metabolite production from [¹⁴C(U)]-palmitate, indicative of an elevated rate of FA β -oxidation. The same trend was observed for *SAR1A* deletion and even more so when the two paralogs were deleted (*SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-}). As PGC-1 α exerts pleiotropic effects (e.g. mitochondrial biogenesis and FA β -oxidation) by coactivating transcription factors such as PPAR α (55), we assessed its expression by western blot. Its protein mass was elevated, indicative of activation, which is in line with PPAR α induction and FA β -oxidation enhancement. Furthermore, experiments with MitoTracker Red staining could document a trend of mitochondrial content rise in *SAR1A*^{-/-} and *SAR1B*^{-/-}, along with a significant augmentation in *SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-}, which suggests an increased mitochondrial mass and confirms PGC-1 α findings. However, additional studies are necessary to evidence the stimulation of mitochondrial biogenesis.

SREBP-1c is the main modulator of FA synthesis by operating in the activation of lipogenic genes such as ACC and FAS (56). A stumpy expression characterized SREBP-1c, AMPK, ACC and FAS in *SAR1B*^{-/-} cells, which is consistent with the decline in *de novo* FA synthesis. Overall, these findings reflect the drop in the lipogenic pathway. It is possible that PPAR α is the master controller since various studies have shown that PPAR α activation can suppress the activation of SREBP-1c (57-60).

As lipophagy plays a crucial role in lipid metabolism, it was important to determine its implication in the intestinal lipid accumulation caused by *SAR1B* deficiency. By definition, lipophagy is defined as the autophagic degradation of intracellular lipid droplets by the lysosomal acid lipase (61). Recently, it has been demonstrated that perilipin 2 (PLIN2) is a critical regulatory factor for lipophagy (62). For example, *PLIN2*^{-/-} mice are characterized by a marked reduction of hepatic TG content and a sustained protection against fatty liver development (63). At the mechanistic level, a shortfall of PLIN2, acting as a shield for the TG core of cytosolic lipid droplets, enables lipases to access and hydrolyze triglycerides (64). Since PLIN2 is largely expressed in the intestine, represents one of the most abundant lipid droplet coat proteins with a profusion closely associated with the level of intracellular lipid (65-66), we determined its protein expression in genetically modified Caco-2/15 cells. Our data showed a significant PLIN2 increase in *SAR1B*^{-/-} and *SAR1A*^{-/-}/*B*^{-/-} but with a decline in *SAR1A*^{-/-}, suggesting different mechanisms for the two paralogs.

Although one may speculate that the high levels of intracellular lipids may have pathophysiological implications for the intestinal mucosa of CRD patients in terms of cellular turnover rate and damage, the exploration of cell viability and differentiation did not show any defects in genetically modified Caco-2/15 cells. However, before totally dismissing this eventuality, measurements should be performed either in biopsies of CRD patients or in the small intestine of animal models engineered in the near future.

In conclusion, *SAR1B* silencing results not only in a failure to absorb lipids and fat-soluble vitamins in the form of CMs, but also in lipid homeostasis disruption, reflected by enhanced mitochondrial FA β -oxidation and diminished lipogenesis in intestinal absorptive cells. Additionally, *SAR1B*^{-/-}

cells, which mimicked enterocytes of CRD, spontaneously disclosed inflammatory and oxidative characteristics. In most conditions, the combined defect in *SAR1A and SAR1B* promoted the severity of the aforementioned disorders.

Acknowledgments

The authors thank Dr Randy W Schekman, Howard Hugues Medical Institute Reagents of the University of California for providing Sar1B/A antibody.

Source of funding

This work was supported by grants from Canadian Institutes of Health Research (MOP 10584 & PJT 153113) and the JA deSève Research Chair in nutrition (EL).

Disclosure statement

The authors have nothing to disclose.

LIST OF ABBREVIATIONS

ACADL;	acyl CoA dehydrogenase long chain
ACC;	acetyl-CoA-carboxylase
AMPK;	AMP-activated protein kinase
CM;	chylomicron
COPII;	coat protein complex II
CPT-1 α ;	carnitine palmitoyl transferase-1 α
CRD;	chylomicron retention disease
ER;	endoplasmic reticulum
FABP;	fatty acid-binding proteins
GPX;	glutathione peroxidase
I-kB;	inhibitor kappa-B
MDA;	malondialdehyde
NF-kB;	nuclear factor kappa-B
NRF2;	nuclear factor erythroid-2-related factor 2
OxS;	oxidative stress
PLIN2	perilipin 2
PGC-1 α ;	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
SREBP-1c;	sterol regulatory element-binding protein 1

TBA; thiobarbituric acid
TER; transepithelial resistance
TG; triglyceride
TNF α ; tumor necrosis factor alpha
UCP-2; uncoupling protein-2

REFERENCES

1. Levy E. 2015. Insights from human congenital disorders of intestinal lipid metabolism. *J. Lipid Res.* 56: 945–962.
2. Mansbach C. M. II, and Siddiqi S.. 2016. Control of chylomicron export from the intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 310: G659–G668.
3. Kumar N. S., and Mansbach C. M. II. 1999. Prechylomicron transport vesicle: isolation and partial characterization. *Am. J. Physiol.* 276: G378–G386.
4. Mansbach C. M., and Siddiqi S. A.. 2010. The biogenesis of chylomicrons. *Annu. Rev. Physiol.* 72: 315–333.
5. Siddiqi S., Saleem U., Abumrad N. A., Davidson N. O., Storch J., Siddiqi S. A., and Mansbach C. M. II. 2010. A novel multiprotein complex is required to generate the prechylomicron transport vesicle from intestinal ER. *J. Lipid Res.* 51: 1918–1928.
6. Jones B., Jones E. L., Bonney S. A., Patel H. N., Mensenkamp A. R., Eichenbaum-Voline S., Rudling M., Myrdal U., Annesi G., Naik S., et al. . 2003. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat. Genet.* 34: 29–31.
7. Peretti N., Sassolas A., Roy C. C., Deslandres C., Charcosset M., Castagnetti J., Pugno-Chardon L., Moulin P., Labarge S., Bouthillier L., et al. . 2010. Guidelines for the diagnosis and management of chylomicron retention disease based on a review of the literature and the experience of two centers. *Orphanet J. Rare Dis.* 5: 24.
8. Bouma M. E., Infante R., Jos J., and Schmitz J.. 1988. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology.* 94: 554–556.
9. Levic D. S., Minkel J. R., Wang W. D., Rybski W. M., Melville D. B., and Knapik E. W.. 2015. Animal model of Sar1b deficiency presents lipid absorption deficits similar to Anderson disease. *J. Mol. Med. (Berl.)*. 93: 165–176.

10. Magnolo L., Najah M., Fancello T., Di Leo E., Pinotti E., Brini I., Gueddiche N. M., Calandra S., Slimene N. M., and Tarugi P.. 2013. Novel mutations in SAR1B and MTTP genes in Tunisian children with chylomicron retention disease and abetalipoproteinemia. *Gene*. 512: 28–34.
11. Treepongkaruna S., Chongviriyaphan N., Suthutvoravut U., Charoenpipop D., Choubtum L., and Wattanasirichaigoon D.. 2009. Novel missense mutations of SAR1B gene in an infant with chylomicron retention disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 48: 370–373.
12. Hussain M. M. 2014. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr. Opin. Lipidol.* 25: 200–206.
13. Sané A. T., Seidman E., Peretti N., Kleme M. L., Delvin E., Deslandres C., Garofalo C., Spahis S., and Levy E.. 2017. Understanding chylomicron retention disease through Sar1b Gtpase gene disruption: insight from cell culture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37: 2243–2251.
14. Charcosset M., Sassolas A., Peretti N., Roy C. C., Deslandres C., Sinnett D., Levy E., and Lachaux A.. 2008. Anderson or chylomicron retention disease: molecular impact of five mutations in the SAR1B gene on the structure and the functionality of Sar1b protein. *Mol. Genet. Metab.* 93: 74–84.
15. Sané A., Seidman E., Spahis S., Lamantia V., Garofalo C., Montoudis A., Marcil V., and Levy E.. 2015. New insights in intestinal Sar1B GTPase regulation and role in cholesterol homeostasis. *J. Cell. Biochem.* 116: 2270–2282.
16. Kleme M. L., Sané A. T., Garofalo C., and Levy E.. 2016. Targeted CFTR gene disruption with zinc-finger nucleases in human intestinal epithelial cells induces oxidative stress and inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 74: 84–94.
17. Benson K., Cramer S., and Galla H. J.. 2013. Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond. *Fluids Barriers CNS.* 10: 5.

18. Levy E., Marcel Y., Deckelbaum R. J., Milne R., Lepage G., Seidman E., Bendayan M., and Roy C. C.. 1987. Intestinal apoB synthesis, lipids, and lipoproteins in chylomicron retention disease. *J. Lipid Res.* 28: 1263–1274.
19. Roy C. C., Levy E., Green P. H., Sniderman A., Letarte J., Buts J. P., Orquin J., Brochu P., Weber A. M., Morin C. L., et al. . 1987. Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology.* 92: 390–399.
20. Fryer L. G., Jones B., Duncan E. J., Hutchison C. E., Ozkan T., Williams P. A., Alder O., Nieuwdorp M., Townley A. K., Mensenkamp A. R., et al. . 2014. The endoplasmic reticulum coat protein II transport machinery coordinates cellular lipid secretion and cholesterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 289: 4244–4261.
21. Huang M., and Wang Y.. 2019. Targeted quantitative proteomic approach for probing altered protein expression of small GTPases associated with colorectal cancer metastasis. *Anal. Chem.* 91: 6233–6241.
22. Marcil V., Delvin E., Seidman E., Poitras L., Zoltowska M., Garofalo C., and Levy E.. 2002. Modulation of lipid synthesis, apolipoprotein biogenesis, and lipoprotein assembly by butyrate. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283: G340–G346.
23. Bernotti S., Seidman E., Sinnett D., Brunet S., Dionne S., Delvin E., and Levy E.. 2003. Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in Caco-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285: G898–G906.
24. Sané A. T., Sinnett D., Delvin E., Bendayan M., Marcil V., Menard D., Beaulieu J. F., and Levy E.. 2006. Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J. Lipid Res.* 47: 2112–2120.

25. Grenier E., Maupas F. S., Beaulieu J. F., Seidman E., Delvin E., Sané A., Tremblay E., Garofalo C., and Levy E.. 2007. Effect of retinoic acid on cell proliferation and differentiation as well as on lipid synthesis, lipoprotein secretion, and apolipoprotein biogenesis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293: G1178–G1189.
26. Leblond F., Seidah N. G., Précourt L. P., Delvin E., Dominguez M., and Levy E.. 2009. Regulation of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296: G805–G815.
27. Levy E., Menard D., Delvin E., Montoudis A., Beaulieu J. F., Mailhot G., Dube N., Sinnett D., Seidman E., and Bendayan M.. 2009. Localization, function and regulation of the two intestinal fatty acid-binding protein types. *Histochem. Cell Biol.* 132: 351–367.
28. Taha R., Seidman E., Mailhot G., Boudreau F., Gendron F. P., Beaulieu J. F., Menard D., Delvin E., Amre D., and Levy E.. 2010. Oxidative stress and mitochondrial functions in the intestinal Caco-2/15 cell line. *PLoS One.* 5: e11817.
29. Marcil V., Seidman E., Sinnett D., Boudreau F., Gendron F. P., Beaulieu J. F., Menard D., Précourt L. P., Amre D., and Levy E.. 2010. Modification in oxidative stress, inflammation, and lipoprotein assembly in response to hepatocyte nuclear factor 4alpha knockdown in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 285: 40448–40460.
30. Levy E., Harmel E., Laville M., Sanchez R., Emonnot L., Sinnett D., Ziv E., Delvin E., Couture P., Marcil V., et al. . 2011. Expression of Sar1b enhances chylomicron assembly and key components of the coat protein complex II system driving vesicle budding. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31: 2692–2699.
31. Cammisotto P. G., Bendayan M., and Levy E.. 2012. Regulation of leptin receptor expression in human polarized Caco-2/15 cells. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.* 12: 57–70.

32. Précourt L. P., Marcil V., Ntimbane T., Taha R., Lavoie J. C., Delvin E., Seidman E. G., Beaulieu J. F., and Levy E.. 2012. Antioxidative properties of paraoxonase 2 in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 303: G623–G634.
33. Grenier E., Garofalo C., Delvin E., and Levy E.. 2012. Modulatory role of PYY in transport and metabolism of cholesterol in intestinal epithelial cells. *PLoS One.* 7: e40992.
34. Levy E., Ben Djoudi Ouadda A., Spahis S., Sané A. T., Garofalo C., Grenier E., Emonnot L., Yara S., Couture P., Beaulieu J. F., et al. . 2013. PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells. *Atherosclerosis.* 227: 297–306.
35. Yara S., Lavoie J. C., Beaulieu J. F., Delvin E., Amre D., Marcil V., Seidman E., and Levy E.. 2013. Iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation causes epigenetic changes in the antioxidant defense in intestinal epithelial cells: impact on inflammation. *PLoS One.* 8: e63456.
36. Grenier E., Mailhot G., Dion D., Ravid Z., Spahis S., Bendayan M., and Levy E.. 2013. Role of the apical and basolateral domains of the enterocyte in the regulation of cholesterol transport by a high glucose concentration. *Biochem. Cell Biol.* 91: 476–486.
37. Harmel E., Grenier E., Bendjoudi Ouadda A., El Chebly M., Ziv E., Beaulieu J. F., Sané A., Spahis S., Laville M., and Levy E.. 2014. AMPK in the small intestine in normal and pathophysiological conditions. *Endocrinology.* 155: 873–888.
38. Kleme M. L., Sané A., Garofalo C., Seidman E., Brochiero E., Berthiaume Y., and Levy E.. 2018. CFTR deletion confers mitochondrial dysfunction and disrupts lipid homeostasis in intestinal epithelial cells. *Nutrients.* 10: E836.
39. Courtois F., Suc I., Garofalo C., Ledoux M., Seidman E., and Levy E.. 2000. Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279: G12–G19.

40. Zhang J. H., Ge L., Qi W., Zhang L., Miao H. H., Li B. L., Yang M., and Song B. L.. 2011. The N-terminal domain of NPC1L1 protein binds cholesterol and plays essential roles in cholesterol uptake. *J. Biol. Chem.* 286: 25088–25097.
41. Yamanashi Y., Takada T., and Suzuki H.. 2007. Niemann-Pick C1-like 1 overexpression facilitates ezetimibe-sensitive cholesterol and beta-sitosterol uptake in CaCo-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320: 559–564.
42. Vidal R., Hernandez-Vallejo S., Pauquai T., Texier O., Rousset M., Chambaz J., Demignot S., and Lacorte J. M.. 2005. Apple procyanidins decrease cholesterol esterification and lipoprotein secretion in Caco-2/TC7 enterocytes. *J. Lipid Res.* 46: 258–268.
43. Field F. J., Watt K., and Mathur S. N.. 2007. Ezetimibe interferes with cholesterol trafficking from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum in CaCo-2 cells. *J. Lipid Res.* 48: 1735–1745.
44. Feng D., Ohlsson L., and Duan R. D.. 2010. Curcumin inhibits cholesterol uptake in Caco-2 cells by down-regulation of NPC1L1 expression. *Lipids Health Dis.* 9: 40.
45. Charradi K., Elkahoui S., Karkouch I., Limam F., Ben Hassine F., El May M. V., and Aouani E.. 2014. Protective effect of grape seed and skin extract against high-fat diet-induced liver steatosis and zinc depletion in rat. *Dig. Dis. Sci.* 59: 1768–1778.
46. Palmieri V. O., Grattagliano I., Portincasa P., and Palasciano G.. 2006. Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome. *J. Nutr.* 136: 3022–3026.
47. Wada T., Ichihashi Y., Suzuki E., Kosuge Y., Ishige K., Uchiyama T., Makishima M., Nakao R., Oishi K., and Shimba S.. 2018. Deletion of Bmal1 prevents diet-induced ectopic fat accumulation by controlling oxidative capacity in the skeletal muscle. *Int. J. Mol. Sci.* 19: E2813.

48. Vidyashankar S., Sandeep Varma R., and Patki P. S.. 2013. Quercetin ameliorate insulin resistance and up-regulates cellular antioxidants during oleic acid induced hepatic steatosis in HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro.* 27: 945–953.
49. Malaguarnera M., Di Rosa M., Nicoletti F., and Malaguarnera L.. 2009. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J. Mol. Med. (Berl.)*. 87: 679–695.
50. Vitale G., Salvioli S., and Franceschi C.. 2013. Oxidative stress and the ageing endocrine system. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9: 228–240.
51. Kuai X. Y., Ji Z. Y., and Zhang H. J.. 2010. Mitochondrial uncoupling protein 2 expression in colon cancer and its clinical significance. *World J. Gastroenterol.* 16: 5773–5778.
52. Zhang X., Li L., Prabhakaran K., Zhang L., Leavesley H. B., Borowitz J. L., and Isom G. E.. 2007. Uncoupling protein-2 up-regulation and enhanced cyanide toxicity are mediated by PPARalpha activation and oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 223: 10–19.
53. Nübel T., and Ricquier D.. 2006. Respiration under control of uncoupling proteins: clinical perspective. *Horm. Res.* 65: 300–310.
54. Muoio D. M., Way J. M., Tanner C. J., Winegar D. A., Kliewer S. A., Houmard J. A., Kraus W. E., and Dohm G. L.. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha regulates fatty acid utilization in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes.* 51: 901–909.
55. Lin J., Wu H., Tarr P. T., Zhang C. Y., Wu Z., Boss O., Michael L. F., Puigserver P., Isotani E., Olson E. N., et al. . 2002. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature.* 418: 797–801.
56. Ben Djoudi Ouadda A., Levy E., Ziv E., Lalonde G., Sané A. T., Delvin E., and Elchebly M.. 2009. Increased hepatic lipogenesis in insulin resistance and Type 2 diabetes is associated with AMPK signalling pathway up-regulation in *Psammomys obesus*. *Biosci. Rep.* 29: 283–292.

57. Fernández-Alvarez A., Alvarez M. S., Gonzalez R., Cucarella C., Muntane J., and Casado M.. 2011. Human SREBP1c expression in liver is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J. Biol. Chem.* 286: 21466–21477.
58. Cherkaoui-Malki M., Meyer K., Cao W. Q., Latruffe N., Yeldandi A. V., Rao M. S., Bradfield C. A., and Reddy J. K.. 2001. Identification of novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) target genes in mouse liver using cDNA microarray analysis. *Gene Expr.* 9: 291–304.
59. Reddy J. K., and Hashimoto T.. 2001. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu. Rev. Nutr.* 21: 193–230.
60. Reddy J. K. 2001. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. III. Peroxisomal beta-oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281: G1333–G1339.
61. Singh R., Kaushik S., Wang Y., Xiang Y., Novak I., Komatsu M., Tanaka K., Cuervo A. M., and Czaja M. J.. 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 458: 1131–1135.
62. Mardani I., Tomas Dalen K., Drevinge C., Miljanovic A., Stahlman M., Klevstig M., Scharin Tang M., Fogelstrand P., Levin M., Ekstrand M., et al. . 2019. Plin2-deficiency reduces lipophagy and results in increased lipid accumulation in the heart. *Sci. Rep.* 9: 6909.
63. Chang B. H., Li L., Paul A., Taniguchi S., Nannegari V., Heird W. C., and Chan L.. 2006. Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein. *Mol. Cell. Biol.* 26: 1063–1076.
64. Kaushik S., and Cuervo A. M.. 2015. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat. Cell Biol.* 17: 759–770.

65. Xiong X., Bales E. S., Ir D., Robertson C. E., McManaman J. L., Frank D. N., and Parkinson J.. 2017. Perilipin-2 modulates dietary fat-induced microbial global gene expression profiles in the mouse intestine. *Microbiome*. 5: 117.
66. Werno M. W., Wilhelmi I., Kuropka B., Ebert F., Freund C., and Schurmann A.. 2018. The GTPase ARFRP1 affects lipid droplet protein composition and triglyceride release from intracellular storage of intestinal Caco-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 506: 259–265.

5.3.2 FIGURES

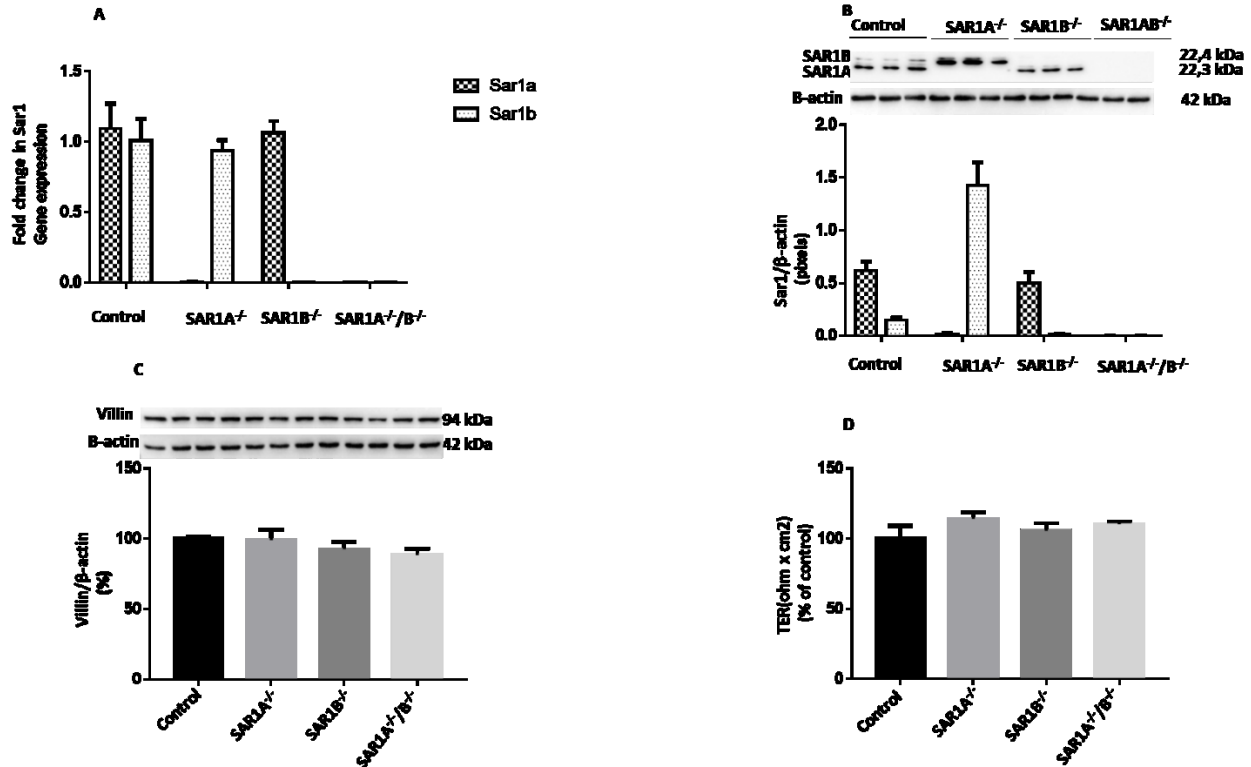


Figure 1. SAR1 knockout and integrity of genetically modified Caco-2/15 cells. Caco-2/15 cells were genetically engineered as described in Methods to produce cells with knockout of *Sar1a*, *Sar1b* or both paralogs. To validate the ablation efficiency, we determined the gene (A) and protein (B) expressions by qRT-PCR and Western blot, respectively. The genetic effect of manipulation on cell monolayer integrity of Caco-2/15 cells was assessed by determining (C) villin protein expression as a marker of cell differentiation, and (D) the transepithelial resistance (TER) as an index of cell permeability and tight junction constancy. Data are expressed as the mean \pm SEM of two to three experiments in triplicates.

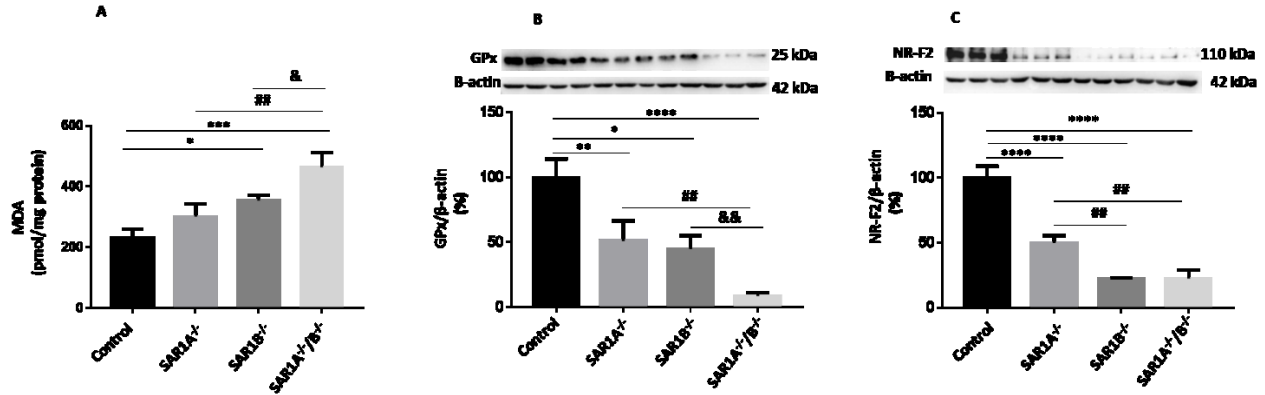


Figure 2 MDA levels and antioxidant response in *SAR1*-deleted cells. Differentiated Caco-2/15 cells were pre-incubated overnight with 1 μ mole oleate and treated with 0.25 μ mole palmitate for 2h. Lipid peroxidation was evaluated by assessing (A) MDA content. Cells were also probed for (B) NR-F2 and (C) GPx protein expression by Western blot. Data are expressed as the mean \pm SEM of at least two experiments in triplicates. * P <0.05, ** P <0.01, *** P < 0.001, **** P <0.0001 vs. Controls; ## P <0.01 vs. *SAR1A*^{-/-}; & P <0.05, && P <0.01 vs. *SAR1B*^{-/-}.

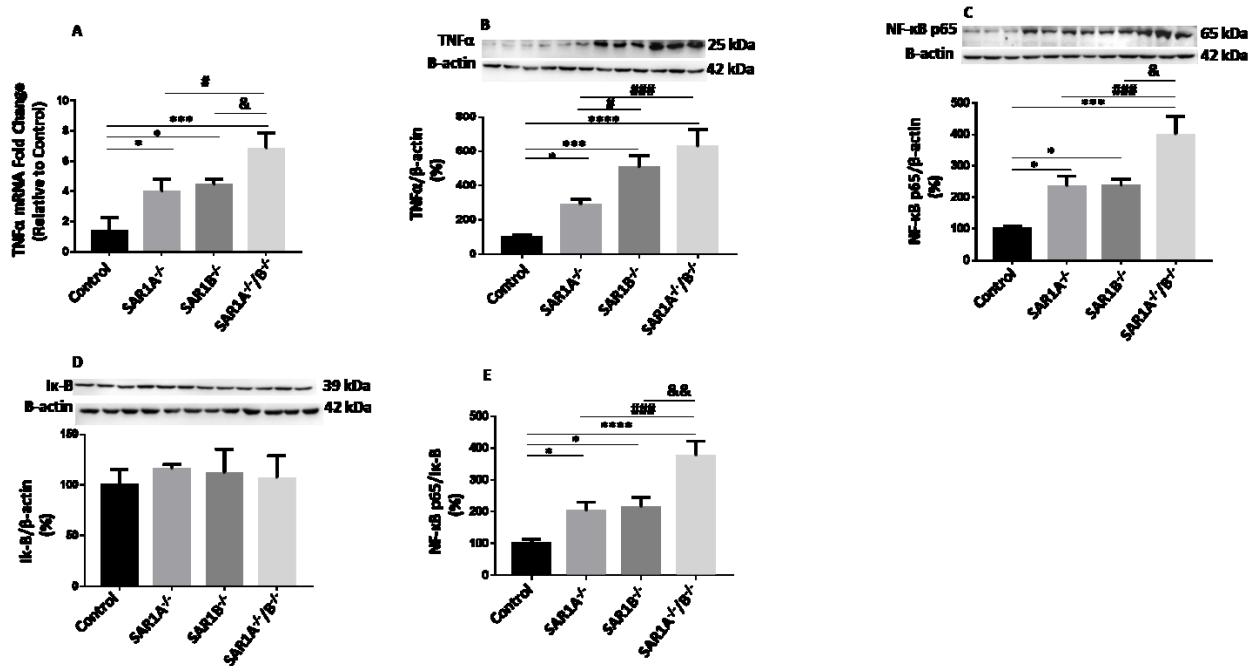


Figure 3 Impact of *SAR1* disruption on inflammatory markers. To rate the inflammation status, (A) gene expression and (B) protein mass of TNF α , (C) NF- κ B p65 and (D) I- κ B were assessed

by qRT-PCR and western blot, respectively. Then after, (E) the ratio NF- κ B/I- κ B was calculated. Data are expressed as the mean \pm SEM of two to three experiments in triplicates. * P <0.05, *** P <0.001, **** P <0.0001 vs. Controls; # P <0.05, ### P <0.001 vs. *SAR1A*^{-/-}; & P <0.05, && P <0.01 vs. *SAR1B*^{-/-}.

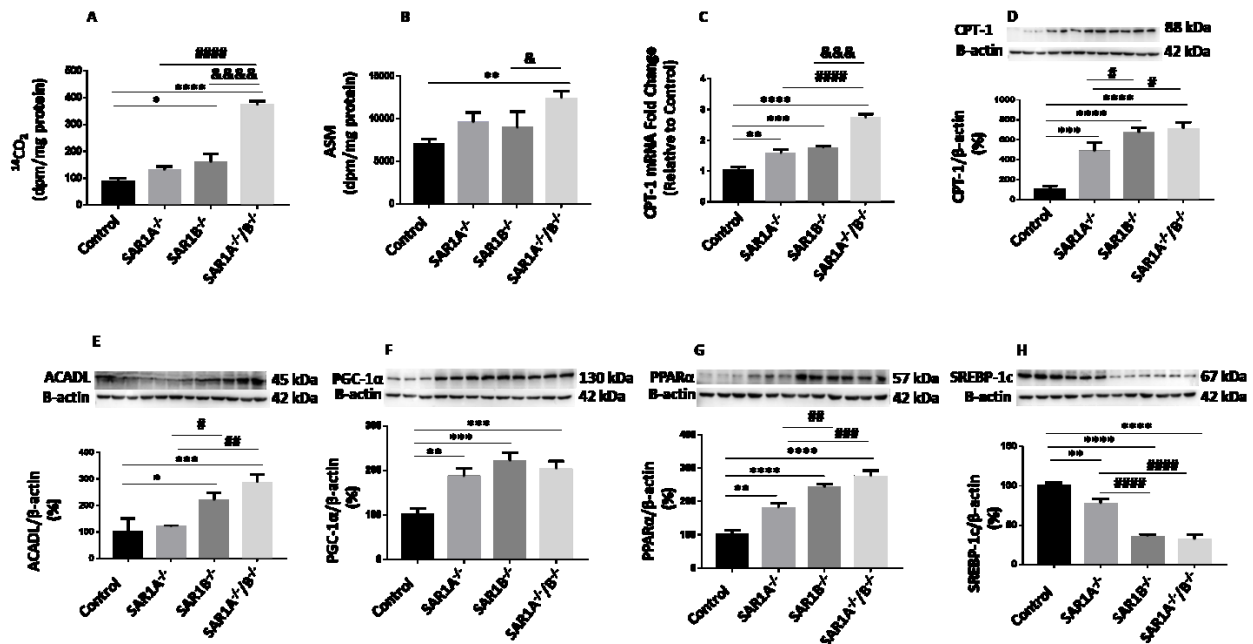


Figure 4 Effects of *SAR1* depletion on production of ^{14}C and expression of major markers of FA β -oxidation. Cell suspensions of differentiated Caco-2/15 cells were incubated for 2 hours with a reaction mixture containing 0.6 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C (U)]-palmitate. (A) The amount of ^{14}C in the paper disc CO_2 fraction and in (B) the acid-soluble metabolites (ASM) fraction were measured by scintillation counting. Furthermore, (C) mRNA and protein levels of (D) CPT-1 α , (E) ACADL, (F) PGC1 α , (G) PPAR α and (H) SREBP-1c were determined by Western blot. Data are expressed as the mean \pm SEM of at least two experiments in triplicates. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.0001 vs. Controls; # P <0.05, ## P <0.01, ### P <0.001, #### P <0.0001 vs. *SAR1A*^{-/-}; & P <0.05, && P <0.01, &&& P <0.001, &&&& P <0.0001 vs. *SAR1B*^{-/-}.

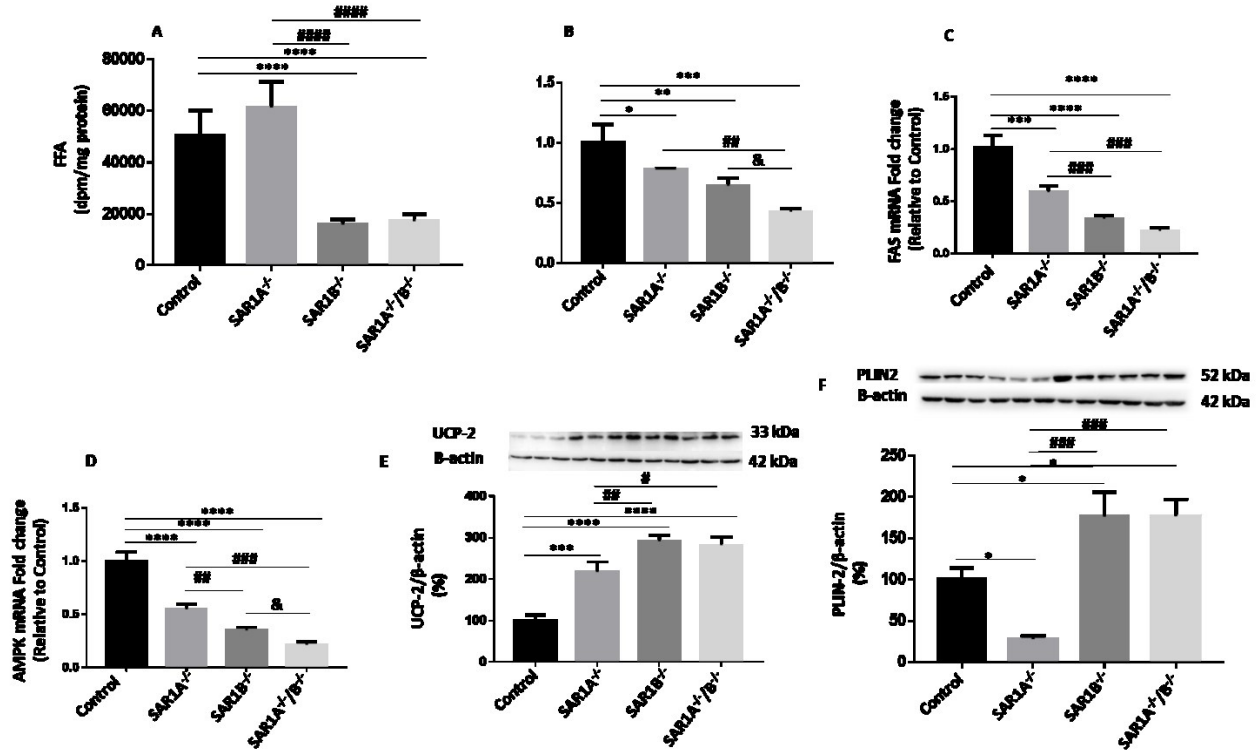


Figure 5 Impact of SAR1 impairment on FA synthesis, lipogenesis biomarkers and perilipin-2, a regulatory factor for lipophagy. Differentiated Caco-2/15 cells were pre-cultured overnight with fatty acid substrate as described in Methods. Cellular [¹⁴C]- FFAs were resolved by TLC. The area corresponding to FFAs was then counted for radioactivity and results expressed as DPM per mg of cell protein (A). Gene expression or protein content were evaluated for (B) ACC, (C) FAS, (D) AMPK, (E) UCP-2 and (F) PLIN2. Data are presented as averages ± SEM of at least two experiments in triplicates. *P<0.05, **P<0.01, ***P< 0.001, ****P<0.0001 vs. Controls; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001, ####P<0.0001 vs. SAR1A^{-/-}; &P<0.05 vs. SAR1B^{-/-}.

5.3.3 SUPPLEMENTARY DATA

Table 1: List of all primers used for qPCR analysis

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
<i>SAR1A</i>	TTGGGCTTTATGGACAGACC	TTGAGCACACTGCACATGAA
<i>SAR1B</i>	TGCAGGAAAAACAACATTGC	GGTCAGTTCTTCGGAAGTGG
<i>TNFα</i>	GACAAGCCTGTAGCCCATGT	TTATCTCTCAGCTCCACGCC
<i>CPT1a</i>	ATTATGCCATGGATCTGCTG	AGCGGAGCAGAGTGGAAATC
<i>ACC</i>	ACTTCGAGCACGCCAGGTTCT	TTCCGCCCATCCGCTGACAA
<i>AMPKα</i>	GACAGCCGAGAAGCAGAAAC	AGGATGCCTGAAAAGCTTGA
<i>FAS</i>	ATGGAGGAGGTGGTGATT	TGGCTTCATAGGTGACTTC
<i>GAPDH</i>	AGAAGGCTGGGGCTCATT	GGCCATCCACAGTCTTCT

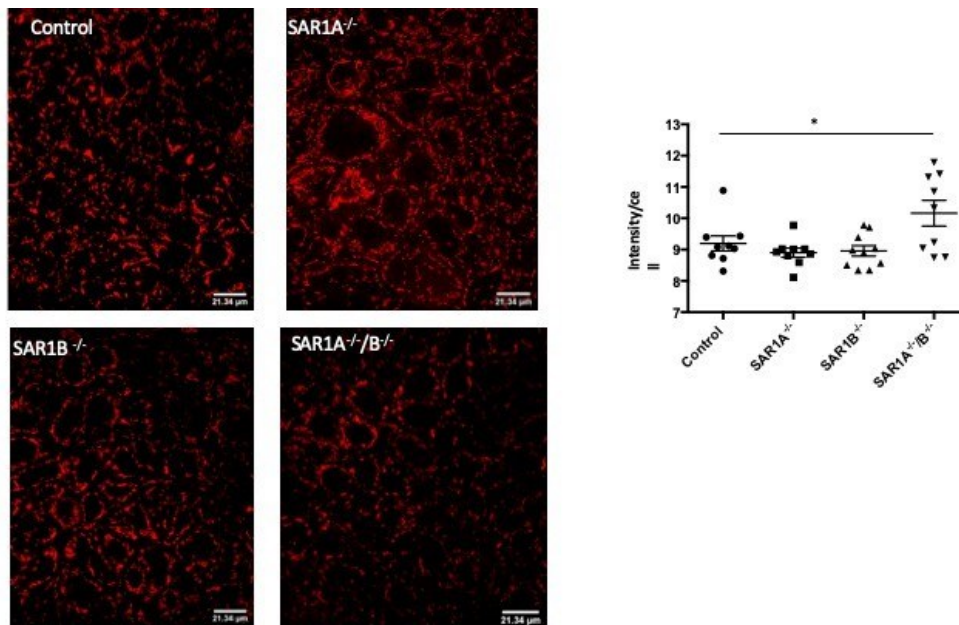


Figure S1: Mitochondrial morphology. The 3D-cell intensities were measured from z-stacks with image J Software and z-projections. The average intensity was calculated as described in Method section. Data are presented as averages \pm SEM of 10 cells/section. *P<0.05 vs. Controls.