



**HAL**  
open science

# Caractérisation du déficit en vitamine E et caroténoïdes chez les patients atteints d'hypobêtalipoprotéïnémies familiales

Claire Bordat

► **To cite this version:**

Claire Bordat. Caractérisation du déficit en vitamine E et caroténoïdes chez les patients atteints d'hypobêtalipoprotéïnémies familiales. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2022. Français. NNT : 2022LYO10194 . tel-04341891

**HAL Id: tel-04341891**

**<https://theses.hal.science/tel-04341891>**

Submitted on 13 Dec 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE CLAUDE BERNARD LYON 1

**Ecole Doctorale N°205  
Interdisciplinaire Sciences Santé**

**Discipline** : Biochimie

Soutenue publiquement le 06/12/2022, par :

**Claire BORDAT**

---

## **Caractérisation du déficit en vitamine E et caroténoïdes chez les patients atteints d'hypobétalipoprotéïnémies familiales**

---

Devant le jury composé de :

Creuzot-Garcher Catherine, Professeure des Universités - Praticien Hospitalier, Université Bourgogne Franche Comté	Rapporteure
Mas Emmanuel, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université Paul Sabatier Toulouse 3	Rapporteur
Hankard Régis, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Tours	Rapporteur
Kodjikian Laurent, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université Claude Bernard Lyon 1	Examineur
Lacaille Florence, Praticien Hospitalier, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris	Examinatrice
Michalski Marie-Caroline, Directrice de Recherche INRAE, Université Claude Bernard Lyon 1	Présidente
Peretti Noël, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université Claude Bernard Lyon 1	Directeur de thèse
Reboul Emmanuelle, Directrice de Recherche INRAE, Aix-Marseille Université	Co-Directrice de thèse

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

<b>Président de l'Université</b>	<b>M. François-Noël GILLY</b>
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Département Biologie	
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Département GEP	
Département Informatique	
Département Mathématiques	
Département Mécanique	
Département Physique	
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	
Polytech Lyon	
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	
Institut de Science Financière et d'Assurances	

# REMERCIEMENTS

---

Ce travail a été réalisé au sein des laboratoires CarMEN (Lyon) et C2VN (Marseille) dirigés le Dr Hubert Vidal et le Pr Marie-Christine Alessi, respectivement, que je remercie pour leur accueil chaleureux. Il a été encadré au sein de l'équipe « Do-IT » par le Pr Noël Peretti et au sein de l'équipe « micronutrition humaine » par le Dr Emmanuelle Reboul. Je remercie infiniment le Dr Emmanuelle Reboul pour sa confiance et pour m'avoir chaleureusement accompagné dans ce travail avec beaucoup de disponibilité, de patience et d'expertise. Je remercie également infiniment le Pr Noël Peretti pour avoir accepté de superviser l'intégralité de ce travail et pour m'avoir permis de le mener à bien durant ces années et je tiens à te remercier de façon plus personnelle pour l'immense soutien et la patience dont tu as fait preuve à mon égard. J'en serai éternellement reconnaissante.

Je tiens également à remercier les Pr Marie-Caroline Michalski pour son accueil au sein de l'équipe « Do-IT », ainsi que les Dr Sybil Charrière, le Dr Lioara Restier, le Dr Sarah Verrecchia et le Pr Laurent Kodjikian, sans qui la partie clinique de ce travail n'aurait pas été possible. Je remercie également le Dr Armelle Penhoat pour son accueil et son aide au sein du laboratoire CarMEN. Ce travail n'aurait pas été possible sans les techniciens du laboratoire C2VN Donato Vairo, Charlotte Halimi et Teresa Gonzales que je remercie chaleureusement pour leur aide et leur expertise et pour m'avoir transmis les connaissances techniques nécessaires à l'accomplissement de ce travail. Je tiens à remercier particulièrement Marion Nowicki, ancienne technicienne du C2VN, qui m'a chaleureusement accueillie, transmis son savoir et accompagnée durant les premiers temps de ce travail. Je souhaite également remercier Franck Peiretti, témoin de mes nombreux échecs et réussites techniques, qui m'a permis de progresser dans mon travail. Enfin, je remercie tout particulièrement le Dr Charlotte Cuerq pour son aide si précieuse tout au long de ce travail.

Je remercie les Pr Catherine Creuzot-Garcher, Emmanuel Mas et Regis Hankard d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Veuillez croire en mon plus profond respect. Je remercie également les Pr Marie-Caroline Michalski et Laurent Kodjikian, ainsi que le Dr Florance Lacaille pour avoir accepté de se constituer membres du jury.

Enfin, je remercie mon entourage, famille et amis, pour leur présence et leur bienveillance. Merci à mes parents pour leur soutien infailible. Et enfin, merci à toi Laurène, pour ton amitié et ton soutien (nous l'avons fait !).

## **Caractérisation du déficit en vitamine E et caroténoïdes chez les patients atteints d'hypobêtalipoprotéïnémies familiales**

Les hypobêtalipoprotéïnémies familiales sont un groupe hétérogène de pathologies héréditaires du métabolisme caractérisées par une hypocholestérolémie sévère, dues à un défaut d'assemblage et de sécrétion des lipoprotéines et un syndrome de malabsorption des lipides. Ces maladies nécessitent une prise en charge précoce associant un régime hypolipidique, et une vitaminothérapie substitutive à fortes doses, pour prévenir l'apparition des complications neuro-ophtalmiques. Or, malgré ce traitement, deux problématiques subsistent : les taux sériques de vitamine E ne sont jamais restaurés et la supplémentation en vitamine A ne permet pas de prévenir l'apparition d'une rétinite pigmentaire conduisant à une perte de la vision.

La compréhension des mécanismes d'absorption des nutriments liposolubles dans ces pathologies est essentielle afin de justifier un ajustement de la prise en charge des patients avec des formes galéniques plus efficaces et/ou des suppléments complémentaires en caroténoïdes. Pour cela l'étude de la biodisponibilité des formes galéniques de vitamine E selon la pathologie est un élément important pour pouvoir adapter au mieux le choix thérapeutique. De plus l'absence de modèle cellulaire d'entérocyte mimant la maladie est un obstacle majeur à cette meilleure compréhension mécanistique de l'absorption et donc à l'adaptation thérapeutique.

Pour ces raisons, notre première étude fondamentale avait pour but de comparer la biodisponibilité des différentes formes de vitamine E dans un modèle entérocytaire classiques (Caco-2). Dans un deuxième temps, nous avons développé un nouveau modèle cellulaire par invalidation des gènes responsables des FHBL, afin de tester in vitro l'absorption de ces différentes formes galéniques ainsi que l'absorption d'autres composés lipidiques d'intérêt : les caroténoïdes. Cette étude fondamentale est complétée par une étude clinique de corrélation entre le statut des patients en caroténoïdes et leur fonction ophtalmique.

Nos travaux montrent que l'absorption-sécrétion de vitamine E dans un modèle entérocytaire classiques (Caco-2) est plus importante avec le tocophérol sous forme libre, intermédiaire avec la forme acétate de tocophérol (TAC) et significativement plus faible sous la forme pégylée (TPGS) ( $p < 0,0001$ ). De plus, nous avons démontré pour la première fois que les cellules Caco-2 sécrètent au pôle basolatéral plusieurs formes de vitamine E lorsque le traitement est donné sous forme estérifiée (Cuerq et al. 2021). Deuxièmement, nous avons

créé de nouveaux modèles cellulaires d'entérocytes par invalidation CRISPR-Cas9 des gènes responsables de l'abêtalipoproténémie ou FHBL-SD1 (*MTTP*) et de la maladie de rétention des chylomicrons ou FHBL-SD2 (*SARIB*). Ces clones invalidés présentent une sécrétion réduite de cholestérol et de triglycérides, ainsi que de vitamine E sous ses différentes formes galéniques (article en révision). L'étude sur l'absorption des caroténoïdes dans ces clones montre une sécrétion basolatérale fortement altérée pour les quatre caroténoïdes étudiés (article en préparation). Enfin l'étude clinique est en cours et les résultats préliminaires confirment le statut déficitaire en caroténoïdes des patients FHBL.

En conclusion, notre travail apporte de nouvelles données fondamentales et cliniques permettant de mieux comprendre la physiopathologie de ces maladies génétiques rares, de développer de nouvelles hypothèses physiopathologiques et d'envisager de nouvelles perspectives thérapeutiques, et notamment des suppléments en caroténoïdes.

---

**Mots clés** : Caroténoïdes, Carotène, Lutéine, Zéaxanthine, Vitamines Liposolubles, A-Tocophérol, Chylomicron, Hypocholestérolémie Génétique, Hypobêtalipoprotéïnémie Familiale, Maladie De Rétention Des Chylomicrons, Abêtalipoprotéïnémie, Nutrition

---

## **Characterization of vitamin E and carotenoid deficiency in patients with familial hypobetalipoproteinemias**

Familial hypocholesterolemia, namely abetalipoproteinemia, hypobetalipoproteinemia and chylomicron retention disease, are rare genetic metabolic disorders characterized by defect in lipoprotein assembly and secretion and lipid malabsorption syndrome causing severe hypocholesterolemia. These diseases require early management with a low-fat diet and high dose vitamin replacement therapy to prevent the onset of neuro-ophthalmic complications. However, despite this treatment, two main issues remain: serum levels of vitamin E are never restored and vitamin A supplementation does not prevent the development of retinitis pigmentosa resulting in vision loss.

Understanding the mechanisms underlying fat-soluble nutrients absorption in these diseases is essential to justify adjusting patient management with more effective galenic forms and/or complementary carotenoid supplements. Consequently, studying vitamin E galenic forms bioavailability in the pathologic context is a crucial aspect to best adapt the therapeutic choice. Furthermore, the lack of an enterocyte cell model mimicking the disease is a major obstacle to a better understanding of absorption and thus to therapeutic adaptation.

In this regard, our first fundamental study aimed to comparing different forms of vitamin E bioavailability in a common enterocyte model (Caco-2). In a second phase, we developed a new cellular model by invalidating the genes responsible for FHBL, in order to study the absorption of these different galenic forms and the hypothesis of a role of carotenoid deficiency in these diseases. This fundamental study is completed by a clinical study of the correlation between the patients plasma carotenoid levels and their eye health.

Our work shows that absorption-secretion of vitamin E in a classic model of enterocytes (Caco-2) is higher with free tocopherol, intermediate with tocopherol acetate (TAC) and significantly lower with pegylated form (TPGS) ( $p < 0.0001$ ). In addition, we demonstrated for the first time that Caco-2 cells secrete multiple forms of vitamin E at the basolateral pole when given the pegylated form (Cuerq et al. 2021). Secondly, we have created a novel enterocyte cell model of abetalipoproteinemia or FHBL-SD1 (MTTP) and chylomicron retention disease or FHBL-SD2 (*SARIB*) by CRISPR-Cas9 genes invalidation. These cells displayed a reduced cholesterol and triglycerides secretion as well as vitamin E in its different galenic forms (submitted paper). The study on the carotenoids absorption in these original models also indicates a strongly altered basolateral secretion regarding the four carotenoids

studied (article in preparation). Finally, the clinical study, still in progress, confirms, with the preliminary results, the carotenoid deficiency status of FHBL patients.

In conclusion, our work brings new fundamental and clinical data to better understand the pathophysiology of these rare genetic diseases, to develop new pathophysiological hypotheses and to consider new therapeutic perspectives by considering the hypothesis of a carotenoid deficiency.

---

Keywords : Carotenoids, Carotene, Lutein, Zeaxanthin, Fat-soluble vitamins, A-Tocopherol, Chylomicron, Genetic hypocholesterolemia, Familial Hypobetalipoproteinemia, Chylomicron Retention Disease, Abetalipoproteinemia, Nutrition

---

### **Intitulé et adresses des laboratoires de recherche**

Laboratoire CarMeN, INSERM U1060, INRAE, Université Claude Bernard Lyon-1,  
Hôpital Lyon Sud Secteur 2  
Bâtiment CENS ELI-2D  
165, chemin du grand Revoyet  
69310 Pierre Bénite

C2VN, INRAE, INSERM, C2VN, Aix-Marseille Université  
Faculté des Sciences Médicales et Paramédicales :  
27, boulevard Jean Moulin  
13005 Marseille



## Articles publiés :

- Comparison of  $\alpha$ -Tocopherol,  $\alpha$ -Tocopherol Acetate, and  $\alpha$ -Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate 1000 Absorption by Caco-2 TC7 Intestinal Cells. Cuerq C, **Bordat C**, Halimi C, Blond E, Nowicki M, Peretti N, Reboul E. *Nutrients*. 2020 Dec 31;13(1):129. doi: 10.3390/nu13010129. PMID: 33396478; PMCID: PMC7823802.
- Lipids Responsible for Intestinal or Hepatic Disorder: When to Suspect a Familial Intestinal Hypocholesterolemia? Sissaoui S, Cochet M, Poinot P, **Bordat C**, Collardeau-Frachon S, Lachaux A, Lacaille F, Peretti N. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2021 Jul 1;73(1):4-8. doi: 10.1097/MPG.0000000000003145. PMID: 33853111.

## Articles soumis :

- Validation of *MTTP*- or *SARIB*-knock-out Caco-2 TC7 cells as models of enterocytes of patients with familial genetic hypobetalipoproteinemias. **Bordat Vairo C**, Cuerq C, Halimi C, Peiretti F, Penhoat A, Vieille-Marchiset A, Gonzales T, Michalski MC, Nowicki M, Peretti N, Reboul E (Nutrients, corrections soumises).
- Alvarado K, Bordat C and Reboul E (2022). Egg carotenoid and eye health. Dans « Handbook of Egg Science and Technology » édité par Yoshinori Mine, Hajime Hatta, Vincent Guyonnet, Françoise Nau, and Ning Qu (Taylor & Francis Group, LLC).

## Communications orales :

- **Bordat C**, Xie Y, Davidson NO, Nowicki M, Halimi C, Peretti N, Reboul E. : Utilisation de deux modèles expérimentaux pour l'étude du métabolisme intestinal de la vitamine E et des lipides dans les hypocholestérolémies primaires intestinales : souris *Mttp*-iKO et cellules Caco-2 / TC7 *MTTP* ou *SARIB*-KO. **Journée de l'EDISS (10.10.2019, Lyon, France)**.
- **Bordat C**, Nowicki M, Halimi C, Peretti N, Reboul E. : Impairment of Vitamin E intestinal secretion in primary hypobetalipoproteinemias : mechanistic studies in a cell models. **41st Congress on Clinical Nutrition & Metabolism (ESPEN), (27.09.2020, Lyon, France)**.
- **Bordat C**, Vairo C, Cuerq C, Halimi C, Peiretti F, Penhoat A, Michalski MC, Nowicki M, Peretti N, Reboul E. Altération de la sécrétion intestinale de quatre caroténoïdes dans les hypobétalipoprotéïnémies primaires : études sur un modèle cellulaire. **22ème journée scientifique de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL), (04.07.2022, Avignon, France)**.

## Communications affichées commentées :

- **Bordat C**, Xie Y, Davidson NO, Nowicki M, Halimi C, Peretti N, Reboul E. : Utilisation de deux modèles expérimentaux pour l'étude du métabolisme intestinal de la vitamine E et des lipides dans les hypocholestérolémies génétiques : souris Mttp-iKO et cellules Caco-2 / TC7 *MTTP* ou *SARIB*-KO. **Journées Francophones de Nutrition**, (27-29.11.2019, Rennes, France).
- **Bordat C**, Nowicki M, Halimi C, Peretti N, Reboul E. : Impairment of Vitamin E intestinal secretion in primary hypobetalipoproteinemias : mechanistic studies in a cell models. **European Conference on Rare Diseases & Orphan Products (ECRD)**, (14-16.05.2020, Numérique).
- **Bordat C**, Nowicki M, Halimi C, Peretti N, Reboul E. : Impairment of Vitamin E intestinal secretion in primary hypobetalipoproteinemias : mechanistic studies in a cell models. **6th World Congress of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (WCPGHN)**, (04-06.06.2020, Numérique).
- **Bordat C**, Halimi C, Vairo D, Peretti N, Reboul E. : Carotenoids and Vitamin E intestinal secretion is impaired in primary hypobetalipoproteinemias: mechanistic studies in a cell model. **42ème Congrès du Groupe Francophone d'Hépatologie-Gastroentérologie et Nutrition Pédiatriques (GFHGNP)**, (23-25.09.2021, Carcassonne, France).
- **Bordat C**, Halimi C, Vairo D, Peretti N, Reboul E. : Altération de la sécrétion des caroténoïdes dans des modèles cellulaires d'hypocholestérolémies génétiques. **Journées Francophones de Nutrition**, (10-12.11.2021, Lille, France).

## Autres travaux :

- Participation à la rédaction du Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS) des hypocholestérolémies génétiques avec la haute Autorité de santé (HAS) :

[https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3272490/fr/hypocholesterolemies-genetiques-intestinales](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3272490/fr/hypocholesterolemies-genetiques-intestinales)

# TABLE DES MATIERES

<b>CARACTERISATION DU DEFICIT EN VITAMINE E ET CAROTENOÏDES CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS D'HYPOBETALIPOPROTEINEMIES FAMILIALES .....</b>	<b>4</b>
<b>CHARACTERIZATION OF VITAMIN E AND CAROTENOID DEFICIENCY IN PATIENTS WITH FAMILIAL HYPOBETALIPOPROTEINEMIAS .....</b>	<b>6</b>
<b>ARTICLES PUBLIES : .....</b>	<b>8</b>
<b>ARTICLES SOUMIS : .....</b>	<b>8</b>
<b>COMMUNICATIONS ORALES : .....</b>	<b>8</b>
<b>COMMUNICATIONS AFFICHEES COMMENTEES : .....</b>	<b>9</b>
<b>I. INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>19</b>
1.1. RAPPEL SUR LA SECRETION DES LIPIDES PAR LA CELLULE INTESTINALE.....	22
1.1.1. <i>Les chylomicrons</i> .....	22
1.1.2. <i>Les lipoprotéines de haute densité (High-Density Lipoprotein ou HDL)</i> .....	36
1.2. L'ABETALIPOPROTEINEMIE (ABL) OU HYPOCHOLESTEROLEMIE FAMILIALE DUE A UN DEFAUT D'ASSEMBLAGE DES LIPOPROTEINES 1 (FHBL-SD1).....	39
1.2.1. <i>Histoire de la maladie</i> .....	39
1.2.2. <i>Symptomatologie clinique</i> .....	41
1.3. LA MALADIE DE RETENTION DES CHYLOMICRONS (CMRD) OU HYPOCHOLESTEROLEMIE FAMILIALE DUE A UN DEFAUT D'ASSEMBLAGE DES LIPOPROTEINES 3 (FHBL-SD3) .....	49
1.3.1. <i>Histoire de la maladie</i> .....	49
1.3.2. <i>Les mutations possibles de la protéine Sar1b</i> .....	50
1.3.3. <i>Symptomatologie clinique</i> .....	51
1.4. L'HYPOBETALIPOPROTEINEMIE FAMILIALE OU HYPOCHOLESTEROLEMIE FAMILIALE DUE A UN DEFAUT D'ASSEMBLAGE DES LIPOPROTEINES 2 (FHBL-SD2) .....	55
1.5. BILAN BIOLOGIQUE DES FHBL .....	57
1.5.1. <i>Le bilan lipidique</i> .....	57
1.5.2. <i>Le bilan vitaminique</i> .....	58
1.6. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES FHBL.....	59
1.7. LA VITAMINE E.....	64
1.7.1. <i>Généralités</i> .....	64
1.7.2. <i>Structure</i> .....	65
1.7.3. <i>Besoins et apports en vitamine E</i> .....	67
1.7.4. <i>Rôles de la vitamine E</i> .....	70
1.8. LES CAROTENOÏDES.....	76
1.8.1. <i>Introduction</i> .....	76

1.8.2.	Caractéristiques chimiques.....	77
1.8.3.	Sources alimentaires .....	84
1.8.4.	Fonctions des caroténoïdes .....	88
1.9.	SECRETION ET METABOLISME DE LA VITAMINE E ET DES CAROTENOÏDES .....	105
1.9.1.	Absorption par l'entérocyte.....	106
1.9.2.	Transport et métabolismes de la vitamine E et des caroténoïdes dans l'entérocyte .....	112
1.9.3.	Sécrétion.....	113
1.9.4.	Métabolisme post-intestinal des lipoprotéines .....	115
<b>II.</b>	<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>123</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>126</b>
3.1.	MATERIELS .....	126
3.2.	CULTURE CELLULAIRE .....	127
3.3.	INVALIDATION DES GENES <i>MTTP</i> ET <i>SAR1B</i> DANS LES CELLULES CACO-2/TC7 .....	129
3.4.	CARACTERISATION DES MODELES INVALIDES .....	132
3.5.	EXPERIENCES D'ABSORPTION DES LIPIDES ET DES MICRONUTRIMENTS LIPOSOLUBLES.....	136
3.5.1.	Les micelles mixtes synthétiques.....	136
3.5.2.	Expériences d'absorption des lipides, des caroténoïdes et de la vitamine E .....	137
3.5.3.	Dosage du cholestérol et des triglycérides dans le milieu basolatéral .....	137
3.5.4.	Analyses de la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) et ses dérivés ainsi que des caroténoïdes par chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	138
3.6.	STATISTIQUES.....	139
<b>IV.</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>141</b>
4.1.	ETUDE 1 : MESURE IN VITRO DE L'ABSORPTION SECRETION DE DIFFERENTES FORMES GALENIQUES DE VITAMINE E....	141
4.1.1.	Introduction.....	141
4.1.2.	Article : « Comparison of $\alpha$ -Tocopherol, $\alpha$ -Tocopherol Acetate, and $\alpha$ -Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate 1000 Absorption by Caco-2 TC7 Intestinal Cells. Cuerq C, Bordat C, Halimi C, Blond E, Nowicki M, Peretti N, Reboul E. <i>Nutrients</i> . 2020 Dec 31;13(1):129 ».....	141
4.1.3.	Principaux résultats et discussion.....	154
4.2.	ETUDE 2 : CREATION ET VALIDATIONS DE CLONES MUTES PAR LA TECHNIQUE CRISPR/CAS9 .....	156
4.2.1.	Article : « Validation of <i>MTTP</i> - or <i>SAR1B</i> -knock-out Caco-2 TC7 cells as models of enterocytes of patients with familial genetic hypobetalipoproteinemias. <b>Claire Bordat</b> , Donato Vairo, Charlotte Cuerq, Charlotte Halimi, Franck Peiretti, Armelle Penhoat, Marie-Caroline Michalski, Marion Nowicki, Noël Peretti, Emmanuelle Reboul1 (JLR, corrections soumises) ».....	157
4.2.2.	Principaux résultats et discussion.....	184
4.3.	ETUDE 3 : ETUDE DE L'ABSORPTION-SECRETION DES CAROTENOÏDES DANS LES MODELES VALIDES .....	188
4.3.1.	Introduction.....	188

4.3.2.	<i>Résultats</i> .....	188
4.3.1.	<i>Discussion</i> .....	193
4.4.	CARACTERISATION DE LA DENSITE DU PIGMENT MACULAIRE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS D'HYPOCHOLESTEROLEMIES PRIMAIRES INTESTINALES EN LIEN AVEC LEUR STATUT EN CAROTENOÏDES ET ANTI-OXYDANT : ETUDE CACo (CAROTENOID IN HYPOCHOLESTEROLEMIA).....	194
4.4.1.	<i>Présentation de l'étude</i> .....	194
4.4.2.	<i>Avancées de l'étude</i> .....	196
<b>V.</b>	<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>197</b>
5.1.	CREATION DES MODELES.....	197
5.2.	DES RESULTATS INNOVANTS.....	201
5.3.	PERSPECTIVES.....	204
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>206</b>
	<b>ANNEXES</b> .....	<b>254</b>
1.	<b>ANNEXE 1. TABLEAU DES PRINCIPALES MUTATIONS DE <i>MTTP</i> IDENTIFIEES DANS LA FHBL-SD1 ET LEURS CONSEQUENCES SUR LA PROTEINE MTP, D'APRES (RODRIGUEZ GUTIERREZ ET AL. 2021).</b> .....	<b>255</b>
2.	<b>ANNEXE 2. TABLEAU PRESENTANT LES PRINCIPAUX SYMPTOMES DE LA FHBL-SD1 ET LEURS FREQUENCES D'APRES UNE REVUE DE LA LITTERATURE</b> .....	<b>259</b>
3.	<b>ANNEXE 3. PRINCIPALES MUTATIONS DE <i>SAR1B</i> PUBLIEES ET LEURS CONSEQUENCES SUR LA PROTEINE SAR1B-GTPASE D'APRES UNE REVUE DE LA LITTERATURE.</b> .....	<b>265</b>
4.	<b>ANNEXE 4. TABLEAU PRESENTANT LES PRINCIPAUX SYMPTOMES DE LA FHBL-SD3 ET LEURS FREQUENCES D'APRES UNE REVUE DE LA LITTERATURE.</b> .....	<b>266</b>
5.	<b>ANNEXE 5. BILANS VITAMINIQUES PLASMATIQUES DES CAS DE FHBL RECENSES DANS LA LITTERATURE.</b> <b>268</b>	
6.	<b>ANNEXE 6. ETUDES INTERVENTIONNELLES EVALUANT L'EFFET ANTIOXYDANT DES CAROTENOÏDES D'APRES UNE REVUE DE LA LITTERATURE.</b> .....	<b>272</b>
7.	<b>ANNEXE 7. ETUDES OBSERVATIONNELLES SUR LE LIEN ENTRE LES APPORTS EN CAROTENOÏDES ET LA FONCTION OPHTALMIQUE D'APRES UNE REVUE DE LA LITTERATURE.</b> .....	<b>274</b>
8.	<b>ANNEXE 8. ETUDES INTERVENTIONNELLES DE L'IMPACT D'UNE SUPPLEMENTATION EN CAROTENOÏDES SUR LA FONCTION OPHTALMIQUE D'APRES UNE REVUE DE LA LITTERATURE</b> .....	<b>277</b>
9.	<b>ANNEXE 9. PROTOCOLE ET DOSSIER CPP ETUDE CLINIQUE « CARACTERISATION DE LA DENSITE DU PIGMENT MACULAIRE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS D'HYPOCHOLESTEROLEMIES PRIMAIRES INTESTINALES EN LIEN AVEC LEUR STATUT EN CAROTENOÏDES ET ANTI-OXYDANT : ETUDE CACO (CAROTENOID IN HYPOCHOLESTEROLEMIA) ».</b> .....	<b>283</b>

1.	INFORMATIONS GENERALES .....	285
2.	<i>Justification scientifique</i> .....	288
3.	<i>Objectifs de la recherche</i> .....	291
4.	<i>Conception de la recherche</i> .....	291
5.	<i>Organisation générale</i> .....	294
6.	<i>Evaluation de la sécurité</i> .....	299
7.	<i>Aspects statistiques</i> .....	299
8.	<i>Droits d'accès aux données et documents sources</i> .....	301
9.	<i>Contrôle et assurance de la qualité</i> .....	301
10.	<i>Considérations éthiques</i> .....	302
11.	<i>Gestion et conservation des données</i> .....	303
12.	<i>Règles relatives à la publication</i> .....	305
13.	<i>Références bibliographiques citées dans le protocole clinique</i> .....	305
14.	<i>Liste des annexes du protocole</i> .....	307

## **LISTE DES FIGURES**

---

<b>Figure 1.</b> Structure de la protéine MTP. ....	27
<b>Figure 2.</b> Structure de la protéine Sar1b.....	32
<b>Figure 3.</b> Formation de vésicules de transport intracellulaire.. ....	34
<b>Figure 4.</b> Formation intra entérocytaire des chylomicrons.....	36
<b>Figure 5.</b> Acanthocytose caractéristique de la FHBL-SD1.....	<b>43</b>
<b>Figure 6.</b> Microscopie optique montrant la vacuolisation des entérocytes et microscopie électronique montrant des gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des entérocytes. ....	44
<b>Figure 7.</b> Photographies du fond de l'œil montrant un aspect dystrophique de la rétine .....	48
<b>Figure 8.</b> Acanthocytose observée chez un garçon de 6 mois atteint de FHBL-SD1 (Lesesve et al. 2009). ....	55
<b>Figure 9.</b> Structures chimiques des (A) quatre tocophérols et des (B) quatre tocotriénols. ....	67
<b>Figure 10.</b> Transport de la vitamine E entre les astrocytes et les neurones. ....	76
<b>Figure 11.</b> Structures du $\beta$ -carotène et de l' $\alpha$ -carotène .....	81
<b>Figure 12.</b> Structures de la lutéine et de la zéaxanthine.....	82
<b>Figure 13.</b> Image de la région maculaire de la rétine du singe macaque en microscopie optique.. ....	95
<b>Figure 14.</b> Absorption des lipides au niveau entérocytaire.....	111
<b>Figure 15.</b> Schéma du système de culture sur insert avec membrane semi-perméable.....	128

## **LISTE DES TABLEAUX**

---

<b>Tableau 1.</b> Principales caractéristiques cliniques des hypocholestérolémies familiales d'origine intestinale d'après PNDS « hypocholestérolémies génétiques » (Haute Autorité De Santé 2021).....	20
<b>Tableau 2.</b> Synthèse clinico-biologique des bêta-hypocholestérolémies (LDL-C et Cholestérol total d'après le PNDS « hypocholestérolémies génétiques » (Haute Autorité De Santé 2021). .....	21
<b>Tableau 3.</b> Proposition de suivi clinique, biologique et para-clinique des patients FHBL-SD1, d'après Bredefeld et al. (2021) .....	63
<b>Tableau 4.</b> Teneurs en $\alpha$ -tocophérols (mg/100g), en tocophérols et tocotriénols totaux (mg/100g), formes majoritaires et pouvoir vitaminique E de certaines huiles végétales et matières grasses .....	69
<b>Tableau 5.</b> Conséquences cliniques de la carence en vitamine E en fonction du type de pathologie (d'après Sokol 1988).....	73
<b>Tableau 6.</b> Classification des caroténoïdes d'après (Rodriguez-Amaya 2001).....	80
<b>Tableau 7.</b> Principales sources des caroténoïdes ( $\mu$ g/100 g) dans le régime occidental.....	86
<b>Tableau 8.</b> Séquences d'ADN cibles et séquences des gRNA utilisés dans les expériences de transfection par CRISPR/Cas9 .....	126
<b>Tableau 9.</b> Séquences d'ADN cibles et séquences des gRNA utilisés dans les expériences de transfection par CRISPR/Cas9 .....	129
<b>Tableau 10.</b> Amorces génomique utilisés dans l'expérience CRIPSR/Cas9 et pour le séquençage.....	130
<b>Tableau 11.</b> Amorces utilisées dans les expériences de RT-qPCR.....	134
<b>Tableau 12.</b> Composition lipidique des micelles mixtes .....	137



## ABBREVIATION

---

AA : Acide Aminé  
ABC : ATP-binding Cassette  
ABCB1 : ATP-binding cassette transporter B1  
ABCG5/G8 : ATP-binding cassette transporter G5/G8  
ABL : Abêtalipoproteinémie  
ACAT : Acyl-CoA cholesterol acyltransferase  
AG : Acides Gras  
AGE : Acides Gras Essentiels  
AGPI : Acides Gras Polyinsaturés  
ALAT : Alanine Aminotransférase  
ANC : Apports nutritionnels conseillés  
ANGPTL3 : Angiopoietin-like protein 3  
ANSES : Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail  
Apo : Apolipoprotéine  
APOBEC1 : Apo B mRNA-editing catalytic subunit-1  
ASAT : Aspartate Aminotransférase  
ATP : Adénosine Triphosphate  
AVED : Ataxia with isolated Vitamin E Deficiency (Ataxie avec déficience isolée en vitamine E)  
ARC : Age-Related Cataract (cataracte sénile)  
Cas9 : CRISPR associated protein 9  
CD36 : Cluster Determinant 36  
CEH : Carboxylester hydrolase  
CETP : Cholesteryl Ester Transfer Protein (Protéine de transfert des esters de cholestérol)  
CMRD : Chylomicron Retention Disease (Maladie de Rétention des Chylomicrons)  
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats  
DGAT : Diacylglycérol O-Acyltransférase  
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium  
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid (acide éthylène diamine tétra acétique)  
FABP : Fatty Acid Binding Protein (Protéines de liaison aux acides gras)  
FATP : Fatty acid transport protein (Protéine de transport des acides gras)  
FHBL : Hypobêtalipoproteinémie Familiale  
GDP : Guanosine Diphosphate  
GTP : Guanosine Triphosphate  
HBL: Hypobêtalipoproteinémie  
HDL : High-Density Lipoprotein (Lipoprotéine de haute densité)  
HPLC : High Performance Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide haute performance)  
HSPG : Protéoglycanes à Héparane Sulfate (Héparane Sulfate Proteoglycan)  
INR : International Normalized Ratio  
LCAT : Lécithine-Cholestérol Acyltransférase  
LDL : Low-Density Lipoprotein (Lipoprotéine de basse densité)  
LDLR : LDL receptor (Récepteur aux LDL)  
LPL : Lipoprotéine Lipase  
LRAT : Lécithine Rétinol Acyltransférase  
LRP1 : Lipoprotein Receptor-related Protein 1  
MAG : Monoacylglycérol  
MTP : Microsomal Triglyceride Transfer Protein (protéine)  
MTTP : Microsomal Triglyceride Transfer Protein (gène)  
NPC1L1 : Niemann-Pick C1 like 1  
PAL : Phosphatases Alcalines

TAG : Triacylglycérol  
TG : Triglycérides  
PBS : Phosphate-buffered saline (Tampon phosphate salin)  
PC : Phosphatidylcholine  
PCSK9 : Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9  
PCTV : Pre-Chylomicron Transport Vesicle (Vésicule de transport des pré-chylomicrons)  
PDI : Protein disulfide isomerase  
PEG : Polyéthyléneglycol  
RE : Réticulum endoplasmique  
SAR1B : Secretion Associated, Ras Related GTPase 1B  
SNC : Système Nerveux Central  
SR-BI : Scavenger Receptor Classe B type I (Récepteur Scavenger Classe B de type I)  
Syndecan-1 HSPG : Syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan  
SVF : Sérum de Veau Fœtal  
TAC : Acétate de tocophérol  
TAP : Tocopherol associated protein (Protéine associée au tocopherol)  
TPGS : Tocophéryl polyéthylène glycol 1000  
VLDL : Very Low-Density Lipoprotein (Lipoprotéine de très basse densité)  
 $\alpha$ -TTP :  $\alpha$ -tocopherol transfert protein (protéine de transfert de l' $\alpha$ -tocophérol)

*“La vie est courte, l'art est long, l'occasion fugitive, l'expérience trompeuse, le jugement difficile.” ~ HIPPOCRATE*

*A mes parents, à Jean et à Oscar*

# I. Introduction générale

Les hypobétalipoprotéïnémies familiales (HBL) ou hypocholestérolémies primaires sont des maladies génétiques rares caractérisées par une altération ou une diminution de la fonction des lipoprotéines à apolipoprotéines B (apoB). Ces pathologies sont définies par des concentrations plasmatiques en cholestérol total, en LDL-cholestérol (LDL-C) et en apolipoprotéine B (apoB) inférieures au 5<sup>ème</sup> percentile de la population pour l'âge et le sexe.

Les HBL monogéniques sont majoritairement causées par des mutations sur des gènes connus et identifiés (*APOB*, *PCSK9*, *ANGPTL3*, *MTTP*, *SAR1B*). On peut regrouper ces pathologies en deux catégories distinctes. D'une part on trouve les HBL moins sévères, de transmission dominante, liées à une augmentation du catabolisme des lipoprotéines : les hypolipidémies combinées familiales (FHBL-EC, EC pour « enhanced catabolism ») dues à des mutations hétérozygotes sur le gène *ANGPTL3* codant pour la protéine « angiopoïétin-like 3 » qui inhibe la lipoprotéine lipase (FHBL-EC1) ou le gène *PCSK9* codant pour la proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9, impliquée dans la dégradation des récepteurs cellulaires aux LDL (FHBL-EC2). D'autre part, on trouve trois maladies rares, récessives ou codominantes, dont les complications sont souvent sévères, liées à un défaut d'assemblage ou de sécrétion des lipoprotéines : l'abétalipoprotéïnémie [ABL ou FHBL-SD1, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) 200100], l'hypobétalipoprotéïnémie familiale (FHBL ou FHBL-SD2), et la maladie de rétention des chylomicrons [CMRD ou FHBL-SD3, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) 246700] dues à des mutations dans les gènes *APOB*, *MTTP* et *SAR1B*, respectivement. Depuis 2019, une révision de la classification et de la dénomination de ces maladies a été publiée, ainsi l'abétalipoprotéïnémie sera désignée par l'acronyme FHBL-SD1 et la maladie de rétention des chylomicrons sera désignée par l'acronyme FHBL-SD3 (Bredfeldt et al. 2021). Dans la suite de ce travail, seules la FHBL-SD1 et la FHBL-SD3 seront développées car ce sont ces pathologies qui servent de modèles d'étude pour l'ensemble des hypocholestérolémies primaires. Ces troubles sont caractérisés par l'absence d'assemblage ou de sécrétion de lipoprotéines à apoB par le foie et / ou l'intestin. Bien que la FHBL-SD2 ne soit pas détaillée, une petite partie lui est dédiée et elle est mentionnée dans certains tableaux, afin de permettre une comparaison avec la FHBL-SD1 et la FHBL-SD3 pouvant servir à la compréhension du propos.

Le tableau 1 résume les principales atteintes cliniques des 3 principales maladies rares concernées, et le tableau 2 présente la synthèse clinico biologique générale des hypocholestérolémies génétiques intestinales.

	<b>FHBL-SD1</b>	<b>FHBL-SD2 Biallélique (homozygote)</b>	<b>FHBL1-SD2 hétérozygote</b>	<b>FHBL-SD3</b>
<b>OMIM</b>	20100	615558		246700
<b>Gène muté</b>	<i>MTTP</i>	<i>APOB</i>		<i>SAR1B</i>
<b>Transmission</b>	AR	AD		AR
<b>Conséquences</b>	Absence de lipidation d'ApoB. Dégradation précoce d'ApoB,  Absence de pré-chylomicrons et de VLDL	ApoB tronquée ApoB dysfonctionnelle  Réduction ou absence de VLDL ± de chylomicrons	Réduction de VLDL ± de chylomicrons	Défaut transfert au Golgi  Rétention des chylomicrons dans entérocyte. Synthèse de VLDL possible
<b>Clinique</b>				
Age de début	Néonatal	Néonatal*	Asymptomatique	Néonatal
Diarrhée	+++	+++*	-	+++
Vomissements	+++	+++*	-	+++
Dénutrition	++	++*	-	++
<b>Complications</b>				
Rétinopathie	+++	+++*	-	+
Myopathie	+++	+++*	±	+
Neuropathie	+++	+++*	±	+
Cardiomyopathie	++	++	-	±
Stéatose hépatique	++	++	++	+

Tableau 1. Principales caractéristiques cliniques des hypocholestérolémies familiales d'origine intestinale d'après PNDS « hypocholestérolémies génétiques » (Haute Autorité De Santé 2021).

*Légende* : AD : Autosomique Dominant, AR : Autosomique Récessif, - : absence de signe, + : rare ou minime, ++ : fréquent ou modéré, +++ : très fréquent ou intense ; \*symptomatique si taille de l'apoB tronquée < 30%, biallélique, c'est-à-dire homozygote ou hétérozygote composite (sinon, découverte fortuite possible).

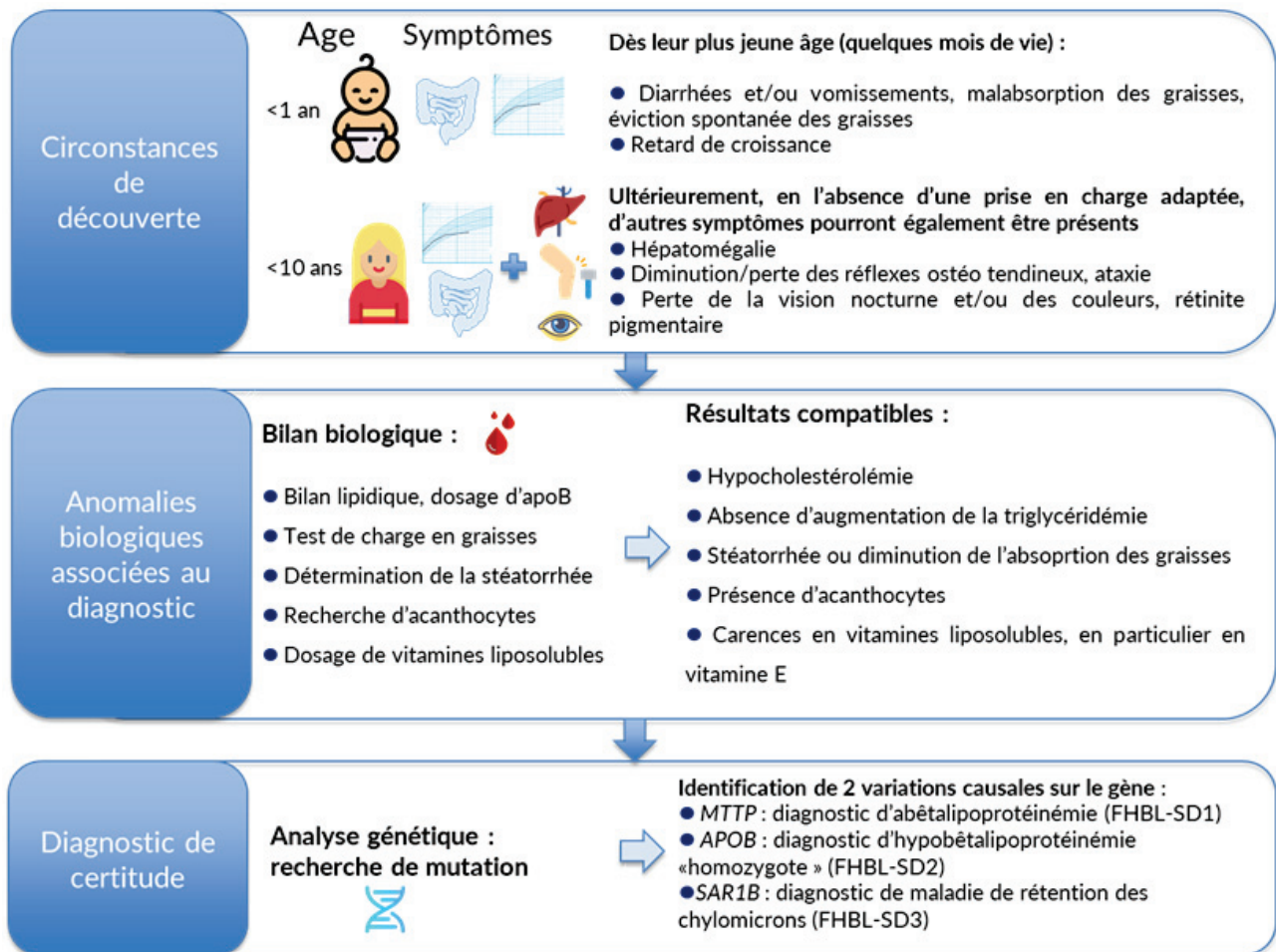


Tableau 2. Synthèse clinico-biologique des bêta-hypocholestérolémies (LDL-C et Cholestérol total d'après le PNDS « hypocholestérolémies génétiques » (Haute Autorité De Santé 2021).

## 1.1. Rappel sur la sécrétion des lipides par la cellule intestinale

La digestion des aliments est un processus complexe permettant de couvrir les besoins énergétiques (macronutriments) et les besoins nutritionnels spécifiques (micronutriments) afin de maintenir l'homéostasie de l'organisme. Ces processus digestifs et absorbifs sont plus complexes pour les lipides comparés aux glucides et aux protéines, plus solubles. Ils nécessitent trois étapes distinctes : 1) la digestion, 2) l'absorption intestinale et 3) l'assemblage sous forme de lipoprotéines intestinales permettant leur exocytose dans la circulation sanguine vers les organes cibles. Ainsi, à l'issue de leur digestion, les lipides sont absorbés par l'entérocyte, puis sécrétés à son pôle basolatéral via deux grandes classes de lipoprotéines : les chylomicrons, largement majoritaires, également appelés lipoprotéines à apolipoprotéine B (apoB), et les lipoprotéines à haute densité (ou HDL pour « High-Density Lipoprotein »).

### 1.1.1. Les chylomicrons

Les chylomicrons sont, du fait de leur grande richesse en lipides très hydrophobes, les plus grosses et les moins denses des lipoprotéines avec un diamètre de 75 à 450 nm et une densité inférieure à 0,93 g/ml. En effet, leur cœur hydrophobe contient près de 90% de TAG et d'esters de cholestérol entourés d'une surface amphiphile constituée de phospholipides, de cholestérol non estérifié, et surtout d'apolipoprotéines (apo) telles que : apoB-48, apoA-I, apoA-IV, apoC-II et apoC-III. L'apoB-48 constitue la protéine structurale essentielle des chylomicrons (Hussain et al. 1996). La synthèse des chylomicrons est un processus séquentiel complexe qui s'initie dans le réticulum endoplasmique pour se terminer par une maturation finale au sein de l'appareil de Golgi avant sécrétion basolatérale.

#### 1.1.1.1. Initiation de l'assemblage des lipoprotéines sur la membrane du RE

Tout d'abord, puisque chaque chylomicron contient une unique copie d'apoB-48 qui permet de le structurer, l'assemblage commence par la synthèse de cette protéine dans le réticulum endoplasmique rugueux. Lorsque l'apoB-48 est synthétisée et transloquée à travers la membrane du réticulum endoplasmique, elle est « lipidée » par translocation d'une quantité minimale de lipides afin de former une particule dense et riche en phospholipides, dite

« primitive ». Ces lipoprotéines primitives sont des particules de haute densité constituées d'une monocouche de phospholipides structurés autour de l'apoB-48 renfermant des phospholipides, du cholestérol et de faibles quantités d'ester de cholestérol et de TAG (Levy et al. 2002; Rava et al. 2006). Il semblerait que l'ajout de phospholipides au niveau des sites de nucléation de l'apoB naissante peut se faire par deux mécanismes. En effet ce transfert peut se faire via la protéine MTP principalement ou via la protéine PLTP (Phospholipid Transfer Protein). Le premier mécanisme semble suffisant pour l'assemblage des lipoprotéines à apoB, puisque des études ont montré, *in vitro* et dans le foie, que l'activité de transfert des phospholipides de la MTP est suffisante pour l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines (Sellers et al. 2003; Rava et al. 2006; Khatun et al. 2012). La PLTP peut également transférer les phospholipides vers les sites de nucléation et aider à prévenir la dégradation de l'Apo-B. En effet, chez la souris, une déficience en PLTP est associée à une baisse de production des lipoprotéines à apoB (Liu et al. 2007). Cependant, la PLTP est incapable de soutenir l'assemblage des lipoprotéines à apoB en l'absence de MTP (Xie et al. 2013). Une fois suffisamment chargée en PLs, les pré- chylomicrons en formation se détachent de la membrane du RE et deviennent des particules lumineales. Les facteurs qui régissent ce détachement ne sont pas bien compris. Il est possible que la fin de la traduction de l'ARNm de l'apoB coïncide avec la libération des particules de la membrane du RE. Par conséquent, la taille des lipoprotéines formées et le nombre de lipides pourrait dépendre du temps nécessaire à la traduction de l'ARNm de l'apoB naissante. Ainsi, il a été suggéré qu'une pause pendant la traduction permettrait une lipodation suffisante de l'apoB (Kivlen et al. 1997; Rusiñol et al. 1998). Cependant, il existe également des preuves suggérant que le diamètre des lipoprotéines finales dépendrait de la taille du polypeptide apoB (Yao et al. 1991). Ces mécanismes n'étant pas élucidés, il est envisageable qu'il existe d'autres mécanismes permettant l'arrêt de l'assemblage des lipoprotéines et leur dissociation de la membrane du RE. L'apoB et la MTP étant deux acteurs clés de ce processus, il est intéressant de les détailler.

#### 1.1.1.1.1. L'Apolipoprotéine B (apoB)

L'apoB est une protéine existant sous deux formes : l'apoB-100, native, de 550 kDa produite par le foie et l'apoB-48, de 265 kDa, produite par l'intestin. Cette dernière ne représente que 48% de la longueur de la molécule d'apoB-100 native, d'où leurs noms respectifs (Powell et al. 1987). Le gène unique codant pour ces deux protéines, composé de 29 exons, est situé sur le bras court du chromosome 2. La formation de l'apoB-48 a lieu dans l'intestin grêle par un



processus unique d'édition de l'ARNm (« RNA editing »), qui consiste en une désamination post-transcriptionnelle hautement spécifique d'une cytosine de l'apoB-100 à l'aide d'une enzyme localisée exclusivement dans les entérocytes, appelée l'APOBEC1 (Apo B mRNA-Editing Catalytic Subunit-1)(Chen et al. 1987). Cette désamination entraîne la substitution d'une cytidine en uridine ce qui entraîne la conversion d'un codon en codon stop prématuré provoquant un arrêt de la transcription de l'apoB (Higuchi et al. 1988). En raison de la location spécifique de l'APOBEC1, l'apoB-48 est retrouvée exclusivement dans les lipoprotéines d'origine intestinale (chylomicrons) tandis que l'apoB-100 caractérise les lipoprotéines produites par le foie (LDL/VLDL). De plus, comme il n'y a qu'une seule molécule d'apoB-48 par lipoprotéine et qu'elle n'est pas échangée entre les différentes fractions lipoprotéiques, contrairement aux autres Apo et lipides plasmatiques, l'apoB sert de marqueur très spécifique du nombre et de la classe de lipoprotéines (Karpe et al. 1996). Pendant la traduction du peptide signal, la partie NH<sub>2</sub> terminale hydrophile de l'apoB naissante est transloquée dans la lumière du réticulum endoplasmique (Chan 1992; Segrest et al. 1994). La première partie hydrophobe du peptide ne peut être transloquée à travers la membrane que si un lipide (TG, phospholipides et/ou esters de cholestérol) est ajouté à la protéine par cotranslation. L'ajout de ce lipide entraîne une solubilisation et une stabilisation mutuelles du complexe protéine/lipide et la libération d'une particule lipoprotéique relativement pauvre en lipides dans la lumière du RE, grâce à une association avec la MTP. Si le lipide n'est pas correctement ajouté à la protéine, la translocation des séquences hydrophobes n'est pas initiée, et le polypeptide partiellement transloqué sera dégradé par protéolyse au niveau du protéasome (Bonnardel, Davis 1995; Ginsberg 1997; Liang et al. 2000; Liu et al. 2017).

#### 1.1.1.1.2. La Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP)

L'absence totale de lipoprotéines à ApoB dans le plasma, qui caractérise la FHBL-SD1, est due à une mutation du gène *MTTP*, composé de 18 exons et localisé chez l'Homme sur le chromosome 4 entre les locus q22 et q24 (locus 4q22-24) codant pour la Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP, NP\_000244.2), une protéine essentielle à l'assemblage intracellulaire et de la sécrétion des lipoprotéines à apoB (Rehberg et al. 1996; Hussain et al. 2003). Cette protéine a été identifiée pour la première fois en 1992 dans les microsomes hépatiques grâce à une étude montrant sa capacité à transférer des lipides neutres, entre les vésicules intracellulaires (Wetterau, Zilversmit 1984; Wetterau et al. 1992). Par la suite, la

MTP a été purifiée à partir de foie bovin et ce qui a permis de la décrire. Le gène code pour une grosse sous-unité (M) de 97 kDa (894 acides aminés (AA)), exprimée principalement dans les hépatocytes et entérocytes, qui forme un hétérodimère avec une protéine disulfide isomérase ubiquitaire ou petite sous-unité (P ou PDI) de 55 kDa (Wetterau et al. 1990). La petite sous-unité permet d'ancrer la grosse sous-unité à la membrane du réticulum endoplasmique, de la stabiliser et de la maintenir sous une forme soluble grâce à sa séquence KDEL (Wetterau et al. 1991; Lamberg et al. 1996; Wetterau et al. 1997). L'importance de la MTP dans l'assemblage des lipoprotéines à apoB est devenue évidente lorsqu'il a été démontré que les sujets atteints de d'Hypobetalipoprotéïnémie Familiale FHBL-SD1 (décrite ultérieurement), sont porteurs d'une mutation du gène *MTTP* (Wetterau et al. 1992). Elle est principalement exprimée dans les hépatocytes et les entérocytes, les deux principaux organes producteurs de lipoprotéines à apoB, mais des études récentes ont révélé qu'elle est également exprimée dans d'autres tissus tels que le cœur, les reins, le tissu adipeux, l'œil, le cerveau et les macrophages (Hussain et al. 2012; Walsh, Hussain 2017).

Curieusement, la protéine MTP est également exprimée dans le tissu adipeux, le cerveau et les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), alors que l'apoB n'y est pas exprimée. Dans les CPA, elle joue un rôle dans la synthèse des protéines CD1, impliquées dans la présentation des antigènes lipidiques aux cellules T spécialisées (NKT) (Brozovic et al. 2004, p. 1; Dougan et al. 2005, p. 1). A l'inverse, la fonction de MTP dans le tissu adipeux est encore floue, mais la délétion du gène *MTTP* dans le tissu adipeux des souris entraîne un amaigrissement significatif lorsqu'elles sont nourries avec un régime riche en lipides (35% de lipides qui représentent 60 % des calories), mais pas lorsqu'elles sont nourries avec un régime standard (5 % de lipides soit 13 % des calories) ou un régime Méditerranéen (20 % de lipides soit 43 % des calories et 1,5 % de cholestérol) (Bakillah, Hussain 2016; Swift et al. 2017). Le rôle de la MTP dans le cerveau est à ce jour inconnu. Les mutations les plus fréquentes aboutissent à la formation de protéines tronquées, soit par apparition d'un codon stop prématuré (décalage du cadre de lecture ou mutation non-sens), soit par anomalie d'épissage. Les mutations faux sens (insertions ou délétions ponctuelles) sont rares et pourraient avoir des phénotypes moins graves.

Dans le foie et l'intestin, la MTP possède trois fonctions capitales, en lien avec l'apoB, pour un assemblage correct des lipoprotéines à ApoB. Tout d'abord elle catalyse le transfert des lipides entre différentes vésicules par un mécanisme de «

navette » (Atzel, Wetterau 1993). Deuxièmement, elle permet la formation et stabilisation des gouttelettes lipidiques dans la lumière du RE en catalysant le transfert des lipides dans la lumière du RE (Wang et al. 1999). Enfin, la MTP peut se lier à l'apoB et possède une activité chaperonne permettant la stabilisation et la bonne conformation de l'apoB à un stade précoce de sa synthèse (Bradbury et al. 1999). En effet, une apoB insuffisamment lipidée est reconnue par hsp90, hsp70 et l'ubiquitine ce qui conduit à sa dégradation (Ginsberg 1997).

a. Structure

Commençons par expliquer sa structure. Shoulders et al. ainsi que Mann et al. ont montré que la MTP contient trois domaines structuraux définis grâce à son homologie de séquence avec la lipovitelline, une lipoprotéine du vitellus retrouvés dans les œufs, notamment des amphibiens (Shoulders et al. 1994; Mann et al. 1999). Sur la base de cette homologie, il a été montré que la MTP contient trois domaines distincts : un domaine en « tonneau bêta » en amino-terminal (AA 22-297), une région centrale  $\alpha$ -hélicoïdale composée de 17 hélices (298- 603), et un domaine carboxyl-terminal (604-894). Des études montrent que, bien que les régions amino-terminale et centrale interagissent avec l'apoB, la liaison à la PDI se produit dans la région centrale, au niveau des hélices 13-17, tandis que la partie carboxy-terminale contient le domaine de liaison et de transfert des lipides (Mann et al. 1999; Hussain et al. 2003). La structure de la MTP est présentée en figure 1.

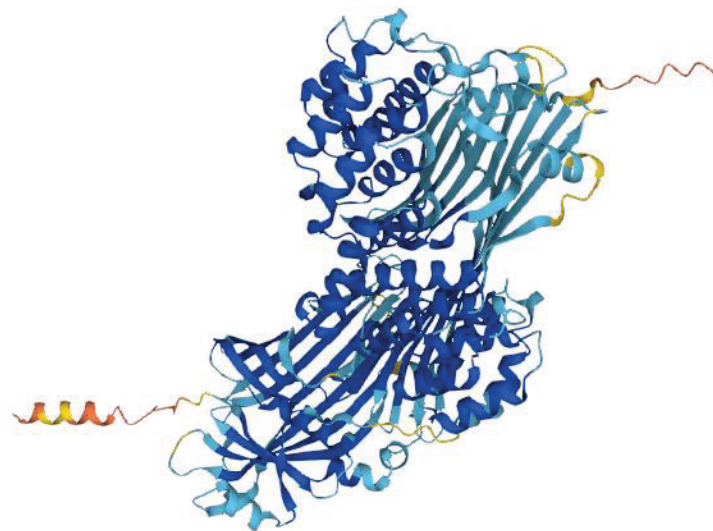


Figure 1. Structure de la protéine MTP d'après la banque de données : « AlphaFold Protein Structure Database » (Varadi et al. 2022).

## b. Fonctions

### - Transfert des lipides

La protéine MTP catalyse le transfert des lipides entre différentes vésicules par un mécanisme de « navette », c'est-à-dire qu'elle extrait les lipides d'une membrane pour les intégrer dans une autre membrane en interagissant de façon transitoire avec la vésicule donneuse et la vésicule acceptrice (Atzel, Wetterau 1993; 1994). Trois approches permettent de fournir des preuves significatives concernant l'implication de la protéine MTP dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines. Tout d'abord, les FHBL constituent une preuve en elles-mêmes que des mutations affectant l'activité de la MTP sont corrélées à l'absence de lipoprotéine à ApoB dans le plasma (Wetterau et al. 1992; Shoulders et al. 1993; Narcisi et al. 1995). De plus, La co-expression de l'apoB et de la MTP dans des cellules non hépatiques et non intestinales leur confère la capacité à assembler et sécréter des lipoprotéines à apoB (Gordon et al. 1994; Leiper et al. 1994; Gretch et al. 1996). Enfin, in vitro, des inhibiteurs de la MTP entraînent une diminution de la sécrétion de lipoprotéines à apoB (Haghpasand et al. 1996; Jamil et al. 1996; Benoist, Grand-Perret 1997).

### - Formation et stabilisation des gouttelettes lipidiques dans la lumière du RE

En plus du transfert de lipides entre deux vésicules, des études ont permis de comprendre que la protéine MTP est également impliquée dans le transport des triglycérides vers la lumière du RE. D'abord, Raabe et al. ont créé des souris *Mtp*-KO et ont montré que leurs hépatocytes ne contenaient pas de gouttelettes lipidiques dans le Golgi ou le RE mais présentaient une quantité significative de gouttelettes lipidiques dans le cytosol. Ils en ont conclu que cette protéine est essentielle pour permettre le transfert des TAG du cytosol vers la lumière du RE (Raabe et al. 1999). Par la suite, Wang et al. ont étudié les effets de l'inhibition de la MTP sur le transfert des lipides dans la lumière du RE et dans les microsomes. Ils ont observé que l'incubation des cellules MCA-RH7777 avec de l'acide oléique a permis d'augmenter les taux

de TAG dans le cytosol et les microsomes, mais la co-incubation avec un inhibiteur de la *MTP* a entraîné une diminution de la fraction membranaire et une inhibition de l'accumulation des TAG dans les microsomes, sans impacter les taux de TAG cytosoliques, d'où son nom (Wang et al. 1999). Dans ces études, les auteurs ont donc conclu que la *MTP* joue un rôle essentiel dans l'accumulation de TAG au sein des microsomes, étape nécessaire à l'assemblage final des lipoprotéines. Ces études ont été approfondies sur des hépatocytes de rat. Ainsi, Kulinski et al. ont montré que l'inhibition de l'activité de la *MTP* diminue la quantité de TAG dans la lumière du RE qu'ils soient associés ou non à l'apoB (Kulinski et al. 2002). Enfin, il a été montré que la *MTP* s'associe de manière stable aux vésicules lipidiques (Bakillah, Hussain 2001). En effet, en l'absence de vésicules lipidiques, la <sup>125</sup>I-*MTP* (*MTP* couplée à un marquage radioactif) a été retrouvée, après centrifugation, dans les fractions inférieures correspondant aux protéines libres. En revanche, en présence de vésicules lipidiques, la *MTP* est retrouvée à la fois dans la fraction correspondant aux protéines et dans la fraction supérieure correspondant aux vésicules lipidiques (1,02-1,063 g/ml) indiquant que la *MTP* était associée de manière stable aux gouttelettes lipidiques (Bakillah, Hussain 2001). Toutes ces données prouvent que la *MTP* est liée de manière stable aux gouttelettes lipidiques et aux lipoprotéines et qu'elle permet le transfert des lipides dans la lumière du RE.

- La liaison à l'apoB et l'activité chaperonne

Plusieurs expériences de co-immunoprécipitation ont permis de montrer qu'il existe une interaction stable entre l'apoB et la *MTP* (Patel et al. 1994; Wu et al. 1996; Mann et al. 1999). Hussain et al. ont d'ailleurs rapporté que la séquence amino-terminale B: 1-771 (B17) l'apoB contient le site de liaison à la *MTP* (Hussain et al. 1995). Finalement des études utilisant la technique de co-immunoprécipitation liquide-solide, décrite par Hussain et al, couplée à un dosage immuno-enzymatique ont montré que les LDL humain se lient avec une haute affinité à la *MTP* (Hussain et al. 1995; Bakillah et al. 2000). Plusieurs études ont indiqué que cette activité de liaison à l'apoB joue un rôle essentiel dans l'assemblage des lipoprotéines et s'apparente à une activité chaperonne. En effet, des études par Shoulders et al. et Bakillah et al., montrent qu'un inhibiteur spécifique de la liaison apoB-*MTP* ou qu'une mutagenèse dirigée contre le site de liaison, entraîne une déstabilisation de l'apoB, suggérant que la liaison apoB-*MTP* joue un rôle physiologique important dans l'assemblage des lipoprotéines et la sécrétion d'apoB (Bradbury et al. 1999; Bakillah et al. 2000). En effet, ces inhibiteurs chimiques diminuent le processus de lipidation de l'apoB qui est alors reconnue par les

protéines hsp90, hsp70 et l'ubiquitine conduisant à sa dégradation dans le protéasome. La protéine MTP contribue à stabiliser l'apoB à un stade précoce de sa synthèse et est responsable de l'activité de transfert des lipides à l'apoB en cours de synthèse (Yao et al. 2013). La MTP se lie à l'extrémité amino-terminale de l'apoB située au niveau de la lumière du RE ce qui permet la libération de l'apoB naissante de la membrane du RE et l'exposition des domaines de liaison aux lipides pour lipider l'apoB (Hussain et al. 1996).

#### 1.1.1.2. Expansion de la particule primitive

Une fois dans la lumière du RE, les lipoprotéines à apoB primitives sont converties en pré-chylomicrons grâce à un processus « d'expansion du noyau ». Au cours de cette étape, les lipoprotéines à apoB primitive de taille proche de celle des HDL fusionnent avec des gouttelettes lipidiques sans apoB, préformées dans la lumière du RE (Rustaeus et al. 1999; Abumrad, Davidson 2012; Sundaram, Yao 2012). Ainsi, cette étape suppose deux processus essentiels : la formation des gouttelettes lipidiques luminales et la fusion de ces gouttelettes avec les lipoprotéines à apoB primitives. L'origine exacte de ces particules lipidiques et leur composition précise sont actuellement débattues (Hussain 2000; Mansbach, Gorelick 2007; Mansbach, Siddiqi 2010), mais la fusion du chylomicron primitif avec ces particules sans apoB-48 se produit dans le réticulum endoplasmique et conduit à la formation des pré-chylomicrons (Hussain 2000; Cartwright, Higgins 2001; Mansbach, Siddiqi 2010). De plus, aucune protéine essentielle n'a été identifiée dont l'absence entraînerait la synthèse et la sécrétion de petites lipoprotéines de la taille des HDL contenant de l'apoB-100 ou de l'apoB-48. Néanmoins, des protéines connues pour participer à la première étape d'assemblage des lipoprotéines pourraient être impliquées dans cette étape de fusion. Par exemple, outre son rôle dans la formation des gouttelettes lipidiques luminales, la MTP pourrait faciliter également la fusion elle-même (Raabe et al. 1999; Read et al. 2000; Rutledge et al. 2010; Lehner et al. 2012; Yao et al. 2013). Cependant, l'expansion du noyau lipidique nécessite une augmentation de la surface des lipoprotéines à apoB, or chaque particule de lipoprotéine ne contient qu'une seule molécule d'apoB. Ainsi, l'acquisition d'autres apolipoprotéines est nécessaire pour stabiliser la surface des lipoprotéines. Ainsi, des approches de surexpression et de knockdown ont démontré que les apolipoprotéines échangeables, y compris l'ApoE, l'ApoC-III et l'ApoA-IV, contribuent à l'assemblage des lipoprotéines (Sundaram, Yao 2012). Ces protéines solubles n'adhèrent pas étroitement à la surface des particules, contrairement à l'apoB-48, et pourront donc être échangées entre les différentes populations de lipoprotéines

dans le plasma. A ce stade, les pré- chylomicrons sont prêts pour atteindre l'appareil de Golgi afin de subir une maturation finale.

#### 1.1.1.3. Sortie des lipoprotéines naissantes du RE et transport vers le Golgi : importance de la protéine Sar1b

Après leur assemblage dans le RE, les pré- chylomicrons sont transférés vers l'appareil de Golgi, pour une maturation finale, par des vésicules spécialisées, appelées vésicules de transport des pré-chylomicrons (PCTV : Pre-Chylomicron Transport Vesicle), qui diffèrent de celles impliquées dans le transport des protéines pour la sécrétion, du fait de la taille imposante des pré-chylomicrons (Siddiqi et al. 2003; Shoulders et al. 2004; Mansbach, Siddiqi 2010). L'acheminement de la particule entre la lumière et la membrane du RE est un mécanisme encore non décrit dans la littérature mais au moins deux étapes déterminantes sont impliquées dans ce processus. Premièrement, la MTP se dissocie de ces particules, deuxièmement, un élément de la lipoprotéine est reconnu par le complexe cytosoliques de protéines « manteau », les coatomères COPII pour un transport sélectif (Mansbach, Siddiqi 2010). Ainsi, le transport cytosolique entre les deux organites se fait dans des vésicules spécialisées adaptées leur grande taille. Cette étape est considérée comme l'étape limitante de la sécrétion des chylomicrons dans l'entérocyte (Mansbach, Nevin 1998; Mansbach, Dowell 2000). Ces vésicules uniques contiennent un certain nombre de protéines spécifiques nécessaires au processus de transport et d'arrimage : La protéine VAMP7 (« Vesicle-Associated Membrane Protein 7 »), la protéine COPII (Coat Proteins type II) et Sar1b, une petite GTPase essentielle au mécanisme d'assemblage de la vésicule de transport (Shoulders et al. 2004; Siddiqi et al. 2003; 2006; 2010).

Cette protéine jouant un rôle prépondérant, il est important de la décrire. Le gène *SAR1B* localisé sur le chromosome 5 sur le locus q31.1 (locus 5q31.1). Ce gène code pour une protéine de 198 AA et essentielle au transport vésiculaire des chylomicrons dans l'entérocyte : la protéine Sar1b (Sar1b, NP\_001028675.1) (Sané et al. 2015). Comme décrit précédemment, la protéine Sar1 est une GTPase (Guanine tri-phosphatase) impliquée dans la

formation des vésicules de type COPII, dans le réticulum endoplasmique en liant la protéine Sec12 (Nakano, Muramatsu 1989). Cette protéine n'est pas encore extensivement connue.

a. Structure de la protéine Sar1b

La protéine Sar1 est hautement conservée et semble présente chez tous les eucaryotes. Chez les mammifères, et particulièrement chez l'Homme, on trouve deux isoformes, Sar1a et Sar1b, de 198 AA, qui diffèrent seulement de 20 AA. L'analyse en cristallographie montre que la protéine Sar1b est constituée de quatre régions structurales distinctes, jouant un rôle précis pour assurer la fonction de la protéine (figure 3). Ainsi, on peut décrire une poche de liaison à la guanine, deux régions dites « switch » (switch 1 et switch 2) et une région amino-terminale, importante pour la fonction de Sar1b (Sassolas et al. 2012). La poche de liaison à la guanine (domaine G), positionnée au niveau central de la protéine, est formée de 6 feuillets  $\beta$  centraux (cinq parallèles et un antiparallèle) pris en sandwich entre six hélices  $\alpha$  (trois de chaque côté,  $\alpha 1 - \alpha 6$ ) (Bi et al. 2002). Ce domaine est essentiel à la fonction de Sar1, et lorsqu'elle est liée au GDP, les trois premiers feuillets  $\beta$  sont approximativement parallèles à la membrane permettant l'ancrage de la protéine (Weissman et al. 2001). Trois autres régions sont également en contact avec la membrane, une à chacune des extrémités (amino et carboxyle) et un motif central (Bi et al. 2002).

La partie amino-terminale de Sar1 contient deux régions : un motif hydrophobe de 9 AA hautement conservé (motif « Sar1-NH2-terminal activation recruitment » ou STAR), spécifique des protéines Sar1, qui facilite le recrutement et l'activation de Sar1 par Sec12, et une hélice amphipathique  $\alpha 1$  essentielle pour l'ancrage de Sar1 à la bicouche lipidique et permettant l'interaction fonctionnelle avec le complexe Sec23/24 (Huang et al. 2001). Son rôle est fondamental comme le démontre la perte d'activité de Sar1b après substitution des 4 AA hydrophobes par 4 Alanine (Barlowe et al. 1993). Entre le motif STAR et l'hélice  $\alpha 1$ , se trouve un court domaine de 5 AA qui participe à la déformation de la membrane du RE (Bielli et al. 2005). Toujours du côté amino-terminal, se situent deux sites actifs pour l'hydrolyse du GTP (entre les AA 32-38 et les AA 75-78) (Antonny et al. 1997). Près du premier motif d'hydrolyse, la thréonine 39 est un résidu hautement conservé dont la substitution empêche la fonction Sar1 en interférant avec l'activation par Sec12 (Huang et al. 2001). Les deux régions « switch », également située en amino-terminal (AA 48-59 et AA 78-94) contiennent deux AA très importants : la Thréonine en position 56 et la Glycine en position 78, respectivement 1531. Le domaine switch I est permet l'interaction entre la guanine et un ion  $Mg^{2+}$  et le



domaine switch II assure l'hydrolyse de GTP (Antonny et al. 1997; Goldberg 1998; Long et al. 2010). En carboxy-terminal, on retrouve une deuxième région structurale spécifique de Sar1 (non observée dans les autres GTPases) constituée d'une longue boucle exposée à la surface (AA 156-171) reliant l'hélice  $\alpha 4$  et le brin  $\beta 6$  jouant un rôle de régulation essentiel à l'activité de Sar1b. Toujours en carboxy-terminal, se trouve un motif spécifique, au niveau du feuillet  $\beta 6$ , qui permet à la protéine de s'orienter vers le RE (Weissman et al. 2001).

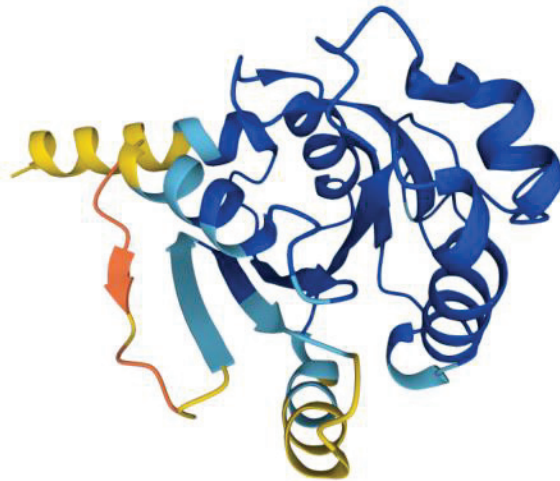


Figure 2. Structure de la protéine Sar1b d'après la banque de données : « AlphaFold Protein Structure Database » (Varadi et al. 2022).

#### a. Fonction de la protéine Sar1b

Comme décrit précédemment, la protéine Sar1 est une GTPase (Guanine tri-phosphatase) qui appartient la famille des petites GTPases de type ARF (ADP-ribosylation factor), impliquée dans la formation des vésicules de type COPII, dans le réticulum endoplasmique en liant la protéine Sec12 (Nakaño, Muramatsu 1989; Barlowe et al. 1994). En effet, le trafic intracellulaire des molécules (protéines ou lipides) est régulé par les petites GTPases. Généralement, ces protéines présentent une homologie de séquence et partagent plusieurs domaines conservés, notamment des séquences d'AA responsables de l'interaction avec la guanosine-5'-diphosphate (GDP) et la guanosine-5'-triphosphate (GTP), ainsi qu'une région permettant la liaison aux effecteurs (Barlowe et al. 1993). Il existe deux paralogues des gènes *SAR1*, *SARIA* sur le chromosome 10q22 et *SAR1B* sur le chromosome 5q23-q31.1 qui partagent 89,9% d'homologie (Melville et al. 2020).

Sar1 assure la formation de vésicules de transport intracellulaire, dites avec manteaux de COP (pour Coat Protein) ou coatomère COP II entre le RE et l'AG. D'un point de vue structurel, le complexe COPII est un manteau constitué d'un hétérotétramère interne Sar1-Sec23-Sec24 et d'une couche externe Sec13-Sec31 (Stagg et al. 2008). Le complexe Sec23/Sec24 qui vient former le manteau protéique dans un premier temps et le complexe Sec13/Sec31 vient renforcer le manteau une fois que celui-ci est formé. Classiquement, pour le transport intracellulaire des protéines contenue dans le RE, la petite protéine GTPase Sar1 joue un rôle pivot. Dans le RE, elle est liée à un GDP et à un AG de façon covalente. Lorsqu'elle interagit avec la protéine Sec12, elle échange son GDP contre un GTP ce qui permet un changement conformationnel de la protéine et l'exposition de son AG. Ces mouvements entraînent l'exposition d'une hélice  $\alpha$  amino-terminale amphipathique qui pénètre de manière stable dans le réticulum endoplasmique, favorisant la déformation locale de la membrane (Hanna et al. 2016). La protéine Sar1-GTP, maintenant activée, peut alors recruter l'hétérodimère Sec23/Sec24 qui va, à son tour, recruter les protéines membranaires incorporées dans la vésicule de transport (Bednarek et al. 1996). Dans un deuxième temps le complexe Sec13/Sec31 va venir renforcer et structurer le manteau de COP II en formation. Sec24 interagit avec des protéines cargo qui vont former un manteau capable de déformer la membrane en une vésicule (Bielli et al. 2005). Au fur et à mesure que la courbure de la membrane augmente, Sec13 et Sec31 vont stimuler l'hydrolyse de Sar1-GTP ce qui va déstabiliser suffisamment la bicouche et permettre la fission de la membrane (Lee, Hegele 2014). Une vésicule de 60 à 70 nm de diamètre va donc se détacher puis perdre son manteau relativement rapidement après la formation de la vésicule.

Cependant, il semble que le diamètre de ces vésicules ne permet pas le transport des pré-chylomicrons mesurant environ 250 nm de diamètre (Mansbach, Siddiqi 2016). Ainsi, une autre particule de transport de 350-500 nm a été proposée comme navette intracellulaire, la vésicule de transport des pré-chylomicrons (PCTV) dont la génération diffère de celle des vésicules qui transportent les protéines nouvellement synthétisées (Siddiqi et al. 2010). Contrairement aux vésicules protéiques qui nécessitent des protéines COPII pour leur initiation, les PCTV ne nécessitent que la protéine de liaison aux acides gras 1 (FABP1) (Neeli et al. 2007). De plus, contrairement aux vésicules protéiques qui sont dépendantes de la présence d'ATP et de GTP, la FABP1 peut se lier au RE en leur absence d'ATP et de GTP, et organiser le complexe de formation de la PCTV (Neeli et al. 2007; Siddiqi et al. 2010). Enfin, la composition des PCTV diffère puisqu'elles sont composées notamment des protéines v-

SNARE VAMP7, apoB-48 et CD36 (Siddiqi et al. 2003). Dans l'intestin, la protéine Sar1b forme un complexe hétéroquaternaire Sar1b/ FABP1/Sec13/SVIP. Lorsque Sar1b est phosphorylée, le complexe se désolidarise ce qui libère FABP1 sous forme monomérique, qui peut alors initier la formation des PCTV (Siddiqi, Mansbach 2012; Mansbach, Siddiqi 2016). Ce mécanisme est illustré dans la figure 2.

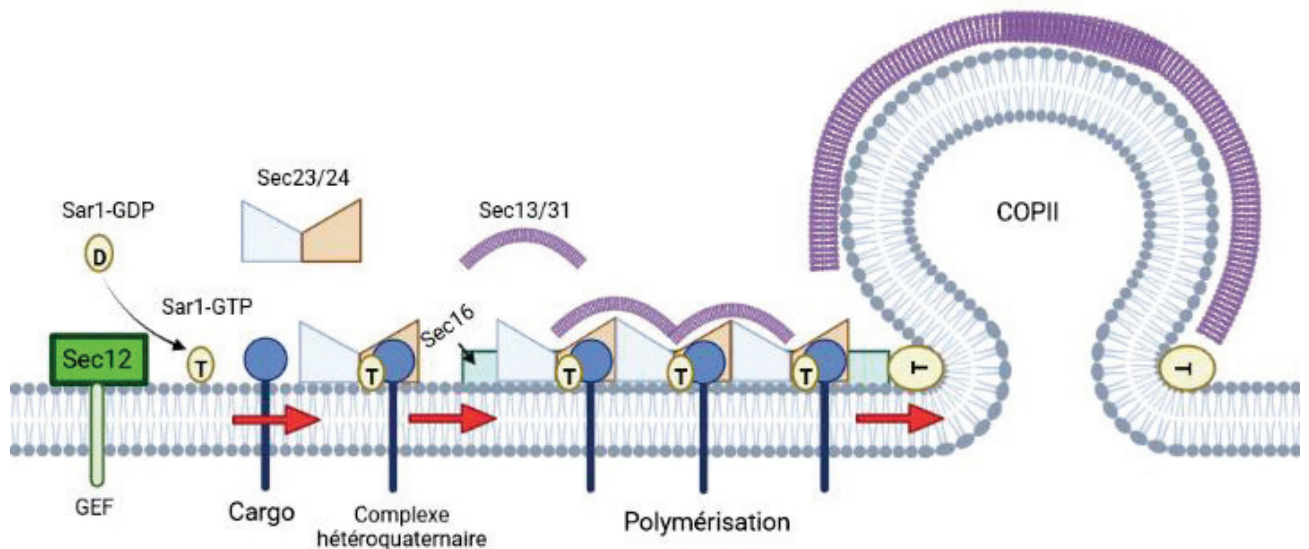


Figure 3. Formation de vésicules de transport intracellulaire. Figure de C. Bordat d'après Yorimitsu et al. (2014).

Classiquement, la formation des vésicules COPII commence par le recrutement des complexes protéiques, COPII, qui vont venir se positionner sur des sites précis du réticulum endoplasmique : les sites de sortie du réticulum (ERES : Endoplasmic Reticulum Exit Sites) (Bannykh et al. 1996; Tang et al. 2001). L'élément clé permettant la reconnaissance du pré-chylomicrons par le complexe COPII, n'est pas connu mais l'apoB pourrait être un bon candidat (Tiwari, Siddiqi 2012). Le complexe COPII est composé de cinq protéines : Sar1, Sec23, Sec24, Sec13 et Sec31. Ces protéines forment une structure rigide en forme de nœud papillon, avec une face concave qui va donner leur courbure aux vésicules de transport. Les cellules de mammifères produisent deux isoformes de Sar1, appelées Sar1a et Sar1b, qui sont toutes deux exprimées dans les entérocytes (Barlowe et al. 1994; Miller et al. 2002; 2003). Sar1 est la première protéine du complexe COPII recrutée à la membrane du réticulum endoplasmique. Sar1 est une petite GTPase de la famille des GTPases ARF, dont l'activité, dépend du degré de phosphorylation du nucléotide auquel elle est liée (Pucadyil, Schmid 2009). A l'état inactif, Sar1 est liée au GDP (Sar1-GDP). Elle va pouvoir être activée par

Sec12, un facteur d'échange de guanine (GEF) retrouvée exclusivement à la membrane du réticulum endoplasmique (Weissman et al. 2001), qui va catalyser la conversion du GDP en GTP ce qui provoque l'exposition d'une hélice  $\alpha$  N-terminale de Sar1 qui peut alors s'ancrer au réticulum endoplasmique et initier le bourgeonnement de la membrane (Lee, Miller 2007). Par la suite, la protéine Sar1-GTP recrute en cascade l'hétérodimère Sec23-Sec24 qui forme la couche intérieure de la vésicule puis le complexe Sec13-Sec31 qui complète la structure du manteau conduisant ainsi à la génération d'une vésicule. Ce mécanisme a été illustré plus haut (cf. figure 2).

Cependant, comme évoqué précédemment, la taille des chylomicrons varie de 75 à 450 nm tandis que les vésicules COPII classiques ne mesurent que de 60 à 70 nm (Hussain 2000). Ainsi, les pré- chylomicrons empruntent une voie alterne donnant naissance à des vésicules de transport spécifiques : les PCTV (Pre-Chylomicron Transport Vesicle) (Siddiqi et al. 2003). Dans cette voie, le complexe COPII ne semble pas nécessaire au bourgeonnement du PCTV provenant du RE mais semble indispensable à la fusion de la vésicule avec le cis-Golgi (Neeli et al. 2007). En revanche, la protéine L-FABP et la Protéine Kinase C sont des éléments clés de la biogenèse des PCTV (Siddiqi et al. 2003; Neeli et al. 2007). Bien que le transport intracellulaire des pré-chylomicrons ne soit pas totalement élucidé, il constitue une étape limitante de l'absorption. En effet, la mutation de la protéine Sar1b (constitutive de COPII) est à l'origine de la maladie de rétention des chylomicrons ou maladie d'Anderson, détaillée ultérieurement (Jones et al. 2003). Cette mutation entraîne une accumulation pathologique de lipides au sein des entérocytes, probablement sous forme de PCTV et à l'absence de chylomicrons dans la lymphe et le plasma.

Une fois les PCTV libérés de la membrane du réticulum endoplasmique, ceux-ci vont fusionner avec le cis-Golgi. Cette fusion fait intervenir, de façon classique, la superfamille des protéines appelée "Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor" ou protéines SNARE considérées, depuis 2013 (Prix Nobel de Physiologie et Médecine 2013), comme étant au cœur des processus d'exocytose. Une fois dans l'appareil de Golgi, l'apoB-48 subit une glycosylation supplémentaire, les ApoA-I, ApoC-II et C-III viennent se lier à la surface du chylomicron et la particule est à nouveau lipidée (Berriot-Varoquaux et al. 2001; Siddiqi et al. 2006; Mansbach, Gorelick 2007; Mansbach, Siddiqi 2010). Le chylomicron mature est finalement acheminé vers la surface basolatérale pour être sécrété dans la lymphe avant de rejoindre la circulation sanguine (Hussain 2000; Sabesin et al. 1977; Jones et al. 2003).

La figure 4 résume brièvement ce processus de formation des lipoprotéines à apoB dans l'entérocyte

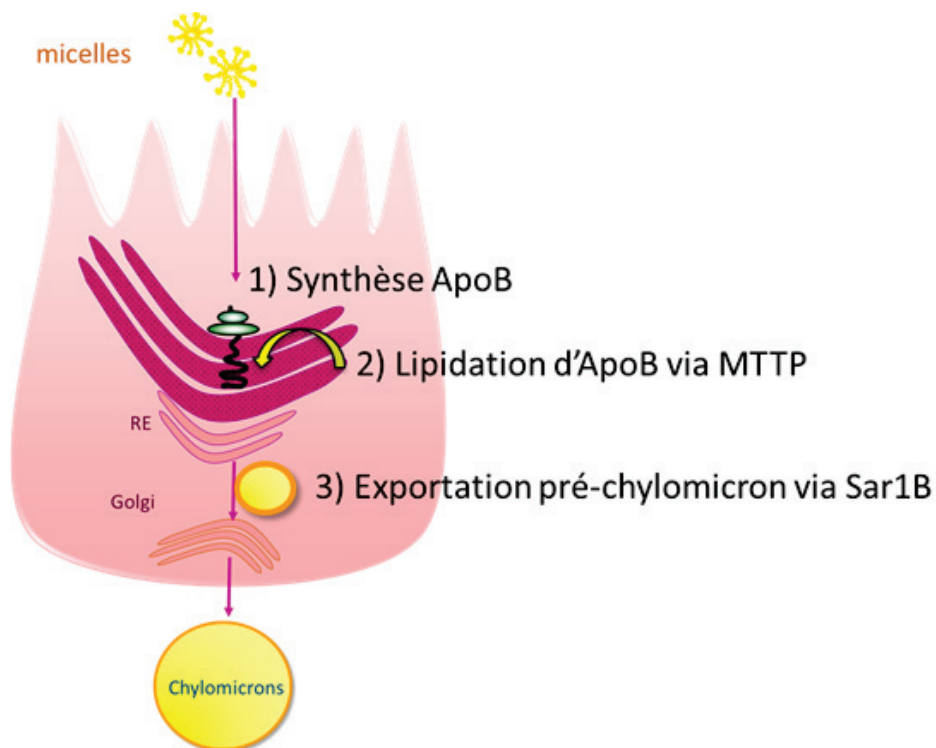


Figure 4. Formation intra entérocytaire des chylomicrons. Figure de E. Reboul, C2VN, d'après PNDS hypocholestérolémies génétique (Haute Autorité De Santé 2021).

*Légende :* 1) L'apoB synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE) assure la structure des chylomicrons et leur interaction avec les cellules cibles ; 2) la MTP assure le transfert des lipides dans les lipoprotéines en cours de synthèse ; 3) La sécrétion des chylomicrons dépend de la Sar1GTPase.

### 1.1.2. Les lipoprotéines de haute densité (High-Density Lipoprotein ou HDL)

Bien que la majorité des TAG et la plupart des micronutriments liposolubles nouvellement absorbés soient incorporés dans des chylomicrons puis sécrétés dans la lymphe par une voie dépendante de l'apoB, un nombre croissant de preuves suggère que l'intestin sécrète également des lipoprotéines de haute densité (High-Density Lipoprotein ou HDL) pendant la période postprandiale (O'Neill, Thurnham 1998). En effet, il a été montré sur in vitro sur cellules Caco-2 différenciées et sur cellules intestinales de rat, que le cholestérol libre était sécrété par deux voies distinctes : une voie dépendante de l'apoB (chylomicrons) et une voie

indépendante de l'apoB. Etant donné que cette voie indépendante de l'apoB était à la fois inhibée par le glyburide et stimulée par les agonistes des récepteurs nucléaires LXR/RXR (liver X receptor/retinoid X receptor), on a supposé qu'il s'agissait d'une voie dépendante du transporteur ABCA1 (ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1) (Hussain et al. 2005). ABCA1 est une protéine de 220 kDa exprimée dans plusieurs tissus tels que le foie, les macrophages, le cerveau et l'intestin grêle (Dean et al. 2001). Au niveau intestinal, le transporteur ABCA1 participe à l'efflux du cholestérol, des phospholipides à travers la membrane cellulaire en les liant à l'apoA-I pour les inclure dans les HDL intestinales (Oram, Heinecke 2005). En effet, plusieurs modèles murins démontrent que la surexpression d'ABCA1 l'efflux du cholestérol et des phospholipides dans différents types cellulaires (Vaisman et al. 2001; Singaraja et al. 2001; Cavelier et al. 2001). Cet efflux dépend de la présence d'un accepteur tel que des HDL déjà formés mais pauvres en lipides ou l'apoA-I pour permettre la formation de nouvelles HDL (Oram 2002; Chroni et al. 2004). D'ailleurs les résultats d'études in vivo ont permis de conclure que le transporteur ABCA1 intestinal contribuerait à l'absorption et la sécrétion plasmatique d'environ 30 % du taux de cholestérol (Attie 2007). En plus du cholestérol et des phospholipides, il a été montré que ABCA1 favorise également la sécrétion d' $\alpha$ -tocophérol, et d'interleukine-1 $\beta$  au niveau tissulaire (Oram et al. 2001). De même, des études in vitro ont montré qu'une fraction de l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) était également sécrétée par les HDL intestinaux via par un transporteur ABC (Anwar et al. 2006; 2007).

Les HDL constituent la plus petite (7-12 nm de diamètre) et la plus dense (1,063-1,25 g/ml) des populations de lipoprotéines plasmatiques. Cette population, très hétérogène, comprend plusieurs sous-populations distinctes dont la forme, la taille, la densité, la composition en protéines/lipides varient (Rye et al. 1999). Ce sont des particules sphériques, constituées d'un noyau hydrophobe (principalement des esters de cholestérol avec une petite quantité de TAG) entouré d'une monocouche de phospholipides, de cholestérol non estérifié et d'apolipoprotéines. Il existe également une sous-population de HDL avec une forme discoïdale, constituée uniquement d'une bicouche de phospholipides avec de petites quantités de cholestérol non estérifié et d'apolipoprotéines, sans contenir de noyau hydrophobe (Rye, Barter 2004). Les HDL plasmatiques contiennent deux apolipoprotéines principales, à savoir l'apoA-I (70 % du contenu protéique) et l'apoA-II (20 % du contenu protéique). Certaines particules HDL contiennent également des quantités mineures d'autres apolipoprotéines telles que l'apoA-IV, l'apoA-V, l'apoC, l'apoD, l'apoE, l'apoJ et l'apoL (Savion, Kotev-Emeth 1993;

Burkey et al. 1992; Vanhollenbeke, Pays 2006; Perdomo, Henry Dong 2009). D'autres protéines, en particulier des enzymes, peuvent également être incorporées dans les HDL et jouer un rôle important dans leur métabolisme comme la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) et la lécithine : cholestérol acyltransférase (LCAT). Nous ne détaillerons pas toutes les sous-populations de HDL, néanmoins il est intéressant de souligner qu'il existe deux sous-populations majeures. La première population contient de l'ApoA-I mais pas d'ApoA-II (HDL A-I), tandis que la deuxième population contient à la fois de l'ApoA-I et de l'ApoA-II (HDL A-I/A-II) (Cheung, Albers 1982). Les HDL A-I représentent environ 70% des HDL plasmatiques totales (Cheung, Albers 1982) et sont celles qui sont considérées ici pour faciliter la compréhension des mécanismes discutés. L'ApoA-I, un polypeptide de 243 AA et d'environ 28 kDa, en plus d'être la protéine structurale majoritaire des HDL, est un cofacteur obligatoire de la LCAT, l'enzyme qui génère la quasi-totalité des AGE (Soutar et al. 1975).

La biogenèse des HDL commence par la production et la sécrétion de l'ApoA-I non lipidée (appelé HDL pré-bêta1) par le foie (70 %) et en plus petite quantité par les intestins (30 %) sous une forme sans lipides (Kingwell et al. 2014). Une fois dans le plasma, cette apoA-I non lipidée va rapidement interagir avec les cellules via le transporteur ABCA1 et acquérir les phospholipides et le cholestérol non estérifié contenus dans les membranes cellulaires. Il en résulte la formation de petites HDL discoïdales pré-bêta-migrantes pauvres en lipides (Breslow 1985; Rousset et al. 2009; Camont et al. 2011). Les particules d'ApoA-I pauvres en lipides peuvent également être générées par hydrolyse des TG par les lipases, et lors remodelage des HDL matures par la CETP, ce qui favorise la dissociation des particules d'ApoA-I de ces particules (Kunitake et al. 1992; Francone et al. 1996; Paromov, Morton 2003; Rye, Barter 2004). En effet, la CETP, est une protéine plasmatique facilitant le transport des esters de cholestérol et des TAG entre les différentes lipoprotéines. Elle permet l'échange d'un TAG des VLDL ou des chylomicrons contre un ester de cholestérol provenant des HDL. Ce processus peut être favorisé par stimulation de l'activité de la CETP avec une molécule telle que le Dalcetrapib (Niesor et al. 2010). Par la suite, le cholestérol présent dans ces HDL discoïdales sera estérifié par la LCAT, formant des esters de cholestérol, très hydrophobes, qui vont migrer à l'intérieur de la particule et s'accumuler au centre, formant un noyau lipidique. Ce processus transformera les HDL discoïdes pré-bêta en particules sphériques HDL3 et HDL2 (Rousset et al. 2009).

## 1.2. L'Abêtalipoprotéinémie (ABL) ou hypocholestérolémie familiale due à un défaut d'assemblage des lipoprotéines 1 (FHBL-SD1)

### 1.2.1. Histoire de la maladie

La FHBL-SD1, anciennement connue sous le nom de syndrome de Bassen-Kornzweig [ABL ou FHBL-SD1, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) 200100], est une maladie autosomique récessive très rare, dont le premier cas a été rapporté en 1950 (Bassen, Kornzweig 1950). En effet, F. A. Bassen, hématologue, et A. L. Kornzweig, ophtalmologue, ont décrit le cas d'une jeune fille de 18 ans, diagnostiquée dans la petite enfance avec une maladie cœliaque, qui présentait un tableau clinique général correspondant à une ataxie de Friedreich associée à une rétinite pigmentaire. Ils ont également souligné la présence de globules rouges plus petits, fortement colorés et présentant de grandes anomalies de forme, avec notamment un aspect crénelé (Bassen, Kornzweig 1950). Ces érythrocytes déformés, alors décrits pour la première fois, sont aujourd'hui désignés par le terme « acanthocytes » et leur présence est considérée comme le signe diagnostique le plus précoce et le plus constant de cette pathologie. Le terme « acanthocytes » a été utilisé pour la première fois par Singer *et al.* en 1952, alors qu'ils décrivaient le cas d'un jeune garçon de 13 ans présentant la même malformation sanguine décrite un an auparavant (Singer *et al.* 1952). Ce terme a ensuite été modifié par Druez en 1959, qui a supprimé la lettre 'r' et désigné ces érythrocytes par le terme « acanthocytes » (du grec « *Akantha* » signifiant « épine ») (Druez 1959).

Par la suite, en 1958, Jampel et Falls ont publié en décembre 1956 un examen de suivi du patient de Singer *et al.*, environ six ans après le premier diagnostic. Ainsi, alors qu'en 1950, aucune rétinite pigmentaire n'avait été constatée, une nette dégradation de la vision a été rapportée lors de l'examen de suivi, avec une progression marquée de l'ataxie. Mais l'observation la plus impactante faite cette année-là fut le taux de cholestérol plasmatique effondré (37 mg/100 ml de sang), taux qualifié comme étant le plus bas au sein de leur institution (Jampel, Falls 1958). Ils ont, ainsi, été les premiers à suggérer que ce syndrome pouvait être lié à une perturbation du métabolisme des lipides à l'origine de la malformation des érythrocytes et des cellules nerveuses. Cette observation fut confirmée par Salt *et al.*, qui ont rapporté, en 1960, un taux de cholestérol de 22 mg/100 ml de sang chez un enfant de 17 mois (HB *et al.* 1960). De plus, ils ont décrit une quasi-absence de bêta-lipoprotéine, une diminution des phospholipides et une absence de chylomicrons plasmatique en post-prandial.



Les taux de vitamine A et de caroténoïdes plasmatiques étaient également effondrés. Ils ont alors confirmé les signes cliniques en décrivant, au cours des années, des retards de développement neurologique et mental ainsi que des signes d'ataxie. Ces signes sont progressifs, de sorte que, vers l'âge de 10 à 15 ans, l'enfant développe de lourdes difficultés pour la marche en lien avec une faiblesse musculaire généralisée et une absence de réflexes profonds. Ce type d'ataxie, similaire à l'ataxie de Friedrich, est la conséquence d'une dégradation diffuse du système nerveux central notamment au niveau des colonnes postérieures, des voies pyramidales et des voies cérébelleuses, généralement repéré par la présence d'un signe de Babinski (HB et al. 1960). Par la suite, des atteintes oculaires apparaissent affectant la vision et les muscles extra-oculaires. Les cas recensés dans la littérature décrivent également un retard mental plus ou moins sévère et, selon les cas, des atteintes cardiaques variables (Schwartz et al. 1961; Druez 1959; Sobrevilla et al. 1964). Ainsi, au milieu des années 60, le tableau clinique a été entièrement décrit : les patients sont souvent issus de parents consanguins, souffrent très vite de stéatorrhée et de diarrhée à l'origine d'une malnutrition et d'un retard du développement staturo-pondéral et des fonctions cognitives. On retrouve généralement une acanthocytose et les patients développent, en grandissant, une neuropathie sous forme d'ataxie cérébelleuse ainsi qu'une dégénérescence rétinienne. D'un point de vue biologique, le taux de cholestérol sanguin est systématiquement effondré avec une quasi-absence de  $\beta$ -lipoprotéine, donnant ainsi son nom moderne à la pathologie. Ce tableau clinique sera détaillé ci-dessous. Ce n'est qu'en 1992 que Wetterau et al. ont montré que les patients FHBL-SD1 avaient un taux et une activité indétectables de protéine *MTTP* (Wetterau et al. 1992). Les années suivantes, les premières mutations du gène *MTTP* ont été rapporté (Shoulders et al. 1993; Sharp et al. 1993).

La prévalence et l'incidence de cette pathologie sont difficiles à établir, mais on estime que la FHBL-SD1 affecte moins d'une naissance sur un million dans la population générale, indépendamment du sexe et de la zone géographique (Kayden 1972). En 2018, il semblerait qu'une centaine de cas ait été décrit dans la littérature, dont environ un tiers résulte de mariages consanguins (Burnett et al. 2018). D'après la Banque Nationale de Données des Maladies Rares, au dernier recensement de mars 2022, la France comptait 23 cas de FHBL-SD1 recensés (*Nombre de cas par maladie rare dans la BNDMR | Banque Nationale de Données Maladies Rares* [Septembre 2022]). Cependant, bien que rares, de nouveaux cas sont régulièrement décrits permettant de recenser de nouveaux variants (Vlasschaert et al. 2021), des symptômes rares (Acar 2020; Sivamurukan et al. 2021) voire des cas de premiers patients

dans certains pays (Rodriguez Gutierrez et al. 2021). Les difficultés de recensement sont d'ailleurs souvent liées à la confusion des symptômes avec d'autres pathologies comme la maladie cœliaque et à la méconnaissance de ces syndromes (Sissaoui et al. 2021; Peretti, Mas 2022).

À ce jour, une grande diversité de mutations a été recensée avec plus de 75 mutations affectant le gène *MTTP* décrites chez une centaine de patients FHBL-SD1. En 2021, Rodriguez Gutierrez et al. (2021) ont publié une superbe analyse des mutations retrouvées dans la population de patients FHBL-SD1. Ainsi, ils rapportent que parmi ces mutations, 30% sont des erreurs d'épissage (n = 22), 26% des délétion (n = 20), 26% sont des mutations faux sens (n = 20), 12% des mutations non-sens (n = 9), 4 % sont des insertions uniquement (n = 3), et finalement 1% sont des insertions-délétions ou « indel » (n = 1). La majorité des patients (79%) sont issus de parents consanguins et présentent des génotypes homozygotes, et les 21% restants présentaient un génotype hétérozygote composite. Les deux variants les plus fréquents (p.G865X et p.N139\_E140) ne dépassent pas 10% et la plupart des mutations ne sont présentes que chez deux patients au maximum (Rodriguez Gutierrez et al. 2021).

Parmi les variants les plus étudiés, on trouve le variant R540H, dû une mutation faux-sens, qui entraîne une incapacité de la MTP à transférer les lipides et faciliter la sécrétion de l'apoB (Di Filippo et al. 2019). On peut citer également les variants mentionnés plus tôt : le p.G865X caractérisé par une perte des 30 derniers AA (Ricci et al. 1995) et le p.N139\_E140 caractérisé par une perte de 140 AA (Al-Mahdili et al. 2006) ce qui crée, dans les deux cas, une MTP tronquée non fonctionnelle. Les principales mutations et leurs conséquences sur la protéine sont présentées dans l'annexe 1.

### 1.2.2. Symptomatologie clinique

Le tableau clinique classique, décrit à l'origine par Bassen et Kornzweig est la conséquence d'une malabsorption intestinale des graisses alimentaires avec diarrhée, stéatorrhée, retard de croissance, ataxie de Friedrich, neuropathie périphérique, rétinite pigmentaire et acanthocytose (Wetterau et al. 1992; Kane 1995; Berriot-Varoqueaux et al. 2000). L'annexe 2 présente les principaux symptômes et leur fréquence au cours de la FHBL-SD1 d'après les cas publiés dans la littérature.

### 1.2.2.1. Atteintes hématologiques et acanthocytose

Comme le suggère l'histoire de la maladie, l'acanthocytose, qui désigne la déformation en spicules de la membrane des globules rouges (figure 5), est le premier symptôme à avoir été découvert et a, par conséquent, initialement défini le syndrome de Bassen-Kornzweig. Cette malformation érythrocytaire étant particulièrement singulière, des recherches ont été menées pour en déterminer la cause, et plusieurs observations intéressantes ont été faites. Tout d'abord, les acanthocytes ne redeviennent pas des cellules normales après incubation pendant 24 heures dans du plasma normal, et les cellules normales ne deviennent jamais des acanthocytes même en présence d'un plasma d'individus atteints (Lamy et al. 1963). Cependant, les érythrocytes déformés semblent reprendre partiellement une forme physiologique s'ils sont immergés dans une solution isotonique à pH acide, contenant 5% d'albumine, et en ajoutant de grandes quantités de détergents anioniques et/ou de petites quantités de détergents cationiques. Ces observations semblent indiquer que la forme de la cellule est inhérente à l'érythrocyte, mais est influencée par les tensions de surface ou la charge superficielle de sa membrane (Farquhar, Ways 1966).

À la suite de ces constats, un grand intérêt a été porté aux lipides de la membrane cellulaire des acanthocytes. Notamment, Ways et al. (1963) ont décrit une teneur en lipides totaux normale, mais un taux de phospholipides faible et une distribution anormale des acides gras (AG). En effet, les acanthocytes semblent souffrir d'un appauvrissement en phosphatidylcholines et un enrichissement en sphingomyélines, ce qui contribue à la diminution de la fluidité de la membrane et prédispose à la transformation acanthocytaire. Ces modifications ont également été retrouvées directement au niveau plasmatique. Or, les lipides circulants et membranaires étant interchangeable, ces observations suggèrent que les modifications observés au niveau plasmatiques sont le reflet de l'altération érythrocytaire (Ways et al. 1963). En parallèle, le constat d'une nette diminution du taux d'acide linoléique (acide gras essentiel ou AGE), remplacé par de l'acide palmitique (premier AG produit au cours de la lipogenèse), évoque un trouble du métabolisme des lipides (Ways et al. 1963). Ainsi, il a été établi que l'aspect crénelé des érythrocytes est lié à une désorganisation structurelle intrinsèque de la membrane due à une composition lipidique anormale.

A ce jour, la présence d'acanthocytes est considéré comme le marqueur le plus constant des maladies impactant le métabolisme et l'absorption des lipides, et notamment dans la FHBL-SD1, parfois désignée par le terme « acanthocytose héréditaire » (Kane 1995). D'ailleurs, la

forme des globules rouges étant si intrinsèquement liée à la teneur et la répartition des lipides plasmatiques, qu'une acanthocytose réversible s'observe régulièrement dans des situations de malnutrition ou de dénutrition telles que l'anorexie nerveuse (Mant, Faragher 1972). Il est établi que le nombre d'acanthocytes devient significatif au-delà de 3 à 5% des globules rouges, or dans la FHBL-SD1, ils peuvent représenter de 50 % à 70 % de la population érythrocytaire totale (Kane 1995).

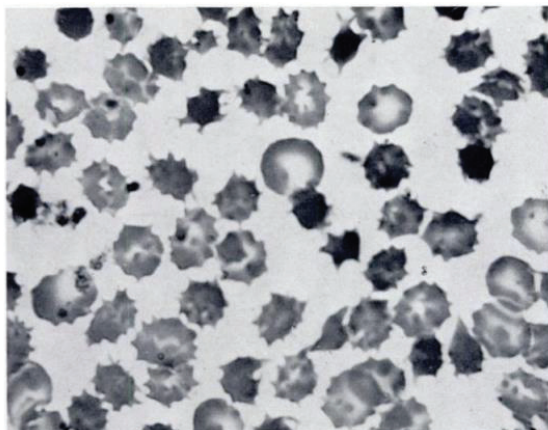


Figure 5. Acanthocytose caractéristique de la FHBL-SD1. Aspect crénelé des globules rouges. Les cellules plus petites et sombres sont des globules rouges en cours de déformation (Bassen, Kornzweig 1950).

#### 1.2.2.2. Syndrome de malabsorption

Comme l'indique l'acanthocytose, la FHBL-SD1 est essentiellement causée par un trouble de l'absorption des lipides, due à une incapacité pour les cellules de la muqueuse intestinales de former des chylomicrons (Gotto et al. 1971). Cliniquement, le syndrome de malabsorption se manifeste, dès la petite enfance, par une stéatorrhée, généralement le premier symptôme à se déclarer, puis des vomissements, une diarrhée chronique, et un ballonnement abdominal très inconfortable (Kane 1995). Ce syndrome, et particulièrement la stéatorrhée, est un marqueur constant des cas pleinement établis de FHBL-SD1. Cette malabsorption entraîne également une mauvaise absorption des caroténoïdes et des vitamines liposolubles (A, D, E, K). C'est pourquoi les taux plasmatiques de vitamine E et de bêta-carotène sont effondrés et non détectables, et les taux de vitamine A et K sont diminués. Curieusement, la carence en vitamine D semble plus rare. L'absence de d'apoB ainsi que la faible concentration en cholestérol, en phospholipides, en AGE (comme l'acide linoléique cité précédemment), en carotène et en vitamine A et E sont responsables de la symptomatologie de cette maladie, car ces micronutriments sont indispensables au bon fonctionnement du système nerveux central,

des érythrocytes et da rétine. Par conséquent, la malnutrition résultante entraîne un important retard staturopondéral.

L'élément clé du diagnostic est l'endoscopie digestive haute à jeun qui montre un aspect de gelée jaune à blanche des villosités intestinales, quasi pathognomonique des hypocholestérolémies génétiques, en raison de l'accumulation de lipides. Cela permet de discriminer les différents syndromes de malabsorption (HB et al. 1960). Au niveau histologique, les entérocytes du duodénum et du jéjunum proximal apparaissent clarifiés en raison de l'accumulation de larges vacuoles lipidiques (figure 6) (Ways et al. 1967; Delpre et al. 1978). La microscopie électronique permet généralement de démontrer l'accumulation de lipides dans les entérocytes chez ces patients. De plus, les gouttelettes lipidiques sont pratiquement absentes dans l'espace intercellulaire ou les canaux lymphatiques (Isselbacher et al. 1964).

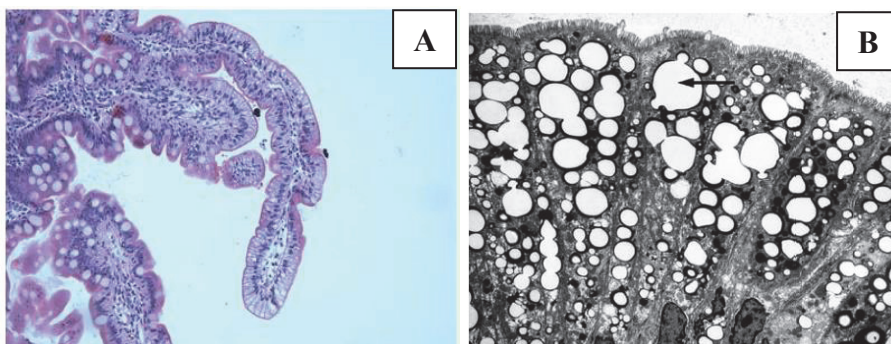


Figure 6. (A) Microscopie optique montrant la vacuolisation des entérocytes, en particulier au sommet des villosités. La vacuolisation donne un aspect plus pâle à cause de la dissolution de la graisse pendant le processus d'inclusion du tissu dans la paraffine. (Desomer et al. 2015). (B) Microscopie électronique montrant des gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des entérocytes, caractéristiques de la FHBL-SD1 (flèche) (Pautler et al. 2008).

Il ne semble pas y avoir d'adaptation de l'intestin à surcharge lipidique. Ainsi, Les signes gastro-intestinaux peuvent régresser lors de l'instauration d'un régime pauvre en graisse (Tarugi, Aversa 2011a) mais les diarrhées reprennent dès l'introduction d'un régime standard même à l'âge adulte (Peretti et al. 2010).

La stéatose, reflet de l'accumulation intracellulaire des lipides non assemblés en lipoprotéines, est également retrouvée dans le foie. On observe donc une hépatomégalie associée à une élévation des enzymes hépatiques (alanine aminotransférase (ALAT), aspartate

aminotransférase (ASAT) et/ou gamma glutamyl transpeptidase (GGT)) (Peretti et al. 2010). Au niveau microscopique, les hépatocytes, à l'instar des entérocytes, sont chargés en gouttelettes lipidiques (Partin et al. 1974). La microscopie électronique permet généralement de confirmer la présence d'énormes globules gras cytoplasmiques qui compriment souvent le noyau et le cytoplasme en une fine bordure à la périphérie de la cellule (Partin et al. 1974). Des anomalies peroxysomales ont également été observées dans certains cas, avec notamment un diamètre supérieur à la normale (Collins et al. 1989). Il est d'ailleurs possible que ces anomalies soient causées par la carence en vitamine. En effet, chez les rats, une carence chronique en vitamine E produit une augmentation du nombre et de la taille des peroxysomes hépatocellulaires, reflétant peut-être des dommages oxydatifs subis par l'organite en l'absence d'antioxydant et d'une surcharge en radicaux libres dérivés des lipides (Dabholkar 1981).

Des cas d'évolution vers la fibrose, voire la cirrhose macro ou micronodulaire, ont été décrits imposant même la transplantation hépatique (Illingworth et al. 1980). La surveillance des fonctions hépatiques de ces patients est donc indispensable, notamment à l'aide d'un FibroScan® et du calcul de l'index FIB-4 tous les trois ans (Peretti et al. 2010; Bredefeld et al. 2021), d'un bilan biologique annuel (ALAT/ASAT, GGT, bilirubine totale, phosphatase alcaline) éventuellement associé à de l'imagerie (Black et al. 1991; Braegger et al. 1998; Peretti et al. 2010).

### 1.2.2.3. Atteintes neurologiques et musculaires

Les atteintes neurologiques font la gravité de la maladie et dominant le tableau clinique. Ces symptômes ont été décrit dès 1950, lors de la découverte du syndrome par Bassen et Kornzweig. Très vite, ces atteintes ont été résumées sous le terme d'ataxie, très proche de l'ataxie de Friedreich, avec notamment des troubles de l'équilibre, une incoordination des mouvements volontaires et une dysarthrie (difficulté à s'exprimer) causés par une dégénérescence de la moelle épinière. (Bassen, Kornzweig 1950). L'homologie des symptômes est d'ailleurs telle, qu'il n'est pas rare de trouver des erreurs de diagnostic. En effet, à l'instar de l'ataxie de Friedreich, la neuropathie de la FHBL-SD1 se développe le plus souvent au cours de la première ou de la deuxième décennie et se caractérise par : 1 - une aréflexie précoce (parfois avant l'âge de 5 ans), 2 - une perte sévère de la proprioception, 3 - une hypoesthésie ou paresthésie périphérique, 4 - une faiblesse musculaire des membres inférieurs, 5 - une diminution de la vitesse et de l'amplitude des potentiels d'actions moteurs,

6 - une apparition de potentiels d'action sensoriels anormaux, et enfin 7 - la présence d'une dénervation musculaire partielle chronique mise en évidence par électromyographie (Sobrevilla et al. 1964). D'un point de vue clinique et électrophysiologiques, on observe une atteinte de la partie postérieure de la moelle épinière (impliquée dans la transmission des informations sensorielles telles que douleur, température, vibrations, et position des membres, de la peau et des articulations) avec notamment une démyélinisation des racines dorsales et une atrophie des ganglions spinaux et des cornes postérieures. On observe également une atteinte cérébelleuse avec une perte des cellules de Purkinje (neurones composant le cortex cérébelleux du cervelet, impliqué dans la motricité fine), une atrophie des voies pyramidales ou corticospinales (faisant le lien entre le cortex moteur et les motoneurones spinaux) et une atteinte des nerfs périphériques moteurs et sensoriels (Pandolfo 2008; Brin et al. 1986). Le processus dégénératif commencerait au niveau des neurones sensoriels des ganglions de la racine dorsale de la moelle épinière et de leurs axones myélinisés. Les axones dégénèrent ce qui provoquerait une démyélinisation secondaire des colonnes postérieures, observée pour la première fois en 1964 par Sobrevilla et al., dont le patient est décédé à l'âge de 36 ans d'une insuffisance cardiaque. En effet, l'autopsie a révélé une démyélinisation étendue des grands neurones sensoriels et une atrophie des noyaux de la corne antérieure de la moelle épinière et de la couche plexiforme du cortex cérébelleux ainsi que la présence de grandes zones de démyélinisation au niveau des nerfs périphériques (Sobrevilla et al. 1964). Il semble d'ailleurs difficile de déterminer quelle part de la perte de proprioception est due à la dégénérescence axonale de la colonne postérieure et quelle part est due aux lésions des nerfs périphériques. Une autre caractéristique histologique importante est l'accumulation généralisée de lipofuscine dans les neurones et les muscles, révélée notamment par analyse d'échantillons de biopsie musculaire (Koenig 2003; Higuchi et al. 1993). Ce marqueur est intéressant car la lipofuscine est un pigment cellulaire composé de résidus oxydés issus de la dégradation des protéines et de la peroxydation des lipides des membranes subcellulaires. Son accumulation est considérée comme un signe de vieillissement cellulaire causé par l'action des radicaux libres (Brunk, Terman 2002). Ainsi l'accumulation de ces dépôts pourrait résulter de l'absence des propriétés antioxydantes de la vitamine E.

Toutes ces observations ont donc mis en évidence une dégénérescence généralisée du système nerveux touchant à la fois les nerfs sensoriels et les nerfs moteurs, à l'origine de graves troubles moteurs, aggravés par une dégénérescence des fibres musculaires lisses et squelettiques (Kott et al. 1977). L'évolution des symptômes est variable, cependant en

l'absence de traitement précoce, par forte dose de vitamine E, ces complications neurologiques constituent progressivement un handicap lourdement invalidant (Hegele, Angel 1985), notamment avec des risques d'apparition de déformations plantaires et de cyphoscoliose qui s'additionnent aux troubles moteurs empêchant la marche à un jeune âge, une neuropathie périphérique à l'origine de douleurs, de paresthésies et d'hypoesthésie et des troubles neurovégétatifs.

#### 1.2.2.4. Atteintes ophtalmologiques

Les manifestations ophtalmologiques sont variables et certains patients peuvent rester asymptomatiques jusqu'à l'âge adulte. Elles sont la conséquence d'une dégénérescence pigmentaire atypique (souvent qualifiée de rétinite pigmentaire atypique) de la rétine et sont généralement corrélées au degré de la neuropathie. Ainsi la dégradation de l'œil est caractérisée par une perte progressive des photorécepteurs et un dysfonctionnement de l'épithélium pigmentaire. Dès la première décennie, on peut constater une altération de la vision de nuit (héméralopie) et des couleurs, évoluant vers une diminution globale de l'acuité visuelle voire une cécité (Chowers et al. 2001). L'électrorétinogramme et l'angiographie montrent généralement une atteinte de la rétine, avant même la présence de signes cliniques, avec une forte diminution voire une absence de la réponse électrique (Kornzweig, Bassen 1957). Par la suite, l'examen du fond d'œil révèle une rétinite pigmentaire atypique caractérisée par l'existence de petites taches irrégulières blanchâtres et brillantes, correspondant à des zones de dépigmentation, pouvant atteindre la région maculaire (figure 7) (Lee, Hegele 2014; Alshareef et al. 2015). L'accumulation de pigment de lipofuscine dans la rétine (Cogan et al. 1984; Von Sallmann et al. 1969), à l'instar des muscles squelettiques et des neurones, suggère que les carences en vitamine E et en antioxydants jouent un rôle prépondérant dans la rétinopathie en plus de la carence en vitamine A. Du fait des atteintes nerveuses et musculaires, décrites précédemment, on peut également observer, chez certains patients, une atteinte des muscles extra-oculaires conduisant à un ptosis partiel, une exotropie unilatérale et un nystagmus (Kane 1995).

La rétinite pigmentaire atypique de la FHBL-SD1, bien qu'inconstante dans le tableau clinique de la pathologie, présente des caractéristiques régulièrement observées chez différents patients, et permet parfois de révéler la maladie (Khan et al. 2019). Les mécanismes



sous-jacents restent encore mal connus, mais à ce jour, seule la vitaminothérapie substitutive a permis de ralentir la progression des complications ophtalmiques (Bishara et al. 1982).

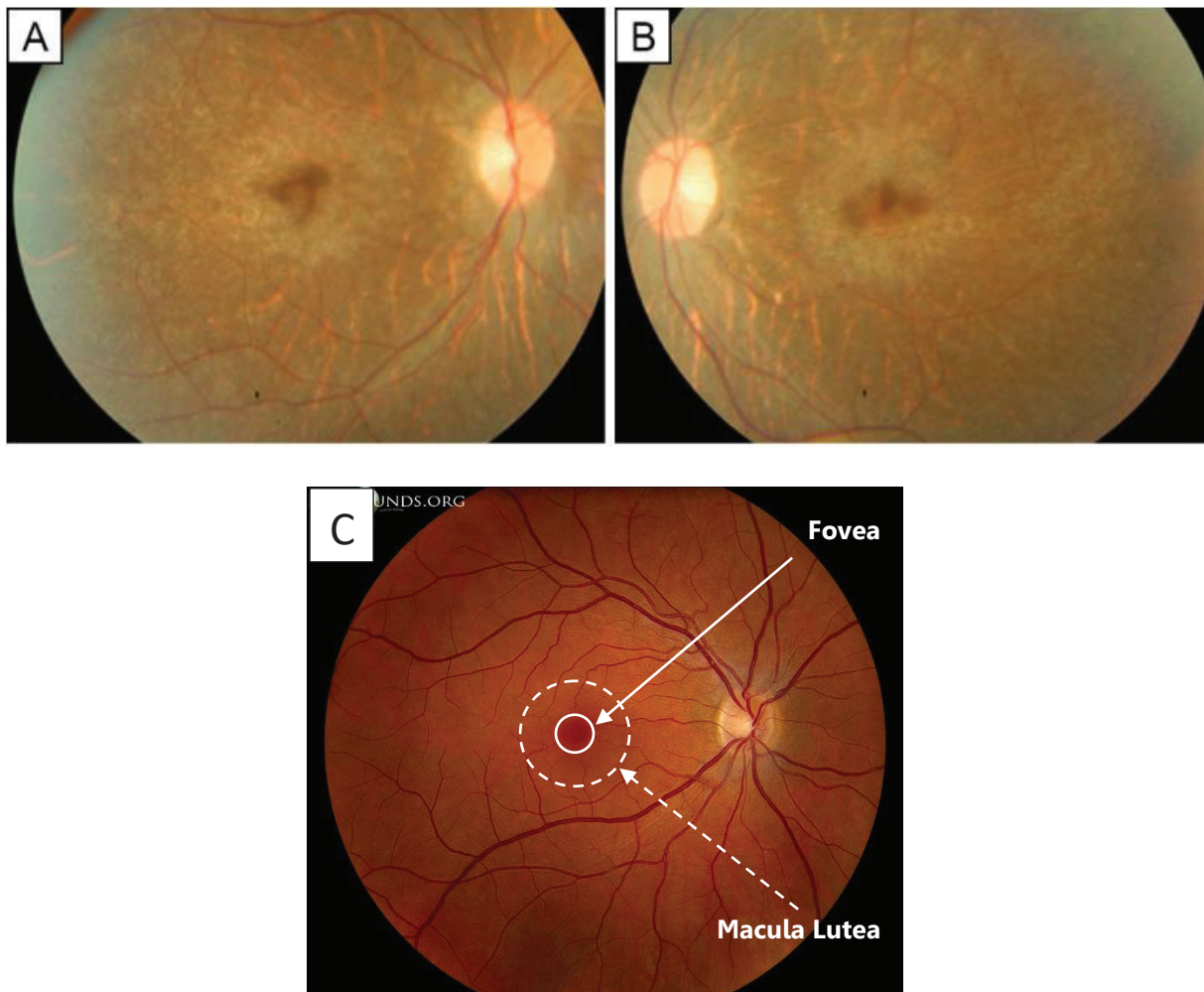


Figure 7. Photographies du fond de l'œil montrant un aspect dystrophique de la rétine dans les yeux droit (A) et gauche (B), avec une atrophie maculaire centrale (Khan et al. 2019) . (C) Rétine normale (Ophthalmic Atlas Images by EyeRounds.org, sous License « Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported », <https://www.eyerounds.org/atlas/pages/normal-fundus.htm>).

#### 1.2.2.5. Autres atteintes (osseuses et cardiaques)

Du fait du caractère essentiel des vitamines liposolubles et des AG, leur malabsorption peut impacter l'ensemble des organes. Ainsi, en plus des atteintes organiques, détaillées ci-dessus, définissant la pathologie, on peut retrouver des symptômes plus variables et moins bien documentés. Ainsi, une déminéralisation osseuse associée à un retard d'âge osseux (Lacaille et al. 1989), ainsi qu'une carence en vitamine D ont déjà été observés (Triantafillidis et al.

2004), notamment chez des femmes. Les atteintes osseuses résulteraient de la malabsorption et d'un état de dénutrition induisant une carence en vitamine D (Mignard et al. 2004).

### 1.3. La Maladie De Rétention Des Chylomicrons (CMRD) ou hypocholestérolémie familiale due à un défaut d'assemblage des lipoprotéines 3 (FHBL-SD3)

#### 1.3.1. Histoire de la maladie

La Maladie de Rétention des Chylomicrons [CMRD ou FHBL-SD3, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) 246700], également appelée « maladie d'Anderson » en référence à Charlotte Morrison Anderson qui fût la première à publier une description de ce trouble en 1961, est une autre forme d'hypobêtalipoprotéïnémie primaires à transmission autosomique récessive, particulièrement rare. Charlotte Morrison Anderson, connue pour être la première femme professeur de pédiatrie au Royaume-Uni et spécialiste de la maladie cœliaque, publia le cas d'une fillette de sept mois souffrant de stéatorrhée, dont la muqueuse intestinale était remplie de gouttelettes lipidiques (Charlotte M. Anderson et al. 1961). Les similarités avec les cas cliniques de FHBL-SD1 rapportés par Salt et al. (1960) ont permis d'entreprendre des analyses complémentaires. C.M. Anderson rapporta donc, chez cette petite fille, une baisse des taux plasmatiques de lipides totaux, de cholestérol et de phospholipides, ainsi qu'une carence profonde en caroténoïdes et une quasi-absence de chylomicron. A la différence des cas rapportés par Salt et al., aucune acanthocytose n'a été constatée et les taux d'apoB sont réduits seulement de moitié et aucun symptôme n'a été observé dans l'entourage de la patiente (Charlotte M. Anderson et al. 1961). Du fait de ces différences, C.M. Anderson n'avait finalement pas conclu sur ce cas, suggérant simplement qu'il pouvait s'agir d'une variante de la FHBL-SD1. Par la suite, pendant plus de 20 ans, seuls 4 cas semblent avoir été recensés dans la littérature sous le terme de « maladie d'Anderson » mais seules subsistent des références à ces textes. Ce n'est qu'en 1987 que le terme « maladie de rétention des chylomicrons » (ou « Chylomicron Retention Disease ») apparaît dans la littérature scientifique. Ainsi, une étude publiée par (Roy et al. 1987) décrit huit cas de malabsorption intestinale avec carence en vitamines A et E. Ils rapportent ainsi huit nourrissons et enfants, 6 garçons et 2 filles, suivis à l'Hôpital Sainte-Justine de Montréal entre 1969 et 1981 souffrants de diarrhée chronique dès la petite enfance avec distension abdominale, et retard de croissance, mais également avec une ultrastructure entérocytaire

caractéristique. Cette cohorte de patients canadiens a ainsi permis d'établir un tableau clinique très similaire à celui de la FHBL-SD1 : les enfants souffrent rapidement de stéatorrhée et de diarrhée et présentent des signes de malnutrition évidents, entraînant un retard du développement et une neuropathie. En revanche, l'acanthocytose est modérée (<5%) et l'atteinte rétinienne est inconstante. Au niveau biologique, on note des taux abaissés mais non effondrés de cholestérol sanguin, de lipides totaux, de  $\beta$ -lipoprotéine, et de vitamines liposolubles tandis que le taux de TG à jeun demeure normal (Roy et al. 1987).

A l'instar de la FHBL-SD1, la prévalence est très faible, la maladie affectant moins d'une naissance pour un million. À ce jour, le « Genetic and Rare Disease Information Center » estime le nombre de cas aux Etats-Unis entre 1 et 300 (Committee on Diagnostic Error in Health Care et al. 2015) et la Banque Nationale de Données des Maladies Rares comptait, en mars 2022, 15 cas de FHBL-SD3 recensés (*Nombre de cas par maladie rare dans la BNDMR | Banque Nationale de Données Maladies Rares* [Septembre 2022]). Au niveau mondial, on estime que seule une soixantaine de cas existe, répartis dans quelques petites cohortes (Bouma et al. 1986; Roy et al. 1987; Nemeth et al. 1995; Peretti et al. 2009) mais de nouveaux cas sont régulièrement recensés (Papadogeorgou et al. 2012; Magnolo et al. 2013; Simone et al. 2019).

La rétention intestinale des chylomicrons, qui a donné son nom à la pathologie, est due à des mutations du gène *SARIB*, codant pour la protéine Sar1b décrite précédemment.

Ces vésicules de transport permettent le transfert des lipides alimentaires entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.

### 1.3.2. Les mutations possibles de la protéine Sar1b

Du fait de la rareté de la maladie, environ une centaine de patients FHBL-SD3 ont été décrits dans la littérature dont une quarantaine avec leur génotype. Au total, 17 mutations ont été rapportés, essentiellement des mutations non-sens (n = 7) et faux sens (n = 10). Parmi les sept mutations non-sens, deux sont à l'origine de la délétion d'un exon : la mutation p-14482\_58+1406 del 5946 ins 15bp (appelée "del exon 2") élimine l'exon 2 (codant pour l'hélice  $\alpha$ ) et la mutation p.S117K160del élimine l'exon 6 (codant pour le site de reconnaissance de la guanine), deux entraînent l'insertion de codons stop (p.E122X, p. E167X) et conduisent à des protéines tronquées, et trois mutations produisent des décalages du cadre de lecture (p.L28RfsX34, p.D48TfsX17, p.G187LfsX13) conduisant soit à des protéines

tronquées soit à des séquences carboxy-terminales modifiées. L'ensemble de ces mutations aboutissent à une abolition de la fonction de Sar1b. Concernant les mutations faux sens, on retrouve essentiellement des mutations (p.G11D, p.L31P, p.G37R et p.D75G) à l'origine d'une diminution de l'affinité de Sar1b pour le GDP et le GTP, d'une altération du domaine G et d'une déstabilisation de la protéine. Les mutations p.D137N, p.S179I, p.S179R et p.G185V modifient l'hélice  $\alpha$  et peuvent affecter la stabilité ainsi que la conformation de la protéine (Sassolas et al. 2012). Régulièrement de nouvelles mutations sont recensées, qui aboutissent majoritairement à une protéine tronquée ne pouvant plus assurer sa fonction, notamment car elle devient incapable d'interagir correctement avec la guanine (Simone et al. 2019). Les principales mutations publiées et leurs conséquences sur la protéine Sar1b sont présentées dans l'annexe 3.

### 1.3.3. Symptomatologie clinique

Cette pathologie demeure moins extensivement décrite que la FHBL-SD1. Les symptômes sont relativement comparables à ceux observés dans la maladie cœliaque et la FHBL-SD1, avec une stéatorrhée importante ainsi que des diarrhées et un retard de croissance (C. M. Anderson et al. 1961). Dans la FHBL-SD3, la synthèse des chylomicrons est conservée mais leur transport intracellulaire perturbé, ce qui peut expliquer l'expression clinique et biologique moins sévère que dans FHBL-SD1. Les signes cliniques et leur fréquence sont présentés dans l'annexe 4. Il est important de noter que l'expression de cette pathologie est quasi-exclusivement intestinale, ce qui semble inconsistant avec l'expression ubiquitaire et le rôle généraliste dans la formation vésicules COPII de la protéine Sar1b. Cette incohérence n'est pas encore comprise (Fromme et al. 2007).

#### 1.3.3.1. Atteintes digestives et hépatiques

Comme pour FHBL-SD1 et FHBL-SD2, les symptômes digestifs sont plus marqués au début de la vie mais le syndrome de malabsorption est moins spécifique par rapport à la FHBL-SD1. La diarrhée et l'intolérance aux graisses alimentaire commencent peu après la naissance et sont généralement associés à une stéatorrhée, des vomissements et une distension abdominale. Ces symptômes apparaissent précocement et sont à l'origine de retards de croissance et du développement (Bredefeld et al. 2021). Dans plus de la moitié des cas, ils s'observent avant l'âge de 3 mois et dans 9 cas sur 10, avant 1 an (Sassolas et al. 2012). Malheureusement, bien

que de survenue précoce, ces signes cliniques étant peu spécifiques, le diagnostic est retardé (de 7 ans en moyenne). Ainsi, seuls 17% des diagnostics sont établis avant l'âge d'un an, tandis que près de 60% des diagnostic sont établis entre 1 et 10 ans, avec de rares patients diagnostiqués à l'âge adulte (Sassolas et al. 2012).

Ces symptômes disparaissent en quelques jours à quelques semaines suite à l'instauration d'un régime pauvre en TAG à longue chaîne, mais les diarrhées reprennent dès la reprise d'un régime standard même à l'âge adulte (Peretti et al. 2010). La muqueuse intestinale présente également un aspect de gelée blanchâtre au niveau duodéal, qui peut s'étendre jusqu'au jéjunum voire l'iléon. Au niveau de l'analyse histochimique ultrastructurale, on observe des entérocytes chargés en vacuoles lipidiques sous forme libre dans le cytoplasme, ou sous forme de particules ressemblant à des lipoprotéines (Dannoura et al. 1999). L'endoscopie digestive haute est donc un élément diagnostique important pour discriminer la pathologie face à d'autres maladies digestives telles que la maladie cœliaque, dans laquelle les villosités sont plus courtes et plus larges, et permet d'observer la présence de larges vacuoles lipidiques (Boldrini et al. 2001).

Dans la FHBL-SD3, Le foie est généralement normal, mais hépatomégalie tardive peut apparaître et a été rapportée chez 20% des patients (Peretti et al. 2010). Certains rares cas de stéatose ont été rapportés mais, à l'inverse de la FHBL-SD1, aucun cas de cirrhose n'est retrouvé dans la littérature (Sassolas et al. 2012). Cependant, malgré une atteinte hépatique plus modérée, on observe une élévation des transaminases (ALAT/ASAT) imposant donc une surveillance des fonctions hépatiques avec bilan biologique (dosage des transaminases), FibroScan® et imagerie (Peretti et al. 2010).

### 1.3.3.2. Atteintes neurologiques et musculaires

Les atteintes neurologiques sont celles qui ont souvent le plus d'impact sur la qualité de vie des patients et sont la conséquence des carences en vitamines liposolubles, principalement en vitamine E, mais semblent moins sévères chez les patients FHBL-SD3 comparé aux autres FHBL (Bredefeld et al. 2021). Si elles ne sont pas traitées, les anomalies neuromusculaires secondaires à la carence en vitamine E commencent généralement au cours de la première ou de la deuxième décennie de la vie et touchent à la fois le système nerveux central et périphérique, comme détaillé pour la FHBL-SD1. On observe alors une perte progressive des réflexes tendineux profonds (aréflexie), du sens vibratoire et de la proprioception, des

anomalies électromyographiques (réduction de la vitesse de conduction nerveuse sensorielle et diminution de l'amplitude des potentiels d'action des nerfs sensoriels) et des douleurs et crampes musculaires (Roy et al. 1987; Lacaille et al. 1989; Peretti et al. 2010). On peut également observer des atteintes plus sévères telles qu'une ataxie, une myopathie et une neuropathie sensorielle qui apparaissent plus tardivement (Gauthier, Sniderman 1983; Tarugi, Aversa 2011b). Certains cas présentant des signes rares tels qu'une dystonie, sont également recensés (Bernard et al. 2010). L'analyse histologique du muscle n'a pas révélé de cas d'accumulation significative de lipides ni de nécrose, mais seulement des anomalies légères et non spécifiques avec parfois une variation de l'aspect du muscle et une variation du diamètre des fibres musculaires avec de nombreuses fibres lobulées (Silvain et al. 2008; Peretti et al. 2010). Des cas de concentrations élevées en Créatine Kinase (de 1.5 à 9,4 fois la normale) ou en transaminases, en lien avec une lyse musculaire sont également rapportés (Silvain et al. 2008). Dans la littérature, l'âge moyen des enfants présentant des complications neuromusculaires est de 12 ans, et seule une supplémentation en vitamines (A et E principalement) permet de les ralentir (mais pas de les corriger). Elles peuvent cependant être évitées complètement par traitement précoce, dès la période post-natale, d'où l'importance d'une sensibilisation au diagnostic (Hegele, Angel 1985).

### 1.3.3.3. Atteintes ophtalmologiques

En ce qui concerne les complications ophtalmiques, des anomalies visuelles minimales ont déjà été signalées : micronystagmus (mouvement d'oscillation involontaire du globe oculaire, non visible à l'œil nu), léger déficit de la perception de l'axe bleu-jaune et difficultés d'adaptation à l'obscurité (Chowers et al. 2001; Peretti et al. 2010; Sassolas et al. 2012). Généralement, on observe des anomalies électrophysiologiques mises en évidence par des tests fonctionnels de type électrorétinogrammes et mesure des potentiels évoqués visuels (PEV), caractérisés par des ondes de plus grande amplitude et des latences accrues (Levy 2015). Un cas de pigmentation atypique, observée par analyse du fond d'œil a également été rapportée dans la littérature (Papadogeorgou et al. 2012). Finalement, la complication la plus sévère, bien que rare, reste une dégénérescence rétinienne pigmentaire, décelable au rétinogramme (Segal, Sharma 2005). Cette destruction progressive de la rétine évolue généralement, en l'absence de prise en charge, vers une perte de l'acuité visuelle nocturne et, dans de rares cas, vers une cécité (Runge et al. 1986).

#### 1.3.3.4. Autres atteintes

D'autres complications peuvent être se développer avec l'âge du fait du rôle ubiquitaire des vitamines liposolubles et de la protéine Sar1b, impliquée dans la pathologie. Ainsi une déminéralisation et un retard de maturation osseuse ont déjà été répertoriée (Lacaille et al. 1989), probablement d'une malnutrition et d'une carence en vitamine D. Également, des cas de cardiomyopathie avec une diminution de la fraction d'éjection à 40% ont été décrit chez des adultes atteints de FHBL-SD3, mais cette complication demeure peu documentée et sa prévalence est inconnue (Silvain et al. 2008). En revanche, à l'inverse de la FHBL-SD1, l'acanthocytose (figure 8) est rare voire absente (Chen et al. 2001). Dans quelques cas, des atteintes hématologiques telles que l'acanthocytose sont également observées dans la FHBL-SD3 mais de façon plus inconstante que pour la FHBL-SD1 (Lesesve et al. 2009).

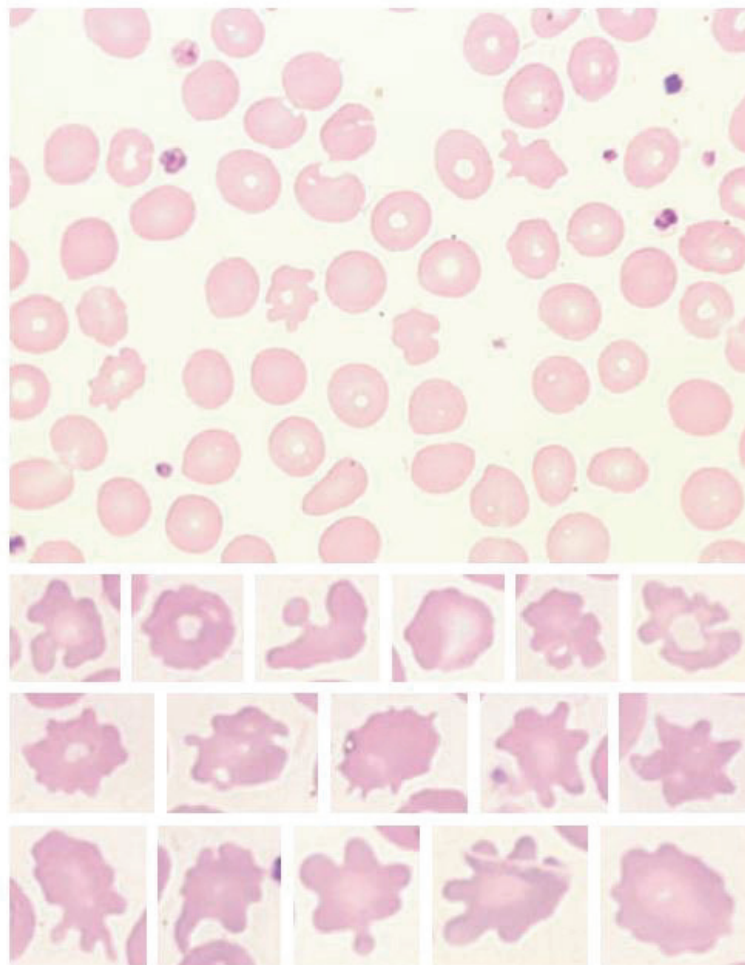


Figure 8. Acanthocytose observée chez un garçon de 6 mois atteint de FHBL-SD1 (Lesesve et al. 2009).

#### 1.4. L'hypobêtalipoprotéinémie familiale ou hypocholestérolémie familiale due à un défaut d'assemblage des lipoprotéines 2 (FHBL-SD2)

L'hypobêtalipoprotéinémie familiale de transmission codominante (FHBL-SD2) ne fait pas directement l'objet de ce travail et de la mise en place d'un modèle d'étude car la symptomatologie clinique, les caractéristiques biologique et les modalités thérapeutiques de cette pathologie sont pratiquement impossible à discerner de la FHBL-SD1. Ainsi, un modèle d'étude de la FHBL-SD1 permet également d'étudier la FHBL. Cependant il est intéressant d'avoir quelques connaissances sur cette pathologie. La FHBL-SD2 (OMIM #615558) est une maladie génétique avec une prévalence faible d'environ 1 pour 1 000 000. Elle est causée par des mutations du gène APOB (mutations homozygotes ou hétérozygotes composites), situé sur le chromosome 2 en position 2p24.1, dont la majorité conduisent à l'insertion d'un codon stop et à la synthèse d'une protéine tronquée (Lee, Hegele 2014). Ainsi, tout comme la FHBL-SD1, cette pathologie se caractérise par des concentrations plasmatiques en apoB et en cholestérol total inférieures au 5<sup>e</sup> percentile de la population et un taux de LDL-cholestérol très faible, entre 0.5 et 1.3 mmol/L (Cottrill et al. 1974).

L'importance de l'apoB dans le métabolisme des lipides et des vitamines liposolubles, discuté ci-dessus, explique qu'en l'absence de prise en charge, les conséquences physiopathologiques de la FHBL-SD2 sont similaires à celles observées dans la FHBL-SD1. Ainsi, les patients souffrent, dès leur plus jeune âge, d'une malabsorption intestinale des lipides associée à des vomissements, une diarrhée chronique et une stéatorrhée. Ces symptômes sont à l'origine d'une malnutrition et d'un retard staturo-pondéral caractéristique de ces pathologies (Burnett et al. 2012). Là encore, on observe une paroi des cellules hépatiques et intestinales surchargées en lipides pouvant causer une hépatomégalie associée à une élévation des enzymes hépatiques (Tarugi et al. 2000). On retrouve également les atteintes neurologiques et ophtalmologiques à l'origine de l'importance d'un diagnostic et d'une prise en charge précoce, notamment par supplémentation en vitamine E. On observe ainsi, un dysfonctionnement cérébelleux sous forme d'ataxie et de dysmétrie, associé à une démyélinisation des axones spinocérébelleux entraînant perte de la proprioception et des réflexes tendineux mais également une diminution de la fonction visuelle et une rétinite pigmentaire (Lee, Hegele 2014). Enfin, on note toujours la présence d'une acanthocytose



associée à une anémie et à des troubles de l'hémostase. Les atteintes osseuses retrouvées dans la FHBL-SD1 n'ont pas été décrites dans la FHBL mais il n'est pas exclu qu'elles puissent exister (Lee, Hegele 2014). Concernant le bilan biologique, détaillé ci-dessous, il n'existe aucune différence entre l'FHBL-SD1 et la FHBL-SD2. On décrit donc une perturbation du bilan lipidique avec effondrement des taux de cholestérol, de triglycérides, d'apoB et de profondes carences en vitamines liposolubles. Comme dans le cas du FHBL-SD1, un dépistage et un traitement précoces sont nécessaires dans le cas du FHBL-SD2 homozygote pour prévenir des complications multi organiques. Le seul élément diagnostique permettant de discriminer la FHBL-SD1 et la FHBL-SD2 est le séquençage du gène *MTTP* et APOB. L'expression clinique de la FHBL-SD2 dépend de la taille du gène APOB tronqué, ainsi les porteurs d'APOB lourdement tronquée développent invariablement une stéatose allant jusqu'à la cirrhose cryptogénique. Les patients FHBL-SD2 hétérozygotes présentent des taux de LDL-C faibles, mais pas absents. Certaines des évaluations cliniques et sérologiques énumérées dans pour la FHBL-SD1 peuvent être appropriées pour la FHBL-SD2 (Bredfeld et al. 2021).

## 1.5. Bilan biologique des FHBL

### 1.5.1. Le bilan lipidique

La première conséquence sur le plan biologique est une profonde perturbation du bilan lipidique, avec des valeurs inférieures au 5<sup>e</sup> percentile de la population pour l'âge et le sexe. Généralement les perturbations sont plus sévères dans la FHBL-SD1 et la FHBL-SD2, tandis qu'elles sont modérées dans la FHBL-SD3. La caractéristique biochimique fondamentale de ces pathologies est l'absence complète ou quasi-complète de lipoprotéines à apoB, à savoir les chylomicrons, les VLDL et les LDL. Ainsi, le bilan lipidique révèle un effondrement des taux de cholestérol plasmatiques, à l'origine du terme d'« hypocholestérolémies » parfois utilisé pour désigner ces pathologies. Dans les cas de FHBL-SD1, on note une nette diminution du cholestérol total (CT) (inférieur à 2 mmol/L), et du LDL-cholesterol (LDL-C), inférieur à 0.1 mmol/L. Les TAG sont le plus souvent inférieurs 0.2 mmol/L), et l'apoB est indétectable ou extrêmement faible chez plus de 90% des FHBL-SD1 (<0.1 g/L) (Bredfeldt et al. 2021). Dans la FHBL-SD3, l'hypocholestérolémie est moins sévère avec un cholestérol total inférieur à 2 mmol/L dans 60% des cas, une diminution modérée des concentrations en LDL et en HDL cholestérol, et surtout des concentrations en TAG normales, qui permettent de distinguer FHBL-SD3 des autres pathologies du groupe. Ainsi, chez les patients à jeun, les taux de cholestérol restent généralement supérieurs à 1,3 mmol/L. Les taux de LDL-cholestérol, de phospholipides, de triglycérides sont également bas. L'apoB-48 est généralement absente, tandis que l'apoB-100 est fortement diminuée mais présente. Les taux d'HDL-cholestérol et d'ApoA1 sont diminués de moitié (Berriot-Varoqueaux et al. 2001; Burnett et al. 2003; Sassolas et al. 2012; Tarugi, Averna 2011b). Ces déficits sont constitutionnels car une épreuve de charge orale en graisses ne permet pas de restaurer les taux de chylomicrons, d'apoB et de TAG plasmatiques. Il est intéressant de noter qu'à l'inverse, les taux HDL-cholestérol sont plus bas dans la FHBL-SD3, où ils sont généralement diminués de moitié, par rapport aux FHBL-SD1 et FHBL-SD2, où les taux ne sont que légèrement diminués (Peretti et al. 2010; Lee, Hegele 2014). Les sujets hétérozygotes, notamment les parents des patients, ont des bilans lipidiques normaux (Antonarakis, Cooper 2001). Concernant les AG, on retrouve des anomalies, déjà évoquées dans la symptomatologie clinique puisqu'elles sont à l'origine des troubles sanguins comme l'acanthocytose. Ainsi, les plus fréquemment rapportées comprennent une diminution de l'acide linoléique au niveau plasmatique et

tissulaire, la imposant la supplémentation orale en AGE (18:2 ω6) (Frezal et al. 1961; Isselbacher et al. 1964; Ways et al. 1967).

## 1.5.2. Le bilan vitaminique

Une autre caractéristique biochimique fondamentale des FHBL est une perturbation du bilan vitaminique, notamment pour les vitamines liposolubles (A, D, E, K). Elle est la conséquence de la malabsorption intestinale des lipides et de l'absence de lipoprotéines en quantités suffisantes pour transporter ces vitamines. Cependant, la carence est variable selon la vitamine et la pathologie considérée. Ainsi, le dosage des vitamines liposolubles permet à la fois d'estimer l'importance de la carence mais également d'orienter le diagnostic.

### *a. La vitamine E*

La vitamine E représente un enjeu capital dans ces pathologies car son déficit est responsable des complications invalidantes de cette pathologie. Elles sont les seules pathologies, avec l'ataxie par déficit en vitamine E, où l'on retrouve un tel effondrement des taux plasmatiques en vitamine E. Et c'est d'ailleurs grâce aux FHBL, que l'importance du rôle de la vitamine E dans le développement neurologique a pu être mis en évidence (Burck et al. 1981; Muller et al. 1985). Ainsi, dans plus de 85% des cas de FHBL-SD1, les concentrations plasmatiques et érythrocytaires en vitamine E sont effondrées (Cuerq et al. 2018). Ces valeurs si basses ont même inspiré Kayden et al. (1965) à les qualifier de « record de la carence en vitamine E rencontrée chez l'homme » (Kayden et al. 1965). Pour l'anecdote, cette carence est à la fois si rare et si caractéristique qu'elle a permis de diagnostiquer une FHBL-SD3 chez un jeune garçon italien également atteint du syndrome de Marinesco-Sjögren, une autre pathologie autosomique récessive rare, faisant de ce cas, un cas unique au monde (Aguglia et al. 2000). Généralement, un déficit profond en vitamine E oriente le diagnostic vers une FHBL-SD1, ou une FHBL-SD3. Cette vitamine E est la plus affectée parmi les vitamines liposolubles, car son métabolisme et son transport, notamment plasmatique, est fortement dépendant des lipoprotéines à apoB (Berriot-Varoqueaux et al. 2000).

### *b. Les autres vitamines et micronutriments liposolubles*

Concernant les autres vitamines liposolubles, les concentrations en vitamines A et D sont généralement diminuées mais pas effondrées. Cette différence peut s'expliquer par l'existence

de transporteurs spécifiques indépendants des lipoprotéines pour les vitamines A et D ; ainsi que par la synthèse endogène cutanée pour la vitamine D. Les données pour la vitamine K sont encore plus rares et parfois seuls les marqueurs de la coagulation sont rapportés mais cette vitamine ne semble pas représenter l'enjeu principal de la prise en charge des FHBL car le suivi se fait facilement grâce à l'INR. Cela étant dit, en 2021, un cas de FHBL-SD1 a été rapporté avec des symptômes inhabituels de carence en vitamine K (Sivamurukan et al. 2021). De même, les données concernant les carences en micronutriments liposolubles tels que les caroténoïdes sont très rares, mais, lorsqu'elles existent ces données démontrent des carences profondes, avec des valeurs généralement largement en-dessous des valeurs normales.

L'annexe 5 répertorie les statuts vitaminiques et nutritionnels plasmatiques des cas de FHBL recensés dans la littérature.

## 1.6. Prise en charge thérapeutique des FHBL

Une prise en charge précoce est essentielle pour limiter l'ensemble des complications liées à la malabsorption lipidique chronique et à la carence en vitamines liposolubles. Les recommandations de prise en charge ont été mises à jour en 2010 et 2014 par Peretti et al. (Peretti et al. 2010), ainsi que Lee, J. et al. (Lee, Hegele 2014), respectivement. Le traitement est essentiellement basé sur une prise en charge diététique imposant l'instauration d'un régime pauvre en graisse (moins de 30% de l'apport calorique total) contenant une quantité suffisante d'AGE (3 à 5% du total des calories en  $\omega$ -6 et 0,5 à 1% en  $\omega$ -3) associée à une supplémentation en vitamines liposolubles. Avec un diagnostic et un traitement précoce, un rattrapage de la courbe de croissance est généralement observé chez la plupart des patients. L'apport quotidien en AGE ( $\omega$ 3 et  $\omega$ 6) se fait sous forme d'huiles végétales (huile d'olive ou de soja), de l'ordre de 2 à 4 cuillères à café par jour chez le très jeune enfant et 5 à 10 cuillères à café par jour chez l'adolescent. Chez les très jeunes enfants, les préparations à base de lait à chaîne moyenne permettent d'améliorer le confort digestif et de corriger la malnutrition en quelques jours. Chez les enfants plus âgés, un régime pauvre en AG à longue chaîne suffit généralement à atténuer les signes d'intolérance digestive (Peretti et al. 2010). La supplémentation en vitamines liposolubles représente l'enjeu majeur du traitement symptomatologique de ces maladies et se doit d'être efficace et suivi pour prévenir l'apparition des lésions neurologiques et rétiniennes. Ainsi, le traitement est basé sur une

supplémentation orale à fortes doses en vitamine E (100 à 300 UI/kg/24h) et en vitamine A (10 000 à 20 000 UI/24h), notamment pour les patients FHBL-SD1 chez qui les complications tendent à être plus sévères. Chez les patients FHBL-SD3, la dose de vitamine E est généralement moindre puisqu'une supplémentation de 50 UI/kg/24h semble nécessaire et suffisante (Peretti et al. 2010) (Muller et al. 1985) (Zamel et al. 2008). La supplémentation orale en vitamine E se fait sous forme d'acétate de RRR- $\alpha$ -tocophérol pour palier à sélectivité élevée du tissu nerveux et conserver le motif phénol (Vatassery et al. 1998) et ne semble pas présenter de problème en termes de toxicité et de sécurité. En revanche, du fait d'un cas de toxicité de la vitamine A rapporté dans la littérature (Bishara et al. 1982) et de sa tératogénicité, une surveillance particulière doit être accordée au dosage plasmatique des carotènes, notamment chez les femmes en âge de procréer. Une supplémentation en vitamine D (800 à 1200 UI/24h), instaurée tôt, permet de prévenir le développement d'une ostéopénie et l'administration de 15 mg/semaine de vitamine K est nécessaire pour maintenir des fonctions normales de coagulation et d'hémostase sans risque d'hémorragie. La dose se doit, cependant, d'être ajustée en fonction de l'INR (Peretti et al. 2010). Le protocole de supplémentation est résumé dans le tableau 3 ci-dessous. Il est important de noter que la supplémentation en vitamines se fait par voie orale car il est admis que de fortes doses de vitamines liposolubles permettent une absorption par voie portale et possiblement par incorporation dans des particules de HDL, dont le métabolisme n'est pas, a priori, impacté par les mutations.

Le suivi se fait tous les ans avec un examen clinique et une évaluation biologique de la croissance et des éventuelles complications gastro-intestinales, hépatiques et neurologiques. Il s'agit de vérifier la compliance au traitement et de la bonne qualité du régime afin de s'assurer du développement (physique et osseux) normal, et pouvoir détecter précocement les complications. Ce suivi se fait principalement grâce aux bilans lipidique (Cholestérol total, triglycérides, HDL et LDL cholestérol, apoB et apoA-I) et vitaminique ( $\beta$ -carotène, vitamine A, D, E, K), réalisés tous les ans. Il est également important d'évaluer le bien-être gastro-intestinal des patients : appétit, diarrhée, vomissements, ballonnements, essentiel à leur confort de vie et témoin d'une alimentation adaptée. Le suivi de la fonction hépatique est également indispensable, les complications étant fréquentes. Tous les ans le bilan hépatique doit quantifier les transaminases (ASAT et ALAT), les phosphatases alcalines (PAL), la gamma-glutamyltransférase (GGT), les bilirubine totale et directe, l'albuminémie et les taux

de prothrombine. Une échographie hépatique doit être pratiquée tous les 3 ans et un Fibroscan peut être envisagé (Peretti et al. 2010; Bredefeld et al. 2021).

A partir de 10 ans, une surveillance des fonctions neurologiques et ophtalmologiques est effectuée à chaque examen clinique, et des examens spécialisés (électroneuromyogramme ou examens ophtalmologiques comme le fond de l'œil, un test de vision des couleurs, des potentiels évoqués et une électrorétinographie) doivent être réalisés, au minimum tous les trois ans. Un échocardiogramme peut également être éventuellement envisagé à l'âge adulte, tous les trois ans à partir de 18 ans afin de détecter précocement une éventuelle atteinte cardiaque. Enfin, une mesure de la densité osseuse est indiquée tous les 3 ans chez les patients de plus de 10 ans, pour suivre l'apparition d'une ostéoporose.

Concernant le pronostic, celui-ci est bon dès lors que les recommandations diététiques sont correctement suivies et que la supplémentation vitaminique est maintenue et surveillée. Ainsi, les patients traités ont une espérance de vie d'au moins soixante ans. De plus, les patients ne semblent pas soulever de problématiques concernant la vie sexuelle et des cas de grossesses réussies ont été rapportés (Illingworth et al. 1980; Segal, Sharma 2005; Gaudet et al. 2006). Cependant, malgré une supplémentation vitaminique strictement suivie, de nombreux cas de dégénérescences rétiniennes ont été observés et les taux plasmatiques de vitamine E ne sont jamais rétablis (Bishara et al. 1982; Chowers et al. 2001).

## Nourrissons et enfants de moins de 10 ans

### Examen physique annuel

<b>Paramètres de croissance</b>	Taille/poids et évaluation du développement attendu pour l'âge.
<b>Neurologie</b>	Réflexes ostéotendineux, Tests des fonctions proprioceptives, cérébelleuses, nerveuses, motrices et sensorielles.
<b>Gastro-intestinal</b>	Distension abdominale, hépatomégalie, ictère.

### Recommandations diététiques

<b>Lipides</b>	La consommation d'AG à longue chaîne n'est pas recommandée Les triglycérides à chaîne moyenne ne sont pas recommandés de manière systématique ; cependant, chez les nourrissons, ils peuvent prévenir ou traiter la malnutrition. Apport calorique suffisant en limitant la consommation de lipides à < 10 - 15 % (5-15 g/j) des besoins caloriques quotidiens. 1 à 2 cuillères à café d'huiles riches en AGPI pour assurer un apport suffisant en AGE.
<b>Supplémentation en vitamines</b>	Vitamine E 100-300 UI/kg/j (50 UI/kg/j en cas de FHBL-SD3 si le diagnostic est posé avant l'âge de 1 an) Vitamine A 100-400 UI/kg/j (15 000 UI/jour dans les cas de FHBL-SD3) Vitamine D 800-1200 UI/j Vitamine K 5-35 mg/semaine

### Suivi biologique annuel

<b>Bilan lipidique</b>	apoB, apoA-I, albumine, tests de la fonction hépatique
<b>Bilan vitaminique</b>	25-OH vitamine D, vitamine A plasmatique, vitamine E plasmatique ou érythrocytaire, vitamine B12, folate
<b>Bilan sanguin</b>	INR, NFS, numération des réticulocytes, calcium, phosphore, acide urique.

## A partir de 10 ans

### Les éléments suivants s'ajoutent à ce qui est indiqué ci-dessus pour les enfants < 10 ans

Examen hépatique, FibroScan /Fibrosis-4 (FIB 4) et ElectroCardioGramme tous les 3 ans.

Densité minérale osseuse (DMO) par DXA tous les ans jusqu'à la puberté puis tous les 3 ans.

Examen du fond d'œil tous les 6-12 mois.

EMG si cliniquement indiqué (peut être envisagée au début de la maladie et tous les 1-3 ans pour évaluer l'atteinte du système nerveux périphérique).

Ajustement du traitement

Surveillance de l'observance du régime alimentaire et des suppléments vitaminiques ainsi que des complications reste l'objectif clinique tout au long de la vie.

Surveillance des interactions alimentaires et médicamenteuses en lien avec la supplémentation vitaminique à forte dose.

Consultation formelle d'un diététicien connaissant bien les troubles lipidiques.

Tableau 3. Proposition de suivi clinique, biologique et para-clinique des patients FHBL-SD1, d'après Bredefeld et al. (2021).



## 1.7. La Vitamine E

### 1.7.1. Généralités

Bien que la découverte de la vitamine E fête ses 100 ans en 2022, ses fonctions biologiques ne sont pas encore entièrement connues. Cette vitamine a été découverte par l'embryologiste Herbert McLean Evans (1881–1971) et son assistante Katherine Scott Bishop (1889–1976) à l'Université de Berkeley, lorsqu'ils démontrèrent que l'absence d'un composé liposoluble, présent dans les feuilles vertes et les germes de blé, entraîne la résorption ou la mort des fœtus, chez des rates gestantes (Evans, Bishop 1922). Ce composé, initialement nommé Facteur X, semblait jouer un rôle essentiel dans la reproduction puisqu'en 1924, indépendamment des recherches de H. Evans et K. Bishop, Bennett Sure montre qu'une carence en un composé lipophile se traduit par une altération de l'épithélium séminifère chez les rats mâles, ainsi qu'une stérilité. Ce composé sera finalement nommé « tocophérol », du grec *tokos* : « progéniture » et *pherein* : « porter ». C'est en 1936 que la vitamine E sera extraite pour la première fois de l'huile germe de blé, puis isolée et décrite en 1938 (Fernholz 1938; Evans et al. 1974). La même année, Paul Karrer est récompensé par le Prix Nobel de Chimie pour sa synthèse réussie de l' $\alpha$ -tocophérol racémique (( $\pm$ )- $\alpha$ -tocophérol). La reproduction de la molécule a permis rapidement de découvrir son puissant pouvoir antioxydant, qui fut particulièrement étudiés par Henry A. Mattill (1883–1953) et Harold Saft Olcott (1909–1979) (Wasserman, Taylor 1972), mais ce n'est qu'en 1968 que la vitamine E est reconnue comme un composé nutritif indispensable à l'Homme par le *Food and Nutrition Board* du National Research Council aux Etats-Unis. Depuis plusieurs dizaines d'années, le panel des rôles biologiques de la vitamine E s'élargit de plus en plus. Au-delà de ses puissantes propriétés antioxydantes, de nombreuses études ont montré le rôle direct de la vitamine E au sein de nombreux mécanismes cellulaires tels que la régulation génique, la prolifération et l'adhésion cellulaire.

## 1.7.2. Structure

Le terme « vitamine E » désigne une famille de molécules liposolubles appelées « vitamères » regroupant les tocophérols (TOH) et les tocotriénols (T3), et possédant une activité biologique mesurée par un test appelé « *resorption gestation assay* ». Ce test permet de définir l'activité vitaminique de la vitamine E en mesurant sa capacité à prévenir la mort des embryons chez des rates gestantes carencées en vitamine E, par simple analyse du nombre de foetus viables, mal formés ou morts après apport d'une forme spécifique de tocophérol ou de tocotriénol (Bieri, Evarts 1974). Cette activité vitaminique ne doit pas être confondue avec l'activité antioxydante. En effet, cette dernière ne dépend que de la structure chimique de la molécule tandis que le pouvoir vitaminique dépend non seulement de la structure de la molécule mais également de sa capacité à se lier à certains récepteurs et, bien évidemment, de sa biodisponibilité dans l'organisme illustrée par des concentrations plasmatiques et tissulaires significativement plus faibles en  $\gamma$ -tocophérol qu'en  $\alpha$ -tocophérol par exemple.

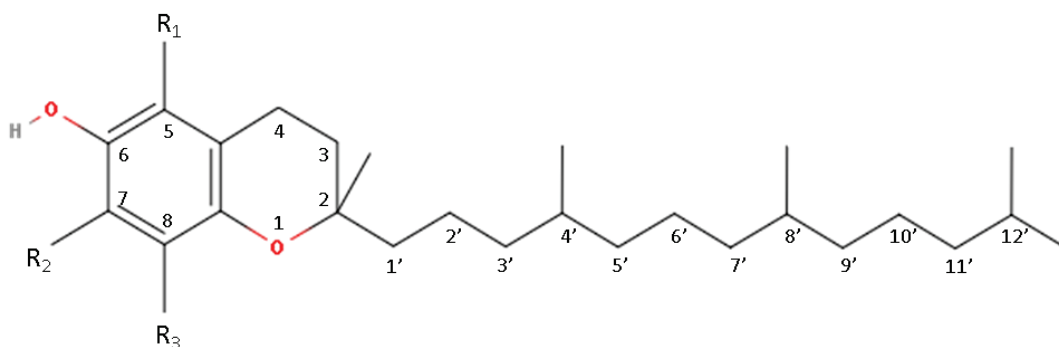
La structure chimique de cette famille de molécules est composée d'un noyau 6-hydroxy-chromane (cycle chromanol) mono-, di- ou tri-méthylé d'où part une chaîne latérale isoprénique à 16 atomes de carbone, saturée chez les tocophérols et insaturée chez les tocotriénols. La position et le nombre de groupements méthyles (sur les carbones 5, 7 et/ou 8) présents sur le cycle aromatique distingue les différents vitamères ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) (figure 9) tandis que la chaîne latérale détermine la lipophilie et la stéréochimie de la molécule. Les lettres grecques désignent le degré de méthylation du noyau, l' $\alpha$ -tocophérol étant le composé le plus méthylé. Ce dernier est la forme naturelle la plus active et sert donc de référence au sein de la famille de molécules. Ainsi, par rapport à cette référence, les  $\beta$ - et  $\gamma$ -tocophérols présentent une activité vitaminique réduite (respectivement 40 et 15 % de l'activité de la forme  $\alpha$ ) et le  $\delta$ -tocophérol est pratiquement inactif (Pennock 1964).

Pour des raisons d'uniformisation, on exprime les taux de vitamine E dans un aliment en équivalent  $\alpha$ -tocophérol ( $\alpha$ -TE ou  $\alpha$ -Teq). Ainsi, la teneur en vitamine E des aliments basée uniquement sur les taux d' $\alpha$ -tocophérol est inférieure ou égale à celle calculée en équivalents  $\alpha$ -tocophérol, car les  $\alpha$ -TE pondèrent également la contribution des autres tocophérols et des tocotriénols. Cet équivalent se calcule en déterminant dans un premier temps la quantité en mg/100g (m/m) de chaque tocophérol et chaque tocotriénol et en appliquant la formule suivante :

$$\alpha\text{-tocophérol} + \text{tocophérols } (0.4\beta + 0.1\gamma + 0.01\delta) + \text{tocotriénols } (0.3\alpha + 0.05\beta + 0.01\gamma)$$

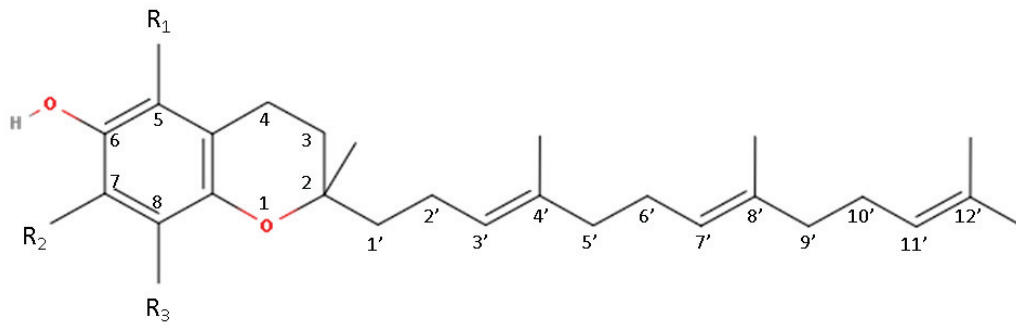
Ce calcul suggère que chaque molécule ne contribue pas de façon équivalente à l'activité vitaminique E. En effet, 1 mg d'équivalents  $\alpha$ -tocophérol ( $\alpha$ -TE) correspond à 1 mg d' $\alpha$ -tocophérol, 2 mg de  $\beta$ -tocophérol, 10 mg de  $\gamma$ -tocophérol et 3,3 mg d' $\alpha$ -tocotriénol.

Ainsi, depuis 1982 l'utilisation du terme « vitamine E » désigne l'ensemble des dérivés tocophérols et tocotriénols démontrant une activité biologique que l'on peut exprimer par rapport à l' $\alpha$ -tocophérol, activité retrouvée dans les 8 molécules précédemment citées (*International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry and Molecular Biology Joint Commission on Biochemical Nomenclature, 1982*) (Keil, Whelan 1982).



$R_1 = R_2 = R_3 = H$	Tocol
$R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$	$\alpha$ -tocophérol
$R_1 = R_2 = CH_3 ; R_3 = H$	$\beta$ -tocophérol
$R_1 = H ; R_2 = R_3 = CH_3$	$\gamma$ -tocophérol
$R_1 = R_2 = H ; R_3 = CH_3$	$\delta$ -tocophérol

**A**



$R_1 = R_2 = R_3 = H$	Tocotriénol
$R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$	$\alpha$ -tocotriénol
$R_1 = R_2 = CH_3 ; R_3 = H$	$\beta$ -tocotriénol
$R_1 = H ; R_2 = R_3 = CH_3$	$\gamma$ -tocotriénol
$R_1 = R_2 = H ; R_3 = CH_3$	$\delta$ -tocotriénol

## B

Figure 9. Structures chimiques des (A) quatre tocophérols et des (B) quatre tocotriénols.

### 1.7.3. Besoins et apports en vitamine E

#### 1.7.3.1. Apports conseillés

Les apports quotidiens conseillés en vitamine E sont révisés régulièrement mais sont assez voisins d'un pays à l'autre. Ainsi, le dernier rapport de l'EFSA (*European Food Safety Authority*) datant de 2015 établit que les apports adéquats sous forme d' $\alpha$ -tocophérol s'élèvent à 13 mg par jour pour les Hommes, 11 mg par jour pour les femmes, et entre 5 et 13 mg par jour pour les nourrissons et les enfants (*Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin E as  $\alpha$ -tocopherol* 2015). A partir de 75 ans, l'apport conseillé est plus important et s'élève de 20 à 50 mg/jour. Une alimentation équilibrée et diversifiée en fruits et légumes assure un apport suffisant en vitamine E mais la consommation occasionnelle de graines (amandes, noisettes) est recommandée pour assurer un apport optimal (Martin, 2000).

Cependant, l'apport en vitamine E dans la population générale est trop faible quelle que soit la région du monde considérée. En effet, selon une méta-analyse datant de 2015, les apports en

tocophérols (toutes formes confondues) étaient inférieurs à l'apport journalier recommandé pour la majeure partie de la population, voire inférieurs au seuil minimal de 12 mg par jour, tant dans les pays en développement que dans les pays industrialisés. En France, la grande étude sur la situation et l'évolution des apports alimentaires de la population (étude SUVIMAX) a révélé que 41% des hommes et 63% des femmes avaient des apports en vitamine E inférieurs à l'ANC et ces valeurs ont atteint 65 et 82% en 2002 (Deschamps et al. 2005). Aux Etats-Unis, l'apport médian était de 6,2 mg par jour pour l' $\alpha$ -tocophérol et de seulement 1 mg par jour pour le  $\gamma$ -tocophérol (Péter et al. 2015). Une autre étude a récemment montré que plus de 2/3 des adultes sud-coréens présentent des concentrations sériques en vitamine E proches du seuil minimal (12 à 30  $\mu\text{mol/L}$ ; le seuil optimal étant fixé à 30  $\mu\text{mol/L}$ ) et près du quart des adultes sont carencés ( $< 12 \mu\text{mol/L}$ ) (Kim, Cho 2015). De même, dans les zones rurales du Népal et du Bangladesh, environ un tiers des femmes enceintes sont gravement carencées en vitamine E ( $< 10 \mu\text{mol/L}$ ). L'apport en vitamine E est également trop faible dans de nombreux pays industrialisés comme le Royaume-Uni, l'Allemagne et les Pays-Bas (Troesch et al. 2012).

Pourtant, malgré un apport insuffisant, la carence en vitamine E est quasiment inexistante en conditions physiologiques du fait du stockage préférentiel de la vitamine E dans le tissu adipeux (environ 90% de la teneur totale en vitamine E du corps) (Shils et al. 1994) à partir duquel elle est constamment mobilisée. C'est pourquoi les symptômes liés à une alimentation largement déficitaire en vitamine E ne sont généralement visibles qu'après plusieurs décennies de malnutrition.

### 1.7.3.2. Sources alimentaires de vitamine E

La vitamine E est retrouvée essentiellement dans les végétaux. Ainsi, on la retrouve majoritairement dans les céréales (seigle, blé, avoine...), dans les fruits, et dans la plupart des oléagineux, dont leurs huiles (tournesol, soja, maïs, olive, arachide...). Les concentrations en vitamine E sont très variables allant de concentrations extrêmement faibles dans les légumes (moins de 0.5 mg  $\alpha$ -TE/100g) à des niveaux très élevés dans les graines de plantes oléagineuses (environ 170 mg  $\alpha$ -TE/100g dans l'huile de germe de blé). Une quantité restreinte de vitamine E est retrouvée dans les produits d'origine animale (muscles et organes) (Dupin et al. 1992). D'un point de vue nutritionnel, la forme la plus importante de vitamine E est l' $\alpha$ -tocophérol, ainsi les sources alimentaires contenant préférentiellement de l' $\alpha$ -

tocophérol (comme l'huile de germe de blé) doivent être favorisées. Les teneurs en  $\alpha$ -tocophérol (mg/100g), en tocophérols et tocotriénols totaux (mg/100g), ainsi que les formes majoritaires et le pouvoir vitaminique E de certaines huiles végétales et matières grasses sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 4). Ce tableau permet de mettre en évidence l'importance de la teneur en  $\alpha$ -tocophérol dans le pouvoir vitaminique E d'une huile. Par exemple, bien que l'huile de ricin soit riche en tocophérols et tocotriénols (81,99 mg/100g), son équivalent  $\alpha$ -tocophérol est faible (6,20) du fait de la faible quantité d' $\alpha$ -tocophérol comparativement aux autres formes de tocophérols.

Huile/corps gras	$\alpha$ -tocophérol (mg/100g)	Tocophérols + tocotriénols totaux (mg/100g)	Formes majoritaires (par ordre décroissant)	$\alpha$ -Teq
Huile de ricin	0,90	81,99	$\gamma > \delta > \beta > \alpha$	6,20
Huile de noix de coco	1,82	3,88	$\alpha > \delta > \gamma > \beta$	2,25
Huile de maïs	25,69	108,65	$\gamma > \alpha > \delta > \beta$	34,09
Huile de lin	0,54	58,62	$\gamma > \delta > \alpha > \beta$	6,28
Huile d'olive	11,91	13,25	$\alpha > \gamma$	12,04
Huile de palme	6,05	27,24	Tocotriénols $> \alpha$	7,91
Huile d'arachide	8,86	13,59	$\alpha > \gamma > \delta > \beta$	9,37
Huile de pépins de raisin	18,88	68,67	$\gamma > \alpha > \delta$	23,75
Huile de carthame	44,92	49,33	$\alpha > \gamma > \beta > \delta$	45,54
Huile de soja	9,53	104,57	$\gamma > \delta > \alpha > \beta$	17,28
Huile de tournesol	62,20	67,13	$\alpha > \gamma > \beta$	63,37
Huile de germe de blé	150,75	240,14	$\alpha > \gamma > \beta$	169,60
Huile de foie de morue	20,26	20,26	$\alpha$	20,26
Margarine	7,56	28,98	$\alpha > \gamma > \delta$	9,47
Beurre	2,00	2,00	$\alpha$	2,00

Tableau 4. Teneurs en  $\alpha$ -tocophérols (mg/100g), en tocophérols et tocotriénols totaux (mg/100g), formes majoritaires et pouvoir vitaminique E de certaines huiles végétales et matières grasses.

(selon « Vitamin E : Food Chemistry, Composition, and Analysis » Livre de Ronald R. Eitenmiller, Lee, J. (2004), Boca Raton: CRC Press, <https://doi.org/10.1201/9780203970140> et "Tocopherols and Tocotrienols in Finnish Foods: Oils and Fats" E.-L. Syv~ioja, V. Piironenb, P. Varo , P. Koivistoinenb and K. Salminen a avalio Finnish Cooperative Dairies' Association, Helsinki, Finland, and Department of Food Chemistry and Technology, University of Helsinki, Helsinki, Finland).

#### 1.7.4. Rôles de la vitamine E

Les rôles biologiques de la vitamine E sont étroitement liés à la structure chimique étudiée précédemment. En effet, du fait de sa nature lipophile, la vitamine est présente dans toutes les membranes des cellules animales au sein desquelles elle joue un rôle crucial de protection de leur intégrité structurale. De plus, elle est impliquée dans de nombreux mécanismes physiologiques que ce soit au niveau neurologique, immunitaire ou métabolique.

##### 1.7.4.1. Activité antioxydante

Le stress oxydant a été défini par Sies pour la première fois en 1985. Il a été défini comme étant un syndrome résultant d'un déséquilibre entre les systèmes de défense antioxydants et la production de radicaux libres oxygénés. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines : déficit nutritionnel en antioxydant, surproduction endogène d'origine inflammatoire, exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (Sies 1997). Les radicaux libres, quant à eux, sont définis comme des espèces chimiques possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur orbitale externe, générés lors de la scission homolytique d'une liaison covalente. Au cours du métabolisme normal, de nombreuses espèces réactives de l'oxygène (ROS) et espèces réactives de l'azote (RNS) sont produites, car elles sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme (rôle de défense, vasodilatation, anti-agrégation plaquettaire, neurotransmission, signalisation cellulaire, *etc.*). Or, du fait de l'existence d'un électron libre, ces espèces sont fortement instables et capables de déstabiliser d'autres molécules de l'environnement cellulaire, notamment les acides gras polyinsaturés (AGPI). Ainsi, un radical libre peut réagir avec un lipide cellulaire (LH) pour donner un radical peroxyde ( $L^{\circ}$ ) capable, à son tour, d'attaquer d'autres AG et de former un hydroperoxyde (LOOH) et un nouveau radical libre, créant une réaction en chaîne de lipoperoxydation. En l'absence de processus de défense capable de stopper cette réaction en chaîne, l'intégrité de la cellule entière peut être mise en danger (Favier 1997). Autour de cette ambiguïté entre danger et besoins en radicaux libres, la nature a développé de puissants systèmes de défenses antioxydantes permettant de contrôler et de maîtriser le plus précisément possible ce métabolisme.

Il est à présent bien établi que la vitamine E est, de loin, l'antioxydant liposoluble le plus puissant chez l'Homme, capable de stopper très précocement la propagation du processus de

peroxydation lipidique au sein des membranes cellulaires et des lipoprotéines plasmatiques (Burton et al. 1982). En effet, du fait de son caractère hydrophobe et de la présence du système phénolique poly-hydroxylés du noyau chromane capable de stabiliser par résonance l'électron célibataire, la vitamine E est un libérateur d'hydrogène (Van Gossum 1988). Ce système est d'autant plus stable que le noyau est porteur de substituants donateurs d'électrons tels que les méthyles, expliquant la réactivité supérieure de l' $\alpha$ -tocophérol par rapport aux autres tocophérols. La cinétique et les données moléculaires disponibles suggèrent que les propriétés antioxydantes de cette vitamine sont uniques dans le panorama des micronutriments phénoliques. Ainsi, chaque molécule d' $\alpha$ -tocophérol peut donner deux électrons aux radicaux peroxydes ( $\text{LOO}^\circ$ ) pour générer le radical tocophéroxyde ( $\alpha\text{-TO}^\circ$ ) et un hydroperoxyde ( $\text{LOOH}$ ). Ce radical évoluera rapidement vers des composés stables tels que la tocophéryl-quinone (Buettner 1993) ou bien sera régénéré par le glutathion réduit ou l'acide ascorbique (vitamine C) et les réductases NADH-dépendantes (Packer 1991). La capacité antioxydante de l' $\alpha$ -tocophérol permet donc de protéger les bicouches lipidiques des organismes vivants telles que celles des membranes cellulaires ou des lipoprotéines de faible densité (LDL).

#### 1.7.4.2. Vitamine E et fonction neurologique

Depuis une trentaine d'années, il est admis que la vitamine E joue un rôle majeur dans le maintien de la structure et de l'intégrité du système nerveux (Sokol 1988; Ulatowski et al. 2014). En 1928, pour la première fois, une paralysie a été constatée chez des enfants allaités par des mères carencées en vitamine E. Plus tard, un régime pauvre en vitamine E a été incriminé dans le développement d'une encéphalomalacie et d'une ataxie observée chez des poussins (Pappenheimer et al. 1931) et dans le développement d'une dystrophie musculaire chez des cochons et des rats (Goettsch, Pappenheimer 1931). À la suite de ces observations, à partir de 1962, les conséquences neurologiques d'une carence chronique en vitamine E a été plus particulièrement étudiée chez le rat par Pentschew et al. qui ont alors décrit une dégénérescence des axones afférents au niveau de la moëlle épinière, des noyaux graciles et cunéiformes de la voie lemniscale, du ganglion trigéminal et du tractus solitaire (Pentschew, Schwarz 1962). Une dystrophie axonale des nerfs sensitifs périphériques a également été observée (Towfighi 1981). L'idée qu'une carence en vitamine E peut causer des anomalies profondes du système nerveux a donc commencé à être admise. Quelques années plus tard, des dystrophies axonales de même type ont été décrites lors d'autopsie d'enfants et de jeunes



adultes atteints d'atrésie biliaire congénital ou de mucoviscidose (Sung et al. 1980). Bien qu'à cette époque, les taux sériques en vitamine E de ces patients n'aient pas été mesurés, les auteurs avaient estimé très probable la carence en vitamine E car ces deux pathologies sont associées à un syndrome de malabsorption intestinale des lipides, ce qui inclut les vitamines liposolubles. C'est ainsi qu'en 1977, Muller et al. ont apporté les premières preuves irréfutables de lien entre carence en vitamine E et ataxie spinocérébelleuse chez des patients atteints de FHBI-SD1 (Muller et al. 1977). Des troubles neurologiques de même type apparaissent également chez les patients souffrant de stéatorrhées chroniques après résection chirurgicale dans le traitement de la maladie de Crohn, chez les patients souffrant de pseudo-obstruction intestinale (Harding et al. 1982) ou de thrombose vasculaire mésentérique (Hamel, Logigian 2019). Toutes ces pathologies sont caractérisées par une malabsorption intestinale acquise des lipides qui conduit, en 10 à 20 ans à une carence symptomatique en vitamine E. Finalement, le lien a définitivement été fait lors de la découverte de l'ataxie avec déficit isolé en vitamine E (AVED), une ataxie héréditaire rare et sévère entraînant une neurodégénérescence progressive des voies nerveuses allant du cervelet à la moelle épinière (Harding et al. 2010). Le rôle de la vitamine E dans le maintien de l'intégrité du système nerveux a donc été reconnu et admis. Dans la population générale, la carence en vitamine E est généralement secondaire à une pathologie associée à des troubles de l'absorption intestinale telles que l'insuffisance pancréatique exocrine, la cholestase ou les hypocholestérolémies génétiques mais également à des défauts moléculaires qui affectent le transport des lipides tel que décrit dans la maladie de Niemann-Pick de type C et la maladie de Tangier dont les défauts moléculaires sont respectivement des mutations de gènes codant pour les transporteurs NPC1 ou NPC2 et ABCA1.

#### 1.7.4.2.1. Les conséquences cliniques de la carence en vitamine E sur le plan neurologique

La carence prolongée en vitamine E est donc responsable d'une ataxie spino-cérébelleuse, notamment chez les patients atteints de malabsorption digestive et d'AVED. On observe souvent, en premier lieu, la diminution, puis la perte des réflexes ostéotendineux. S'installent ensuite progressivement une atteinte de proprioception, un syndrome cérébelleux (dysmétrie, ataxie, diplégie spastique avec élargissement du polygone de sustentation) et une faiblesse musculaire (Tanyel, Mancano 1997). Les études électrophysiologiques montrent que les symptômes observés sont liés à un défaut de conduction au niveau des fibres centrales et, de

façon moindre, au niveau des fibres périphériques. Il semble, par ailleurs, que les anomalies des fonctions sensibles sont plus fréquentes que celles des fonctions motrices. L'atteinte musculaire peut être biologiquement détectée par l'augmentation des taux sériques des phosphocréatine kinases, de l'aldolase et des transaminases (Hegele, Angel 1985). Les troubles neurologiques ne sont pas totalement identiques d'une pathologie à l'autre et n'apparaissent pas forcément dans le même ordre tel que démontré par Sokol et al. et résumé dans le tableau 5 (Sokol 1988).

	FHBL-SD1	Cholestase chronique de l'enfant	Autre trouble de la malabsorption	AVED
Hypo/areflexie	++	++	++	±
Ataxie cerebelleuse	++	++	++	++
Perte du sens de la position	++	++	+	±
Perte du sens de la vibration	++	++	++	++
Loss of touch-pain	+	±	+	-
Ophtalmoplégie	+	+	+	-
Ptosis	+	+	±	-
Faiblesse musculaire	+	+	+	+
Rétinite pigmentaire	++	±	+	-
Dysarthrie	+	±	+	+

Tableau 5. Conséquences cliniques de la carence en vitamine E en fonction du type de pathologie (d'après Sokol 1988).

*Légende* : ++ : toujours présent, + : souvent présent, ± : variable, - : absent.

#### 1.7.4.2.2. Physiopathologie

Le système nerveux central (SNC), y compris la rétine, est susceptible d'être particulièrement vulnérable à une carence en vitamine E. En effet, ce tissu 1) contient des taux élevés d'AGPI, sensibles à la peroxydation lipidique, 2) reçoit un pourcentage disproportionné d'oxygène, 3) est relativement déficient en systèmes antioxydants (avec une catalase presque inexistante, activité réduite de la glutathion peroxydase et une concentration réduite de glutathion) et 4) certaines régions spécifiques contiennent des concentrations élevées de fer, qui est capable de

catalyser la production de radicaux libres (Olanow 1990). Ces éléments caractérisent également la rétine, particulièrement riche en AGPI et consommatrice d'oxygène, en plus d'être fortement exposée et vulnérable aux dommages phototoxiques oxydatifs, comme nous le verrons plus bas.

D'un point de vue morphologique et fonctionnel, des études menées sur des rats déficients en vitamine E ont montré une dystrophie et une dégénérescence axonale des colonnes dorsales, en particulier dans les noyaux graciles et cunéiformes des ganglions de la racine dorsale des nerfs sensoriels, avec perte subséquente de myéline (Pentschew, Schwarz 1962). Au niveau histologique, la dystrophie axonale se traduit par un gonflement des axones lié à une accumulation d'agrégats intracellulaires dérivées du réticulum endoplasmique lisse, des mitochondries, des corps lamellaires denses, des neurofilaments, et des lysosomes (Southam et al. 1991). Dans cette étude, Southam et ses collègues suggèrent ainsi que les anomalies neuronales pourraient résulter des dommages aux mitochondries et autres structures membranaires intra-axonales, qui aggraveraient l'état d'oxydation du fait de la forte proportion d'AGPI, et qui deviendraient des obstacles physiques empêchant un transport axonal efficace (Southam et al. 1991). D'ailleurs, au niveau fonctionnel, les neurones affectés présentent une altération du transport et du processus de respiration mitochondrial, qui se manifestent par des anomalies des potentiels évoqués somatosensoriels et visuels (Goss-Sampson et al. 1988; Yokota et al. 2001; Cuddihy et al. 2008). Néanmoins, le point clé de la physiopathologie est l'absence d'effet antioxydant de la vitamine E, car les déficits neurologiques pouvaient être réduits par l'administration alimentaire concomitante d'éthoxyquine, un antioxydant synthétique, et étaient nettement aggravés par l'administration d'AGPI (Southam et al. 1991). L'ataxie cérébelleuse se caractérise également par une myélinisation réduite des fibres de la moelle épinière et implique probablement une lésion des neurones de Purkinje cérébelleux, médiateurs essentiels de l'innervation motrice provenant du cortex cérébelleux, car une atrophie de ces neurones est observée chez les souris  $\alpha$ TTP<sup>-/-</sup>, un modèle murin permettant d'étudier les ataxies cérébelleuses (Altman 1972; Yokota et al. 2001; 2000).

On dispose encore de peu d'informations concernant les voies par lesquelles l' $\alpha$ -tocophérol traverse le SNC et sur les mécanismes qui régulent ce processus de transport. Il a été suggéré que l' $\alpha$ -tocophérol passerait la barrière hémato-encéphalique complexés aux HDL, par un mécanisme médié par les récepteurs SR-B1 (Mardones et al. 2002; Balazs et al. 2004). De plus, chez la souris, il a été montré que l'apolipoprotéine E (apoE) transporte l' $\alpha$ -tocophérol

dans le cerveau et dans le liquide céphalo-rachidien (Vatassery et al. 2006; 2007). Il semble donc que, comme dans le cas du foie, la vitamine E utilise dans le SNC des voies de transport partagées avec d'autres lipides. Par ailleurs, une étude d'hybridation in situ a révélé que l'ARNm de l' $\alpha$ TTP est exprimé dans les cellules cérébelleuses qui entourent les neurones de Purkinje et les approches de microscopie de fluorescence montrent que l' $\alpha$ TTP est également exprimé dans les astrocytes cérébelleux (Hosomi et al. 1998). En tenant compte des rôles connus des astrocytes dans le soutien métabolique des neurones et dans le trafic de cholestérol médié par l'apoE entre les astrocytes et les neurones, Ulatowski et al. proposent que la localisation astrocytaire de l' $\alpha$ TTP suggère que ces cellules stockent l' $\alpha$ -tocophérol dans des vésicules périnucléaires, et régule la sortie de la vitamine E vers le neurone voisin via l' $\alpha$ TTP. La sortie de l' $\alpha$ -tocophérol de l'astrocyte se ferait via ABCA1 qui serait transporté au sein du SNC par des lipoprotéines contenant l'ApoE (figure 10). Lors de l'induction d'un stress oxydatif, l'expression de l' $\alpha$ TTP dans les astrocytes augmente afin de faciliter le transport de l' $\alpha$ -tocophérol aux neurones voisins, les protégeant ainsi des dommages oxydatifs. Ainsi, un stress oxydatif excessif, une carence en vitamine E ou des mutations  $\alpha$ TTP peuvent compromettre la capacité du système à prévenir les dommages oxydatifs dans les neurones de Purkinje, ce qui entraîne une ataxie (Ulatowski, Manor 2013).

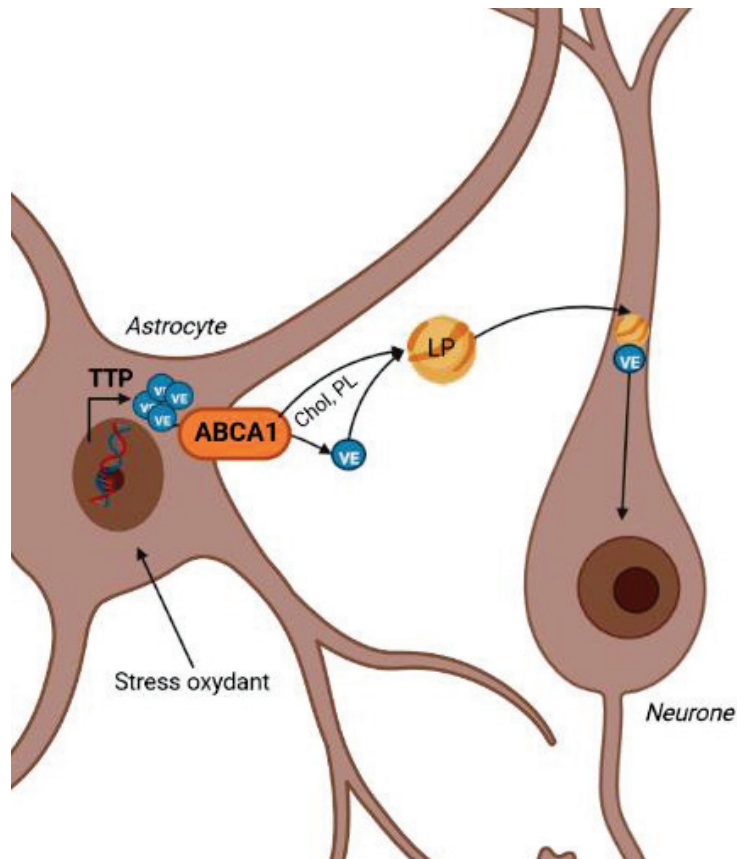


Figure 10. Transport de la vitamine E entre les astrocytes et les neurones. Figure de C. Bordat d'après Ulatowski et al. (2013).

## 1.8. Les caroténoïdes

### 1.8.1. Introduction

Les caroténoïdes, molécules lipophiles isopréniques, sont les pigments (molécules absorbant la lumière visible) les plus largement répandus dans la nature, et sont présents dans les bactéries, les algues et les plantes photosynthétiques, mais également dans certaines espèces d'archées et de champignons, et même chez les animaux (Goodwin 1986) (Britton et al. 2012). Bien que de très rares animaux (notamment les pucerons (Moran, Jarvik 2010) se soient récemment révélés capables de les synthétiser, les animaux n'en produisent généralement pas et les obtiennent par l'alimentation pour les utiliser en tant que précurseurs des rétinoïdes comme la vitamine A (Olson 1996). Ils sont organisés en 2 grandes classes les xanthophylles, oxygénés, (tels que la lutéine et la zéaxanthine) et les carotènes,

hydrocarbures non oxygénés analogues au squalène, (tels que l' $\alpha$ -carotène, le  $\beta$ -carotène ou le lycopène) (Yabuzaki 2017) et sont essentiels pour l'évolution et l'écologie de nombreux taxons. En effet, parce que ce sont des molécules polyinsaturés et hautement conjugués, ils absorbent une partie du spectre visible (dans le bleu en général, d'où la couleur rouge qu'ils renvoient) et servent de relais d'énergie lumineuse dans la photosynthèse, et participent à la protection de la chlorophylle contre d'éventuelles photo dégradations (Young 1991). De même, dans les tissus et les organismes non photosynthétiques ils jouent le rôle de pigments colorés allant du jaune au rouge (Goodwin 1986). Ils sont à l'origine de la couleur de la plupart des fruits et légumes jaunes, oranges ou rouges, le taux record étant détenu par la spiruline (*Arthrospira platensis*), dont le contenu  $\beta$ -carotène est dix à quinze fois supérieur à celui de la carotte. On peut citer par exemple, le lycopène qui donne sa couleur rouge à la tomate ou au pamplemousse (Khan et al. 2021), la lutéine responsable de la couleur du jaune d'œuf (Kljak et al. 2021), la zéaxanthine retrouvée dans le maïs (O'Hare et al. 2015) ou encore la canthaxantine à l'origine de la couleur dorée des chanterelles (Haxo 1950).

Mais surtout, ils sont responsables de la couleur rouge des feuilles en automne, phénomène particulièrement visible chez les érables, après dégradation annuelle de la chlorophylle et (Namitha, Negi 2010). C'est d'ailleurs de ces caractéristiques fondamentales que découlent les noms des deux grandes classes de caroténoïdes, « xanthos » étant le mot grec pour jaune, et « phyll » pour feuille et « carotène » faisant simplement référence à la carotte, d'où le  $\beta$ -carotène a été extrait pour la première fois en 1831 par Heinrich Wilhelm Ferdinand Wackenroder (1798-1854) à la recherche d'un antihelminthique.

Depuis les années 1980, l'étude des caroténoïdes a explosé du fait, notamment, de leur ubiquité voire de leur universalité. En effet, comme évoqué précédemment, ils sont présents dans tous les règnes du vivant, des procaryotes aux bactéries photosynthétiques, jusqu'aux plantes, aux mammifères et à l'homme, où ils assurent de nombreuses fonctions physiologiques et biologiques qui impliquent ou non l'interaction avec la lumière.

## 1.8.2. Caractéristiques chimiques

### 1.8.2.1. Structures

Plus de 600 caroténoïdes ont pu être isolés à ce jour, et sont tous dérivés d'une structure moléculaire tétraterpénique à 40 atomes de carbone : le lycopène ( $C_{40}H_{56}$ ). Ce dernier est

constitué de 8 unités isopréniques formant un système de 13 doubles liaisons conjuguées. C'est cette caractéristique structurale qui confère aux caroténoïdes leur capacité à absorber le spectre visible dans le bleu.

La base de données recensant les caroténoïdes (« Carotenoids Database » ; <http://carotenoiddb.jp/>) recense, en juin 2020, les structures chimiques de 1204 caroténoïdes naturels, retrouvés dans 722 organismes vivants (Yabuzaki 2017). Il existe deux classifications admises pour cette famille de molécule : une première classification basée sur la présence ou non d'un cycle à une ou deux extrémités de la chaîne carbonée, et une deuxième classification, plus pertinente, basée sur la composition chimique. Cette deuxième classification permet, ainsi, de définir deux sous-groupes : les caroténoïdes constitués exclusivement d'atomes de carbones et d'hydrogène forment le sous-groupe des carotènes, tandis que ceux possédant au moins un atome d'oxygène (donc oxygénés), forment le sous-groupe des xanthophylles. Les groupements chimiques oxygénés les plus couramment retrouvés dans la structure des xanthophylles sont les groupements hydroxyles (lutéine, zéaxanthine), époxydes (violaxanthine, néoxanthine) ou carbonyles (canthaxanthine, capsanthine). Cependant, dans la grande famille des caroténoïdes, on trouve presque tous les types de fonctionnalisation : éther, alcool, ester, éther, aldéhyde, cétone, époxyde, carboxyle, acétate et même des glycosides, des lactones, ou des sulfates (G. Britton 1995) (Britton 1989). En 2020, plus de huit cents molécules appartenant à la sous-famille des xanthophylles ont été caractérisées contre une centaine pour les carotènes (Yabuzaki 2017). Une troisième classification, moins officielle, existe, basée sur la fonction biologique : les caroténoïdes pro-vitaminiques A et les non pro-vitaminiques A (Stahl, Sies 2005). Ainsi, parmi les pro-vitaminiques A on peut citer le  $\beta$ -carotène, l' $\alpha$ -carotène et la  $\beta$ -cryptoxanthine (qui possède un cycle  $\beta$ -ionone), majoritairement responsable de l'apport en vitamine A dans le régime alimentaire occidental (Harrison, Curley 2016).

La grande majorité des caroténoïdes contiennent 40 atomes de carbone ( $C_{40}$ ) et sont formés à partir de la condensation de 8 unités isopréniques ( $C_5$ ) mais il existe des caroténoïdes à chaîne carbonée plus longue ( $C_{45}$  ou  $C_{50}$ ) ou plus courte ( $C_{30}$ ) (Britton 1989). De plus, les caroténoïdes peuvent être clivés et perdre un ou plusieurs fragments à chaque extrémité de la chaîne carbonée, formant ainsi des apocaroténoïdes (Harrison, Curley 2016). Le terme « apocaroténoïde » est largement utilisé dans la littérature pour désigner l'ensemble des molécules issues du clivage enzymatique ou non enzymatique des caroténoïdes, mais cette utilisation n'est pas strictement correcte. En effet, ce terme désigne strictement les molécules

obtenues par élimination formelle d'une ou des deux extrémités d'un caroténoïde (IUPAC, Comm 1971). Les molécules dérivées de caroténoïdes par d'autres transformations chimiques appartiennent à d'autres familles. Ainsi, parmi les produits de dégradation non-apocaroténoïdes on retrouve les norcaroténoïdes (tels que la peridinine) auxquels il manque un, deux ou trois atomes de carbones sur le squelette hydrocarbure central (Liaanen-Jensen 1973). On retrouve également les secocaroténoïdes, dans lesquels une liaison entre deux carbones adjacents (sauf les carbones 1 et 6 des cycles) est rompue. C'est le cas, par exemple, de la semi- $\beta$ -caroténone ou du 2, 3-seco- $\epsilon, \epsilon$ -carotène (IUPAC, Comm 1971). Enfin, on peut citer les rétrocaroténoïdes, comme la rhodoxanthine, dans lesquels l'ensemble du système de doubles liaisons conjugués est décalé d'un carbone, faisant disparaître la double liaison généralement retrouvée entre les carbones 15 et 15', marqueur du centre de symétrie de la chaîne carbonée (IUPAC, Comm 1971). Les produits de dégradation des caroténoïdes, notamment les apocaroténoïdes en C<sub>13</sub> comme les  $\beta$ -ionones ou les  $\beta$ -damascone (Baldermann et al. 2013) sont d'ailleurs des composés bien connus des parfumeurs. En effet, les odeurs florales du thé noir, du raisin, du vin, du tabac et de nombreux fruits résultent pour l'essentiel de produits de dégradation des caroténoïdes (Huang et al. 2009). Par exemple, la  $\beta$ -damascenone, une cétone monoterpénique cyclique, est un composant majeur de la senteur de rose : présente à seulement 0,14 % dans l'huile essentielle de rose, elle contribue à 70% de son odeur (Baldermann et al. 2013) (Enzell 1985). Les sous-groupes principaux sont résumés dans le tableau 6 ci-dessous.

	Sous-groupe	Caractéristiques	Exemples
Structure	Carotènes	Hydrocarbures	$\alpha$ -Carotène, $\beta$ -Carotène, $\beta$ -cryptoxanthine
	Xanthophylles	Hydrocarbures oxygénés	Lutéine, zéaxanthine, violaxanthine, fucoxanthine
Cyclisation	Acyclique	Absence de cycles aux extrémités de la chaîne aliphatique	Lycopène
	Monocyclique	Une seule extrémité cyclisée	$\gamma$ -Carotène
	Bicyclique	Deux extrémités cyclisées	$\beta$ -Carotène
Altération structurelle	Allénique	Présence de deux doubles liaisons adjacentes	Néoxanthine
	Acétylénique	Présence d'une triple liaison	Déhydro apocaroténoïde
	Apocaroténoïde	Moins de 40 atomes de carbone	Bixine
	Caroténoïdes supérieurs	Plus de 40 atomes de carbone	Crocétine

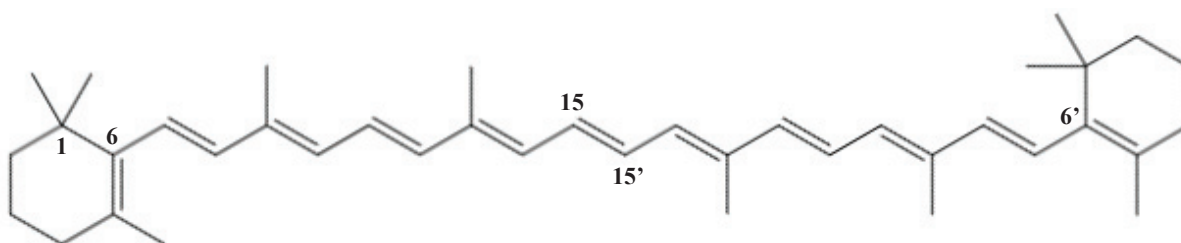


	Primaire	Essentiels à la photosynthèse	$\beta$ -Carotène, lutéine, anthéroxanthine, néoxanthine	zéaxanthine, violaxanthine
Fonction	Secondaire	Présence non directement liée à la survie de la plante (Caroténoïdes localisés dans les fruits et les fleurs)	$\alpha$ -Carotène, capsanthine, bixine, lycopène, astaxanthine	

Tableau 6. Classification des caroténoïdes d'après (Rodriguez-Amaya 2001).

a. L' $\alpha$ - et le  $\beta$ -carotène

Du fait de son activité vitaminique A majeure et de son abondance dans la nature, on comprend aisément que le  $\beta$ -carotène soit l'un des caroténoïdes les plus étudiés. En effet, avec la lutéine, il semble être le pigment organique le plus présent dans les végétaux (Rodriguez-Amaya 2001), et est notamment largement utilisé comme colorant/additif alimentaire (autorisé par la directive 85/C 278/04 publié au Journal officiel des Communautés européennes le 30 Octobre 1985, sous le numéro E160a). D'un point de vue structurel, le  $\beta$ -carotène contient 40 carbones avec 11 doubles liaisons conjuguées et 2 non conjuguées et 2 cycles  $\beta$ -ionone aux deux extrémités de la molécule (figure 11A). Le  $\beta$ -carotène, de formule  $C_{40}H_{56}$  (poids moléculaire :  $536.9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) appartient au groupe des carotènes, synthétisés biochimiquement à partir de huit unités isopréniques. Il se distingue par la présence de cycles  $\beta$ -ionone aux deux extrémités de la molécule. Il a été isolé pour la première fois de la carotte en 1831, d'où son nom (Igielska-Kalwat et al. 2015). Dans la nature, le  $\beta$ -carotène se trouve majoritairement sous la forme configuration « tout-trans » et « 9-cis »  $\beta$ -carotène, et en petites quantités sous la forme de « 13-cis »  $\beta$ -carotène (Young 1991). L' $\alpha$ -carotène, est également un carotène en  $C_{40}$ , avec le squelette polyénique insaturé caractéristique mais possède un cycle  $\epsilon$  et un  $\beta$  aux extrémités du squelette, et non deux cycles  $\beta$  comme le  $\beta$ -carotène (figure 11B). La délocalisation de la double liaison engendre l'apparition d'un centre chiral au niveau du carbone 6'. L' $\alpha$  et le  $\beta$ -carotène peuvent être synthétisés par conversion du lycopène par l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -lycopène cyclase.



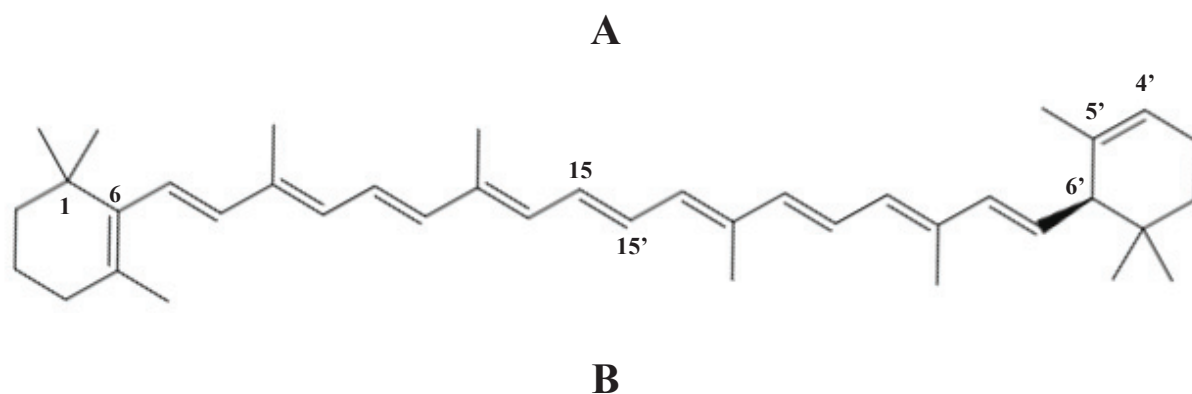


Figure 11. Structures (A) du  $\beta$ -carotène ou 1,3,3-triméthyl-2-[(1E,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17E)-3,7,12,16-tétraméthyl-18-(2,6,6-triméthylcyclohexen-1-yl)octadeca-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaényl]cyclohexène (CID : 5280489, CAS : 7235-40-7) et (B) de l' $\alpha$ -carotène ou (6'R)- $\beta,\epsilon$ -carotène (CID : 6419725, CAS : 7488-99-5) d'après PubChem.

*b. La lutéine et la zéaxanthine*

La lutéine (3R,3'R,6'R- $\beta,\epsilon$ -carotène-3,3'-diol) est une xanthophylle dérivée de l' $\alpha$ -carotène ( $\beta,\epsilon$ -carotène), de formule  $C_{40}H_{56}O_2$  (poids moléculaire :  $568,8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Chez l'homme, la lutéine représente plus de la moitié des caroténoïdes totaux dans l'œil et le cerveau, où elle confère une protection contre les dommages causés par la lumière, les dommages oxydatifs et l'inflammation (Johnson 2014). Dans les chloroplastes, la lutéine représente environ la moitié des caroténoïdes totaux, s'accumule dans les membranes des thylakoïdes et participe à la captation de la lumière et à la photoprotection des tissus végétaux (Jahns, Holzwarth 2012). La lutéine est constituée d'une chaîne polyénique insaturée conjuguée avec la double liaison C-5,6 du cycle  $\beta$  (à gauche sur la figure 12A), mais pas avec la double liaison C-4',5' du cycle  $\epsilon$  (à droite sur la figure 12B). A l'instar de l' $\alpha$ -carotène, cette double liaison délocalisée par rapport à la zéaxanthine introduit un centre chiral supplémentaire, au niveau du carbone 6'. La présence du groupe hydroxyle polaire au niveau des cycles  $\beta$  et  $\epsilon$  diminue l'hydrophobie de la molécule et permet la localisation transmembranaire de la lutéine (Niu et al. 2020). La zéaxanthine, quant à elle, est un isomère de la lutéine et possède donc la même formule chimique. Ces composés ne diffèrent que par la position de la double liaison dans l'un des cycles : la double liaison C-4',5' du cycle  $\epsilon$  de la lutéine est en position entre C-5',6' dans le cas de la zéaxanthine. La zéaxanthine possède donc deux cycles  $\beta$  comme le  $\beta$ -carotène (Gruszecki 2009). Cependant, du fait de la présence des groupes hydroxyles, ni la lutéine ni la zéaxanthine ne sont des précurseurs de la vitamine A.

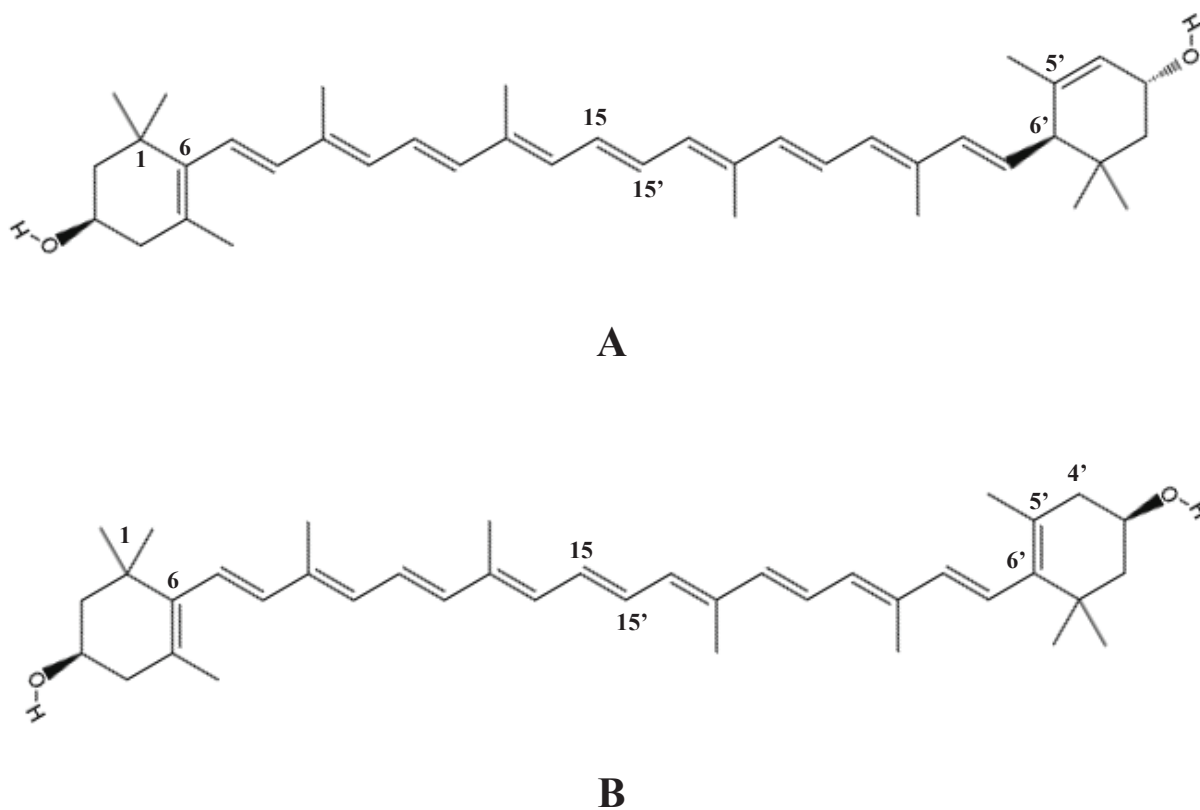


Figure 12. Structures (A) de la lutéine ou 3R,3'R,6'R- $\beta,\epsilon$ -carotène-3,3'-diol (CID : 5281243, CAS : 127-40-2) et (B) de la zéaxanthine ou (1R)-4-[(1E,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17E)-18-[(4R)-4-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl]-3,7,12,16-tetramethyloctadeca-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaenyl]-3,5,5-trimethylcyclohex-3-en-1-ol (CID : 5280899, CAS : 144-68-3) d'après PubChem.

### 1.8.2.2. Isomères optiques et géométriques

Du fait de la présence de doubles liaisons dans la structure des caroténoïdes, de nombreux isomères géométriques peuvent être formés (cis/trans ou Z/E), cependant, dans la plupart des cas, la géométrie de la molécule est imposée par l'encombrement stérique (Britton 1993). Ainsi, naturellement, les caroténoïdes sont en configuration « tout-trans », thermodynamiquement plus stable (G. Britton 1995). Pour autant, les isomères cis sont régulièrement retrouvés in vivo, notamment pour certains caroténoïdes acycliques tels que le lycopène ou le phytoène (Chasse et al. 2001; Meléndez-Martínez et al. 2014). En effet, on retrouve, dans le sérum humain et dans certains tissus de mammifères, une proportion importante de 5-cis-lycopène et de 15-cis-phytoène (Meléndez-Martínez et al. 2014). Cependant, la présence de ces isomères dans les organismes vivants ou dans les matrices

alimentaires semble être majoritairement due à une isomérisation causée par la chaleur, la lumière ou un système enzymatique secondaire. En effet, ils sont plus largement retrouvés dans les aliments transformés ou dans les animaux métabolisant les caroténoïdes que dans les matrices végétales (Chandler, Schwartz 1987).

Un autre point essentiel concernant la géométrie des caroténoïdes est la présence des centres chiraux et, par conséquent, l'existence de différents isomères optiques. Un exemple classique, particulièrement approprié dans le cadre de ce travail, est celui de la zéaxanthine. En effet, on décrit deux isomères optiques, la (3R-3'R)-zéaxanthine et la (3R-3'S)-zéaxanthine (ou méso-zéaxanthine) retrouvés dans la *macula lutea* de la rétine humaine (Bone et al. 1993). Étonnamment, il n'existe pas de source alimentaire connue pour la méso-zéaxanthine, bien qu'on puisse la retrouver dans les jaunes d'œuf des poules nourries avec cet isomère (Rasmussen et al. 2012) ou dans la chair de certains poissons nourris avec une alimentation enrichie (Rasmussen et al. 2012). A ce jour, l'origine de la méso-zéaxanthine est peu connue et peu étudiée mais, n'ayant toujours pas de source naturelle formellement identifiée, il semble admis que la méso-zéaxanthine se forme dans la rétine, à partir de la lutéine (Bone et al. 2007).

### 1.8.2.3. Propriétés physico-chimiques

A de très rares exceptions, les caroténoïdes sont des molécules très lipophiles, insolubles dans l'eau, et sont généralement retrouvés dans des milieux hydrophobes (G. Britton 1995). La très forte hydrophobicité de ces molécules conditionne donc leur répartition dans l'environnement cellulaire, ainsi, les caroténoïdes sont associés aux bicouches lipidiques membranaires et sont transportés dans l'organisme par les lipoprotéines (Gruszecki, Siewiesiuk 1990). Cependant, la présence ou l'absence de groupes fonctionnels plus ou moins polaires sur la chaîne carbonée peut modifier la polarité des caroténoïdes, et influencer leur localisation dans les membranes biologiques et leurs interactions avec différentes molécules. Ainsi, leur estérification avec des AG augmentent d'autant plus leur lipophilie, tandis que leur association à des protéines ou des sucres tend à la diminuer (Jomova, Valko 2013). Par ailleurs, ces variations de propriétés physicochimiques expliquent les différences d'absorption intestinale observées mais également de répartition tissulaire (exemple de la lutéine et de la zéaxanthine au niveau de la rétine) ou de réactivité vis-à-vis des radicaux libres par exemple.

La caractéristique principale des caroténoïdes est la présence d'un système de doubles liaisons conjuguées, responsable de leur couleur (chromophore), de leur forme, de leur réactivité et de leur propriétés photochimiques (G. Britton 1995). Du fait de cette délocalisation permanente des électrons  $\pi$  tout le long de la chaîne carbonée, la majorité des caroténoïdes absorbent la lumière dans le bleu et le violet (400–500 nm) et renvoient une couleur allant du jaune au rouge (George Britton 1995). De plus, la couleur des caroténoïdes dépend de facteurs tels que leur concentration, leur agrégation et leurs interactions avec les protéines. Par exemple, les caroténoïdoprotéines (comme l'alloporine) renvoient plutôt dans le bleu ou le violet (Britton et al. 1982).

Cependant, le rôle de pigment n'est pas la seule fonction des caroténoïdes. En effet, les propriétés physico-chimiques des caroténoïdes leur confèrent des fonctions biologiques plus essentielles. Ils sont particulièrement caractérisés par une grande réactivité due à leur système de doubles liaisons conjuguées (G. Britton 1995) et sont donc capables d'interagir avec des espèces chimiques très réactives tels que les radicaux libres dérivés de l'oxygène ou de l'azote d'où leur activité antioxydante qui sera décrite plus bas (Landrum 2013). Finalement, notons que les caroténoïdes, du fait de leur configuration, sont sensibles à la lumière et à la chaleur (Britton et al. 2012).

La forte hydrophobicité des caroténoïdes permet de les extraire d'un milieu biologique par un solvant comme l'hexane. Leur détection et quantification peut alors se faire par une mesure spectrophotométrique directe à 450 nm. Les techniques modernes font appel à des séparations en chromatographie liquide de partage sur phase inverse, avec une détection à une ou plusieurs longueurs d'onde (Steghens et al. 1997).

### 1.8.3. Sources alimentaires

Dans les pays occidentaux, 80 à 90 % de l'apport en caroténoïdes provient de la consommation de fruits et de légumes. Sur l'ensemble des caroténoïdes naturels identifiés à ce jour, 50 sont présents dans l'alimentation humaine et peuvent être absorbés et métabolisés par le corps humain mais seuls six ( $\beta$ -carotène,  $\alpha$ -carotène,  $\beta$ -cryptoxanthine, lycopène, lutéine et zéaxanthine), représentant plus de 95 % des caroténoïdes sanguins totaux (Khachik et al. 1997). Ils constituent, à ce titre, les caroténoïdes les plus étudiés et sont considérés

comme les plus importants dans l'alimentation humaine en raison de leurs activités biologiques.

Les carotènes hydrocarbonés tels que le  $\beta$ -carotène ou le lycopène sont généralement présents sous forme libre, piégés dans les chloroplastes et les chromoplastes des tissus végétaux. En général, les formes libres sont mieux absorbées. Les sources principales de  $\beta$ -carotène sont les fruits et légumes jaunes, orange et rouges tels que les carottes, les tomates, les patates douces, la pastèque, et la courge mais également dans certains végétaux verts tels que les épinards, la laitue, le brocoli (Zeb, Mehmood 2004; Raju et al. 2007; EL-Qudah 2009). La lutéine et la zéaxanthine sont les xanthophylles les plus abondantes dans les légumes à feuilles vertes (par exemple, le chou frisé, les épinards, le brocoli, les pois et la laitue) mais également le jaune d'œuf. Elles sont abondantes dans un certain nombre de fruits et légumes jaunes ou orange tels que les pêches, les mangues, les papayes, les pruneaux, les courges et les oranges. On les trouve également en quantité relativement importante dans le blé et le maïs et dans les produits alimentaires transformés qui en contiennent, comme le pain (Lakshminarayana et al. 2007; Raju et al. 2007). Le jaune d'œuf de poule est considéré comme une meilleure source de lutéine et de zéaxanthine que les fruits et les légumes en raison de sa biodisponibilité accrue due à la teneur élevée en lipides (Schaeffer et al. 1988; Mangels et al. 1993). Les concentrations de lutéine et de zéaxanthine dans le jaune d'œuf de poule sont respectivement de  $292 \pm 117 \mu\text{g/jaune}$  et de  $213 \pm 85 \mu\text{g/jaune}$  (sachant que le poids moyen du jaune est d'environ 17-19 g), mais ces concentrations dépendent largement du type d'alimentation (Handelman et al. 1999).

Finalement, les principales sources des caroténoïdes, par ordre décroissant sont :

- Carotte, épinard, chénopode, poivron (rouge) et oseille pour le  $\beta$ -carotène,
- Epinard, chénopode, oseille, épinard indien et amarante pour la lutéine,
- Poivrons (rouges), abricot, salsepareille, tamarillo et mandarine pour la  $\beta$ -cryptoxanthine,
- Poivrons (rouges), chénopode, lentille d'eau, baies de goji et maïs pour la zéaxanthine,
- Carotte, potiron, niébé et épinard de Ceylan pour l' $\alpha$ -carotène.
- Tomate, églantier, ketchup, pastèque et sauce tomate pour le lycopène.

---

Caroténoïdes	Source alimentaire	Quantité ( $\mu\text{g/g}$ )	Références
--------------	--------------------	------------------------------	------------

---

		matière sèche)	
<b>B-carotène</b>	Poivron rouge	6530 – 15 400	(Guil-Guerrero et al. 2006)
	Carotte	4350 – 8840	(Murkovic et al. 2000; Leth et al. 2000)
	Chou kale	1020 – 7380	(Kopsell et al. 2007)
	Patate douce	7830	(Kidmose et al. 2006)
	Aneth	5450	(Murkovic et al. 2000)
	Persil	4440 – 4680	(Leth et al. 2000)
	Epinard	3100 – 4810	(Maiani et al. 2009)
	Abricot	585 – 3800	(Sass-Kiss et al. 2005)
	Laitue	870 – 2960	(Niizu, Rodriguez-Amaya 2005)
<b>A-carotène</b>	Carotte	2840 – 4960	(Murkovic et al. 2000; Leth et al. 2000)
	Aneth	13 820	(Murkovic et al. 2000)
<b>Lutéine</b>	Chou kale	4800 – 11 470	(Kopsell et al. 2007)
	Persil	6400 – 10 650	(Murkovic et al. 2000)
	Epinard	5930 – 7900	(Maiani et al. 2009)
	Poivron rouge	248 – 8506	(Guil-Guerrero et al. 2006)
	Cresson	5610 – 7540	(Kimura, Rodriguez-Amaya 2003)
	Endive	2060 – 6150	(Kimura, Rodriguez-Amaya 2003)
	Jaune d'œuf	384 – 1320	(Leth et al. 2000)
	<b>Zéaxanthine</b>	Poivron rouge	593 – 1350

Tableau 7. Principales sources des caroténoïdes ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) dans le régime occidental.

A ce jour, il n'existe pas de valeurs officielles recommandées pour les apports journaliers en caroténoïdes. D'ailleurs, les tables de composition des aliments distinguent les valeurs pour les caroténoïdes, des valeurs de vitamine A (ou équivalent rétinol), seulement depuis peu. En tenant compte de la biodisponibilité du  $\beta$ -carotène et de l'efficacité de sa conversion en vitamine A, il est admis que 1 mg de vitamine A correspondent à 6 mg de  $\beta$ -carotène et 12 mg pour les autres caroténoïdes provitaminiques A. Cette équivalence s'appelle « l'équivalent rétinol » (ER) (Krinsky et al. 2000). En 2001, l'Institut de médecine américain, sur la base de diverses études, a révisé ce rapport de bioconversion du  $\beta$ -carotène de 1:6 à 1:12 et à 1:24 pour les autres caroténoïdes provitaminique A (Trumbo et al. 2001). En 2004, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et l'Organisation Mondiale de la Santé, ont proposé des facteurs d'équivalence révisés de 1:14 pour le  $\beta$ -carotène et de 1:28 pour les autres caroténoïdes (World Health Organization 2004). En revanche, les pays européens ont continué à utiliser le facteur 1:6 (West et al. 2002). En 2015, l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (European Food Safety Authority) a publié un avis scientifique sur les valeurs nutritionnelles de référence pour la vitamine A et a estimé que les preuves actuelles étaient insuffisantes pour justifier une modification des facteurs de conversion proposés précédemment, confirmant que 1  $\mu$ g ER est équivalent à 1  $\mu$ g de rétinol, 6  $\mu$ g de  $\beta$ -carotène, et 12  $\mu$ g pour les autres caroténoïdes ayant une activité provitaminique A (EFSA Panel on Dietetic Products 2015). Dans un avis de 2016, l'ANSES révisé la référence nutritionnelle pour la population à 750  $\mu$ g par jour pour les hommes et à 650  $\mu$ g par jour pour les femmes, ce qui suppose un apport quotidien de 5 à 10 mg de caroténoïdes (selon la composition et la part du  $\beta$ -carotène dans l'alimentation) (Vidailhet et al. 2017). D'après un rapport datant de 2019 de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes sur les recommandations sanitaires relatives aux micronutriments autorisés dans les compléments alimentaires, les apports alimentaires de la population française sont satisfaisants (rapport disponible en ligne : <https://www.economie.gouv.fr/dgccrf/complements-alimentaires-micronutriments-autorises>).

Selon ce rapport, la valeur retenue pour la recommandation de consommation du  $\beta$ -carotène est celle proposée par l'AFSSA en juillet 2009 : 7 mg. D'ailleurs, selon des études interventionnelles menées avec une teneur contrôlée en caroténoïdes alimentaires, un apport de 3 à 6 mg/jour de caroténoïdes est suffisant pour maintenir des niveaux plasmatiques corrects (Micozzi et al. 1992; Zino et al. 1997). En gardant à l'esprit les six caroténoïdes les plus représentatifs mentionnés ci-dessus, le régime méditerranéen offre peut-être la plus grande diversité et le meilleur apport en caroténoïdes en raison de sa forte teneur en fruits et



légumes (frais et/ou transformés) et en huiles végétales. Concernant les caroténoïdes non provitaminiques A, et particulièrement les xanthophylles, aucune AJR n'existe mais il semble y avoir un consensus émergent considérant, notamment, que la lutéine répond aux critères de molécule bioactive essentielle à la santé et/ou diminuant le risque de maladie chronique et dont une AJR doit être envisagée (Ranard et al. 2017). Ainsi, une consommation de lutéine et de zéaxanthine supérieure à 10 mg/jour a été préconisée pour certaines populations (Huang, Dou, Huang, Xu, Zou, Lin 2015). Dans tous les cas, l'élaboration d'un AJR propre aux caroténoïdes est complexe pour deux raisons : (1) la biodisponibilité des caroténoïdes dépend de nombreux facteurs tant nutritionnels, qu'individuels conduisant à une variabilité inter-individuelle trop importante (Bohn 2017), et (2) le manque d'information concernant le métabolisme des caroténoïdes chez les mammifères.

#### 1.8.4. Fonctions des caroténoïdes

De leurs propriétés physico-chimiques, décrites ci-dessus, découlent les fonctions principales des caroténoïdes dans les organismes vivants tels que les plantes, les algues et les bactéries principalement mais également chez les animaux et l'Homme. Ainsi, les caroténoïdes servent essentiellement de relais d'énergie lumineuse dans la photosynthèse, et sont de puissants protecteurs des tissus face à la photo-dégradation. Les caroténoïdes sont retrouvés dans tous les organismes photosynthétiques, où ils jouent un rôle vital dans la photosynthèse. Ils assurent l'intégrité du système photosynthétique, l'absorption de la lumière, et assurent la protection des tissus contre l'excès de lumière pouvant causer des dommages aux membranes, grâce à leur capacité à dissiper l'énergie et à capter les radicaux libres (Dutton, Manning 1941; Green et al. 2003). Certains caroténoïdes comme le  $\beta$ -carotène sont provitaminique A, et ont donc les propriétés de la vitamine A. Cet aspect ne sera pas développé ici. Parmi les nombreuses fonctions des caroténoïdes, nous nous intéressons à leur activité antioxydante et à leur implication dans la vision.

##### 1.8.4.1. Activité antioxydante

###### a. Désactivation de l'oxygène singulet et piégeage des radicaux libres

Comme vu précédemment, les caroténoïdes ont la capacité d'absorber le trop plein d'énergie de la chlorophylle afin d'éviter la formation d'espèces réactives oxygénées (superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ ,

oxygène singulet  $\bullet\text{O-O}\bullet$ , hydroxyle  $\text{HO}\bullet$ ) qui détruiraient la feuille. Ils jouent donc un rôle essentiel dans la protection des tissus photosynthétiques contre le stress oxydant, qu'il soit induit par la lumière ou non. Cependant, cette activité antioxydante a été retrouvée de façon ubiquitaire dans le monde vivant.

De fait, les caroténoïdes sont considérés comme les plus puissants antioxydants au sein des cellules, par leur capacité à piéger l'oxygène singulet  $\bullet\text{O-O}\bullet$  et à réagir avec de nombreuses espèces radicalaires (Paiva, Russell 1999). En effet, la production d'énergie au sein d'un organisme vivant en condition aérobie est permise grâce à des réactions biochimiques dépendantes de chaînes de transport d'électrons, que ce soit la respiration mitochondriale ou la photosynthèse. En cas d'excès de production d'électrons, ces derniers ne sont plus pris en charge par ces systèmes physiologiques et les cellules s'exposent à un risque d'interaction entre les électrons et l'oxygène dissous dans le cytoplasme, libérant alors des molécules dites « espèces réactives de l'oxygène » (Sies 1986). Ces radicaux libres sont capables d'endommager toutes les molécules essentielles au sein d'une cellule, telles que l'ADN, les protéines, les glucides et les lipides. C'est le cas, par exemple, lors d'un apport excessif d'énergie lumineuse aux chlorophylles (Gilmore 1999).

Cette fonction des caroténoïdes est directement liée à leur structure. En effet, la longueur de la chaîne carbonée, la présence d'un système de doubles liaisons conjuguées, et la présence d'un faible nombre de substituants oxygénés sont des éléments clés permettant l'activité antioxydante de ces molécules. Le nombre de doubles liaisons joue également un rôle important car il semblerait que son augmentation entraîne une augmentation de l'activité antioxydante des caroténoïdes (Kobayashi, Sakamoto 1999). D'ailleurs, le lycopène composé de onze doubles liaisons conjugués et deux doubles liaisons non-conjuguées est le caroténoïde naturel le plus efficace pour piéger l'oxygène singulet (Krinsky 1998). En effet, c'est la présence de doubles liaisons qui permet à ces composés d'accepter et de stabiliser les électrons non appariés des espèces réactives (Rutz et al. 2016). Ils sont donc capables de neutraliser les radicaux libres via l'acceptation d'électrons, le transfert d'hydrogène vers le radical libre ou la formation d'un adduit radicalaire (Kaulmann, Bohn 2014). D'ailleurs, il a été démontré que la présence de caroténoïdes permet de réduire les dommages à l'ADN *in vivo*, dans des modèles animaux, ou *in vitro* dans des lignées cellulaires cancéreuses mais également dans les tissus cancéreux de patients (Bowen et al. 2002; Muzandu et al. 2005; Park et al. 2005).

Le principal intérêt de ces propriétés antioxydantes est la photoprotection qu'assure les caroténoïdes dans la peau et l'œil, deux tissus fortement exposés aux UV. Ainsi, les caroténoïdes tels que les  $\alpha$ -,  $\gamma$ - et  $\beta$ -carotènes, la lutéine, la zéaxanthine, le lycopène et leurs isomères protègent la peau humaine contre l'oxydation cellulaire (Darvin et al. 2011). Cette propriété a été testée in vitro sur fibroblastes de peau humains indiquant qu'il existe une gamme de doses optimales pour laquelle on observe une photoprotection optimale par les caroténoïdes, avec une protection de l'ADN face aux dommages oxydatifs (O'Callaghan, O'Brien 2004). En outre, plusieurs études montrent également que les caroténoïdes favorisent les processus de guérison et protègent la peau contre le stress oxydatif et pourraient réduire le risque de cancer de la peau (Frieling et al. 2000; Palozza et al. 2003; Palombo et al. 2007; Astner et al. 2007; Juturu et al. 2016). De plus, il a été démontré que le  $\beta$ -carotène bloque l'induction médiée par  $^1\text{O}_2$  de MMP-1 et MMP-10 (des métalloprotéinases qui dégradent la matrice extracellulaire), de manière dose-dépendante (Wertz et al. 2004). Chez l'homme, Césarini et al, ont montré que 6 semaines de supplémentation avec un complexe d'antioxydant composé de  $\beta$ -carotène, lycopène, sélénium et  $\alpha$ -tocophérol, administré par voie orale, entraîne une augmentation de la protection cutanée contre les dommages induits par les UV, accompagnée d'une réduction de la lipoperoxydation et une augmentation de la pigmentation de la peau (Césarini et al. 2003). D'autres recherches ont montré une réduction significative de l'érythème induit par les UV et une amélioration de l'hydratation et de l'élasticité de la peau après supplémentation orale en lutéine (Palombo et al. 2007). Heinrich et al. ont également montré un effet protecteur du  $\beta$ -carotène seul et d'un mélange de caroténoïdes ( $\beta$ -carotène, lutéine et lycopène) contre l'érythème induit par les UV (Heinrich et al. 2003). Cet effet a également été montré in vitro sur cellules de fibroblastes humains (Trekli et al. 2003). Toutes ces études indiquent que les propriétés antioxydantes des caroténoïdes assurent un effet photoprotecteur cutané ainsi qu'une réduction de la gravité de l'érythème induit par les UV.

b. Modulation des voies Nrf2 et NF- $\kappa$ B

En plus de l'activité antioxydante via une action physique directe, certains caroténoïdes et apocaroténoïdes sont capables d'exercer une action antioxydante indirecte en régulant les systèmes Nrf2 et NF- $\kappa$ B. Le facteur de transcription Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2 (Nrf2) contrôle l'expression des gènes antioxydants et cytoprotecteurs via la séquence régulatrice appelée élément de réponse antioxydant (ARE). Il active de nombreux

gènes impliqués dans l'homéostasie redox des cellules, tels que GSTA2 (Glutathion-Transférase A2), NQO1 (NADPH : Quinone Oxydoréductase 1), et les SODs (SuperOxydes Dismutases), qui protègent les cellules contre les espèces réactives de l'oxygène et d'autres molécules électrophiles (Nguyen et al. 2009; Jaramillo, Zhang 2013). Brièvement, en absence de condition pro-oxydante, Nrf2 est localisé dans le cytoplasme associé à la protéine Keap 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Keap 1 induit l'ubiquitination de Nrf2 et sa dégradation, ce qui maintient une faible concentration en Nrf2. En présence d'un stress oxydant, Keap 1 subit un changement de conformation qui perturbe l'interaction Keap1-Nrf2 et inhibe l'ubiquitination de Nrf2 lui permettant de se déplacer vers le noyau pour assurer l'expression des gènes impliqués dans la défense cellulaire. (Jaramillo, Zhang 2013). Or, il a été montré que les caroténoïdes, et particulièrement le lycopène et le  $\beta$ -carotène, ont la capacité d'activer les gènes de réponse antioxydante via le système Nrf2 (Ben-Dor et al. 2005; Lian, Wang 2008; Chen et al. 2019). Cet effet a également été observé avec la zéaxanthine dans les cellules ARPE-19 (Zou et al. 2014)

Les caroténoïdes interagissent également avec la voie NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-Kappa B) et sont capables de l'inhiber ce qui empêche la production de cytokines pro-inflammatoires. NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription qui module les gènes impliqués dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire (Mitchell et al. 2016). Le système NF- $\kappa$ B a un fonctionnement similaire au système Nrf2 : en condition physiologique, NF- $\kappa$ B est lié à des protéines cytoplasmiques de la famille des protéines inhibitrices  $\kappa$ B (I- $\kappa$ B) qui inactivent NF- $\kappa$ B en l'empêchant de pénétrer dans le noyau. En réponse à des stimuli de stress, les kinases I- $\kappa$ B (IKK) phosphorylent les I- $\kappa$ B, ce qui provoque leur ubiquitination. Cette dégradation permet à NF- $\kappa$ B d'être transloqué dans le noyau, conduisant à l'activation de gènes liés à l'inflammation et au stress oxydant (Mitchell et al. 2016). Plusieurs sources de données suggèrent que les caroténoïdes tels que le lycopène, le  $\beta$ -carotène mais également la lutéine régulent la voie NF- $\kappa$ B (Palozza, Serini, Torsello, Di Nicuolo, Piccioni, et al. 2003; Huang et al. 2007; Linnewiel-Hermoni et al. 2014; Cho et al. 2018). Une explication possible du mode d'action des caroténoïdes avec les voies Nrf2 et NF-B serait qu'ils induisent un certain degré de stress oxydant intracellulaire, conduisant à la modulation de Nrf2, NF- $\kappa$ B ou de leurs protéines inhibitrices, théorie en lien avec ce qui sera observé chez l'homme concernant les propriétés pro-oxydantes des caroténoïdes (Kaulmann, Bohn 2014).

c. Intérêt de l'action antioxydante pour la santé

Les études épidémiologiques suggèrent un lien positif entre forte consommation de caroténoïdes et bénéfiques pour la santé avec un risque plus faible de maladies chroniques (Agarwal, Rao 2000; Bjelakovic et al. 2012). Il a notamment été montré que le  $\beta$ -carotène et le lycopène sont inversement liés au risque de maladies cardiovasculaires et de certains cancers tout comme la lutéine et la zéaxanthine pour les pathologies oculaires troubles liés à l'œil (Agarwal, Rao 2000; Ribaya-Mercado, Blumberg 2004). Ces effets positifs sur les maladies chroniques sont essentiellement attribués aux propriétés antioxydantes, car ces pathologies sont associées à un état pro-inflammatoire et pro-oxydant. Ainsi, un certain nombre d'études prospectives à grande échelle, telles que l'étude EPIC (Riboli et al. 2002), l'étude sur l'athérosclérose de Los Angeles (Wu et al. 2003) et l'étude de (Kabagambe et al. 2002), suggèrent que la consommation de 3 à 8 portions de fruits et légumes par jour présente des avantages significatifs pour la santé. De même, plusieurs études prospectives ont suggéré que la consommation de caroténoïdes est associée à un renforcement du système immunitaire, et une diminution du risque de pathologies chroniques telles que la DMLA, le diabète de type 2, l'obésité et certains types de cancer (sein, ovarien ou colorectal) et les maladies cardiovasculaires (Cooper 2004; Hamer, Chida 2007; Bonet et al. 2015; Leermakers et al. 2016). Les caroténoïdes suscitent également de l'intérêt pour leur effet protecteur des fonctions cognitives (Hammond 2015; Lindbergh et al. 2018). Quelques-unes de ces études sont résumées dans l'annexe 6. Cependant, il est intéressant de souligner un paradoxe important relatif aux caroténoïdes, objet de nombreuses controverses : contrairement aux études épidémiologiques qui évaluent la relation entre les fruits/légumes entiers et leurs effets positifs sur les maladies chroniques, de nombreuses études d'intervention avec des supplémentation isolées en caroténoïdes n'ont pas réussi à démontrer des avantages pour la santé. Ainsi, les célèbres études « Alpha-Tocopherol Beta-Carotene » (ATBC), qui incluait 29 000 participants recevant une dose journalière de 20 mg de  $\beta$ -carotène associée à d'autres microminutriments pendant 5 à 8 ans et l'étude « Carotene and Retinol Efficacy » (CARET), qui incluait 18 000 participants recevant une supplémentation quotidienne de 30 mg de  $\beta$ -carotène pendant 4 ans en moyenne ont montré une augmentation du risque de cancer du poumon ou d'incident cardiovasculaire, respectivement, dans une populations de sujets fumeurs (Omenn et al. 1996; Törnwall et al. 2004). Dans ces deux études, le  $\beta$ -carotène a été administré en supplémentation d'une alimentation équilibrée, résultant en une concentration plasmatique supérieure au 95<sup>e</sup> percentile de la population américaine (jusqu'à 10 fois la concentration usuelle) (Monsen 2000). En revanche, il ressort des études ATBC et CARET que les 22 000 non-fumeurs supplémentés avec 50 mg de  $\beta$ -carotène tous les deux

jours, ne présentaient pas d'effets délétères malgré une augmentation significative des taux plasmatiques (Hennekens et al. 1996). De même, en Chine, l'étude Linxian faisant intervenir 30 000 femmes et hommes, majoritairement non-fumeurs a montré les effets protecteurs vis-à-vis du cancer de l'estomac et de la mortalité en général, d'une supplémentation de 15 mg/jour de  $\beta$ -carotène associé à d'autres micromicronutriments (Blot et al. 1995). Il ressort de ces études et des controverses qu'elles ont engendré, que la supplémentation en caroténoïdes purifiés ou synthétiques ne peut en aucun cas remplacer ceux retrouvés dans une alimentation équilibrée, où on les retrouve associés à d'autres micromicronutriments. De plus, ces études soulignant que le dosage, la forme d'administration, la durée du traitement, et les facteurs individuels du sujet (maladie chronique, état nutritionnel, traitement) sont probablement des éléments essentiels à prendre en compte avant d'envisager une supplémentation en caroténoïdes. Cela dit, ces résultats inattendus ne doivent pas occulter les résultats des études démontrant le puissant pouvoir antioxydant des caroténoïdes.

#### 1.8.4.2. Les caroténoïdes et la vision

##### 1.8.4.2.1. Structure de l'œil

L'œil est constitué de trois structures anatomiques distinctes. La couche la plus externe, appelée tunique fibreuse, est composée de la sclérotique, de la cornée et de la conjonctive, qui donnent leur forme à l'œil et soutiennent les structures plus profondes. La couche intermédiaire, appelée tunique vasculaire ou uvée, se compose de la choroïde (assurant la nutrition de la rétine), du corps ciliaire (sécrétant l'humeur aqueuse), de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et de l'iris (qui donne la couleur à l'œil). La couche la plus interne est la rétine, oxygénée par les vaisseaux sanguins de la choroïde (à l'arrière) et les vaisseaux rétiniens (à l'avant) et reliée au cerveau par le nerf optique (Kaplan 2007). La rétine est une mince membrane pluristratifiée, située entre l'humeur vitrée et l'épithélium pigmentaire sous-choroïdal. Elle est composée de photorécepteurs de deux types : les cônes contenant une protéine sensible à la lumière iodopsine, responsables de la vision diurne et de la vision des couleurs, et les bâtonnets, contenant la rhodopsine permettant la vision crépusculaire et nocturne. Ce sont ces cellules qui captent les signaux lumineux et les transforment en signaux électro-chimiques acheminés par les nerfs optiques vers l'encéphale, grâce au 11-cis-rétinal, le chromophore de toutes ces protéines photoréceptrices, qui forme une base de Schiff protonée avec un groupe amino de la protéine. Les bâtonnets sont sensibles aux très faibles niveaux

d'éclairement et sont capables d'absorption d'un seul photon, mais leur réponse sature à mesure que l'intensité augmente. Les cônes sont moins sensibles que les bâtonnets, mais leur réponse ne sature pas sur une plage d'intensités lumineuses physiologiquement pertinente. Le chevauchement des courbes de réponse en intensité des deux classes de cellules photoréceptrices permet une réponse visuelle impressionnante (Ingram et al. 2016). L'EPR forme une membrane basale sur la surface externe de la rétine, du côté de la choroïde et fait office de barrière hémato-rétinienne, car les cellules hexagonales pigmentées sont étroitement liées entre elles par des jonctions serrées. Le passage de la plupart des métabolites se fait donc via des transporteurs actifs (Lakkaraju et al. 2020). L'EPR assure le transport, le recyclage et le stockage de la vitamine A, qui sont essentiels au fonctionnement des pigments photosensibles et est riche en enzymes antioxydantes (Yang et al. 2021).

Enfin, la macula lutea, située près du centre de la rétine, au pôle postérieur du globe oculaire dans l'axe de la pupille, est une zone reconnaissable par sa forme ovale et sa couleur jaune caractéristique. Il s'agit de la zone de la rétine contenant la concentration maximale de cônes. C'est l'une des parties les plus importantes de l'œil, responsable de la vision centrale (ou acuité visuelle) et de la perception des couleurs. La macula permet donc la vision fine des détails en éclairage diurne et est essentielle pour les activités nécessitant un traitement des images telles que la reconnaissance faciale, la lecture et la conduite (Provis et al. 2005). La macula représente moins de quatre pour cent de la surface totale de la rétine, mais elle est responsable de la quasi-totalité de notre vision photopique (Provis et al. 2005).

La macula, également appelée fovée (ou *fovea centralis*) peut être divisée en quatre zones distinctes. Au centre, se trouve une petite dépression concave, la fovéola, entièrement composée de cônes et située dans l'axe visuel de l'œil, où l'acuité visuelle est à son maximum (également appelée vision fovéale). Elle-même possède une dépression appelée l'umbo (Bringmann et al. 2018). La fovéa est entourée d'une zone d'environ 0,5 millimètre d'épaisseur, appelée la parafovée (*parafovea*). Cet anneau intermédiaire contient des cônes et des bâtonnets avec un ratio de 1:1. Enfin, la périfovée (*perifovea*), c'est-à-dire la région la plus externe de la macula, jouxte la parafovée et est considérée comme une zone de transition entre les régions centrales hautement spécialisées et la périphérie de la rétine (Provis et al., 2005). Une image de la région maculaire est présentée dans la figure 13 ci-dessous.

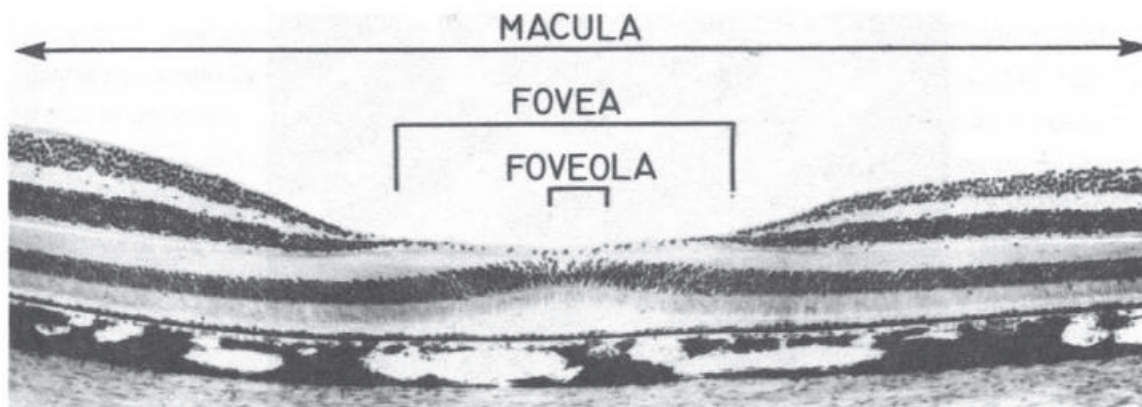


Figure 13. Image de la région maculaire de la rétine du singe macaque en microscopie optique. Les couches neurales s'amincissent au niveau la région fovéale dans la partie la plus centrale de la rétine. D'après (Handelman, Dratz 1986).

#### 1.8.4.2.2. Le pigment maculaire

Les caroténoïdes non provitaminiques A jouent également un rôle direct essentiel pour l'œil en constituant, notamment, le pigment maculaire. Le terme « *macula lutea* » vient du latin « *macula* », qui signifie « tâche », et « *lutea* », qui signifie "jaune" en référence à sa couleur jaune vif liée à la présence de pigments maculaires dans les photorécepteurs (Beatty et al., 1999). Le pigment maculaire aurait été découvert dans les années 1790 sur une pièce de dissection, et décrit comme une tâche jaune ovale au fond de l'œil près du nerf optique (Reil 1797). Puis, avec la naissance de l'ophtalmoscope en 1851, il sera finalement baptisé pigment jaune maculaire ou simplement pigment maculaire (PM) (Hartridge 1951).

Dès 1980, Bone et al. identifie les constituants du PM : deux isomères de même formule chimique  $C_{40}H_{56}O_2$ , structurellement reliée à l' $\alpha$ -carotène et au  $\beta$ -carotène (Bone et al. 1985). Il s'agit en fait une concentration de lutéine, zéaxanthine et méso-zéaxanthine (Bone et al. 1985). La lutéine est présente sous la forme d'un seul stéréo-isomère, (3R, 3'R, 6'R) tandis que la zéaxanthine de la macula est constituée de quantités similaires des stéréoisomères (3R, 3'R) et (3R, 3'S), et d'une quantité beaucoup plus faible du stéréoisomère (3S, 3'S), dont la présence pourrait être liée à une isomérisation de la lutéine dans la rétine (Bone et al. 1993). Enfin, Snodderly et al réussissent à localiser le PM dans la couche des fibres de Henlé chez les primates (Snodderly, Auran, et al. 1984). La concentration de ces caroténoïdes dans la région maculaire est environ 1000 fois supérieure à celle du sang (Bone et al. 2000).



a. Distribution du pigment maculaire dans la rétine

La distribution spatiale du PM dans la rétine a été décrite pour la première fois en 1984 dans l'œil des primates, par micro-spectrophotométrie (Snodderly, Brown, et al. 1984; Snodderly, Auran, et al. 1984). Par la suite, la distribution radiale du PM a été décrite dans la rétine humaine. Ainsi, au centre de la macula, la zéaxanthine est deux fois plus concentrée que la lutéine (rapport lutéine/zéaxanthine de 1:2) puis cette concentration diminue en s'éloignant du centre, tandis que les concentrations en lutéine augmentent dans la parafovéa et la perifovée, devenant le composant dominant dans la rétine périphérique (Bone et al. 1988; Bone, Landrum 1992). Au-delà de 6 mm du centre de la fovée, le rapport lutéine/zéaxanthine se situe entre 2:1 et 3:1 (Handelman et al. 1988; Widomska, Subczynski 2014). Constatant que le rapport entre les bâtonnets et les cônes augmentait également vers la périphérie de la rétine, Bone et al. ont suggéré que ces ratios étaient le reflet d'une association étroite de la lutéine et de la zéaxanthine aux bâtonnets et aux cônes respectivement (Bone et al. 1988). Snodderly et al. (1991), quant à eux, ont proposé que chaque ratios lutéine/zéaxanthine pourraient être associés à des types de cônes spécifiques dont l'abondance relative varie dans la rétine (Snodderly et al. 1991). De même, l'analyse du schéma de distribution du PM le long des axones des photorécepteurs indique de fortes concentrations dans les couches internes de la rétine et de faibles concentrations au niveau de l'EPR et des segments périphériques des photorécepteurs (Bernstein et al. 2001). Dans une étude récente, l'analyse en microscopie confocale couplée à de la microspectroscopie Raman, de la distribution du PM au niveau de la membrane limitante interne à la membrane choroïdienne de la rétine de donneurs humains, a confirmé les études antérieures publiées par Snodderly et al. (1984) ou Bernstein et al. (2001). Cette étude démontre que la zéaxanthine est fortement localisée au centre de la fovéa puis présente en concentrations décroissantes de la couche interne à la couche externe de la rétine, tandis que la lutéine est distribuée de manière diffuse dans la rétine interne à une concentration beaucoup plus faible. Ces données suggèrent que la zéaxanthine pourrait être plus importante que la lutéine pour le maintien de l'intégrité maculaire humaine, en raison de ses concentrations plus élevées et de sa diffusion plus faible par rapport à la lutéine (Li et al. 2020).

b. Rôle du pigment maculaire

Dès 1945, une étude montre que ce pigment a un pouvoir d'absorption maximal pour les longueurs d'onde comprises entre 430 à 490 nm, avec un pic maximal à 465 nm, suggérant

que cela permettrait de neutraliser les effets nocifs des longueurs d'onde bleues et violettes non absorbées par le cristallin et atteignant donc directement la rétine (Wald 1945), une proposition soutenue par des recherches ultérieures (Bone, Landrum 1992). Depuis sa découverte, il est admis que le PM augmente les performances visuelles en jouant le rôle de filtre optique et protège la rétine en neutralisant les espèces réactives de l'oxygène permettant de prévenir la mort des photorécepteurs induite par la lumière bleue.

- Filtre optique

En raison de son spectre d'absorption, le PM filtre les longueurs d'onde correspondant à lumière bleue avant qu'elles ne parviennent au niveau des photorécepteurs. En conditions naturelles, l'arrière-plan du champ visuel est constitué de courtes longueurs d'onde, comme un ciel bleu ou des feuilles vertes, ce qui signifie que les propriétés de filtre sont importantes pour la vision et permettent de réduire l'impact négatif de l'éblouissement, de la diffusion de la lumière et de l'aberration chromatique et augmentant ainsi la sensibilité aux contrastes (Renzi, Hammond 2010; Hammond et al. 2013; Stringham et al. 2017). De plus, un nombre croissant de preuves semblent montrer que le PM aurait un effet favorable sur le traitement neuronal de l'information visuelle (Hammond, Wooten 2005). Il a été démontré que ces caroténoïdes améliorent la communication intercellulaire, régulent l'instabilité dynamique des microtubules et empêchent la dégradation des protéines des vésicules synaptiques (Crabtree et al. 2001; Stahl, Sies 2001; Ozawa et al. 2012)

- Propriétés antioxydantes

Comme vu précédemment à propos du système nerveux en général, Farnsworth et Dratz ont montré que les membranes des photorécepteurs de la rétine sont particulièrement vulnérables à peroxydation lipidique en raison de leur teneur très élevée en AGPI (Farnsworth, Dratz 1976). Les phospholipides de la membrane des photorécepteurs des vertébrés contiennent environ 50% d'acide docosahexaénoïque (22:6  $\omega$ 3), l'AG le plus fortement insaturé que l'on trouve dans la nature. De plus, la rétine présente une consommation d'oxygène par mg de protéine jusqu'à 7 fois plus élevée que tout autre tissu (Alder et al. 1983). Enfin, en plus de créer des aberrations visuelles, la lumière bleue à haute énergie est capable de générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par le métabolisme cellulaire et les produits des réactions photochimiques, provoquant de graves lésions photochimiques toxiques pour la rétine (Widomska, Subczynski 2014). En effet, les zones sensibles aux dommages oxydatifs

sont presque superposables à celles de plus haute densité du PM. Ce dernier joue donc un rôle fondamental dans la protection de la rétine par deux mécanismes : d'abord directement en « éteignant (quench) » l'état de triplet des photosensibilisants et de l'oxygène singulet, en réagissant avec les radicaux libres et en empêchant la peroxydation lipidique et indirectement en filtrant les faibles longueurs d'onde (Ahmed et al. 2005). Ainsi, le pic d'absorption de la lutéine et de la zéaxanthine à 460 nm, leur permet de protéger l'œil en absorbant 40 à 90 % de la lumière bleue visible incidente à haute énergie et à courte longueur d'onde (450-500 nm) avant la formation de ROS. Par la suite, le PM a la capacité de stopper la réaction en chaîne en éteignant chimiquement et physiquement les ROS une fois qu'ils sont formés (Cai et al. 2000). Habituellement, les caroténoïdes interfèrent avec la propagation du phénomène d'oxydation des molécules organiques et des espèces radicalaires en piégeant l'oxygène singulet par transfert d'énergie vers les caroténoïdes, générant des caroténoïdes à l'état triplet qui peuvent dissiper l'énergie excédentaire (Widomska, Subczynski 2019). De telles propriétés antioxydantes ont été démontrées dans un modèle de souris. En effet, dans un modèle de souris knock-out  $\beta5^{-/-}$  qui perdent rapidement leur fonction visuelle en raison d'une destruction progressive des cellules de l'EPR, une accumulation de lipofuscine pro-oxydante est largement observée. Ces souris ont ensuite reçu 1,65 mg de lutéine et 66  $\mu$ g de zéaxanthine par jour, ou 52 mg de lutéine et 2 mg de zéaxanthine par kilogramme de poids corporel pendant neuf mois, ce qui a permis de prévenir l'oxydation de l'EPR, stopper l'apparition de lésions du cytosquelette et enrayer la perte de vision, apportant des preuves solides de l'importance des propriétés antioxydantes du PM pour la santé oculaire (Yu et al. 2012).

- Protection contre les pathologies oculaires liées à l'âge

Les propriétés de filtre de la lumière bleue, d'une part, et antioxydantes, d'autre part, permettent d'attribuer un rôle protecteur du PM vis-à-vis des pathologies de la rétine liées à l'âge, notamment la cataracte (ARC pour « Age-Related Cataract ») et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). L'ARC se définit comme une opacification acquise partielle ou totale du cristallin, altérant la vision (Cabot et al. 2013) en partie due à une exposition aux UV (Yam, Kwok 2014). La DMLA, quant à elle, est une maladie oculaire affectant la région maculaire de la rétine, caractérisée par une dégénérescence progressive des photorécepteurs rétiniens, responsable d'une perte sévère de l'acuité visuelle et d'autonomie chez les patients (Coleman et al. 2008; Mathis, Kodjikian 2022). L'étiologie n'est pas encore élucidée mais le

stress oxydant joue un rôle prédominant (Colijn et al. 2021). Ainsi, dès le milieu des années 80, plusieurs études épidémiologiques ont exploré le rôle possible des antioxydants connus dans la prévention du développement de l'ARC (Jacques et al. 1988; Leske et al. 1991; Knekt et al. 1992). De même, une étude réalisée sur un échantillon de la National Health and Nutritional Examination Survey (NHANES) a montré que les régimes alimentaires riches en fruits et légumes étaient inversement associés au risque de DMLA (Goldberg et al. 1988). En 1992, l'étude « Eye Disease Case-Control Study », une étude observationnelle multicentrique s'intéressant aux facteurs de risque de plusieurs pathologies rétinienne, a montré que les niveaux plasmatiques en caroténoïdes totaux étaient inversement liés au risque de DMLA (Eye Disease Case-Control Study Group 1993). Afin de mieux caractériser les antioxydants impliqués, Jacques et al. ont mené une étude épidémiologique visant à analyser l'impact des niveaux de caroténoïdes plasmatiques, entre autres, sur le risque d'ARC. De façon intéressante, ils ont rapporté pour la première fois l'absence de relation entre l'apport en carotène et le risque d'ARC, alors que les analyses de la consommation de fruits et légumes ont indiqué une diminution significative du risque d'ARC pour les personnes consommant plus de trois portions et demie de fruits et légumes par jour (Jacques, Chylack Jr 1991). Pour appuyer ces résultats, une analyse prospective de la cohorte « The Nurses' Health Study » publiée en 1992 (débutée en 1976), a mis en évidence que la consommation d'épinards (riches en xanthophylles), mais pas de carottes (riches en  $\beta$ -carotène), cinq fois par semaine, était associée à un moindre risque d'ARC chez les femmes (Hankinson et al. 1992). De même, une étude rétrospective menée par Mares-Perlman et al. a révélé qu'une consommation élevée d'épinards, mais pas de carottes, était associée à une opacification de la rétine de moindre gravité (Mares-Perlman et al. 1995). En 1994, une étude épidémiologique a montré pour la première fois une relation directe entre l'apport en lutéine et le risque de DMLA (Seddon et al. 1994). Par la suite, plusieurs études épidémiologiques ont démontré une relation entre l'apport alimentaire et/ou les niveaux sériques en caroténoïdes avec la diminution du risque de DMLA (Snodderly 1995; Lyle et al. 1999; Marse-Perlman et al. 2001; Beatty et al. 2001) et de d'ARC (Jacques, Chylack Jr 1991; Mares-Perlman et al. 1995; Tavani et al. 1996; Chasan-Taber et al. 1999; Brown et al. 1999). Les études observationnelles sont répertoriées dans l'annexe 7.

Suite à ces observations, des essais cliniques randomisés étudiant l'efficacité d'une supplémentation en caroténoïdes dans la prévention des pathologies oculaires ont permis de confirmer l'importance des xanthophylles pour la santé de l'œil. Ainsi, le premier essai

clinique interventionnel (essai clinique randomisé) ayant suggéré une relation entre les vitamines et la cataractogenèse est un essai commencé en 1985 à Linxian (Chine), conçu pour étudier une supplémentation en vitamines/minéraux utilisés dans deux essais d'intervention contre le cancer, dont les résultats ont montré que les suppléments diminuaient le risque de cataracte nucléaire après un suivi de 5 à 6 ans (Sperduto et al. 1993). Le lien avec le pigment maculaire a été établi en 1997, lorsque Hammond et al. ont publié une étude montrant que des concentrations plus élevées en xanthophylles dans la rétine sont corrélées à des concentrations plus élevées dans le cristallin, ce qui a un impact sur le développement d'ARC (Hammond et al. 1997). Ces résultats étaient déjà soutenus par des études transversales (Ciulla et al. 2001; Curran-Celentano et al. 2001; Hammond Jr et al. 1996) et interventionnelles (Hammond et al. 1997; Landrum et al. 1997) établissant une corrélation positive entre l'apport en lutéine et en zéaxanthine et leurs concentrations sériques et rétiniques. Afin d'étayer les hypothèses croissantes selon lesquelles la consommation de lutéine à haute dose réduit les maladies oculaires liées à l'âge, des essais de supplémentation ont été lancés. Ainsi, en 1990, l'étude AREDS (Age-Related Eye Disease Study Research Group 1999) la plus grande étude multicentrique, prospective et randomisée à long terme menée auprès de personnes âgées de 55 à 80 ans a été mise en place. Elle a été conçue par le National Eye Institute pour évaluer l'évolution clinique, le pronostic et les facteurs de risque de la DMLA et d'ARC. Le recrutement des 4 757 volontaires, suivis pendant 6,3 ans en moyenne, a commencé en 1992 et s'est terminé en 1998. Les patients ont été séparés en plusieurs groupes : un groupe recevant des antioxydants (vitamines C et E, et zinc), un groupe recevant 15 mg/jour de  $\beta$ -carotène, un groupe recevant une combinaison des deux (appelée plus tard la « formulation AREDS ») et un groupe contrôle (Age-Related Eye Disease Study Research Group 1999). Concernant l'ARC, les résultats ont été peu concluants et ont donné lieu à une controverse quant au rôle protecteur des xanthophylles sur le développement de l'ARC puisque qu'aucun effet positif de la supplémentation n'a été trouvé sur le développement de l'opacité du cristallin. La proportion de sujets ayant subi une chirurgie de l'ARC était la même dans tous les groupes, ce qui signifie qu'aucune des formulations n'a diminué le risque d'ARC (Age-Related Eye Disease Study Research 2001a). Malgré les résultats mitigés de l'étude AREDS, d'autres études rapportent un effet positif de la lutéine sur le risque d'ARC, soulevant un débat sur la question. Par exemple, une étude pilote rapportée par un groupe espagnol a montré qu'une supplémentation en lutéine à haute dose a permis d'améliorer la vision de patients atteints d'ARC après une supplémentation de deux ans avec 15 mg de lutéine par jour (sous forme de diesters de lutéine) (Olmedilla et al. 2003). De même, l'étude POLA (Pathologies Oculaires

Liées à l'Age) débutée en 1995, a montré que les participants présentant le taux le plus élevé de zéaxanthine plasmatique, mais pas de lutéine, avaient un risque significativement réduit de cataracte nucléaire (Delcourt et al. 2006). La même observation a été faite dans une étude prospective de dix ans examinant les niveaux de caroténoïdes sériques chez les femmes de la cohorte Women's Health Study, où un apport élevé en lutéine/zéaxanthine était associé à un risque plus faible d'ARC (Christen et al. 2008). Plus récemment, des études transversales ont également montré des associations inverses entre cataracte et niveaux d'antioxydants sanguins, ainsi que des effets bénéfiques de la lutéine (Dherani et al. 2008; Karppi et al. 2012). Cependant, conformément aux résultats de l'étude AREDS, plusieurs études ont signalé des effets bénéfiques modérés voire nuls de la lutéine sur le risque d'ARC (Brown et al. 1999; Chasan-Taber et al. 1999; Lyle et al. 1999; Taylor et al. 2002; Vu et al. 2006). De plus, l'étude AREDS2, lancée en 2006 pour tester l'intérêt de l'ajout d'AG oméga-3 ( $\omega$ 3) ou de lutéine/zéaxanthine à la « formule AREDS », a confirmé que la supplémentation en lutéine était inefficace, tant pour prévenir la perte de vision que pour ralentir la progression de l'ARC (Chew et al. 2012). L'apparition d'une opacification du cristallin étant fortement associée aux dommages oxydatifs, l'utilisation d'antioxydants semble toujours être une stratégie envisageable pour protéger les fonctions visuelles bien que les résultats des études cliniques varient d'un effet protecteur à un effet nul de la supplémentation en caroténoïdes. Cependant, il est intéressant de noter qu'une analyse des études cliniques mentionnées ci-dessus tend à confirmer que l'apport de micronutriments au sein d'une matrice alimentaire complète est plus efficace qu'une supplémentation artificielle pour la prévention de l'ARC, ce qui signifie que les résultats mitigés pourraient s'expliquer par des différences de bioaccessibilité et de biodisponibilité des xanthophylles et par un « effet de matrice alimentaire » (Braakhuis et al. 2019).

Concernant la DMLA, les résultats positifs sont bien plus marqués. En effet, l'étude AREDS a rapporté une diminution statistiquement significative de la progression de DMLA par rapport au groupe placebo (Age-Related Eye Disease Study Research 2001b; 2001a). La même année, Bone et al. ont publié une étude comparative cas-témoins, de rétines humaines provenant de 56 donneurs atteints de DMLA et de 56 témoins. Ils ont confirmé une association inverse entre le risque de DMLA et les quantités de lutéine et de zéaxanthine dans la rétine (Bone et al. 2001). Parallèlement, une étude d'un groupe de Milan, en Italie, a montré que la supplémentation de patients atteints de DMLA avec 15 mg de lutéine par jour pendant 18 mois a entraîné une amélioration de l'acuité visuelle par rapport au groupe placebo

(Massacesi 2001). Dans l'ensemble, ces études ont permis d'établir que la supplémentation en lutéine et zéaxanthine permet des modifications structurales de la rétine, et affecte positivement l'acuité visuelle, de sorte que la formulation AREDS est rapidement devenue une référence dans la prévention des pathologies rétinienne. Cependant, comme cette formulation contenait du  $\beta$ -carotène mais pas de lutéine ni de zéaxanthine, elle est devenue controversée, ce qui a conduit à la conception de l'étude AREDS2 en 2006, un essai randomisé, multicentrique, en double aveugle et contrôlé par placebo, incluant 4 203 sujets âgés de 50 à 85 ans souffrant de maladies oculaires liées à l'âge, et suivis pendant 6 ans. Dans cette étude, les participants prenant des antioxydants avec de la lutéine (10 mg/jour) et de la zéaxanthine (2 mg/jour) à la place du  $\beta$ -carotène (« formule AREDS2 ») ont vu leurs bénéfices visuels augmenter de manière significative et leur risque de DMLA avancée diminuer, par rapport à ceux prenant la formule AREDS (Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) Research 2013). Depuis lors, un nombre croissant d'études cliniques ont démontré non seulement les effets préventifs d'un régime riche en lutéine, mais aussi les effets bénéfiques de la supplémentation sur les fonctions visuelles, notamment grâce à la mesure de la densité optique du pigment maculaire (DOPM). Parmi les études cliniques les plus connues rapportant un effet bénéfique significatif de la supplémentation en lutéine sur la fonction visuelle chez les patients atteints de DMLA, on peut citer l'étude « Lutein Antioxidant Supplementation Trial » (LAST) (Richer et al. 2004), l'étude « Taurine, Omega-3 Fatty Acids, Zinc, Antioxidants and Lutein » (TOZAL) (Cangemi 2007), l'étude italienne « Carotenoids and Antioxidants in Age-Related Maculopathy Italian Study » (CARMIS) (Parisi et al. 2008), l'étude « Carotenoids with Co-antioxidants in Age-Related Maculopathy » (CARMA) (Neelam et al. 2008), l'étude LUTEGA (Dawczynski et al. 2013), l'étude « Combination of Lutein Effects in the Aging Retina » (CLEAR) (Murray et al. 2013), l'étude « Meso-zeaxanthin Ocular Supplementation » (MOST) (Akuffo et al. 2015), l'étude « Lutein Influence on Macula of Persons Issued From AMD Parents » (LIMPIA) (Korobelnik et al. 2017), et l'étude « Central Retinal Enrichment Supplementation Trials » (CREST) (Akuffo et al. 2017). Les études cliniques qui ont établi l'effet positif de la lutéine sur les performances visuelles des patients atteints de DMLA sont répertoriées dans le tableau en annexe 8.

La majorité de ces essais cliniques, présentées dans l'annexe 8, ont montré que la supplémentation en antioxydants et en lutéine/zéaxanthine à long terme augmentait la DOPM et améliorait la fonction maculaire, l'acuité visuelle et/ou la sensibilité au contraste. Ainsi, en l'absence de nouvelles thérapies capables d'améliorer l'évolution clinique de la DMLA, la

mise en place de stratégies préventives s'est avérée efficace pour prévenir l'apparition de la DMLA (Mathis, Kodjikian 2022). L'effet de la lutéine et de la zéaxanthine a également été étudié pour d'autres maladies oculaires, telle que la rétinopathie diabétique (Hu et al. 2011; Zhang et al. 2017). Concernant la rétinopathie pigmentaire (RP), la lutéine a également été considérée comme une modalité thérapeutique potentielle (Semba, Dagnelie 2003). Ainsi, quelques essais évaluant la supplémentation en lutéine chez des patients RP ont été réalisés et ont suggéré que la supplémentation en lutéine améliorerait ou ralentissait la perte de champ visuel et pourrait également améliorer légèrement l'acuité visuelle (Bahrami et al. 2006; Berson et al. 2010). De même, en 2022, une étude rapporte suggère qu'une supplémentation à long terme en lutéine pourrait ralentir la déficience visuelle et améliorer le stress oxydatif oculaire (Olivares-González et al. 2022). Ces résultats doivent être interprétés avec prudence car les échantillons étudiés sont faibles, la supplémentation en lutéine est souvent accompagnée d'autres nutriments et aucune explication mécanistique n'a été apportée. Cependant, il est prouvé que la lutéine est un antioxydant important pour le maintien de la fonction visuelle et qu'elle contribue à la prévention des maladies oculaires liées à l'âge. Il ressort donc de ces études et des propriétés connues du PM qu'il pourrait jouer un rôle fondamental dans la protection de la rétine, fortement exposée aux dommages oxydatifs et qu'une faible concentration plasmatique en caroténoïdes est associée à une augmentation du risque de pathologies rétinienne (Colijn et al. 2021). Cela explique pourquoi l'hypothèse d'une forte déplétion en caroténoïdes pourrait causer ou aggraver les complications ophtalmiques des patients FHBL.

#### 1.8.4.2.3. Activité pro-vitaminique A

La vision, dans sa forme la plus élémentaire, nécessite un chromophore ou une substance absorbant la lumière dans un neurone sensoriel et un mécanisme permettant de coupler l'information photonique à une information électrique au niveau d'un neurotransmetteur. Dans tous les systèmes visuels connus, le chromophore est le 11-cis-rétinal lié de manière covalente à une protéine appelée opsine. L'absorption d'un photon provoque l'isomérisation du 11-cis-rétinal en tout-trans-rétinal, ce qui modifie la forme de l'opsine et lui permet d'interagir avec les composants en aval afin de modifier le taux de libération du glutamate par les cellules photoréceptrices (Lamb, Pugh 2006). Le rétinal (également connu sous le nom de rétinaldéhyde) est l'une des trois formes de la vitamine A. En effet, le terme « vitamine A » désigne un groupe de composés organiques comprenant le rétinol, le rétinal et l'acide



rétinoïque qui correspondent à trois états d'oxydation d'une même molécule (Karrer, Helfenstein 1933; Olson 1996). Chez l'homme, on trouve quatre caroténoïdes ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -carotènes, et  $\beta$ -cryptoxanthine) qui peuvent être transformés en rétinol, le plus important et le plus abondant étant le  $\beta$ -carotène. Le terme « provitamine A » désigne donc les caroténoïdes qui contiennent un ou deux cycles  $\beta$ -ionone non substitués, à l'extrémité d'une chaîne aliphatique d'au moins 11 carbones (von Lintig, Sies 2013). La vitamine A ne sera pas développée dans ce travail, mais du fait de son rôle essentiel dans la régénération du pigment visuel, il est important d'avoir la notion de caroténoïdes provitaminiques A. On peut également rapidement évoquer l'idée qu'une carence en rétinol entraîne une perte de la vision crépusculaire en raison d'une déficience en rhodopsine qui peut conduire à une cécité nocturne, également appelée nyctalopie. Si la carence persiste, les bâtonnets dégèrent et la xérophtalmie se développe, entraînant une véritable cécité (Gilbert 2013). Ainsi la vitamine A, mais surtout les caroténoïdes provitaminiques A permettant les apports nutritionnels en rétinol (notion d'équivalent rétinol évoqué précédemment), sont donc essentiels au bon fonctionnement de l'œil humain et de la vision.

## 1.9. Sécrétion et métabolisme de la vitamine E et des caroténoïdes

La vitamine E et les caroténoïdes, en tant que micronutriments liposolubles, suivent les processus d'absorption intestinale et de transport vasculaire des lipides alimentaires. Ce mécanisme complexe se déroule en plusieurs étapes clés et commence par une rupture mécanique et enzymatique de la matrice alimentaire permettant l'extraction et la libération des caroténoïdes. La digestion, ou absorption des micronutriments liposolubles, et plus particulièrement des caroténoïdes, est un processus rendu complexe par leur forte hydrophobie, en contradiction avec l'environnement aqueux du tractus gastro-intestinal. Par conséquent, une fois dans l'estomac, la première étape indispensable est l'émulsification mécanique et chimique des lipides pour permettre une solubilisation dans le chyme et créer l'interface eau-lipide nécessaire à la lipolyse. Se forment alors, dans l'estomac, de fines gouttelettes lipidiques, de diamètre inférieur à 100  $\mu\text{m}$  (Armand et al. 1994), sous l'action de forces de cisaillement créées par les contractions péristaltiques (Yonekura, Nagao 2007) en présence d'émulsifiants (peptides provenant des protéines alimentaires, polysaccharides complexes, phospholipides membranaires) (Borel et al. 1996). Une fois passés dans les gouttelettes lipidiques, les lipides et les caroténoïdes vont atteindre le duodénum grâce à la vidange gastrique.

La propulsion du chyme gastrique dans le duodénum par le canal pylorique déclenche la libération de cholécystokinine. Cette hormone peptidique gastro-intestinale permet la contraction de la vésicule biliaire, la relaxation du sphincter d'Oddi, et la sécrétion d'enzymes pancréatiques et biliaires (Go et al. 1970). Les forces de cisaillement générées par les mouvements des fluides, additionnées à la présence de sels biliaires, agissant comme des surfactants, permettent la formation de micelles, particules de 3 à 35 nm dans lesquelles les micronutriments lipidiques seront acheminés vers les entérocytes (Johnson, Gerwin 2007). Cette étape est appelée « micellisation ». Les micelles, entourées d'une enveloppe de sels biliaires et de PLs amphiphiles, contiennent alors un noyau constitué de caroténoïdes, de vitamines liposolubles d'AG libres, d'acylglycérols et de cholestérol (Linthorst et al. 1977). Les micelles ainsi formées dans le duodénum vont permettre un rapprochement des micronutriments lipophiles vers le pôle apical des entérocytes de la muqueuse intestinale, pour permettre leur absorption par les entérocytes sous forme libre (non estérifiés), principalement au niveau du duodénum.

### 1.9.1. Absorption par l'entérocyte

#### a. Absorption par diffusion passive

Du fait de leur forte lipophilie, la première hypothèse concernant l'absorption des caroténoïdes par les entérocytes a naturellement été la diffusion simple à travers la membrane cellulaire, constituées de deux bicouches lipidiques. Cette diffusion a été montrée expérimentalement grâce à de nombreuses études, mettant en évidence une relation linéaire entre concentration en caroténoïde et taux d'absorption, notamment pour le  $\beta$ -carotène, que ce soit sur des tissus de rats (Hollander, Ruble 1978) ou sur des cellules intestinales en culture (Scita et al. 1992; Moore et al. 1996; Sugawara et al. 2001). De même, une étude comparative a mis en évidence les différences de schéma d'absorption entre le  $\beta$ -carotène et le rétinol chez le rat. Cette étude montre une absorption rapide et saturable pour le rétinol, affectée négativement par l'ajout de 2,4-dinitrophénol, un inhibiteur métabolique. A l'inverse, l'absorption du  $\beta$ -carotène est plus lente, non saturable, et non affectée par l'ajout d'un inhibiteur. Ces données ont permis de conclure quant à une absorption passive de ce dernier, en opposition au rétinol dont l'absorption apparaît facilitée par des transporteurs spécifiques (El-Gorab et al. 1975). Tout comme pour les caroténoïdes, l'absorption de la vitamine E a longtemps été considérée comme un phénomène passif puisqu'une étude par Hollander et al., dans l'intestin grêle de rat, a montré que l'absorption de la vitamine E était linéaire jusqu'à 1,2 mmol/L et que des inhibiteurs de la synthèse d'ATP ne diminuaient pas l'absorption de la vitamine (Hollander 1981).

D'un point de vue mécanistique, le phénomène est simple : à l'approche de la muqueuse intestinale, les micelles migrent à travers la couche d'eau non agitée jusqu'à la membrane des entérocytes, les caroténoïdes quittent la structure micellaire et traversent simplement la membrane jusqu'au cytoplasme. D'ailleurs, toujours en lien avec la structure même des molécules, les carotènes semblent mieux absorbés par les cellules Caco-2, que les xanthophylles, légèrement moins lipophiles (Garrett et al. 1999; Sugawara et al. 2001; During et al. 2002). Finalement, une comparaison entre le taux d'absorption et la lipophilie de quinze caroténoïdes a permis de conclure quant à une relation linéaire entre ces deux données, fournissant un argument fort en faveur de la diffusion passive de cette classe de molécule (Sugawara et al. 2001). Ainsi, plus la molécule est lipophile, plus elle diffuse : pour exemple, l' $\alpha$ -carotène ( $\log P = 13,6$ ) traverse la membrane plus facilement que la zéaxanthine ( $\log P = 10,9$ ).

Longtemps considéré comme le seul mécanisme d'absorption des caroténoïdes, l'hypothèse de l'implication de récepteur membranaire a été émise après avoir constaté des phénomènes de saturation dépendante du temps et de la concentration ainsi que de fortes variations inter-individuelles des taux d'absorption (During et al. 2002). Cette hypothèse semble dorénavant appuyée par de nombreuses études *in vitro* dans des modèles d'inhibition chimique sélective ou de surexpression, suggérant l'implication de transporteurs des lipides et du cholestérol, dont la glycoprotéine transmembranaire CD36, le récepteur scavenger classe B de type I (SR-BI) et le transporteur intestinal Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1). Les premières preuves fortes proviennent d'une étude démontrant, chez la drosophile, une absorption des caroténoïdes médiée par des récepteurs homologues aux récepteurs SR-BI et CD36 (Kiefer et al. 2002). Cette étude a été suivie, en 2006, des travaux de Reboul et al. démontrant pour la première fois l'implication de SR-BI dans l'absorption de la vitamine E. Rapidement, des études ont donc été menées sur cellules humaines afin d'élucider le rôle de chacun de ces récepteurs chez l'Homme (Reboul et al. 2006).

*b. Rôle de CD36 ?*

Le récepteur CD36 (aussi appelé SR-B2) est une glycoprotéine exprimée à la surface cellulaire de plusieurs cellules différenciées, et appartenant à la famille des récepteurs « scavenger » (SR) de classe B, qui comprend également le récepteur membranaire SR-BI et la protéine LIMP2 (Lysosomal Integral Membrane Protein II) (Abumrad et al. 1993). Le CD36 est fortement exprimé sur les villosités de la membrane apicale des entérocytes dans la partie proximale de l'intestin grêle (duodénum-jéjunum), le principal site d'absorption des lipides (Poirier et al. 1996). Cette glycoprotéine est notamment impliquée dans l'absorption des AG libres et du cholestérol, faits bien établis à présent (Nassir et al. 2007). En ce qui concerne les caroténoïdes et les vitamines liposolubles, le rôle de CD36 a été montré dans les cellules 3T3-L1 (cellules préadipocytaires de souris) et dans des cellules issues d'explants de tissu adipeux de souris. Ainsi, Moussa et al. (2008) ont montré que l'inhibition de CD36 dans des cellules 3T3-L1 grâce à un inhibiteur chimique ou un siRNA dirigé contre CD36, entraîne une diminution significative de l'absorption de la lutéine et du lycopène (Moussa et al. 2008). Ils ont également rapporté une diminution de l'absorption de ces deux caroténoïdes dans des cellules issues du tissu adipeux de souris CD36<sup>-/-</sup> (Moussa et al. 2008). Cette étude démontre, pour la première fois, que deux des principaux caroténoïdes du plasma humain sont absorbés par les adipocytes et le tissu adipeux via un processus facilité qui implique le récepteur CD36.

Son CD36 sur l'absorption intestinale du tocophérol est encore peu étudié, Goncalves et al. ont montré que l'absorption de la vitamine E était augmentée dans les cellules HEK surexprimant CD36 et altérée en présence d'un inhibiteur chimique de CD36 (Goncalves et al. 2014).

A ce jour, d'autres études sont nécessaires pour confirmer, comprendre et caractériser le rôle de CD36 dans l'absorption intestinale des micronutriments liposolubles, mais il semble que tous ces premiers travaux sont prometteurs en la matière.

### c. Rôle de SR-B1 ?

SR-BI a été découvert par Calvo et al. (1993) grâce à son homologie de séquence avec le récepteur du cholestérol CD36 (Calvo, Vega 1993). Cette protéine transmembranaire de 82 kDA est exprimée dans une grande variété de tissus et particulièrement au niveau des tissus impliqués dans le métabolisme du cholestérol tels que le foie et les intestins (Acton et al. 1994; 1996). SR-B1 et CD36 partagent plusieurs propriétés communes, notamment leur structure tertiaire qui leur confère la capacité de liaison aux phospholipides anioniques, aux lipoprotéines natives et oxydées ainsi qu'aux cellules apoptotiques. SR-B1 intervient principalement dans le métabolisme du cholestérol. En effet, dans le foie, SR-B1 lie les HDL avec une très forte affinité, facilitant l'entrée sélective du cholestérol estérifié dans les hépatocytes. C'est l'étape finale limitante du transport inverse du cholestérol (Acton et al. 1996).

La lutéine est le premier caroténoïde pour lequel l'implication de SR-B1 dans son absorption intestinale, a été démontrée. Ainsi, en 2005, Reboul et al. (2005) démontre, grâce à un inhibiteur chimique sélectif (Blocks Lipid Transport 1, BLT1) et un anticorps anti-SR-B1, que l'absorption de la lutéine, dans les cellules Caco-2, est, au moins en partie, médiée par SR-B1. De même, During et al. (2005) ont rapporté une baisse significative d'absorption et de sécrétion de 6 caroténoïdes majeurs ( $\alpha$ - et  $\beta$ -carotène, lutéine, zéaxanthine, lycopène et  $\beta$ -cryptoxanthine) dans des cellules Caco-2 traitées à l'Ézétimibe, utilisée à cette époque comme un inhibiteur des récepteurs SR-B1 et NPC1L1. Cette baisse de l'absorption est associée à une diminution significative de l'expression des gènes SR-BI, NPC1L1 et du transporteur de cassettes à liaison ATP, sous-famille A (ABCA1). Dans cette étude, les auteurs confirment le rôle de SR-B1 dans l'absorption des caroténoïdes mais ne concluent pas quant à un rôle du récepteur NPC1L1, probablement car le mécanisme d'action de l'Ézétimibe était encore mal

connu, particulièrement son action inhibitrice sur NPC1L1 (During et al. 2005). Par ailleurs, toujours en 2005, Le rôle de SR-B1 dans l'absorption des caroténoïdes a été montré in vivo, chez des souris SR-B1<sup>-/-</sup>, chez qui l'absorption du  $\beta$ -carotène est significativement diminuée par rapport aux souris contrôles ( $8 \pm 7\%$  vs  $22 \pm 4\%$ ,  $p < 0,001$ ) (van Bennekum et al. 2005). Ces résultats ont été confirmés en 2008 par Moussa et al. qui ont rapporté que l'utilisation d'un anticorps anti-SR-B1 humain ou d'un inhibiteur chimique du transport lipidique par SR-B1 (BLT1) a altéré de 60 % l'absorption du lycopène dans les cellules Caco-2 tandis que les concentrations plasmatiques en lycopène étaient environ 10 fois plus élevées ( $P < 0,001$ ) chez les souris surexprimant SR-B1 nourries avec un régime enrichi pendant 1 mois, par rapport aux souris contrôles (Moussa et al. 2008). De même, les travaux de Reboul et al. ont permis de montrer qu'une partie du tocophérol est absorbée selon un mécanisme actif médié par un récepteur, que son absorption est diminuée jusqu'à 80% en présence d'un anticorps anti-SR-BI et de BLT1, un inhibiteur chimique de SR-BI sur cellules Caco-2 et que sa biodisponibilité est significativement supérieure chez les souris sur-exprimant SR-BI (Reboul et al. 2006). En 2013, toujours à l'aide d'un inhibiteur, Borel et al. (2013) ont montré l'implication de SR-B1 dans l'absorption des caroténoïdes provitaminique A ( $\alpha$ -carotène,  $\beta$ -carotène et  $\beta$ -cryptoxanthine). A ce jour, aucune étude n'a été menée spécifiquement sur la zéaxanthine mais il semble raisonnable de supposer qu'une étude de ce type aboutirait aux mêmes observations du fait, notamment de la forte proximité structurale de la lutéine et de la zéaxanthine.

#### d. Rôle de NPC1L1 ?

Parmi les transporteurs membranaires des molécules lipophiles, NPC1L1 est l'un des derniers à avoir été identifié. Cette protéine transmembranaire de 135 kDa est préférentiellement localisée sur la membrane en brosse de l'intestin grêle chez les mammifères et sur la membrane canaliculaire des hépatocytes chez les primates (Park 2013; Luo et al. 2020). Son nom lui vient de son homologie de séquence avec la protéine NPC1, responsable de la maladie de Niemann-Pick de type C1 (NPC1), une protéine membranaire impliquée dans le transport intracellulaire du cholestérol au niveau de l'endosome tardif et du lysosome (Jia et al. 2011). NPC1L1 possède trois grands domaines extracellulaire (N-terminal, médian, et un domaine riche en cystéine), et un domaine transmembranaire (Park 2013). In vitro, le domaine N-terminal semble responsable de la liaison au cholestérol, tandis que le domaine médian permet la liaison à l'Ézétimibe, une molécule identifiée comme inhibiteur de NPC1L1 et SR-

B1 (Garcia-Calvo et al. 2005; Weinglass et al. 2008; Ge et al. 2008). Ce transporteur a été décrit comme le principal transporteur de cholestérol et de phytostérols dans l'intestin (Davis et al. 2004). En effet, des études menées sur des souris knock-out montrent qu'il permettrait le transport d'environ 60 % du cholestérol alimentaire (Altmann et al. 2004; Davis et al. 2004; Davies et al. 2005). Il a également été démontré, chez la souris et sur cellules Caco-2, que NPC1L1 était impliquée dans l'absorption intestinale de l' $\alpha$ -tocophérol et du  $\gamma$ -tocotriénol (Narushima et al. 2008; Abuasal et al. 2010). Cependant, concernant les caroténoïdes, les résultats sont moins clairs. Tout d'abord, dans l'étude menée par During et al. citée précédemment, les auteurs ont rapporté une baisse significative d'absorption et de sécrétion de 6 caroténoïdes majeurs (jusqu'à moins 50% pour la  $\beta$ -cryptoxanthine) dans les cellules Caco-2 traitées à l'Ézétimibe, concluant sur l'implication de SR-B1 dans ce processus (During et al. 2005). On, on sait à présent que l'Ézétimibe est un inhibiteur quasi sélectif de NPC1L1, puisqu'il reste efficace chez les souris double knockout SR-B1. Notamment, une étude a montré que l'absorption du cholestérol était inhibée de plus 90 % chez les souris SR-B1 knockout et les souris contrôles recevant 1 ou 3 mg/kg d'Ézétimibe, suggérant que SR-B1 n'est pas essentiel à son mécanisme d'action (Altmann et al. 2002; Phan et al. 2012). Ainsi, During et al. ont peut-être démontré l'importance du rôle de NPC1L1, et non de SR-B1, dans l'absorption des caroténoïdes (During et al. 2005). Pourtant, l'étude de Moussa et al. (2008) montrant l'implication de SR-B1 dans l'absorption du lycopène, comme expliqué au paragraphe précédemment, a également étudié le possible rôle de NPC1L1, l'absorption du lycopène n'étant altérée que de 60% avec un inhibiteur de SR-B1. Ils ont alors montré que l'Ézétimibe et un anticorps anti-NPC1L1 n'ont pas diminué les taux d'absorption du lycopène dans les cellules Caco-2 (Moussa et al. 2008). A ce jour, des expériences supplémentaires sont donc nécessaires pour clarifier cette question.

La figure 14 résume les transporteurs connus actuellement dans l'absorption-sécrétion des lipides incluant les caroténoïdes, au niveau de l'entérocyte.

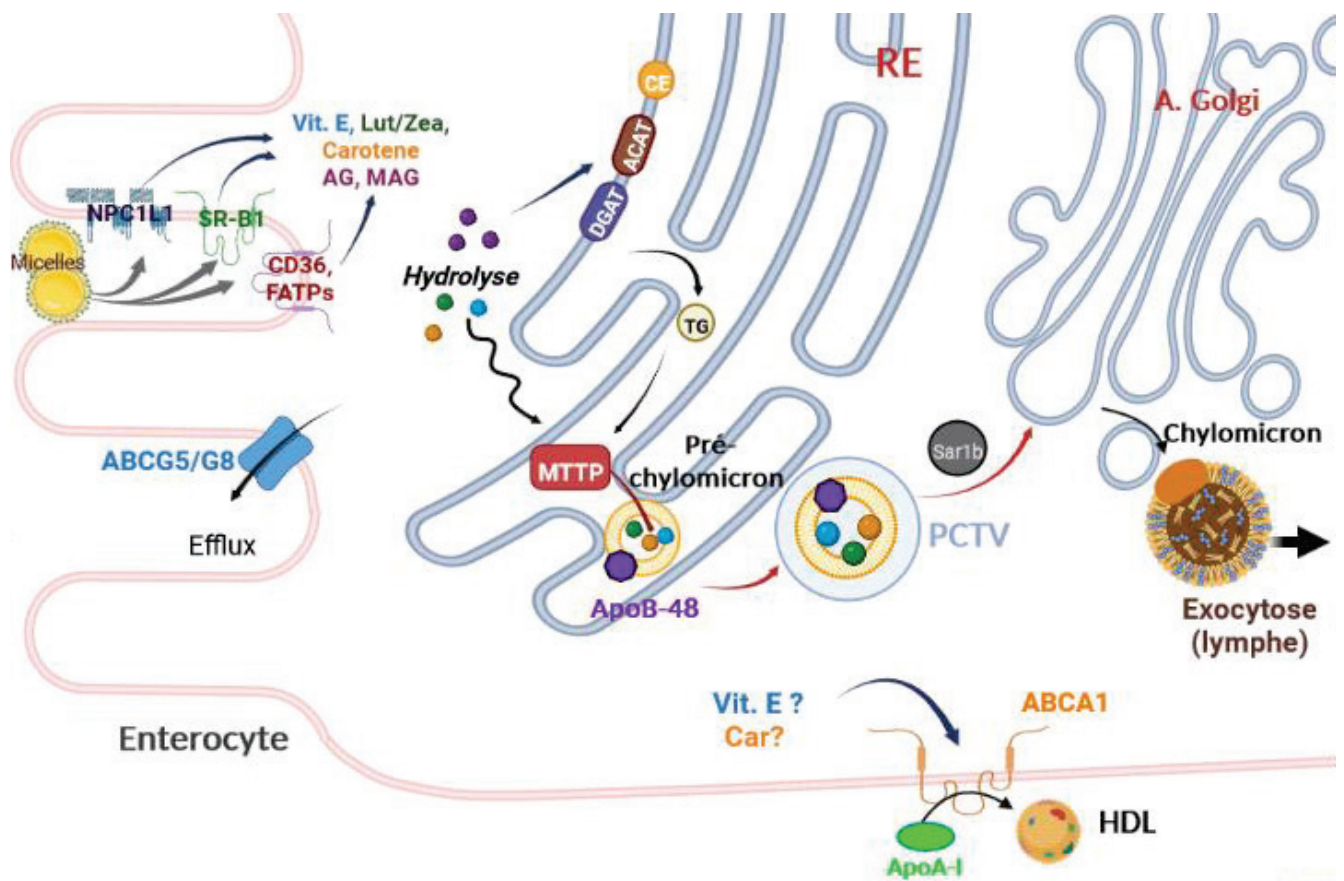


Figure 14. Absorption des lipides au niveau entérocytaire. Figure de C. Bordat d'après « Intestinal Lipid Absorption and Lipoprotein Formation » (Hussain 2014).

**Légendes :** ABCG5/G8 : Membres 5 et 8 de la sous-famille G des Transporteur de Cassette de liaison à l'ATP (« ATP-binding cassette sub-family G member 5 and 8 »), ACAT : Acyl-CoA Cholestérol Acyltransférase, AG : Acides Gras, apoB : Apolipoprotéine B, CD36 : Cluster Déterminant 36, DGAT : Diacylglycérol O-Acyltransférase, FATP : Protéine de Transport des Acides Gras (« Fatty Acid Transport Protein »), Lut : Lutéine, MAG : Monoacylglycérol, PCTV : Vésicule de Transport des Pré-Chylomicrons (« Pre-Chylomicron Transport Vesicle »), RE : Réticulum Endoplasmique, SR-B1 : Scavenger receptor class B type 1, Vit.E : Vitamine E, Zea : Zéaxanthine.



### 1.9.2. Transport et métabolismes de la vitamine E et des caroténoïdes dans l'entérocyte

Les données sur le trafic intracellulaire de la vitamine E sont peu nombreuses. Néanmoins, des protéines sont candidates au transport intracellulaire de la vitamine E, telles que la protéine associée au tocophérol (TAP), capable de se lier à la vitamine E dans les tissus humains, les protéines sec14p-like, également exprimées dans l'intestin humain et pouvant améliorer le transport des tocophérols aussi efficacement que la protéine de transport des tocophérols ( $\alpha$ -TTP) retrouvée dans le foie, ou encore les mêmes protéines prenant en charge les caroténoïdes telles que SR-BI ou NPC1L1 (Reboul, Borel 2011).

Concernant le transport intracellulaire des caroténoïdes dans l'entérocyte, les mécanismes impliqués ne sont pas encore élucidés. On suppose que, du fait de leur lipophilie, ces molécules sont soit liées à des protéines intracellulaires, soit incorporées dans les membranes des organites intracellulaires pour être transférées vers le côté basolatéral de l'entérocyte (Reboul, Borel 2011; Reboul 2019a). Les premiers candidats pour le transport intracellulaire sont les transporteurs apicaux qui suivent un cycle intracellulaire entre la membrane apicale et les organites cellulaires. Par exemple, NPC1L1 a été observé dans les endosomes, les régions périnucléaires, les lysosomes et les mitochondries de la cellule intestinale humaine (Yu et al. 2006; Sané et al. 2006). De même, le récepteur CD36 a été détecté à la fois dans la membrane apicale et dans l'appareil de Golgi (Pohl et al. 2004). Enfin, SR-BI a été trouvé dans les membranes apicales et basolatérales des entérocytes et dans les gouttelettes lipidiques cytoplasmiques et semble être endocyté lors de l'absorption des lipides, comme le montre une étude menée sur des entérocytes de cochon (Hansen et al. 2003). L'hypothèse a donc été faite que certains caroténoïdes pourraient se lier à ses transporteurs au niveau apical de l'entérocyte et les suivre à l'intérieur de la cellule pour être transférés vers d'autres transporteurs intracellulaires ou vers des membranes intracellulaires (Reboul, Borel 2011).

Au sein de l'entérocyte, les caroténoïdes peuvent être soit incorporés dans les lipoprotéines (chylomicrons) afin d'être sécrétés, soit subir une dégradation enzymatique (Castenmiller, West 1998; Tyssandier, Cardinault, et al. 2002). Chez l'homme, une fraction des caroténoïdes provitaminique A est clivée par oxydation par la  $\beta$ -Carotène-15,15'-Oxygénase (BCO1), principalement localisée dans les entérocytes du jéjunum, en deux molécules de tout-trans-rétinal qui peuvent être soit oxydées de manière irréversible en acide tout-trans-rétinoïque (atRA), soit réduites de manière réversible en tout-trans-rétinol (ou vitamine A) (Duszka et al.

1996; Harrison 2012). Le rétinol est ensuite estérifié par action de la lécithine-rétinol acyl-transférase (LRAT), pour former des esters de rétinyle (principalement du palmitate de rétinyle) qui suivront les lipides alimentaires dans des chylomicrons (Herr, Ong 1992; Noy 2000; MacDonald, Ong 1988). Les caroténoïdes provitaminique A ou non peuvent également être clivés en apocaroténoïdes par la  $\beta$ -carotène-9',10'-Oxygénase (BCO2) mitochondriale (Amengual et al. 2011; Lobo et al. 2012). Concernant la fraction restante, à l'instar des autres lipides, les caroténoïdes, y compris le rétinol, vont être réestérifiés ou non, et incorporés dans les CM pour être sécrétés dans la lymphe puis transportés dans le sang (Parker 1996). Chez l'homme, entre 17 à 45% du  $\beta$ -carotène ingéré n'est pas clivé au niveau de l'intestin et est retrouvé incorporé dans les lipoprotéines circulantes (Mušinić et al. 2014).

### 1.9.3. Sécrétion

La vitamine E libre et les caroténoïdes sous forme natives sont majoritairement inclus dans les chylomicrons pour être sécrétés (Reboul 2017; 2019a). Cependant, une voie alternative co-existe, indépendante des lipoprotéines à apoB. L'idée que la vitamine E soit sécrétée selon deux voies métaboliques est née en 1997 lorsque Makoto Arita et ses collègues ont étudié la sécrétion de vitamine E dans des cellules de foie surexprimant la protéine de transfert de l' $\alpha$ -tocophérol ( $\alpha$ TTP). La surexpression de l' $\alpha$ TTP a entraîné une augmentation de la sécrétion de l' $\alpha$ -tocophérol par les cellules transfectées. Cependant, alors que la brefeldine A (perturbateur de la structure des compartiments membranaires et en particulier de l'appareil de Golgi) a inhibé la sécrétion de triglycérides (qui se fait via les VLDL au niveau hépatique), aucun effet n'a été observé sur la sécrétion d' $\alpha$ -tocophérol. Ces résultats suggèrent que les cellules hépatiques sont capables de sécréter l' $\alpha$ -tocophérol indépendamment de la sécrétion de VLDL (Arita et al. 1997). Plus tard, les études d'Oram, de Vaughan et de Stocker (Oram et al. 2001) ont montré qu'il existait une voie de sécrétion de vitamine E insensible à l'action de la brefeldine A mais induite par un transporteur du cholestérol : l'ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1). De plus, il a été démontré que l'ablation de ABCA1 chez la souris entraînait une carence en vitamine E (Orsó et al. 2000). En parallèle, Jahangir Iqbal et M. Mahmood Hussain ont mis en évidence, chez la souris, deux voies complémentaires d'absorption intestinale du cholestérol (Iqbal, Hussain 2005). À la suite de ces résultats encourageant, il a été envisagé que la vitamine E possède également deux voies d'absorption au niveau intestinal. Cette théorie a été validée par les travaux de Anwar et al. menés sur des cellules Caco-2 (cellules d'adénocarcinome du côlon humain capables d'exprimer par

différentiation les caractéristiques de cellules intestinales adultes). En effet, en présence d'inhibiteur de la voie des chylomicrons (BMS197636, antagoniste de la MTP ou brefeldine) la sécrétion d' $\alpha$ -tocophérol au pôle basolatéral était diminuée mais pas inexistante. Par ailleurs, l'incubation des cellules en présence d'HDL exogène augmente la sécrétion d' $\alpha$ -tocophérol suggérant l'existence d'une deuxième voie de sécrétion d' $\alpha$ -tocophérol dépendante des HDL (Anwar et al. 2006). Finalement, l'hypothèse a été définitivement confirmée grâce aux travaux de Reboul et al. chez la souris ABCA1-/- qui ont confirmé que l'importance du transporteur ABCA1, et donc des HDL, dans la sécrétion de l' $\alpha$ -tocophérol par les cellules intestinales (Reboul et al. 2009). Très récemment, une étude a montré que le transporteur ABCG1 est également impliqué dans l'efflux cellulaire de vitamine E (Olivier et al. 2014).

Concernant les caroténoïdes, à ce jour, il existe très peu de données sur une potentielle implication de la voie HDL dans la sécrétion entérocytaire. Il existe tout de même une étude montrant in vitro et in vivo l'effet de la modulation de l'expression d'ABCA1 et de l'activité de CETP dans l'absorption intestinale de la lutéine et de la zéaxanthine. Cette étude rapporte des résultats intéressants permettant d'alimenter la réflexion à ce sujet (Niesor et al. 2014). En effet, dans cette belle étude, les auteurs ont d'abord montré qu'un agoniste du LXR (T0901317), un activateur endogène de ABCA1, associé à un apport d'ApoA-I (10  $\mu$ g/mL) a permis de doubler la sécrétion basolatérale de lutéine sur cellules Caco-2. Cet effet n'a pas été impacté par l'ajout d'un inhibiteur de la MTP, ce qui suggère l'implication d'une voie alternative à la voie des chylomicrons, dépendant du complexe ABCA1/ApoA-I. Ils ont également développé un modèle de hamster pour étudier les facteurs régulant l'absorption et la sécrétion intestinale de la lutéine et de la zéaxanthine en comparant les effets in vivo de l'induction ou de la répression d'ABCA1 par le T0901317 ou la simvastatine, respectivement. Contrairement aux souris et aux rats, les hamsters expriment la CETP et les composés affectant son activité modulent leur taux plasmatique de HDL. Ainsi, l'administration d'une dose élevée de T0901317 a entraîné une augmentation dose-dépendante des concentrations de lutéine et de zéaxanthine dans le plasma et plus modérément dans le foie, associé à une augmentation significative de l'expression de ABCA1. Ces résultats sont cohérents avec les résultats in vitro et soutiennent un rôle clé pour ABCA1 dans le transport transmembranaire de la lutéine et de la zéaxanthine. Par ailleurs, l'administration de simvastatine, un inhibiteur de la synthèse endogène du cholestérol, a significativement diminué les taux plasmatiques et hépatiques de lutéine et de zéaxanthine, et modérément impacté l'expression de ABCA1 (-22 %) sans pour autant impacter les taux plasmatiques de cholestérol total ou de HDL-

cholestérol. Chez l'Homme, les statines diminuent l'expression de ABCA1, ABCG1, G5 et G7 (Cerde et al. 2012) ce qui suggère que l'absorption de la lutéine et de la zéaxanthine est sensible à des diminutions modérées et à des augmentations modérées de l'expression d'ABCA1. De plus, le traitement des hamsters avec le Dalcétrapib, a augmenté de façon significative les taux de lutéine et de zéaxanthine dans le plasma et le foie sans augmenter l'expression de ABCA1, ce qui suggère que ces résultats s'expliquent par une plus grande disponibilité d'ApoA-I non lipidée. Enfin, l'effet de la Simvastatine a été maintenu chez les animaux recevant à la fois de la Simvastatine et du Dalcétrapib, ce qui suggère un rôle plus important du transporteur ABCA1 par rapport à l'ApoA-I. Tous ces résultats ont permis aux auteurs de conclure qu'une partie de l'absorption intestinale de la lutéine et de la zéaxanthine est médiée par une voie HDL-dépendante liée au complexe ABCA1/ApoA-I (Niesor et al. 2014). Cependant, une étude par Connor et al. (2007) rapporte que chez les poulets WHAM (c'est-à-dire muté pour le transporteur ABCA1 avec une réduction de 90 % des concentrations plasmatiques de cholestérol HDL et d'ApoA-I), les niveaux de lutéine et de zéaxanthine dans le foie et le sac vitellin des poussins sont comparables aux animaux contrôles. Selon les auteurs, cela suppose que le mécanisme de transport de l'entérocyte au foie est médié par les chylomicrons et les VLDL et non les HDL (Connor et al. 2007). Certains apocaroténoïdes, moins apolaires que les formes natives, pourraient être libérés directement dans la circulation sanguine (REF).

Le rôle des HDL dans l'absorption et le transport intestinal des caroténoïdes nécessite encore de nombreuses investigations car les données existantes ne permettent pas de conclure définitivement et d'établir un mécanisme précis. A l'inverse, le rôle des HDL dans le transport plasmatique est mieux étudié et sera discuté ci-après.

## 1.9.4. Métabolisme post-intestinal des lipoprotéines

### 1.9.4.1. Métabolisme hépatique

Une fois synthétisées, les lipoprotéines passent dans les capillaires lymphatiques, ou vaisseaux chylifères, situés au centre des villosités (Hsu, Itkin 2016). Ceux-ci rejoignent les vaisseaux lymphatiques mésentériques et aboutissent dans le canal thoracique qui draine la lymphe riche en chylomicrons dans le sang, au niveau de la veine sous-clavière gauche. Une fois dans la circulation sanguine, les chylomicrons subissent une dégradation partielle par

l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) associée à l'endothélium, libérant une partie du contenu lipidique des particules, y compris la vitamine E et les caroténoïdes. L'hydrolyse du core hydrophobe conduit à la formation de « remnants » de chylomicrons, beaucoup plus petits, enrichis en esters de cholestérol et relativement pauvres en TAG. Leur composition en apo va également changer, par échange avec les HDL. Ainsi, l'apoA-I et l'apoA-IV sont perdues tandis qu'ils vont acquérir une protéine essentielle à la captation hépatique des « remnant » : l'ApoE (Nilsson-Ehle et al. 1980). Alors que la lipolyse progresse et que les particules diminuent de taille, les apoC-II et C-III sont transférés vers d'autres lipoprotéines, ce qui diminue la capacité de la LPL à poursuivre la dégradation des chylomicrons. Ainsi, la plupart des nutriments liposolubles rejoignent le foie, associés à ces « remnants » tandis qu'une partie est transférée dans les HDL, et reste dans la circulation générale. Ainsi, 4 à 8 heures après l'absorption intestinale, les caroténoïdes sont retrouvés essentiellement dans les chylomicrons, et rejoindront les LDL entre 16 et 48 heures post-absorption, pour finir associés aux HDL après plus de 48 heures (Parker 1996).

En post-prandial, la majorité des vitamines et caroténoïdes incorporés aux chylomicrons atteint le foie au sein des remnants en passant à travers l'endothélium fenêtré, qui agit comme un filtre limitant l'entrée des chylomicrons de grande taille (Fraser et al. 1995). L'apoE présente à leur surface, a la capacité de se lier aux HSPG présent à la surface des hépatocytes, permettant l'internalisation de la particule entière par le biais du récepteur LDLR (« LDL Receptor » ou récepteur aux LDL) ou du LRP1 (Lipoprotein receptor-related protein 1) mais également via le syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan (syndecan-1 HSPG), le syndecan-4 et le SR-B1 (Ji et al. 1994; Fuki et al. 1997; Heeren et al. 2006). Le LDLR et le LRP1 agissent de façon complémentaire puisque même en l'absence du LDLR, l'internalisation des remnants se produit par endocytose lente via la voie HSPG-LRP (Mortimer et al. 1995). L'absorption sélective du cholestérol des HDL se fait, quant à elle, via SR-B1 par un mécanisme encore peu compris, mais différent de la voie LDLR. Alors que les remnants de chylomicrons ou les LDL se lient au LDLR pour être endocyté entièrement par la cellule, l'absorption des HDL par SR-B1 se produit en deux étapes avec la liaison de la particule HDL au domaine extracellulaire de SR-B1 puis absorption sélective des molécules lipophiles sans internalisation de la particule HDL (Meyers et al. 2014).

Une fois les lipoprotéines endocytées au niveau hépatique, l' $\alpha$ -tocophérol est soit métabolisé puis excrété dans la bile, soit ou prise en charge par l' $\alpha$ -TTP (Traber, 2013). Le rôle principal de l' $\alpha$ -TTP est de maintenir l'homéostasie de l' $\alpha$ -tocophérol dans le plasma et les tissus extra

hépatiques (Traber et al. 2004). Cette fonction est assurée en facilitant le transport de l' $\alpha$ -tocophérol des lysosomes vers les membranes des cellules (Qian et al. 2005), permettant une exocytose continue de ce dernier du foie vers la circulation sanguine via ABCA1 (Traber, Ramakrishnan, et al. 1994). Les caroténoïdes, quant à eux, peuvent être 1) métabolisés pour produire de la vitamine A par clivage par la BCO1, 2) sécrétés dans la bile, 3) resécrétés dans le sang et distribués aux tissus périphériques via les VLDL, ou 4) stockés dans les cellules stellaires (anciennement appelées cellules de Ito) (Parker 1996; Faure et al. 1999). Le foie est un organe de stockage majeur pour les caroténoïdes, le  $\beta$ -carotène et le lycopène étant les plus abondants, notamment dans les gouttelettes lipidiques des cellules parenchymateuses et stellaires (Lakshman et al. 1989; Kaplan et al. 1990; Schmitz et al. 1991; Shmarakov et al. 2010). A lui seul, il contient environ 10% des caroténoïdes totaux (Shmarakov et al. 2010).

Finalement, la fraction de caroténoïdes non clivée, non métabolisée et non stockée est incorporée dans les VLDL hépatiques afin d'être sécrétés dans la circulation sanguine et distribués aux tissus périphériques, notamment pendant les phases de jeûne. De même, à la sortie du foie, la vitamine E est complexée aux VLDL et suit le métabolisme de ces lipoprotéines pour être distribuée dans les tissus (Rigotti 2007).

#### 1.9.4.2. Transport plasmatique de la vitamine E et des caroténoïdes

Les caroténoïdes et la vitamine E renvoyés dans la circulation sanguine, sont retrouvés associés aux VLDL qui seront hydrolysés par la LPL en IDL puis en LDL, les lipoprotéines majoritaires en période de jeûne. Déjà en 1958, Krinsky et al. avait rapporté que 75% des caroténoïdes hydrocarbonés plasmatiques ( $\beta$ -carotène et lycopène) se trouvaient dans les LDL tandis que la fraction restante étaient associée aux HDL (Krinsky et al. 1958). De même, Auletta et al. (1974) ont rapporté que, sur le total de  $\beta$ -carotène sérique de patient présentant une caroténémie, environ 79% se trouvait dans les LDL, 8% dans les HDL et 12% dans les VLDL. Plus tard, l'amélioration des techniques d'ultracentrifugation et de chromatographie liquide à haute performance a permis la publication d'une étude plus précise sur la distribution relative des caroténoïdes majeurs dans le plasma. En général, les caroténoïdes sont transportés selon un schéma de distribution similaire à celui du cholestérol c'est-à-dire principalement par les LDL (55%), suivies des HDL (33%) puis des VLDL (10% à 19%) (Clevidence, Bieri 1993). De plus, il est intéressant de noter l'existence d'une ségrégation

plasmatique des caroténoïdes selon leur polarité : les caroténoïdes polaires (xanthophylles) sont principalement associés aux HDL, tandis que les caroténoïdes apolaires (carotènes et lycopène), sont associés aux LDL (Parker 1996). Ainsi la lutéine et la zéaxanthine ont été retrouvées principalement dans les HDL (53%), et en des proportions plus faibles dans les LDL et VLDL (31 et 16 %, respectivement) (Clevidence, Bieri 1993). La répartition de chaque caroténoïde entre les différentes classes de lipoprotéines et au sein de chaque lipoprotéine semble donc déterminée par leurs caractéristiques physico-chimiques et la composition lipidique des lipoprotéines. Ainsi, les molécules fortement hydrophobes comme les carotènes ont plus d'affinité pour le centre hydrophobe des LDL riches en TAG, tandis que les xanthophylles, un peu plus polaires, sont localisées plutôt à la surface des HDL. Cependant, les mécanismes par lesquels les caroténoïdes sont incorporés dans les lipoprotéines et leur localisation exacte dans les particules sont mal connus et doivent encore être identifiés. La vitamine E, quant à elle, est également répartie entre les fractions LDL et HDL et est retrouvée et à hauteur de 20 % dans les autres lipoprotéines (Traber 2013).

A noter que cette répartition n'est pas figée puisque la vitamine E, les caroténoïdes, et particulièrement les xanthophylles, à l'instar des autres lipides et des apolipoprotéines, peuvent être échangées entre les LDL et les HDL. En effet, il a été démontré que l' $\alpha$ -tocophérol peut se déplacer activement entre les différentes classes de lipoprotéines (Traber et al. 1992) grâce à l'intervention de la protéine plasmatique de transfert des phospholipides (PLTP) qui assure les échanges entre les différentes classes de lipoprotéines mais également entre les HDL et les membranes des cellules des tissus cibles (Kostner et al. 1995). Pour les caroténoïdes, cette notion a été correctement démontrée pour la première fois en 2002, chez la truite (Tyssandier, Choubert, et al. 2002). Le transfert entre lipoprotéines a été étudié en incubant des lipoprotéines riches en caroténoïdes (soit des HDL, soit des VLDL) avec des lipoprotéines pauvres en caroténoïdes (HDL ou VLDL). Les lipoprotéines riches en caroténoïdes étaient soit des lipoprotéines provenant de truites nourries avec des régimes contenant des caroténoïdes, soit des lipoprotéines provenant d'un sujet humain présentant un taux élevé de caroténoïdes plasmatiques. Inversement, les lipoprotéines pauvres en caroténoïdes étaient obtenues à partir de truites nourries avec régime déficient en caroténoïdes, ou isolé d'un sujet humain ayant un faible taux plasmatique de caroténoïdes. Dans le cas des lipoprotéines de truites, la présence d'inhibiteurs de la CETP et de la LCAT a entraîné une réduction du pourcentage de caroténoïdes dans la fraction VLDL et une augmentation du pourcentage de caroténoïdes dans la fraction HDL. De plus, l'astaxanthine et

la zéaxanthine ont été récupérées presque exclusivement dans les HDL, tandis qu'une proportion significative de  $\beta$ -carotène (27 %) a été récupérée dans les VLDL. Dans le cas des lipoprotéines issues de plasma humain, l'incubation des HDL riches en caroténoïdes avec les VLDL pauvres en caroténoïdes pendant deux heures à 37°C, a entraîné une augmentation de la proportion de lutéine dans les VLDL après incubation (+12%). La proportion des autres caroténoïdes dans les VLDL, après incubation, était également plus élevée (environ 4 % d'augmentation), mais ces résultats n'étaient pas significatifs. Lorsque les VLDL, riches en caroténoïdes, ont été incubées avec les HDL pauvres en caroténoïdes, on observe un transfert de lutéine de la lipoprotéine la plus riche en lutéine (VLDL dans ce cas) vers la lipoprotéine la plus pauvre en lutéine (HDL). Ces résultats démontrent l'existence d'un transfert important pour la lutéine, dépendant d'un facteur sensible à l'inhibition de la CETP et la LCAT mais pas pour les carotènes ( $\alpha$ -carotène,  $\beta$ -carotène et lycopène) (Tyssandier, Choubert, et al. 2002). Finalement, cette étude montre essentiellement que les caroténoïdes suivent les différents lipides dans les phénomènes d'échange et de distribution plasmatique. Concernant les capacités de transport des lipoprotéines, il est admis que les LDL transportent environ une molécule de caroténoïde par particule (ratio de 1:1), tandis que les HDL ne transportent qu'une molécule de caroténoïde pour 20 particules de HDL (ratio de 1:20) (Harrison 2019).

Pour ce qui est des concentrations plasmatiques moyennes, il est difficile d'établir des valeurs de référence. En effet, de nombreux facteurs extrinsèques et intrinsèques entrent en jeu et modifient les concentrations finales en caroténoïdes. Le premier facteur, le plus évident, est le contenu du régime alimentaire de chaque individu : quantité de fruits et légumes riches en caroténoïdes consommés, présence ou non de lipides dans le bol alimentaire, biodisponibilité des molécules (type de matrice alimentaire, cuisson, conservation de l'aliment, interactions entre caroténoïdes) (Schweiggert et al. 2011; Goltz et al. 2012; White et al. 2017). En effet, il est largement admis que les concentrations sériques en caroténoïdes reflètent, au moins dans une certaine mesure, la consommation d'aliments riches en caroténoïdes (Brevik et al. 2004). Le mode de vie est également à considérer pour expliquer les fortes variations inter-individuelles telles que la consommation ou non de cigarettes, d'alcool et/ou de médicaments (Handelman et al. 1996; Rydén et al. 2012; Woodside et al. 2013). Enfin, de nombreux facteurs physiologiques intrinsèques modifient les cinétiques d'absorption et de métabolisme : âge, composition corporelle, inflammation chronique, statut hormonal (on observe une légère augmentation des concentrations plasmatiques en lutéine et en  $\beta$ -carotène pendant la phase d'ovulation, et une diminution au moment des menstruations, même après ajustement des



concentrations de cholestérol sanguin) et polymorphisme génétique (Kritchevsky et al. 2000; Ferrucci et al. 2009; Bovier et al. 2013; Mumford et al. 2016; Stuetz et al. 2016). Ainsi, une méta-analyse publiée par Michael S. Donaldson, rassemblant les données de nombreuses études pour établir un indice de santé en fonction de taux sanguins en caroténoïdes basé, a montré une variation des concentrations plasmatiques entre 0,513 et 6,57  $\mu\text{M}$  dans une population d'Amérique du Nord (Donaldson 2011). Cependant, les connaissances actuelles sur les caroténoïdes permettent d'affirmer qu'un faible niveau plasmatique est associé à un risque élevé de pathologies telles que la dégénérescence maculaire liée à (lutéine et zéaxanthine), les maladies cardiométaboliques (principalement  $\beta$ -carotène et lutéine) et le cancer (principalement lycopène) (Giordano et al. 2012; Rowles, Erdman 2020; Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) Research 2013). Ainsi, en 2020, une revue de la littérature a été publiée dans le but de proposer des suggestions pour une gamme de concentrations « normales », sûres et souhaitables qui sont vraisemblablement bénéfiques pour la santé (Böhm et al. 2020). D'après leur analyse de la littérature, des concentrations sanguines de caroténoïdes totaux inférieures à 1  $\mu\text{mol/L}$  semblent associées à un risque accru de maladies chroniques, et un effet « plateau » s'observe au-delà de 7,5  $\mu\text{mol/L}$ , après supplémentation. Selon cette étude, la seule recommandation possible est de conseiller l'adoption d'un régime alimentaire riche en fruits et légumes mais ils proposent, tout de même, des valeurs de concentrations plasmatiques moyennes pour chaque caroténoïde reflétant un régime alimentaire sain : 1,725  $\mu\text{mol/L}$  de caroténoïdes totaux 0,100  $\mu\text{mol/L}$  d' $\alpha$ -carotène, 0,5  $\mu\text{mol/L}$  de  $\beta$ -carotène, 0,6 nmol/L de lycopène, 0,2  $\mu\text{mol/L}$  de  $\beta$ -cryptoxanthine, et 0,3  $\mu\text{mol/L}$  de lutéine et de zéaxanthine (Böhm et al. 2020).

#### 1.9.4.3. La distribution à la rétine et à la macula

Une fois dans la circulation sanguine, les caroténoïdes vont être soit de nouveau absorbés par le foie, comme discuté précédemment, soit absorbés par d'autres organes. La lutéine, la zéaxanthine et la mésozéaxanthine s'accumulent en grande majorité (environ 25%) dans la région maculaire de la rétine, indiquant l'existence d'un mécanisme sélectif (Bone et al. 2000). Cette idée est soutenue par les études cliniques, discutées précédemment, montrant une corrélation entre l'augmentation des concentrations sériques de xanthophylle et l'augmentation de la densité du pigment maculaire. Le transport et l'absorption et la stabilisation des xanthophylles dans la rétine humaine sont des processus d'un mécanisme sélectif complexe encore loin d'être compris.

L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) est similaire à la barrière hémato-encéphalique en ce qu'il sert d'interface cellulaire et métabolique entre la rétine et les vaisseaux sanguins de la choroïde (Fliesler, Bretillon 2010). Les cellules de l'EPR présentent une polarité avec un côté basolatéral avec des jonctions serrées créant une barrière avec les capillaires de la choroïde et un côté apical où les villosités s'étendent et effectuent la phagocytose des photorécepteurs de la rétine. Cette position unique de l'EPR lui permet de fournir des micronutriments aux cellules photoréceptrices, tout en éliminant les déchets de la rétine. Le passage des xanthophylles des capillaires vers la rétine suppose donc l'existence d'un mécanisme de transport hautement sélectif. Ainsi, les xanthophylles liées aux lipoprotéines doivent traverser l'EPR pour atteindre les photorécepteurs de la rétine maculaire. Nous avons précédemment mentionné que la lutéine et la zéaxanthine sont principalement associées aux HDL dans le sérum, pourtant, *in vitro* la zéaxanthine est délivrée beaucoup plus efficacement aux cellules ARPE-19 lorsqu'elle est associée aux HDL, alors que la lutéine est délivrée plus efficacement via les LDL (Thomas, Harrison 2016). Ainsi, il existe une absorption sélective de la zéaxanthine par rapport à la lutéine, même si les deux sont transportées dans les HDL. De plus, il a été montré que le SR-BI facilite l'absorption de la lutéine, de la zéaxanthine et d'autres caroténoïdes dans les cellules rétinienne (During et al. 2008) mais il semble que la zéaxanthine serait délivrée selon un processus dépendant de SR-BI, tandis que l'absorption de la lutéine par les LDL pourrait impliquer le LDLR (Thomas, Harrison 2016). Ces résultats suggèrent que la lutéine et la zéaxanthine sont absorbées par des mécanismes différents ce qui conduit à une absorption nettement préférentielle de la zéaxanthine. Le mécanisme moléculaire exact par lequel la zéaxanthine est préférentiellement délivrée par les HDL qui contiennent également de la lutéine reste à déterminer. Ces propos sont appuyés par une étude de Tserentsoodol et al. (2006) montrant que la rétine des primates, y compris la rétine humaine, exprime la plupart des principales protéines impliquées dans le transport systémique des lipides, notamment ABCA1, les ApoA-I et E et SR-BI (Tserentsoodol et al. 2006). D'ailleurs, la vitamine E, serait transportée vers la rétine principalement par les HDL via le SR-BI mais également au sein même de la rétine puisque les HDL et le SR-BI sont présents dans les régions de l'épithélium pigmentaire rétinien et de la couche choriocapillaire, dans les cellules de Müller, les cellules ganglionnaires, ainsi que dans les photorécepteurs des primates (Tachikawa et al. 2007; Tserentsoodol et al. 2006). La vitamine E serait également prise en charge par l' $\alpha$ -TTP et l' $\alpha$ -TAP puisque ce tissu neuronal et ses circuits sont une extension du cerveau et du système nerveux, mais ces mécanismes sont encore très peu connus (London et al. 2013; De Groef, Cordeiro 2018).

Dans la rétine, les principales protéines de liaison impliquées dans le transport des caroténoïdes sont GSTP1 et StARD3. GSTP1, qui joue un rôle important dans la détoxification cellulaire et dans les systèmes antioxydants, a été la première protéine spécifique de liaison aux caroténoïdes à être identifiée dans la rétine humaine, avec une forte affinité pour la zéaxanthine et la méso-zéaxanthine. Fait intéressant, GSTP1 peut se lier et stabiliser la zéaxanthine pour former des dimères possédant un fort pouvoir antioxydant (Bhosale, Bernstein 2005). Le domaine de transfert lipidique 3 lié à StAR (StARD3), une protéine de liaison aux stérols impliquée dans le trafic des lipides, a également été identifié comme une protéine de liaison de la lutéine (Vachali et al. 2013). En ce qui concerne les autres xanthophylles présentes dans l'œil, aucune protéine de liaison spécifique n'a encore été décrite et on sait très peu de choses sur leur métabolisme. Fait intéressant, contrairement à la lutéine et à la zéaxanthine, la méso-zéaxanthine n'est pas détectable dans le plasma humain si elle n'est pas spécifiquement supplémentée dans l'alimentation (Khachik et al. 2002), ce qui implique que l'isomérisation se produit dans les tissus oculaires (Gorusupudi et al. 2016).

## II. Objectifs

Les hypobétalipoprotéïnémies familiales (FHBL) et les troubles apparentés constituent un groupe de maladies monogéniques complexes dont les enjeux cliniques sont fondamentaux : prévenir et corriger les complications neurologiques et ophtalmologiques, fortement invalidantes. Ces atteintes sont celles qui ont le plus d'impact sur la qualité de vie des patients et sont directement liées, au moins en grande partie, aux carences en vitamines A et E qui résultent d'un défaut d'absorption et de transport du fait de l'altération de la formation des lipoprotéines à apoB.

Ainsi, afin de prévenir les anomalies neuro-ophtalmiques, ces pathologies imposent la mise en place d'un régime pauvre en lipides associé à une vitaminothérapie substitutive à fortes doses. Or, à ce jour, malgré une prise en charge précoce, la protection ophtalmique n'est pas totale et la restauration des concentrations sériques en vitamine E demeure un échec malgré l'utilisation de très fortes doses de vitamine E. Ainsi, des cas de patients présentant une dégradation de la fonction ophtalmique à l'adolescence ou à l'âge adulte ont été rapportés. Cette dégradation se fait généralement sous la forme d'une rétinite pigmentaire (dite secondaire) caractérisée par une perte progressive des photorécepteurs, un dysfonctionnement de l'épithélium pigmentaire et une atrophie de la macula lutea composée de deux molécules lipophiles de la famille des xanthophylles que sont la lutéine et la zéaxanthine, aussi appelées pigments maculaires se traduisant par une perte progressive et graduelle de la vision évoluant généralement vers la cécité (Pagon 1988). L'importance de ces molécules pour la vision a été discutée dans l'introduction de ce travail et n'ayant jamais été considérées dans la prise en charge thérapeutique des patients FHBL, l'hypothèse d'une implication d'un fort déficit plasmatique en caroténoïdes dans la perte de la fonction visuelle est envisagée.

En regard des données bibliographiques et étant donné que les mécanismes d'absorption entérocytaire des micronutriments liposolubles (vitamines A/E et caroténoïdes) sont communs à ceux des lipides, deux hypothèses ont été émises concernant la dégradation de la fonction ophtalmique. Elle pourrait être liée, d'une part, directement aux carences combinées en vitamine A/E et en caroténoïdes et d'autre part, à l'accumulation de conditions pro-oxydantes induisant un déficit en molécules antioxydantes (vitamine E, vitamine A, caroténoïdes, polyphénols, lycopène) conduisant à un état de stress oxydant pathologique permanent. Ce

stress oxydant pourrait être en cause dans la dégénérescence rétinienne observée et pourrait justifier d'ajuster la prise en charge des patients avec des suppléments complémentaires en caroténoïdes (prioritairement lutéine et zéaxanthine) et éventuellement en vitamine C (acide ascorbique).

Afin de répondre à ces hypothèses deux axes de recherche ont été mis en place : un volet fondamental, ainsi qu'un volet clinique.

### **La partie fondamentale**

Le volet fondamental visait à étudier l'absorption et la sécrétion entérocytaire de la vitamine E et de quatre caroténoïdes dans des cellules Caco-2 mutées, représentatives des pathologies étudiées. Cette partie repose donc sur la création de modèles cellulaires représentatifs des cellules intestinales de patients atteints de FHBL par invalidation des gènes d'intérêt grâce à la méthode CRISPR/Cas9. Ces modèles ont pour but d'étudier l'absorption de la vitamine E et de certains dérivés utilisés en thérapeutique (Tocofersolan et acétate de tocophérol) afin d'apporter de nouvelles données permettant de comprendre les difficultés de supplémentation. C'est pourquoi, nous avons étudié l'absorption et la sécrétion de la forme libre du tocophérol, mais également la forme acétate qui est la forme majoritaire utilisée en thérapeutique, et enfin la forme pégylée (hydrosoluble) qui a antérieurement fait l'objet d'une recherche clinique afin d'étudier une alternative thérapeutique à la forme liposoluble (Cuerq et al. 2018). Dans un deuxième temps, ces modèles ont été utilisés pour caractériser la sécrétion de quatre caroténoïdes majeurs ( $\alpha/\beta$ -carotène, lutéine et zéaxanthine), afin d'étayer un nouvel axe de recherche dans ces pathologies pour lesquelles les micronutriments liposolubles essentiels, autres que les vitamines, n'ont jamais fait l'objet d'une étude approfondie, bien que des données préliminaires de notre équipe et des éléments de la littérature confirment l'existence d'un déficit sévère chez l'ensemble des rares cas pour lesquels les dosages ont été faits.

### **La partie clinique**

Le volet clinique consistait à caractériser et évaluer la densité du pigment maculaire chez les patients FHBL par la méthode de l'imagerie par auto-fluorescence pour être comparée à celle de patients témoins. Cette étude comportait également quatre objectifs secondaires :

- Caractériser le statut en caroténoïdes des patients et quantifier les éventuels déficits plasmatiques et érythrocytaires en caroténoïdes.

- Caractériser les niveaux des marqueurs de stress oxydant des patients.
- Etudier la corrélation entre la densité optique du pigment maculaire avec d'une part le statut en caroténoïdes, et d'autre part le niveau de stress oxydant.
- Rechercher une possible évolution à un an de la densité optique, des statuts vitaminiques et du stress oxydant.

In fine, les données de ce travail visent à tester l'hypothèse de l'intérêt éventuel de l'apport d'un ou plusieurs caroténoïdes en sus du traitement standard chez les patients atteints de HBL.

### III. Matériel et méthodes

#### 3.1. Matériels

Le milieu de culture (Dulbecco's modified Eagle's medium ou DMEM) contenant 4,5 g/L de glucose et un mélange trypsine-EDTA, les acides aminés non essentiels, le mélange pénicilline / streptomycine ainsi que le PBS viennent de Life Technologies (Illkirch, France). Le sérum de veau fœtal (SVF) a été fourni par Gibco (Gibco par Thermo Fisher Scientific Inc., Illkirch, France). Les amorces d'ADN, les ARN guides synthétiques (sgARN), la protéine TrueCut™ Cas9 v2 (Invitrogen™), le réactif de transfection Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Cas9 (Invitrogen™), le kit d'ADN génomique PureLink™ (Invitrogen™), l'ADN polymérase AmpliTaq Gold® 360 (Applied Biosystems) et le réactif TRIzol proviennent de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, États-Unis) et produits par Synthego (Synthego Corporation, Redwood City, Californie, États-Unis). Les séquences reçues au laboratoire et les séquences d'ADN ciblées par l'ARN guide, sont résumées dans le tableau 8 ci-dessous.

Gène (ID)	Séquence d'ADN cible (5' – 3')	Nom du gRNA	Séquences des gRNA (5' – 3')
<i>MTTP</i> (4547)	ACGCTCCTTCATCTAATCCA	<i>MTTP</i> -gRNA #1	ACGCUCCUUCAUCUAAUCCA
		<i>MTTP</i> -gRNA #2	UACACGGCCAUUCCCAUUGU
SAR1B (338)	TTGACTCTAACAGCCTTTTCG	<i>SAR1B</i> -gRNA #1	UUGACUCU AACAGCCUUUCG
		<i>SAR1B</i> -gRNA #2	UCCGAAGAACUGACCAUGC
<i>HPRT1</i> (3251)	GCATTTCTCAGTCCTAAACA	<i>HRPT1</i> -gRNA #1 (contrôle positif)	GCAUUUCUCAGUCCUAAACA

Tableau 8. Séquences d'ADN cibles et séquences des gRNA utilisés dans les expériences de transfection par CRISPR/Cas9.

L'alpha et le gamma-tocophérol sont fournis par Sigma (St Quentin-Fallavier, France). Tous les solvants utilisés en HPLC ont été fournis par SDS (Peypin, France). Les analyses Western-blot ont été réalisées à l'aide d'un anticorps monoclonal primaire de souris dirigé contre MTP (C-1, sc-515742), Sar1b (AT1C7, sc-517425) ou la  $\beta$ -actine (ACTBD11B7, sc-81178) produits par Santa Cruz Biotechnology INC. (Dallas, Texas, USA). L'anticorps secondaire anti-souris est un anticorps IgG de chèvre anti-souris conjugué à la HRP (cat. N°62-6620, 1:10000 ; Zymed, Thermo Fisher Scientific). Le tocofersolan utilisé pour la préparation des micelles était celui contenu dans le médicament commercialisé sous le nom de Vedrop® avec une concentration en  $\alpha$ -tocophérol de 50mg/ml. Il s'agit d'une molécule de synthèse obtenue par estérification du succinate de tocophérol avec du polyéthylène glycol 1000. Le produit final majoritaire est le mono-TPGS mais d'autres produits tels que le succinate de tocophérol, le tocophérol, la chaîne PEG ou le di-TPGS peuvent co-exister dans la préparation finale.

### 3.2. Culture cellulaire

La lignée cellulaire Caco-2/TC7, dérivée d'un adénocarcinome du côlon humain, se différencie en 2 à 3 semaines naturellement en une monocouche de cellules hautement polarisées jointes par des jonctions serrées fonctionnelles et organisées avec des microvillosités à la membrane apicale adoptant ainsi un phénotype proche des entérocytes de la barrière intestinale (Chantret et al. 1994). Dans le cadre de ce travail, les expérimentations ont été réalisées avec le clone TC7.

La culture de ces cellules s'est effectuée dans des flasques de 25 cm<sup>2</sup> (PolyStyrene, Sarstedt, Marnay, France), avec un milieu complet constitué du tampon *Dulbecco's Modified Eagle Medium Glutamax* (DMEM) riche en glucose (4,5 g/L) et glutamine (DMEM Gibco™ GlutaMAX™ ; Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) et complémenté par 8% ou 16% de SVF, 1% d'antibiotique (streptomycine et pénicilline) et 1% d'acides aminés non essentiels. La croissance s'est effectuée sous atmosphère contrôlée, à 37°C et 10% de CO<sub>2</sub>. Toutes les lignées cellulaires Caco-2/TC7 mutées ont été cultivées dans du DMEM contenant 8% de SVF tandis que la lignée mère non mutée a été cultivée dans du DMEM contenant 16% de SVF, 1% de pénicilline-streptomycine et 1% d'acides aminés non essentiels à 37°C dans une atmosphère à 10% de CO<sub>2</sub>.

Pour l'entretien, le milieu a été changé toutes les 48 heures. Lorsqu'une les tapis cellulaires atteignaient 80% de confluence (habituellement après 4 jours de culture), les cellules étaient



ensemencées dans de nouvelles flasques avec une densité de 2,5 millions de cellules par flasque après un traitement à la trypsine-EDTA à 0,05 % (Éthylène Diamine Tétra-Acétique). Pour les expériences d'absorption/sécrétion, à 80 % de confluence, les cellules ont été traitées à la Trypsine-EDTA à 0,05 % puis ensemencées sur inserts de membrane perméable Millicell® à une densité de  $3 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> (insert de 24 mm, membrane en polyester avec des pores de 1 µm, Millicell®, Merck, Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) dans des plaques 6 puits, afin de reproduire la barrière intestinale. Ces filtres permettent un accès différentiel aux 2 pôles de la cellule ainsi qu'une meilleure différenciation (figure 15). Les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence avec un milieu complet au niveau apical et basolatéral (environ 7 jours) puis avec un milieu sans SVF en apical jusqu'à différenciation totale (environ 14 jours soit 21 jours après l'ensemencement) en monocouches de cellules proches des entérocytes humains matures. Le milieu a été changé tous les 2-3 jours.

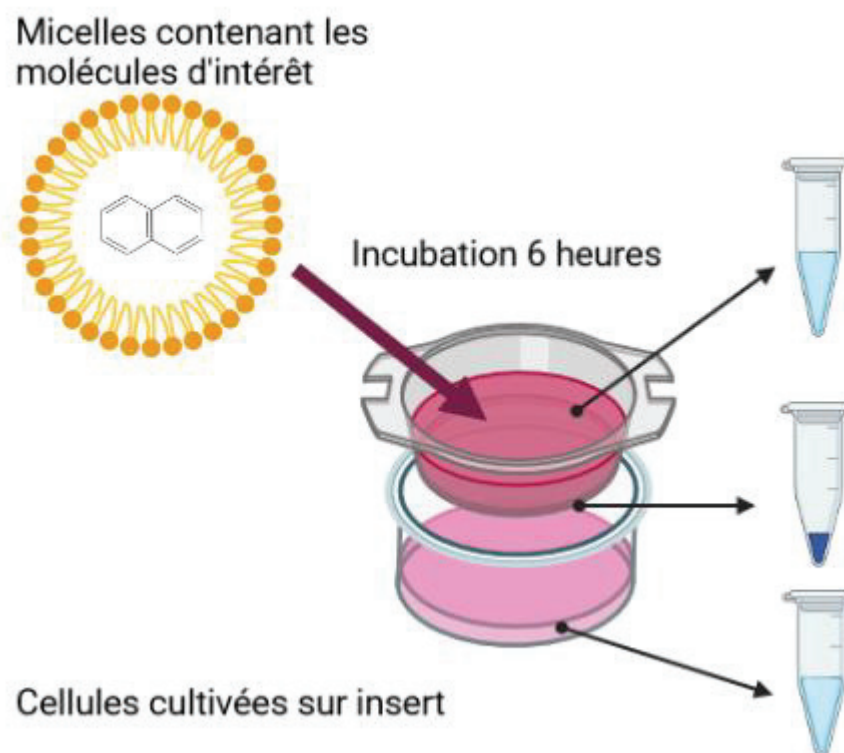


Figure 15. Schéma du système de culture sur insert avec membrane semi-perméable. Figure de C. Bordat.

### 3.3. Invalidation des gènes *MTTP* et *SAR1B* dans les cellules caco-2/TC7

#### a. Design des ARN guide pour la transfection et des amorces génomiques pour la PCR

Les cellules Caco-2/TC7 ont été invalidés pour les gènes *SAR1B* ou *MTTP* grâce au système d'édition du génome « CRISPR / Cas9 » en utilisant des gARN conçus par Invitrogen™ et produit par Synthego. Les séquences reçues au laboratoire, ainsi que les séquences d'ADN cibles sont indiquées dans le tableau 9 ci-dessous.

NB : A date de ce travail, l'ARN guide a été reçu en deux parties (crRNA:tracrRNA) et été reconstitué à partir d'un ARN CRISPR (crRNA) contenant la séquence guide et d'un « trans-activating RNA » (tracrRNA) qui stabilise l'ARN final. Cet ARN guide reconstitué se nomme ARN guide synthétique (ou sgRNA) mais ne sera pas désigné ainsi dans ce travail car ce système d'ARN guide dissocié n'est plus proposé par Invitrogen™.

Nom du gène (ID)	Séquence d'ADN cible (5' – 3')	Identifiant du gRNA	Séquence du gRNA (5' – 3')
<i>MTTP</i> (4547)	ACGCTCCTTCATCTAATCCA	<i>MTTP</i> -gRNA #1	ACGCUCCUUCAUCUAAUCCA
		<i>MTTP</i> -gRNA #2	UACACGGCCAUUCCCAUUGU
<i>SAR1B</i> (338)	TTGACTCTAACAGCCTTTCG	<i>SAR1B</i> -gRNA #1	UUGACUCU AACAGCCUUUCG
		<i>SAR1B</i> -gRNA #2	UCCGAAGAACUGUGUGC
<i>HPRT1</i> (3251) (Contrôle positif)	GCATTCTCAGTCCTAAACA	<i>HPRT1</i> -gRNA	GCAUUUCUCAGUCCUAAACA

Tableau 9. Séquences d'ADN cibles et séquences des gRNA utilisés dans les expériences de transfection par CRISPR/Cas9.

b. Vérification des amorces génomiques

La spécificité des amorces génomiques produites par Invitrogen™ (Invitrogen™ by ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, États-Unis), a été confirmée par PCR génomique en suivant un protocole conventionnel. Ainsi, 2 µL d'ADN commercial et 25 µL de Master Mix AmpliTaq® Gold 360 (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) ont été mis en présence de 100 ng d'amorces sens et antisens (voir Données complémentaires). Le produit PCR résultant (2 µL) a été mélangé avec 8 µL d'eau exempte de RNase et 2 µL de glycérol (30% v/v) et analysé avec un gel d'agarose E-gel EX à 1% en utilisant le bromure d'éthidium comme intercalant d'ADN. Les séquences d'amorces génomiques utilisées dans l'expérience CRISPR/Cas9 sont indiquées dans le tableau 10 ci-dessous.

Nom du gène	ID	Amorce sens (5' – 3')	Amorce antisens (5' – 3')
<b><i>MTTP</i></b>	4547	GCAGAGAGGAGAGAAGAGCA	CCAAGGCTGAGGCTGTCAGA
<b><i>SAR1B</i></b>	338	GCTGGGACTACAGACCCT	CTGAATGCCCGACCCTTAGA
<b><i>HPRT1</i></b>	3251	ACATCAGCAGCTGTTCTG	GGCTGAAAGGAGAGAACT

Tableau 10. Amorces génomique utilisés dans l'expérience CRIPSR/Cas9 et pour le séquençage.

c. Détermination de la confluence initiale optimale pour la transfection

Afin d'établir les conditions optimales pour la transfection, les cellules ont été comptées et ensemencées puis cultivées dans des plaques de culture à 24 puits pour atteindre différentes confluences (de 30 à 50 %) dans chaque puits. Les cellules ont ensuite été lipotransfectées en utilisant la Lipofectamine CRISPRMAX® selon le protocole proposé par Invitrogen™. Ce test a été réalisé en utilisant un gARN conçu par Invitrogen™ pour cibler le gène domestique HPRT1 (5'-GCAUUUCUCUGUCCUAAACA-3') considéré comme un contrôle positif. Les cellules ont été transfectées comme décrit ci-dessous.

d. Génération de cellules Caco-2/TC7 MTTP ou SAR1B-knock-out

La veille de la transfection, les cellules adhérentes (cultivées en flasques T25) Caco-2/TC7 indifférenciées ont étéensemencées dans des plaques de culture cellulaire à 24 puits à une densité de  $3 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>. Lorsqu'elles ont atteint 30 % de confluence, les cellules ont été transfectées avec les complexes ribonucléoprotéiques TrueCut™ Cas9 V2 Proteins/sgARN (cas9-RNP) à l'aide du réactif de transfection Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Cas9 selon les instructions fournies par le fabricant. Brièvement, les complexes Cas9-RNP ont été préparés en incubant la protéine Cas9 avec le sgARN dans un rapport molaire de 5 pour 1 à 25°C, pendant 10 minutes juste avant la lipofection. Les cellules ont ensuite été mises en contact avec 50µl de complexe CRISPR-Cas9/sgARN/réactif de transfection par puits pendant 48 heures, puis récupérées après trypsinisation. L'efficacité de la modification du génome a été vérifiée à l'aide du kit de détection du clivage génomique GeneArt® (« GeneArt® Genomic Cleavage Detection Kit ») conformément aux instructions du fabricant pour effectuer la lyse des cellules, la PCR génomique et la détection de la présence d'une mutation. Cette méthode permet de détecter la formation d'insertions ou des délétions génomiques (indels) créées par les mécanismes de réparation cellulaire, après clivage de l'ADN par la protéine Cas9 au niveau des loci spécifiques. L'ADN des cellules transfectées est amplifié par PCR puis le produit de la PCR est dénaturé et ré-annexé de sorte que des mésappariements sont générés lorsque des brins avec mutations sont ré-annexés à des brins sans mutation. Les mésappariements sont ensuite détectés et clivés par l'endonucléase I T7, ce qui génère des brins d'ADN de tailles variables qui peuvent être analysées par électrophorèse sur gel et densitométrie des bandes. L'édition du locus HPRT1 a été utilisée comme contrôle positif. Succinctement, l'ADN génomique a été purifié puis amplifié, à partir de cellules collectées au préalable comme décrit ci-dessus, à l'aide du kit PureLink®, selon le protocole du fabricant. Le produit PCR résultant (2 µL) a été mis en contact avec l'enzyme de détection conformément aux informations fournies. Les produits de digestion ont été analysés séparés par électrophorèse sur gel d'agarose E-gel EX à 2 %, puis visualisés par un transilluminateur UV Syngene™. Le logiciel Syngene Genetools 4.03.05.0 (Synoptics Ltd, Cambridge, Royaume-Uni) a été utilisé pour quantifier la densité optique des brins d'ADN. Le pourcentage de clivage a été quantifié en utilisant la formule donnée par le fabricant ( $\% \text{ Indel} = 1 - ((1 - \text{fraction clivée})^{1/2})$ ).

Après confirmation du clivage, la transfection a été réalisée à nouveau avec le sgARN validé uniquement, et la sélection des clones de Caco-2 a été effectuée par dilution limite, après

comptage, en plaque à 96 puits, avec 0,8 cellule/puits. Chaque cellule isolée a été cultivée jusqu'à obtenir un nombre suffisant de cellules, pour êtreensemencées en boîte de Pétri. Afin de vérifier la présence de mutation dans chaque clone, à 80% de confluence, les cellules ont été collectées et l'ADN génomique a été purifié comme décrit ci-dessus. Après amplification PCR avec le kit Master Mix AmpliTaq® Gold 360 en présence des amorces sens et antisens correspondantes à chaque gène d'intérêt (voir Données complémentaires), les échantillons ont été séparés sur un gel d'agarose pour confirmer la conformité de leur taille appropriée. Les produits PCR purifiés ont été envoyés pour un séquençage Sanger à GenoScreen (Lilles, France). Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Chromas 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd).

### 3.4. Caractérisation des modèles invalidés

#### a. Analyse des effets « off-target »

Les mutations indésirables sur des séquences ADN hors cibles ont été déterminées *in silico* à l'aide d'un algorithme conçu pour identifier l'ensemble des sites potentiels de liaison des gRNA candidats en fonction de la complémentarité des séquences et de la séquence PAM (disponible sur <https://cm.jefferson.edu/Off-Spotter/>) (Pliatsika, Rigoutsos 2015). Les résultats ont permis de lister les séquences appartenant à des gènes (30 sites potentiels ciblés par le *MTTP*-gRNA et 15 sites potentiels ciblés par le *SARIB*-gRNA). Pour chaque séquence identifiée, la probabilité de ciblage et de liaison (Off-Target Scoring) a été calculée en utilisant le package R DeepCRISPR-1.0 (Fortin et al. [Assessed May 2022]). Cette probabilité, ou score, correspond à la fréquence de clivage sur la séquence initialement non-ciblée. L'analyse des données a été réalisée à l'aide de RStudio 2022.02.0 Build 443. Les sites hors cible dont la fréquence de clivage est inférieure à  $10^{-5}$  ont été considérés comme fortement improbables. Les autres sites ont été amplifiés par PCR à partir de l'ADN génomique de chaque clone étudié et séquencés par la méthode Sanger pour vérifier la présence de mutations.

#### b. Analyses Western-Blot

Après avoir été cultivées en flasques T25 pendant 21 jours (soit 14 jours post-confluence), les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS puis récupérées par grattage dans 2 ml de PBS

contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases (dilution 1 : 200) dans des tubes Eppendorf stériles. Chaque échantillon a ensuite été vortexé pendant 15 minutes tout en étant maintenu à 4°C. Après 15 minutes de sonication dans la glace, les lysats cellulaires ont été centrifugés (680 × g, 5 min, 4 °C). Les surnageants ont été récupérés dans de nouveaux tubes, et quantifiés par le kit de dosage protéique Pierce™ BCA (kit 23225, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Une même quantité de protéines (20 µg pour MTP et 30 µg pour Sar1b) ont été séparés par SDS-PAGE et transférées sur une membrane PVDF. Après 45 minutes de saturation dans une solution de lait à 10%, les membranes ont été mises en contact avec l'anticorps primaire spécifique de chaque protéine d'intérêt dilué au 1/500e (Sar1B (AT1C7) : sc-517425 et MTP (C-1) : sc-515742 ; Santa Cruz Biotechnology, INC., CA, USA) une nuit entière à 4°C. Après avoir été lavées trois fois avec du TBST, les membranes ont été mises en contact avec un anticorps secondaire conjugués à la peroxydase de raifort (1 : 10000) à température ambiante pendant 1 heure. Les protéines ont été détectées par chimioluminescence (ECL ; Pierce, Thermo Fisher Scientific) et détectées avec ImageQuant® LAS-4000 mini (GE Healthcare).

c. Extraction de l'ARN et RT-PCR quantitative

L'ARN total a été extrait à l'aide du réactif TRIzol™ Invitrogen™ conformément aux instructions du fabricant. Un microgramme d'ARN total a été utilisé pour la transcription inverse en ADNc par la transcriptase inverse M-MLV (Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, Référence : 28025013) et l'amplification a été réalisée par la plateforme LightCycler® 480 Instrument (Roche Molecular Systems, Inc). L'ARNr 18S a été utilisé comme contrôle endogène pour comparer les valeurs de C<sub>t</sub> (cycle seuil). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel LC480 (Roche Diagnostics, Penzberg, Allemagne). Pour chaque gène, la valeur 1 a été attribuée aux niveaux d'ARNm des cellules non mutées et les niveaux d'ARNm des clones mutées sont exprimés en valeurs relatives par rapport au contrôle. Les séquences des amorces sont indiquées dans le tableau 11 ci-dessous.

<b>Fonction</b>	<b>Nom du gène</b>	<b>ID</b>	<b>Amorce sens (5' – 3')</b>	<b>Amorce antisens (5' – 3')</b>
Transport des Acides Gras	<i>SLC27A4</i>	10999	GCTTCATCCGGGTCTTCATC	AGTTGGCTACACTGCTTGAG
	<i>FABP2</i>	2169	TAGCAGACGGAAGTGAAGTCTC	GTGCGCCAAGAATAATGCTC
Formation des chylomicrons	<i>APOB</i>	338	GCCATGTCCAGGTATGAGCTC	TTCTCCGGGTAAAGGAAAACC
	<i>MTTP</i>	4547	TGTTCAAGACATCTACGTTTGGGA	TGAGCGACCATTTCTTCAGA
	<i>SAR1A</i>	56681	TCCAACACTACATCCGACATCA	TTTCCAAACGCGACGTGC
	<i>SAR1B</i>	338	ATTGCTGGCATGACGTTTAC	TGCCATTGATAGCAGGAAGG
	<i>PLIN2</i>	123	ATCCAAGATCAAGCCAAGCA	AAGGGACCTACCAGCCAGTT
Métabolisme du cholestérol	<i>ABCA1</i>	19	ACAACATGAATGCCATTTTCCA	ATAATCCCCTGAACCCAAGGA
	<i>ABCG8</i>	64241	CACTCGCAGCCCTGTTTCTA	TTTCCACACAGGTGCTCTCG
	<i>NPC1L1</i>	2+881	GGCAGACCTCCCAAGTCGA	ATCCTTGAAGGTGAGCGGG
	<i>PGP</i>	283871	ATCAGCAGCCCACATCATCA	TCCTTCCAATGTGTTCCGGCA
	<i>SCARB1</i>	949	AGTCTGGAATTCAGAACGTC	GTGGATGTCCAGGAACAAGG
Synthèse intracellulaire des lipides	<i>ACAT2</i>	39	AGGTGAGATGCCACTGACTG	TTCTGGGACAGAAGTCAAC
	<i>DGAT1</i>	8694	CAGTGGCTTCAGCAACTACC	CAGAGAAACCACCTGGATGG
	<i>DGAT2</i>	84649	AAGGGCTTTGTGAAACTGGC	CCTCCTCGAAGATCACCTGC
	<i>MGAT2</i>	80168	CCCTCCCACTCTTTCATGGC	GATGGGCTTCCCACCAC
Stress Oxydant	<i>CAT</i>	847	CTGTGAACTGTCCCTACCGT	AATTTGGAGCACCACCCTGAT
	<i>SOD1</i>	6647	CTAGCGAGTTATGGCGACGAA	CACTGGTCCATTACTTTCCTTCTG

Tableau 11. Amorces utilisées dans les expériences de RT-qPCR.

d. Microscopie optique

*Imagerie sur cellules chargées en FBS* - Les cellules KO et témoins ont été cultivées en plaques de 24 puits pendant 21 jours. Un jour avant l'expérience, le milieu utilisé en apical et basolatéral a été changé pour du DMEM à 16% de SVF. Le jour de l'expérience, les monocouches de cellules ont été lavées deux fois avec 0,5 ml de PBS et colorées avec de l'Oil Red O. La solution d'Oil Red O a été préparée à partir d'une solution d'isopropanol saturée d'Oil Red O (Sigma ref : O0625-25g [1320-06-5]) diluée dans de l'eau (2:3 v/v). Les cellules ont ensuite été fixées dans les puits de culture par incubation pendant 15 minutes avec une solution aqueuse d'acide acétique à 10% et de méthanol à 10%. Toutes les images ont été recueillies avec un microscope inversé Nikon Eclipse TS100 (Nikon ; Tokyo, Japon) équipé d'un objectif de microscope Nikon ELWD 0.3/OD75 C-A-O. Les images ont été acquises avec le logiciel Nikon NIS Elements (NIS-Elements F 2.3, SP3, Nikon ; Tokyo, Japon) à trois grossissements différents (20X, 100X, 400X). Les images ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ (ImageJ, 1.53k, National Institutes of Health, USA).

*Imagerie sur cellules incubées avec des micelles mixtes pour la quantification des lipides intracellulaires* - Les cellules KO et témoins ont été cultivées sur des inserts de filtres de culture cellulaire comme décrit ci-dessus. Vingt-quatre heures avant chaque expérience, le milieu apical et basolatéral a été remplacé par un milieu sans SVF. Les monocouches cellulaires ont ensuite été incubées avec des micelles mixtes synthétiques, préparées comme décrit par Reboul et al. (Reboul et al. 2005) ou avec du milieu sans sérum pendant 16 heures. Le jour de l'expérience, les monocouches cellulaires ont été lavées deux fois avec 0,5 ml de PBS, puis fixées avec du paraformaldéhyde et colorées avec une solution d'Oil Red O préparée extemporanément à partir d'une solution saturée d'isopropanol d'Oil Red O diluée dans de l'eau (2:3 v/v). Les gouttelettes lipidiques intracellulaires ont été quantifiées comme décrit par (Vincent et al. 2020) après acquisition de 20 images par puits en microscopie optique standard. Les images de cellules colorées à l'Oil Red O ont été analysées à l'aide du logiciel d'imagerie ImageJ. La condition sans micelles a été utilisée comme condition basale pour chaque clone. Le rapport de surface de coloration Oil Red O entre la condition en présence de micelles et la condition en l'absence de micelles a été calculé. Le nombre et la taille moyenne des gouttelettes ont été déterminés en comptant le nombre de gouttelettes observées dans le champ de vision et exprimés par le rapport entre la condition en présence de micelles et la condition en absence de micelles. Tous les ratios ont été comparés au ratio calculé pour les cellules témoins.



## 3.5. Expériences d'absorption des lipides et des micronutriments liposolubles

### 3.5.1. Les micelles mixtes synthétiques

Afin d'apporter les lipides et les micronutriments liposolubles aux cellules, lors des différentes expériences, des micelles mixtes synthétiques ont été fabriquées. Ces micelles contiennent systématiquement de la phosphatidylcholine (PC), de la lyso-phosphatidylcholine (lysoPC), de la mono-oléine (MO), du cholestérol libre (C), de l'acide oléique (AO) et un nutriment liposoluble (caroténoïdes ou vitamines) selon les besoins. Un volume approprié de chaque solution mère de ces lipides a été mélangé afin d'obtenir une concentration finale de 0.04 mM PC, 0.16 mM lysoPC, 0.3 mM MO, 0.1 mM C et 0.5 mM AO. Le solvant (ici chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v)) a ensuite été évaporé sous azote jusqu'à l'obtention d'un film sec lipidique. Ce dernier a été solubilisé dans du DMEM contenant 5 mM de taurocholate de sodium puis soniqué grâce à une microsonde (Branson 3510, Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, Connecticut, USA) pendant 3 minutes à 25 Watts. Ce mélange a ensuite été filtré à 0,22  $\mu\text{m}$  de porosité (Filtres Millipore®, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) pour obtenir les micelles qui ont été conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au jour de l'expérimentation.

Composé lipidique	Concentration
Taurocholate de sodium	5 mmol/L
Cholestérol (C)	0,1 mmol/L
Phosphatidylcholine (PC)	0,04 mmol/L
Lyso-phosphatidylcholine (LysoPC)	0,16 mmol/L
Acide oléique (AO)	0,5 mmol/l
Monooléine (MO)	0,3 mmol/l
± DL $\alpha$ -tocophérol	100 $\mu\text{mol/l}$
± DL Acétate de tocophérol	100 $\mu\text{mol/l}$
± Tocofersolan	100 $\mu\text{mol/l}$
± Lutéine/Zéaxanthine	10 $\mu\text{mol/l}$
± $\alpha$ -/ $\beta$ -carotène	1 $\mu\text{mol/l}$

Tableau 12. Composition lipidique des micelles mixtes.

### 3.5.2. Expériences d'absorption des lipides, des caroténoïdes et de la vitamine E

Des micelles mixtes, enrichies ou non avec 100  $\mu$ M de vitamine E, ou 10  $\mu$ M de lutéine/zéaxanthine, ou 1  $\mu$ M de carotène ont été préparées comme décrit précédemment. Les lignées cellulaires ont été cultivées sur membrane semi-perméable en plaques 6 puits pendant 21 jours. Vingt-quatre heures avant chaque expérience, les cellules ont été mises à jeun en utilisant un milieu sans sérum aux pôles apical et basolatéral. Le jour de l'expérience, les monocouches cellulaires ont été lavées deux fois avec 0,5 ml de PBS puis 1 ml de micelles a été déposé au niveau apical, tandis que le côté basolatéral a reçu du milieu complet sans sérum. Les cellules ont été incubées pendant 6h (pour les micronutriments liposolubles) ou 16h (pour les triglycérides et le cholestérol) à 37°C. À la fin de l'expérience, les milieux apicaux et basolatéraux ont été récoltés. Les cellules ont été soigneusement rincées deux fois avec 0,5 ml de PBS froid avant d'être et recueillies dans 0,560 ml de PBS. Les échantillons ont été conservés à -80°C. Chaque expérience a été répétée au moins deux fois.

### 3.5.3. Dosage du cholestérol et des triglycérides dans le milieu basolatéral

Le contenu du milieu basolatéral en triglycérides et cholestérol et a été analysé en utilisant des tests de quantification fluorimétriques (respectivement Picoprobe® ab178780 Abcam, Cambridge, MA et Amplite® cholesterol quantification kit 40006 ; AAT Bioquest, USA) selon les instructions du fabricant. Pour la quantification du cholestérol, 50  $\mu$ l d'échantillons ont été homogénéisés et incubés avec le mélange réactionnel pendant 30 minutes à 37°C à l'abri de la lumière. Pour la quantification des triglycérides, 50  $\mu$ l d'échantillons ont été homogénéisés et incubés avec 2  $\mu$ l de lipase pendant 20 minutes à 37°C puis avec le mélange réactionnel pendant 30 minutes à 37°C à l'abri de la lumière. La fluorescence des échantillons a été déterminée à Ex/Em = 540/590 nm pour le cholestérol et Ex/Em = 537/587 nm pour les

triglycérides en utilisant l'instrument EnSight Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA).

#### 3.5.4. Analyses de la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) et ses dérivés ainsi que des caroténoïdes par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

L' $\alpha$ -tocophérol et les caroténoïdes ont été récupérés par extraction liquide-liquide en phase hexanique selon le protocole décrit ci-dessous. L'extraction des molécules d'intérêt a été réalisée à partir de 1000, 500 ou 250  $\mu$ L d'échantillon (selon sa nature) complétés si nécessaire par de l'eau bi-distillée (qsp 500  $\mu$ L pour les prises d'essai inférieures à 500  $\mu$ L). Un volume équivalent de solution éthanolique contenant l'étalon interne en quantité connue, et deux volumes d'hexane ont ensuite été ajoutés à chaque échantillon. La phase hexane obtenue après centrifugation ( $1200 \times g$ , 10 min, 4 °C) a été recueillie et évaporée à sec sous azote, et les extraits secs ont été dissous dans différents solvants selon les composés puis injectés en HPLC. Un volume de 20 à 200  $\mu$ L a été utilisé pour l'analyse HPLC. Le système HPLC comprenait un module de séparation Ultimate U3000 (Thermo Scientific) avec une pompe LPG 3400SD, un four à colonne TCC-3000SD et un passeur automatique d'échantillons WPS-3000/TSL, suivi d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD) DAD-3000 et d'un détecteur à Fluorescence FLD-3100. Le logiciel Chromeleon 7.2 (Thermo Scientific) servait à piloter l'HPLC ainsi qu'à retraiter les données. Les composés d'intérêt ont été identifiés par leurs temps de rétention et leurs spectres d'absorption par comparaison à des solutions standards pures (>95% de pureté).

##### a. Vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol), acétate de Tocophérol (TAC) et $\alpha$ -tocophéryl polyéthylène glycol succinate 1000 (TPGS)

L'étalon interne utilisé était le  $\gamma$ -tocophérol. L'extrait sec a été repris avec 200  $\mu$ L de méthanol, correspondant à la phase mobile utilisée pour l'analyse HPLC. L' $\alpha$ -tocophéryl polyéthylène glycol succinate 1000 (TPGS) a été dosé indirectement en quantifiant l' $\alpha$ -tocophérol libéré après saponification par l'hydroxyde de potassium (KOH 5,5 % + pyrogallol 1 %) pendant 10 min à température ambiante et en soustrayant l' $\alpha$ -tocophérol déterminé avant saponification. Un volume de 10 à 200  $\mu$ L a été injecté, selon la nature de l'échantillon. Les

composés ont été séparés à l'aide d'une colonne Zorbax Eclipse XDB-C18 de 250 × 4,6 mm, 5 µm (Agilent Technologies, Les Ulis, France) précédée d'une pré-colonne et maintenue à une température constante (40 °C). L'analyse de la vitamine E et du TAC a été effectuée avec une phase mobile de méthanol à 100% (débit = 1,5 ml.min<sup>-1</sup>). Les composés ont été détectés en UV à 292 nm, et en fluorescence (pour l'α-tocophérol) à 325 nm après excitation de la lumière à 292 nm.

b. Lutéine, Zéaxanthine, α- et β-carotène des échantillons in vitro

L'étalon interne utilisé était l'apo-8'-caroténal. L'extrait sec a été repris avec 10, 20 ou 50 µL de méthanol, correspondant à la phase mobile utilisée pour l'analyse HPLC. Un volume de 5 à 20 µl a été injecté, selon la nature de l'échantillon. Les composés ont été séparés à l'aide d'une colonne Kinetex® C18 100 Å de 100 × 4,6 mm, 2,6 µm (Phenomenex, USA) précédée d'une pré-colonne et maintenue à une température constante (40 °C). L'analyse a été effectuée avec une phase mobile de méthanol à 100% (débit = 1,2 ml.min<sup>-1</sup>). Le système HPLC était le même que décrit précédemment. Les composés ont été détectés en UV-visible à 350 nm, correspondant à leur longueur d'onde d'absorption maximale. Ils ont été identifiés par leurs temps de rétention et leurs spectres d'absorption.

c. Lutéine, Zéaxanthine, α-/β-carotène, lycopène et β-cryptoxanthine des échantillons de plasma humain

L'étalon interne utilisé était l'échinénone. L'extrait sec a été repris avec 200 µL de méthanol /dichlorométhane (65 :35), correspondant à la phase mobile utilisée pour l'analyse HPLC. Un volume de 50 à 180 µl a été injecté, selon la nature de l'échantillon. Les composés ont été séparés à l'aide d'une colonne YMC C30 de 250 × 4,6 mm de diamètre interne couplée à une colonne de garde Zorbax et maintenue à une température constante (35 °C). La phase mobile consistait en un gradient de méthanol (A), de méthyl tert-butyl éther ou MTBE (B) et d'eau (C). Le débit était de 1 mL/min. Le profil du gradient de la phase mobile (A:B:C) a été réglé à 96:2 :2 et a changé linéairement jusqu'à 18:80:2 en 27 min, pour revenir à 96:2:2 de 31 à 35 min. Les caroténoïdes, ont été détectés à 450 nm.

### 3.6. Statistiques

Les tests statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism, version 8.4.3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. Les conditions des tests statistiques ont été vérifiées et testées pour la normalité, ainsi que les résidus (tracé résiduel, tracé d'homoscédasticité et tracé QQ), pour la distribution normale et l'égalité des variances avant les tests statistiques. Le cas échéant, si une hétéroscédasticité était détectée dans les résidus, les données ont été transformées en logarithme avant de procéder à une analyse paramétrique supplémentaire. Chaque groupe de données non appariées a été comparé au groupe témoin à l'aide du test ANOVA. Le test post-hoc de Dunnett a été utilisé pour comparer les moyennes des différents groupes. Pour tous les tests, le risque alpha bilatéral était  $\alpha = 0,05$ . Une valeur  $p < 0,05$  a été considérée comme significative.

## IV. Résultats

### 4.1. Etude 1 : Mesure in vitro de l'absorption sécrétion de différentes formes galéniques de vitamine E

#### 4.1.1. Introduction

La vitamine E est l'un des traitements essentiels pour la prévention des complications neurologiques et ophtalmiques comme détaillé dans la première partie de ce mémoire. Puisqu'il s'agit d'une molécule liposoluble, sa digestion et son absorption intestinale peuvent être altérées dans certaines pathologies. Pour cette raison, des formes pharmacologiques spécifiques de vitamine E ont été développées visant à augmenter son hydrophilie pour améliorer son absorption intestinale ; l'ajout d'une chaîne pégylée est l'une des stratégies utilisées (RRR- $\alpha$ -tocopheryl polyéthylène glycol 1000 succinate = TPGS = tocofersolan).

L'absorption intestinale de ces molécules ayant été très peu étudiée dans la littérature, nous avons décidé de mener une évaluation des cinétiques d'absorption sécrétion dans le modèle entérocytaire Caco-2 des différentes formes de vitamine E afin d'évaluer leurs pertinences respectives en situation classique intestinale.

Ce travail, réalisé avec le Dr Charlotte Cuerq, poursuit sa thèse qui avait évalué la cinétique d'absorption in vivo chez des patients HBL (Cuerq et al. 2018).

#### 4.1.2. Article : « Comparison of $\alpha$ -Tocopherol, $\alpha$ -Tocopherol Acetate, and $\alpha$ -Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate 1000 Absorption by Caco-2 TC7 Intestinal Cells. Cuerq C, Bordat C, Halimi C, Blond E, Nowicki M, Peretti N, Reboul E. *Nutrients*. 2020 Dec 31;13(1):1

Communication

# Comparison of $\alpha$ -Tocopherol, $\alpha$ -Tocopherol Acetate, and $\alpha$ -Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate 1000 Absorption by Caco-2 TC7 Intestinal Cells

Charlotte Cuerq<sup>1,2</sup>, Claire Bordat<sup>2,3</sup>, Charlotte Halimi<sup>3</sup>, Emilie Blond<sup>1,2</sup>, Marion Nowicki<sup>3</sup>, Noël Peretti<sup>2,4,\*</sup> and Emmanuelle Reboul<sup>3,\*</sup> 



check for updates

**Citation:** Cuerq, C.; Bordat, C.; Halimi, C.; Blond, E.; Nowicki, M.; Peretti, N.; Reboul, E. Comparison of  $\alpha$ -Tocopherol,  $\alpha$ -Tocopherol Acetate, and  $\alpha$ -Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate 1000 Absorption by Caco-2 TC7 Intestinal Cells. *Nutrients* **2021**, *13*, 129. <https://doi.org/10.3390/nu13010129>

Received: 3 December 2020

Accepted: 24 December 2020

Published: 31 December 2020

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<sup>1</sup> Biochemistry Department, Hospices Civils de Lyon, 69495 Pierre-Benite, France; charlotte.cuerq@chu-lyon.fr (C.C.); emilie.blond@chu-lyon.fr (E.B.)

<sup>2</sup> CarMeN Laboratory, INSERM U1060, INRA UMR 1397, INSA-Lyon, Université Lyon 1, 60310 Pierre-Benite, France; [claire.bordat@univ-amu.fr](mailto:claire.bordat@univ-amu.fr)

<sup>3</sup> AMU, INRAE, INSERM, C2VN, 13005 Marseille, France; charlotte.halimi@univ-amu.fr (C.H.); marion.nowicki@univ-amu.fr (M.N.)

<sup>4</sup> Pediatric Hepato-Gastroenterology and Nutrition Unit, Hôpital Femme Mère Enfant de Lyon, Hospices Civils de Lyon, 69677 Bron, France

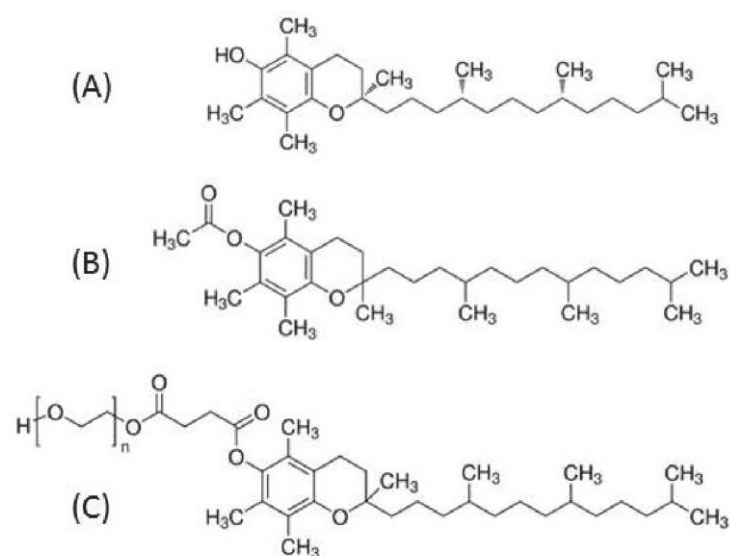
\* Correspondence: noel.peretti@chu-lyon.fr (N.P.); emmanuelle.reboul@univ-amu.fr (E.R.)

**Abstract:** (1) Background: vitamin E is often supplemented in the form of tocopherol acetate, but it has poor bioavailability and can fail to correct blood tocopherol concentrations in some patients with severe cholestasis. In this context,  $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol succinate 1000 (TPGS) has been of value, but very little is about the mechanisms of its absorption. The aim of our work was to evaluate the mechanisms of absorption/secretion of TPGS compared to tocopherol acetate (TAC) and  $\alpha$ -tocopherol by human enterocyte-like Caco-2 TC7 cells. (2) Methods: two weeks post-confluence Caco-2 cells were incubated with tocopherol- or TAC- or TPGS-rich mixed micelles up to 24 h and, following lipid extraction, TAC and tocopherol amounts were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) in apical, cellular, and basolateral compartments. (3) Results: at equivalent concentrations of tocopherol in the apical side, the amounts of tocopherol secreted at the basolateral pole of Caco-2 cells are (i) significantly greater when the tocopherol is in the free form in the micelles; (ii) intermediate when it is in the TAC form in the micelles ( $p < 0.001$ ); and (iii) significantly lower with the TPGS form ( $p < 0.0001$ ). Interestingly, our results show, for the first time, that Caco-2 cells secrete one or more esterified forms of the vitamin contained in TPGS at the basolateral side.

**Keywords:** vitamin E; tocofersolan; TPGS; enterocyte; micelles; bioavailability; intestine

## 1. Introduction

Vitamin E is a generic term for a group of eight fat-soluble compounds, the tocopherols and tocotrienols, of which  $\alpha$ -tocopherol has the highest biological activity [1]. Alpha-tocopherol functions as an antioxidant that protects cell membranes from oxidative damage. Moreover, it plays a role in improving nerve conduction, and, in connection with vitamin A, is important for preserving normal vision [2]. During digestion, vitamin E is solubilized into mixed micelles in the presence of bile salts before being incorporated in chylomicrons in the enterocyte to be secreted into the circulation [3]. Normal vitamin E blood levels generally range from about 23  $\mu\text{mol/L}$  to 46  $\mu\text{mol/L}$ . The risk of vitamin E deficiency is of primary concern in malnutrition and can be caused by reduced dietary intake, inadequate bile-dependent intestinal absorption, insufficient pancreatic secretions, digestive resection or genetic diseases, such as ataxia with isolated vitamin E deficiency or intestinal genetic hypocholesterolemia (namely abetalipoproteinemia, hypobetalipoproteinemia, and chylomicron retention disease) [4]. In clinical nutrition, vitamin E is often supplemented in the form of tocopherol acetate (TAC) and the oral route is the preferred and often sufficient route of administration. Nevertheless, oral TAC has a poor bioavailability and can fail to prevent neurological complications in children with intestinal malabsorption of lipids, such as in severe cholestasis or intestinal genetic hypocholesterolemia [5]. In this context,  $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol succinate 1000 (TPGS, i.e., tocopherolsolan), a water-soluble derivative of RRR- $\alpha$ -tocopherol, has been developed and has shown its effectiveness in severe chronic cholestasis (Figure 1) [6]. Owing to its amphipathic structure, it forms micelles in the absence of bile acids allowing vitamin E to cross the unstirred water layer at the apical side of the intestinal mucosa and then be absorbed into the enterocyte. However, very little is known about the mechanisms of TPGS absorption. The aim of our work was to characterize the absorption of TPGS compared to TAC and  $\alpha$ -tocopherol by the enterocytes, independently of the other digestive factors such as biliary micelle formation and pancreatic enzyme activity.





**Figure 1.** Schematic representation of tocopherol and its esterified derivatives; (A):  $\alpha$ -Tocopherol, (B):  $\alpha$ -Tocopherol acetate, (C):  $\alpha$ -Tocopherol polyethylene glycol succinate 1000 (TPGS— $n \approx 23$ ).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals

RRR- $\alpha$ -tocopherol (>99% pure) was a generous gift from DSM Nutritional Products Ltd. (Kaiseraugst, Switzerland). RRR- $\gamma$ -tocopherol (>97% pure), DL- $\alpha$ -tocopherol acetate (>96% pure), 2-oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (phosphatidylcholine), 1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (lysophosphatidylcholine), monoolein, non-esterified cholesterol, oleic acid, sodium taurocholate, potassium hydroxide (KOH) and pyrogallol were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). TPGS was contained in VEDROP® 50 mg/mL (Orphan Europe, Puteaux, France). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 4.5 g/L glucose, trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (500 mg/L and 200 mg/L, respectively), penicillin/streptomycin, phosphatebuffered saline (PBS) were purchased from Life Technologies (Villebon-sur-Yvette, France). Fetal bovine serum (FBS) was from PAA (Vélizy-Villacoublay, France).

### 2.2. Preparation of Vitamin-Rich Micelles

For delivery of vitamin E forms to cells, molecules were incorporated into or dissolved with mixed micelles, which had a similar lipid composition to those found in vivo [7]. Micelles were prepared as previously described [8] to obtain the following final lipid concentrations: 0.04 mM phosphatidylcholine, 0.16 mM lysophosphatidylcholine, 0.3 mM monoolein, 0.1 mM non-esterified cholesterol, 0.5 mM oleic acid, and 5 mM taurocholate. Vitamin concentrations in the micellar solutions were checked by HPLC before each experiment.

### 2.3. Caco-2 TC7 Cell Culture

Cells were cultured in the presence of DMEM supplemented with 20% heat-inactivated FBS, 1% non-essential amino acid, and 1% antibiotics (complete medium), as previously described [8]. For each experiment, cells were seeded and grown on transwells as previously described to obtain confluent, differentiated cell monolayers [8]. Twelve h prior to each experiment, the medium used in apical and basolateral chambers was a serum-free complete medium. During preliminary tests, the integrity of the cell monolayers was checked by measuring trans-epithelial electrical resistance before and after the different experiments using a voltohmmeter fitted with a chopstick electrode (Millicell ERS; Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

### 2.4. Vitamin E Absorption by Caco-2 TC7 Cells

At the beginning of each experiment, cell monolayers were washed twice with 0.5 mL PBS. The apical side of the cell monolayers received either  $\alpha$ -tocopherol ( $\approx 100 \mu\text{M}$ ), TAC ( $\approx 100 \mu\text{M}$ ), or TPGS ( $\approx 100 \mu\text{M}$ ) micellar solutions at the apical side, whereas the other side received the serum-free complete medium. The concentration of  $100 \mu\text{M}$  was chosen to have a good cellular amount of newly absorbed vitamin E as shown in

our previous work [9] and to accurately measure basolateral efflux of vitamin E. Cells were incubated for up to 24 h at 37 °C. At time (t) = 0, 3 h, 6 h, 10 h, and 24 h, both apical and basolateral media were harvested. Cells were then carefully rinsed twice with 0.5 mL ice-cold PBS before being scrapped in 560 µL PBS. All samples were stored at −80 °C until further analysis.

### 2.5. Vitamin E Extraction and HPLC Analysis

- $\alpha$ -tocopherol and TAC

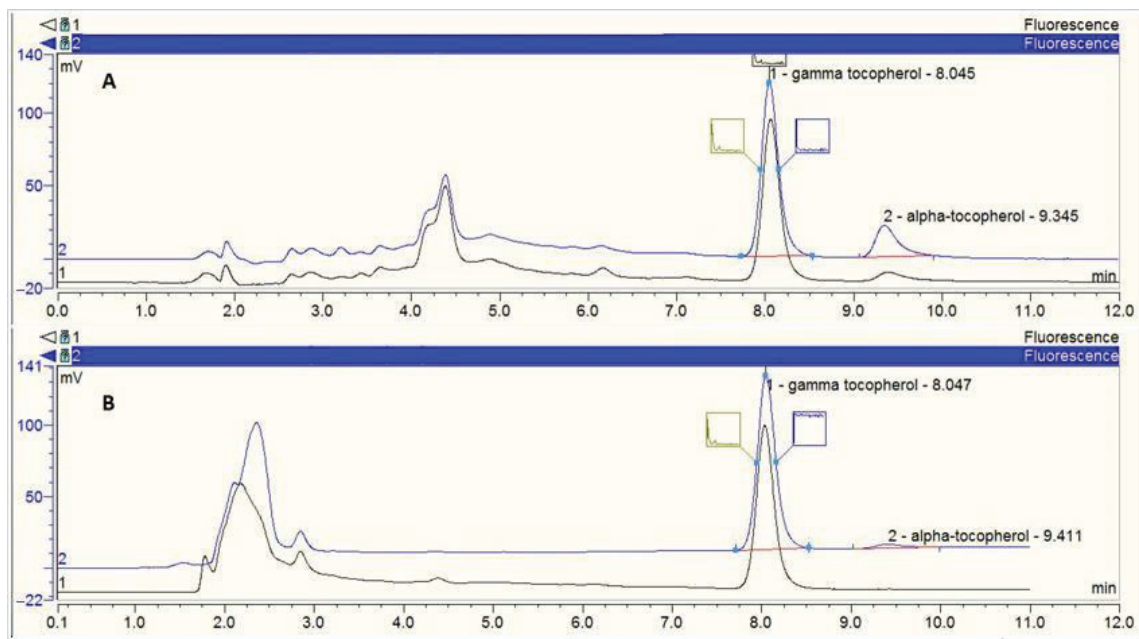
$\alpha$ -tocopherol and TAC were extracted from 25 µL to 1 mL aqueous samples using the following method.  $\gamma$ -tocopherol, which was used as an internal standard, was added to the samples in the same volume of ethanol. The mixture was extracted once with one volume of hexane. The hexane phase obtained after centrifugation (500× g, 10 min, 4 °C) was collected and evaporated to dryness under nitrogen. The dried extracts were dissolved in 200 µL methanol. A volume of 5–200 µL was used for HPLC analysis.

- TPGS

TPGS was assayed indirectly by quantifying  $\alpha$ -tocopherol released after saponification by potassium hydroxide (KOH 5.5% + pyrogallol 1%) for 10 min at room temperature and by subtracting  $\alpha$ -tocopherol determined before saponification.

### 2.6. Vitamin E HPLC Analysis

All the analyses were realized using a 250 × 4.6 nm RP C18, 5 µm Zorbax column (Agilent Technologies, Montpellier, France) maintained at a constant temperature (25 °C) and a guard column. Vitamin E analysis was performed with a 100% methanol mobile phase (flow rate = 1.5 mL/min). The HPLC system comprised a Dionex separation module (P680 HPLC Pump and ASI-100 Automated Sample Injector, Dionex, Aix-en-Provence, France), a Dionex UVD340U photodiode array detector (vitamin E detection at 292 nm) and a JASCO fluorimetric detector (JASCO, Nantes, France). For fluorimetric analysis, tocopherols were detected at 325 nm after light excitation at 292 nm. Vitamins were identified by retention time compared with pure standards. Quantification was performed using Chromeleon software (v6.50 SP4 Build 1000, Dionex) comparing peak area with standard reference curves (Figure 2).

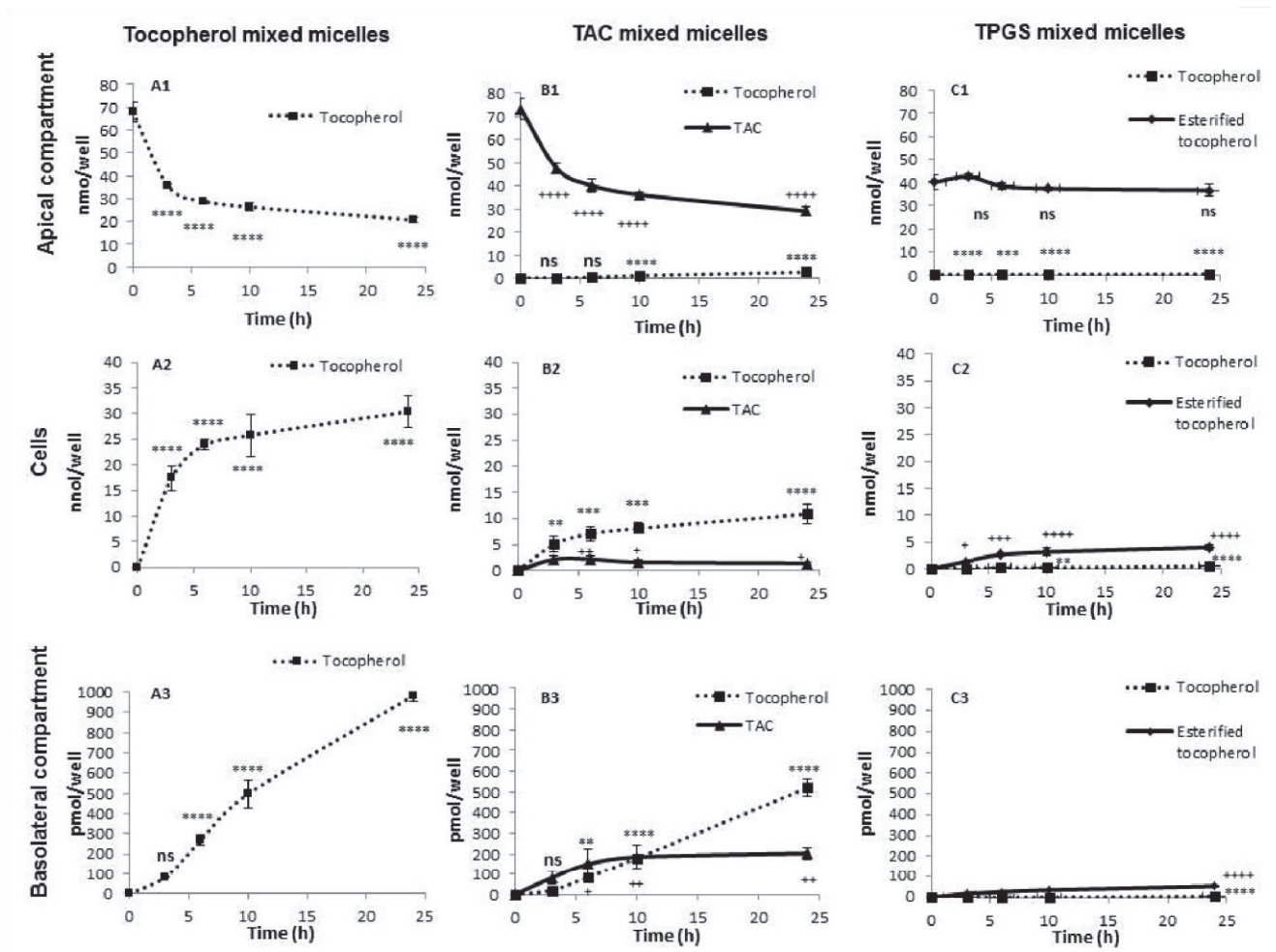


**Figure 2.** Example of chromatogram. (A) The upper part of the figure represents the chromatogram after analysis of the basolateral compartment under the condition with saponification (=hydrolysis of esterified tocopherol). The conditions at 3 h (h3) are shown in black and the conditions at 24 h (h24) are in blue on the same chromatogram. (B) The lower part of the figure represents the chromatogram after analysis of the basolateral compartment under the condition without saponification (=free tocopherol). The conditions at h3 are shown in black and the conditions at h24 are in blue on the same chromatogram.  $\gamma$ -tocopherol was used as an internal standard. The red lines represent the baselines of the chromatography peaks.

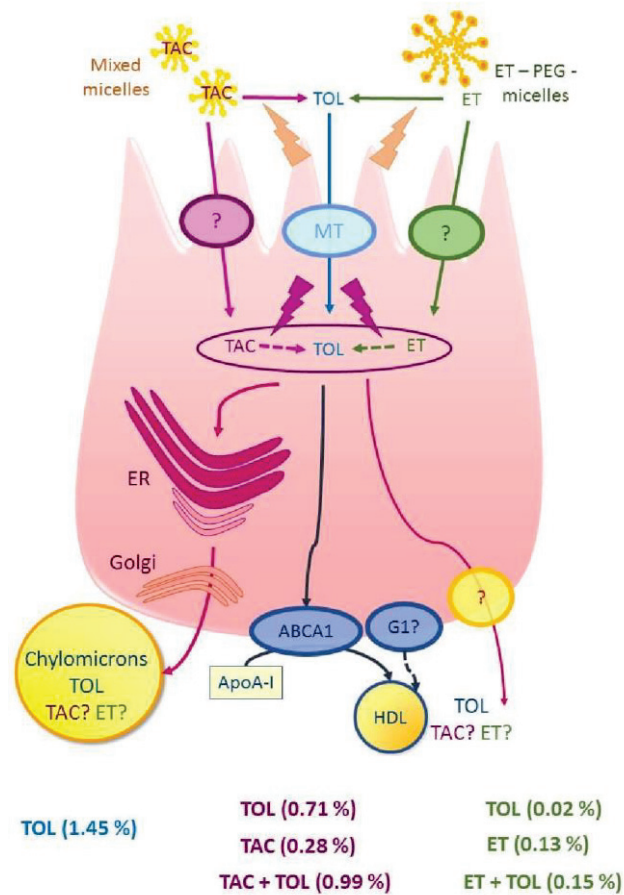
### 2.7. Statistics

Results are expressed as means of amounts with their standard errors (Figure 3). The percentage of vitamers secreted at the basolateral compartment at h24 is the ratio of the amounts of vitamers between the basolateral compartment at h24 and the apical compartment at h0. Under the TAC and TPGS conditions, the percentages were calculated in two forms: (i) the percentage of TAC secreted in its entire form and (ii) the percentage of tocopherol equivalent, which represents the concentrations of TAC (or esterified tocopherol) in its entire form as well as free tocopherol released by hydrolysis (Figure 4).

Differences in vitamer apical decrease, cellular uptake, and basolateral efflux were tested using analysis of variance (ANOVA—fixed-effects models). Prior to ANOVA, data were tested for equality of variances. Tukey’s test was used as a post hoc test for pairwise comparisons. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, LLC; San Diego, CA, USA). Values of  $p < 0.05$  were considered significant.



**Figure 3.** Uptake and secretion of different forms of tocopherol by Caco-2 cells. Two weeks post-confluence Caco-2 cells were incubated with tocopherol- or tocopherol acetate (TAC)- or  $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol succinate 1000 (TPGS)-rich mixed micelles up to 24 h and, following lipid extraction, TAC and tocopherol amounts were measured by HPLC in the different compartments. For the TPGS condition, esterified tocopherol was determined indirectly by measuring the tocopherol before and after saponification of the different compartments. (A1–A3) Tocopherol amounts in the apical, cellular, and basolateral compartment upon incubation with tocopherol-rich mixed micelles. (B1–B3) TAC and free tocopherol amounts in the apical, cellular, and basolateral compartment upon incubation with TAC-rich mixed micelles (C1–C3) Esterified tocopherol and free tocopherol amounts in the apical, cellular, and basolateral compartment upon incubation with TPGS-rich mixed micelles. For each vehicle and for each time point,  $n = 3$ . Values are means of amounts with their standard errors represented by vertical bars. Tukey test with time as a factor were carried out. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; +  $p < 0.05$ ; ++  $p < 0.01$ ; +++  $p < 0.001$ ; ++++  $p < 0.0001$  (\* are for tocopherol and are replaced by + for TAC and esterified tocopherol). ns = non-significant. Abbreviations: TAC: tocopherol acetate; TPGS:  $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol succinate 1000.



**Figure 4.** General view of the absorption/secretion of the different forms of tocopherol by the enterocyte. Consumption of  $\alpha$ -tocopherol (TOL) leads to its uptake by the intestine and secretion in the circulation in chylomicron and HDL particles together with triacylglycerol and cholesterol. TAC and esterified tocopherol (ET) in the form of PEGylated  $\alpha$ -tocopherol (ET-PEG, i.e.,TPGS) may be hydrolyzed to free  $\alpha$ -tocopherol in the stomach by non-enzymatic hydrolysis, in the proximity of the brush border epithelium by esterase hydrolysis, and at the surface of the enterocytes via a lipase. Alternatively, entire TAC or ET can pass through cell membranes, thereby enabling the absorption of the intact TAC or ET molecule. A certain proportion of TAC and ET can then be secreted in their entire form. The percentages indicate the fraction secreted at h24 compared to the amount in the apical compartment at h0. TAC + TOL (or ET + TOL) indicates the tocopherol equivalent from the apical amount of TAC (or ET-PEG). Abbreviations: ABCA1: ATP-binding cassette A1; ApoA-1: apolipoproteine A1; ER: endoplasmic reticulum, ET: esterified tocopherol; G1: ATP-binding cassette G1; HDL high density cholesterol; MT: membrane transporter; PEG: polyethylene-glycol; TAC: tocopherol acetate; TOL:  $\alpha$ -tocopherol; TPGS:  $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol succinate 1000.

### 3. Results

#### 3.1. $\alpha$ -Tocopherol Absorption by Caco-2 TC7 Monolayers

In the control condition with micelles containing  $\alpha$ -tocopherol, a decrease in the tocopherol amount over time was observed at the apical site of the Caco-2 cells (from 68 nmol/well at h0 to 21 nmol/well at h24;  $p < 0.0001$ ) (Figure 3(A1)). This decrease was concomitant with the appearance of tocopherol up to 30 nmol/well in Caco-2 cells ( $p < 0.0001$ )

(Figure 3(A2)) and up to 983 pmol/well at the basolateral site ( $p < 0.0001$ ) (Figure 3(A3)).

### 3.2. TAC

Concerning the condition using mixed micelles enriched with TAC, a decrease in TAC amount concomitant with the appearance of free  $\alpha$ -tocopherol at the apical side was observed (from 73 and 0 nmol/well at h0 to 29 and 2.6 nmol/well at h24 of TAC and free  $\alpha$ -tocopherol, respectively;  $p < 0.0001$ ) (Figure 3(B1)). At the cellular level, an increase in the concentrations of TAC and free tocopherol was observed over time ( $p < 0.0001$ ) (Figure 3(B2)). Finally, at the basolateral side, tocopherol was secreted predominantly in the form of free  $\alpha$ -tocopherol (520 pmol/well at h24;  $p < 0.0001$ ) (Figure 3(B3)). Interestingly a small amount of TAC was found at the basolateral level tocopherol (202 pmol/well at h24;  $p < 0.0001$ ) (Figure 3(B3)).

### 3.3. TPGS

Finally, when TPGS was diluted into mixed micelles, the amounts of TPGS and free  $\alpha$ -tocopherol hardly varied over time at the apical side (from 40 to 36 nmol/well at h0 and h24, respectively, for TPGS;  $p < 0.0001$ ) (Figure 3(C1)). The vitamin E content in the cells (Figure 3(C2)) as well as on the basolateral side (Figure 3(C3)) was predominantly in the form of esterified tocopherol (4 nmol/well and 54 pmol/well at h24 in cellular and basolateral compartment respectively;  $p < 0.0001$ ).

### 3.4. Percentage of Secretion of Each Vitamers

At equivalent amounts of tocopherol at the apical side, the amounts of tocopherol secreted at the basolateral pole of Caco-2 cells are (i) significantly greater when the tocopherol is in the free form in the micelles (% tocopherol secreted = 1.45%); (ii) intermediate when it is in the TAC form in the micelles (% tocopherol + TAC secreted = 0.99%) ( $p < 0.001$ ); and (iii) significantly lower with the TPGS form (% tocopherol + esterified secreted = 0.15%) ( $p < 0.0001$ ) (Figure 4).

## 4. Discussion

The objective of this work was to compare the absorption/secretion of RRR- $\alpha$ -tocopherol, dl- $\alpha$ -tocopherol acetate and dl- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate by Caco-2 cells. It is often suggested that tocopherol esters should be hydrolyzed prior absorption by the intestine [3]. However, this hydrolysis by digestive enzymes may be incomplete and a fraction of the ingested tocopherol esters may reach the brush border membrane of the enterocytes.

The fact that two molecules used were in dl form and the other in RRR form has no impact on the results insofar as the intestinal cells do not discriminate against the various isomers of vitamin E [10,11]. We incorporated or diluted the different vitamers in mixed micelles, as such vehicles containing bile salts and fatty acids are (i) present during the postprandial period, and (ii) required for both correct uptake and secretion in chylomicronlike structures by Caco-2 cells [12,13]. Caco-2 cell secretion to the basolateral compartment is usually low, but allows comparison between different conditions [9,12].

Our main results are: (1) the absorption of TPGS and TAC are efficient, and partly requires a hydrolysis at the apical pole of Caco-2

cells; (2) TAC absorption into the enterocyte partially occurs in its entire form; (3) TPGS absorption and secretion are much lower than those of TAC and  $\alpha$ -tocopherol; (4) and vitamin E can be secreted at the basolateral side in esterified forms (Figures 3 and 4).

The Caco-2 cell is a model that enables the study of the enterocyte phase of digestion. In vivo, both TPGS and TAC are submitted to digestive enzymes (salivary, gastric, and pancreatic lipases) and bile salts. The supplied form of  $\alpha$ -tocopherol, either as a free molecule or as TAC is of particular importance for its bioavailability. In animals, when vitamin E is ingested alone, the net uptake of alpha-tocopherol from the free phenol form is only half that from the acetate form [14]. However, in animals and in humans, when given with a meal, the competitive uptake studies of the two forms showed that the absorption of the 2 forms (free phenol or TAC) was equivalent [14]. This difference in our results highlights the importance of the intraluminal steps for vitamin E absorption.

Our results concerning the absorption of  $\alpha$ -tocopherol and TAC are consistent with the prior literature [8,9,15]. The fact that TAC is hydrolyzed at the apical pole of Caco-2 cells and partially penetrates in its entire form into these cells has already been reported [15,16]. This hydrolysis is compatible with the presence of an esterase at the brush border or in the cytosol of Caco-2 cells. Several enzymes are candidates, including cholesterol ester hydrolase or carboxyl esterase 1 [15–19]. Furthermore, studies demonstrated the presence of a hydrolase activity directed against retinol esters at the brush border of rat and human enterocytes [20–22]. The secretion at the basolateral pole of TAC in its intact form has been reported by Brisson et al. in quantities greater than those found in our work

(0.3 nmol of vitamin E/cm<sup>2</sup> of cells versus 0.2 nmol/well) [15]. However, recent work by Desmarchelier et al. did not allow detection of TAC at the basolateral pole of Caco-2 cells with micelles containing 20  $\mu$ mol/L of TAC, an incubation time of 6 h and a detection limit of 62.5 pmol/well [16]. Despite these discrepancies, our results are consistent with these observations since (i) the micelles used in our work contained nearly four times more TAC, and (ii) the incubation times were longer, likely inducing a greater absorption of vitamin E. In addition, at 6 h, we found 81 pmol/well on average of TAC, i.e., a quantity very close to the detection limit set by Desmarchelier et al. [16].

Interestingly, our results show, for the first time, that Caco-2 cells secrete one or more esterified forms of the vitamin contained in TPGS at the basolateral side. Traber et al. previously reported that TPGS could be taken up in its entire form by Caco-2 cells but did not evaluate its secretion at the basolateral side [23]. They demonstrated that increasing concentrations of TPGS increased proportionally the total cellular tocopherol content in cultured fibroblasts. When the fibroblasts were incubated in the presence of TPGS for 4 h, the tocopherol contained in the cells was almost entirely in the form of esterified tocopherol. As the incubation time increased to 24 h, the amount of tocopherol in free form increased but remained much less than the amount of esterified tocopherol. This phenomenon was also dependent on the temperature. In order to be able to characterize whether the esterified tocopherol found in the fibroblasts was in the form of tocopherol succinate or TPGS, the authors synthesized 14-carbon-labeled TPGS (14C-TPGS) from unlabeled tocopherol succinate and labeled polyethylene-glycol 1000

(PEG1000–14C-PEG). The amount of esterified tocopherol present in the Caco-2 cells was equivalent to the amount of 14C, unequivocally indicating that the TPGS had been taken up by the Caco-2 cells in its entire form. In our work, micelles were made with TPGS from the drug VEDROP® and we cannot affirm that the vitamin E quantified after saponification comes from the TPGS only. The results therefore indicate a concentration of esterified tocopherol that may correspond to either mono- or di-TPGS as well as to tocopherol succinate, even if the concentrations of these last two molecules are in the minority. Our results suggesting that TPGS is partially absorbed in its intact form are also consistent with the work of Folmer and colleagues [19]. By synthesizing tocopherol esters with PEG chains containing 6 or 12 ethylene oxide units, the authors demonstrated that more than half of the tocopherol contained in Caco-2 cells after 24 h of incubation with mixed micelles was found in its intact esterified form. The esterified molecule of smaller size was found in larger quantity. The other half was a mixture of tocopherol and tocopherol succinate. According to their modeling work, it would appear that tocopherol derivatives displaying less than eight ethylene oxide units are preferentially hydrolyzed to tocopherol, while longer compounds are preferentially hydrolyzed to tocopherol succinate. In their model with micelles containing the synthesized molecules at a concentration of 26 µmol/L, no molecule was detected at the basolateral side, either in free or esterified form. This may be due to the fact that the concentration used was lower than in our study. Furthermore, it seems unlikely that the presence of esterified tocopherol at the basolateral side is due to cell damage insofar as cytotoxicity tests based on the release of lactate dehydrogenase (LDH) by Caco-2 cells have shown that TPGS 1000 is cytotoxic at concentrations much higher (625 µmol/L) than those used in our experiments (100 µmol/L) [24].

Finally, Sokol, in his work on the use of TPGS in the treatment of children with cholestasis, performed loading doses of TPGS at a dose of 100 IU/kg (maximum 2000 IU) in adult controls and children with cholestasis [25]. He showed that a very small fraction of PEG 1000 was found in the urine (1.7 and 3% of the ingested amount in children with cholestasis and in control adults, respectively). The authors considered that the PEG 1000 found in the urine was derived from the PEG absorbed following the hydrolysis of the TPGS before it entered the enterocyte. In fact, prior work had shown that after oral loading with 10 g of PEG 1000: 37% and 48.6% of PEG 1000 was found in the urine of patients with Crohn's disease and of controls respectively [26]. The PEG 1000 found in the urine by Sokol following the administration of TPGS may actually come from the hydrolysis of the

TPGS following its secretion in entire form by the enterocytes, as shown in our study on a Caco-2 cell model.

Overall, our work shows that at equivalent concentrations of tocopherol at the apical side, the amounts of tocopherol secreted at the basolateral pole of Caco-2 cells are (i) significantly greater when the tocopherol is in free form in the micelles; (ii) intermediate when it is in the TAC form in the micelles ( $p < 0.001$ ); and (iii) significantly lower with the TPGS form ( $p < 0.0001$ ) (Figure 4). These results are consistent with the literature reporting that supplementation with tocopherols had minimal effect on plasma  $\alpha$ -tocopherol in adults with normal intestinal absorption, whereas similar doses of TAC resulted in a significant



increase in plasma  $\alpha$ -tocopherol [27]. These data are also consistent with our recently published work that showed that TAC was better absorbed than tocopherol after a single oral dose in healthy volunteers [28]. One hypothesis to explain the lower absorption of TPGS compared to the TAC could be the steric hindrance of the PEG chain, which would limit (i) its absorption at the enterocyte level, and (ii) its access to an esterase to release tocopherol. In the future, studies with patients are needed to evaluate the differences of intestinal absorption of these molecules and the long-term consequences in growth, and neurological, visual, and hepatic evolution.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.R., N.P.; methodology, E.R., N.P., M.N., C.H., and C.C.; software, E.R. and C.B.; validation, E.R., N.P., and C.C.; formal analysis, C.C., C.H.; writing—original draft preparation, E.R., N.P., and C.C.; writing—review and editing, E.B., C.B., E.R., N.P., C.C.; funding acquisition, C.C. and N.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Hospices Civils De Lyon, young investigator award 2011.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding authors.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Suskind, D.L. Nutritional deficiencies during normal growth. *Pediatr. Clin. N. Am.* **2009**, *56*, 1035–1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Alvarez, F.; Landrieu, P.; Laget, P.; Lemonnier, F.; Odievre, M.; Alagille, D. Nervous and ocular disorders in children with cholestasis and vitamin A and E deficiencies. *Hepatology* **1983**, *3*, 410–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Reboul, E. Vitamin E intestinal absorption: Regulation of membrane transport across the enterocyte. *IUBMB Life* **2019**, *71*, 416–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Traber, M.G. Vitamin E inadequacy in humans: Causes and consequences. *Adv. Nutr.* **2014**, *5*, 503–514. [[CrossRef](#)]
5. Sokol, R.J.; Heubi, J.E.; Iannaccone, S.; Bove, K.E.; Balistreri, W.F. Mechanism causing vitamin E deficiency during chronic childhood cholestasis. *Gastroenterology* **1983**, *85*, 1172–1182. [[CrossRef](#)]
6. Thebaut, A.; Nemeth, A.; Le Mouhaer, J.; Scheenstra, R.; Baumann, U.; Koot, B.; Gottrand, F.; Houwen, R.; Monard, L.; de Micheaux, S.L.; et al. Oral Tocopherol Corrects or Prevents Vitamin E Deficiency in Children with Chronic Cholestasis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2016**, *63*, 610–615. [[CrossRef](#)]
7. Staggers, J.E.; Hernell, O.; Stafford, R.J.; Carey, M.C. Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 1. Phase behavior and aggregation states of model lipid systems patterned after aqueous duodenal contents of healthy adult human beings. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2028–2040. [[CrossRef](#)]
8. Reboul, E.; Klein, A.; Bietrix, F.; Gleize, B.; Malezet-Desmoulins, C.; Schneider, M.; Margotat, A.; Lagrost, L.; Collet, X.; Borel, P. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 4739–4745. [[CrossRef](#)]
9. Reboul, E.; Trompier, D.; Moussa, M.; Klein, A.; Landrier, J.F.; Chimini, G.; Borel, P. ATP-binding cassette transporter A1 is significantly involved in the intestinal absorption of alpha- and gamma-tocopherol but not in that of retinyl palmitate in mice. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *89*, 177–184. [[CrossRef](#)]
10. Traber, M.G.; Goldberg, I.; Davidson, E.; Lagmay, N.; Kayden, H.J. Vitamin E uptake by human intestinal cells during lipolysis in vitro. *Gastroenterology* **1990**, *98*, 96–103. [[CrossRef](#)]
11. Traber, M.G.; Burton, G.W.; Hughes, L.; Ingold, K.U.; Hidaka, H.; Malloy, M.; Kane, J.; Hyams, J.; Kayden, H.J. Discrimination between forms of vitamin E by humans with and without genetic abnormalities of lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.* **1992**, *33*, 1171–1182. [[PubMed](#)]

12. Anwar, K.; Kayden, H.J.; Hussain, M.M. Transport of vitamin E by differentiated Caco-2 cells. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 1261–1273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Reboul, E.; Soayfane, Z.; Goncalves, A.; Cantiello, M.; Bott, R.; Nauze, M.; Terce, F.; Collet, X.; Comera, C. Respective contributions of intestinal Niemann-Pick C1-like 1 and scavenger receptor class B type I to cholesterol and tocopherol uptake: In Vivo v. in vitro studies. *Br. J. Nutr.* **2012**, *107*, 1296–1304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Burton, G.W.; Ingold, K.U.; Foster, D.O.; Cheng, S.C.; Webb, A.; Hughes, L.; Lusztyk, E. Comparison of free alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl acetate as sources of vitamin E in rats and humans. *Lipids* **1988**, *23*, 834–840. [[CrossRef](#)]
15. Brisson, L.; Castan, S.; Fontbonne, H.; Nicoletti, C.; Puigserver, A.; Ajandouz, E.H. Alpha-tocopheryl acetate is absorbed and hydrolyzed by Caco-2 cells comparative studies with alpha-tocopherol. *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *154*, 33–37. [[CrossRef](#)]
16. Desmarchelier, C.; Tourniaire, F.; Preveraud, D.P.; Samson-Kremser, C.; Crenon, I.; Rosilio, V.; Borel, P. The distribution and relative hydrolysis of tocopheryl acetate in the different matrices coexisting in the lumen of the small intestine during digestion could explain its low bioavailability. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 1237–1245. [[CrossRef](#)]
17. Grober, J.; Lucas, S.; Sorhede-Winzell, M.; Zaghini, I.; Mairal, A.; Contreras, J.A.; Besnard, P.; Holm, C.; Langin, D. Hormonesensitive lipase is a cholesterol esterase of the intestinal mucosa. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 6510–6515. [[CrossRef](#)]
18. Hui, D.Y.; Howles, P.N. Carboxyl ester lipase: Structure-function relationship and physiological role in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J. Lipid Res.* **2002**, *43*, 2017–2030. [[CrossRef](#)]
19. Folmer, B.M.; Barron, D.; Hughes, E.; Miguët, L.; Sanchez, B.; Heudi, O.; Rouvet, M.; Sagalowicz, L.; Callier, P.; Michel, M.; et al. Monocomponent hexa- and dodecaethylene glycol succinyl-tocopherol esters: Self-assembly structures, cellular uptake and sensitivity to enzyme hydrolysis. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 1464–1474. [[CrossRef](#)]
20. Rigtrup, K.M.; Kakkad, B.; Ong, D.E. Purification and partial characterization of a retinyl ester hydrolase from the brush border of rat small intestine mucosa: Probable identity with brush border phospholipase B. *Biochemistry* **1994**, *33*, 2661–2666. [[CrossRef](#)]
21. Rigtrup, K.M.; McEwen, L.R.; Said, H.M.; Ong, D.E. Retinyl ester hydrolytic activity associated with human intestinal brush border membranes. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**, *60*, 111–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rigtrup, K.M.; Ong, D.E. A retinyl ester hydrolase activity intrinsic to the brush border membrane of rat small intestine. *Biochemistry* **1992**, *31*, 2920–2926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Traber, M.G.; Thellman, C.A.; Rindler, M.J.; Kayden, H.J. Uptake of intact TPGS (d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate) a water-miscible form of vitamin E by human cells in vitro. *Am. J. Clin. Nutr.* **1988**, *48*, 605–611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Collnot, E.M.; Baldes, C.; Wempe, M.F.; Hyatt, J.; Navarro, L.; Edgar, K.J.; Schaefer, U.F.; Lehr, C.M. Influence of vitamin E TPGS poly(ethylene glycol) chain length on apical efflux transporters in Caco-2 cell monolayers. *J. Control. Release* **2006**, *111*, 35–40. [[CrossRef](#)]
25. Sokol, R.J.; Heubi, J.E.; Butler-Simon, N.; McClung, H.J.; Lilly, J.R.; Silverman, A. Treatment of vitamin E deficiency during chronic childhood cholestasis with oral d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol-1000 succinate. *Gastroenterology* **1987**, *93*, 975–985. [[CrossRef](#)]
26. Heuman, R.; Sjødahl, R.; Tagesson, C. Passage of molecules through the wall of the gastrointestinal tract. Intestinal permeability to polyethyleneglycol 1 000 in patients with Crohn's disease. *Acta Chir. Scand.* **1982**, *148*, 281–284.
27. Dimitrov, N.V.; Meyer-Leece, C.; McMillan, J.; Gilliland, D.; Perloff, M.; Malone, W. Plasma alpha-tocopherol concentrations after supplementation with water- and fat-soluble vitamin E. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *64*, 329–335. [[CrossRef](#)]
28. Cuerq, C.; Henin, E.; Restier, L.; Blond, E.; Drai, J.; Marcais, C.; Di Filippo, M.; Laveille, C.; Michalski, M.C.; Poinot, P.; et al. Efficacy of two vitamin E formulations in patients with abetalipoproteinemia and chylomicron retention disease. *J. Lipid Res.* **2018**, *59*, 1640–1648. [[CrossRef](#)]

### 4.1.3. Principaux résultats et discussion

L'objectif de ce travail était de comparer les cinétiques d'absorption entérocytaire du RRR- $\alpha$ -tocophérol, de l'acétate de tocophérol (TAC) et de l' $\alpha$ -tocophéryl polyéthylène glycol succinate 1000 (TPGS) par les cellules Caco-2, ainsi que les mécanismes régulateurs en cas de différence significative. Bien que la sécrétion basolatérale des cellules Caco-2 est généralement faible, ce modèle, qui permet l'étude de la phase entérocytaire de la digestion, nous a permis de comparer nos différentes conditions (Anwar et al. 2006; Reboul et al. 2009). Ainsi, les principaux résultats de cette étude sont :

- 1) l'absorption du TPGS et du TAC est efficace, et nécessite en partie une hydrolyse au pôle apical des cellules Caco-2,
- 2) l'absorption du TAC dans l'entérocyte se produit partiellement sous sa forme entière,
- 3) l'absorption et la sécrétion du TPGS sont beaucoup plus faibles que celles du TAC et de l' $\alpha$ -tocophérol,
- 4) la vitamine E peut être sécrétée du côté basolatéral sous formes estérifiées.

Nos résultats concernant l'absorption du tocophérol sont cohérents avec les résultats décrits dans la littérature (Traber et al. 1990; Reboul et al. 2006; Brisson et al. 2008; Reboul et al. 2009). Ainsi, le fait que le TAC pénètre en partie sous sa forme entière et en partie sous forme hydrolysée dans les cellules Caco-2 a déjà été rapporté et est cohérent avec la présence d'estérase niveau de la bordure en brosse des cellules Caco-2 notamment l'hydrolase d'esters de cholestérol (CEH) ou la carboxylestérase 1 (Grober et al. 2003; Hui, Howles 2005; Brisson et al. 2008; Prévéraud et al. 2015). D'ailleurs, un parallèle peut être fait avec la présence au niveau de la bordure en brosse d'une activité hydrolase dirigée contre les esters de rétinol, chez l'homme et le rat (Rigtrup et al. 1994). Sa sécrétion sous sa forme intacte, a également déjà été rapportée antérieurement et nous confirmons cette observation (Brisson et al. 2008).

L'innovation de ces résultats réside dans la démonstration que les cellules Caco-2 sont capables de sécréter du tocophérol sous forme estérifiée, également à partir de tocofersolan. Il avait déjà été rapporté par Traber et al. que le TPGS pouvait être absorbé sous sa forme complète par les cellules Caco-2 mais ils n'avaient rapporté aucune donnée concernant sa sécrétion au niveau basolatéral (Traber et al. 1988). En effet, dans leur étude, un apport croissant en TPGS dans des fibroblastes induisait une augmentation proportionnelle de

contenu cellulaire total en tocophérol, majoritairement sous forme estérifié, le tocophérol libre n'étant quasiment pas augmenté. A l'aide de TPGS marqué au carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ -TPGS), ils ont pu caractériser plus précisément le tocophérol trouvé dans les fibroblastes, en montrant que la quantité de tocophérol estérifié présente dans les cellules Caco-2 était équivalente à la quantité de  $^{14}\text{C}$ , indiquant sans équivoque que le TPGS avait été absorbé par les cellules Caco-2 sous sa forme entière (Traber et al. 1988). Nos résultats suggérant que le TPGS est partiellement absorbé sous sa forme intacte sont également cohérents avec les travaux de Folmer et ses collègues, qui ont rapporté que plus de la moitié du tocophérol contenu dans les cellules Caco-2 après 24 heures d'incubation avec des micelles mixtes se trouvait sous sa forme estérifiée intacte (Folmer et al. 2009).

Globalement, nos travaux montrent qu'à des concentrations équivalentes de tocophérol du côté apical, les quantités de tocophérol sécrétées au pôle basolatéral des cellules Caco-2 sont (1) significativement plus importantes lorsque le tocophérol est sous forme libre dans les micelles ; (2) intermédiaires lorsqu'il est sous forme TAC dans les micelles ( $p < 0,001$ ) ; et (3) significativement plus faibles avec la forme TPGS ( $p < 0,0001$ ) (Figure 4). Ces résultats sont cohérents avec la littérature rapportant que la supplémentation en tocofersolan avait un effet minime sur l' $\alpha$ -tocophérol plasmatique chez les adultes ayant une absorption intestinale normale, alors que des doses similaires de TAC entraînaient une augmentation significative de l' $\alpha$ -tocophérol plasmatique (Dimitrov et al. 1996). Ces données sont également cohérentes avec les travaux de Cuerq et al. récemment publiés qui ont montré que le TAC était mieux absorbé que le tocofersolan après une dose orale unique chez des volontaires sains (Cuerq et al. 2018).

Bien que la sécrétion de TPGS soit faible, elle n'est pas nulle et surtout nous avons confirmé que son absorption est efficace dans un modèle cellulaire d'entérocyte sain. Ainsi, la suite de ce travail était de comparer l'absorption et la sécrétion basolatérale d' $\alpha$ -tocophérol, de TAC et de TPGS dans un modèle cellulaire représentatif des hypobetalipoprotéïnémies intestinales. Pour cela, la prochaine étape de ce travail a été la création et la caractérisation de modèles cellulaires représentatifs des cellules intestinales de patients d'hypobetalipoprotéïnémies intestinales par invalidation des gènes d'intérêt grâce à la méthode CRISPR/Cas9. Ces modèles ayant pour but, dans un premier temps, d'étudier l'absorption de la vitamine E et de certains dérivés utilisés en thérapeutique (TAC et TPGS).

## 4.2. Etude 2 : Création et validations de clones mutés par la technique CRISPR/CAS9

Afin de faire suite à nos travaux sur les cinétiques d'absorption de la vitamine E et faire un parallèle à l'étude clinique de Cuerq et al. (Cuerq et al. 2018; 2021), mais également de comprendre les mécanismes sous-jacents à l'incapacité à restaurer les taux plasmatiques en vitamine E, nous avons orienté nos travaux vers la mise en place et la création d'un modèle cellulaire représentatif des hypobêtalipoprotéïnémies familiales. Une première tentative de création de ce modèle avait été faite par l'équipe de Pr Levy (Centre de Recherche du CHU de Sainte Justine à Montréal) par la technologie ZFN qui consistait à transférer les cellules avec un plasmide codant pour une nucléase à doigt de zinc dirigée comme le gène humain *SARIB*. Cependant, cette technologie était longue, fastidieuse, onéreuse et présentait une faible efficacité.

En conséquence, j'ai mis en place un protocole d'inactivation des gènes d'intérêt par la technologie CRISPR/Cas9, plus efficace et moins coûteuse, afin d'obtenir des clones de cellules d'entérocytes humains (Caco-2) mutés pour le gène *MTTP* (modèle ABL FHBL-SD1) ou *SARIB* (modèle CMRD FHBL-SD3) pour explorer l'absorption des lipides et de la vitamine E et de ses alternatives thérapeutiques.

- 4.2.1. Article : « Validation of *MTTP*- or *SARIB*-knock-out Caco-2 TC7 cells as models of enterocytes of patients with familial genetic hypobetalipoproteinemias. **Claire Bordat**, Donato Vairo, Charlotte Cuerq, Charlotte Halimi, Franck Peiretti, Armelle Penhoat, Marie-Caroline Michalski, Marion Nowicki, Noël Peretti, Emmanuelle Reboul<sup>1</sup> (JLR, corrections soumises) »

**Validation of knock-out Caco-2 TC7 cells as models of enterocytes of patients with familial genetic hypobetalipoproteinemias**

Claire Bordat<sup>1,2</sup>, Donato Vairo<sup>1</sup>, Charlotte Cuerq<sup>2,3</sup>, Charlotte Halimi<sup>1</sup>, Franck Peiretti<sup>1</sup>, Armelle Penhoat<sup>2</sup>, Aurélie Vieille-Marchiset<sup>2</sup>, Teresa Gonzales<sup>1</sup>, Marie-Caroline Michalski<sup>2</sup>, Marion Nowicki<sup>1</sup>, Noël Peretti<sup>2,4\*</sup>, Emmanuelle Reboul<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup> Aix-Marseille Université, INRAE, INSERM, C2VN, 13385 Marseille, France.

<sup>2</sup> Université de Lyon, CarMeN Laboratory, INSERM, U1060, INRAE, UMR 1397, Université Claude Bernard Lyon 1, 69310 Pierre-Benite, France.

<sup>3</sup> Biochemistry Department, Hospices Civils de Lyon, 69495 Pierre-Benite, France

<sup>4</sup> Department of Pediatric Gastroenterology-Hepatology and Nutrition, Hospices Civil de Lyon HCL, Hôpital Femme Mere Enfant, HFME, 69500 Bron, France.

# Validation of knock-out Caco-2 TC7 cells as models of enterocytes of patients with familial genetic hypobetalipoproteinemias

Claire Bordat<sup>1,2</sup>, Donato Vairo<sup>1</sup>, Charlotte Cuerq<sup>2,3</sup>, Charlotte Halimi<sup>1</sup>, Franck Peiretti<sup>1</sup>, Armelle Penhoat<sup>2</sup>, Aurélie Vieille-Marchiset<sup>2</sup>, Teresa Gonzales<sup>1</sup>, Marie-Caroline Michalski<sup>2</sup>, Marion Nowicki<sup>1</sup>, Noël Peretti<sup>2,4\*</sup>, Emmanuelle Reboul<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup> Aix-Marseille Université, INRAE, INSERM, C2VN, Marseille, France;

[claire.bordat@univ-amu.fr](mailto:claire.bordat@univ-amu.fr) (C.B.); [donato.vairo@univ-amu.fr](mailto:donato.vairo@univ-amu.fr) (D.V.);

[charlotte.halimi@univ-amu.fr](mailto:charlotte.halimi@univ-amu.fr) (C.H.); [franck.peiretti@univ-amu.fr](mailto:franck.peiretti@univ-amu.fr) (F.P.);

[teresa.gonzalez@univ-amu.fr](mailto:teresa.gonzalez@univ-amu.fr) (T.G.)

<sup>2</sup> CarMeN Laboratory, INSERM U1060, INRA UMR 1397, INSA-Lyon, Université Lyon 1,

60310 Pierre-Benite, France; [armelle.penhoat@inserm.fr](mailto:armelle.penhoat@inserm.fr) (A.P.), [aurelie.vieille-](mailto:aurelie.vieille-marchiset@univ-lyon1.fr)

[marchiset@univ-lyon1.fr](mailto:marchiset@univ-lyon1.fr) (A.V-M), [marie-caroline.michalski@inrae.fr](mailto:marie-caroline.michalski@inrae.fr) (M-C.M.)

<sup>3</sup> Biochemistry Department, Hospices Civils de Lyon, 69495 Pierre-Benite, France;

[charlotte.cuerq@chu-lyon.fr](mailto:charlotte.cuerq@chu-lyon.fr) (C.C.)

<sup>4</sup> Pediatric Hepato-Gastroenterology and Nutrition Unit, Hôpital Femme Mère Enfant de

Lyon, Hospices Civils de Lyon, 69677 Bron, France

\* Correspondence: [noel.peretti@chu-lyon.fr](mailto:noel.peretti@chu-lyon.fr) (N.P.); [emmanuelle.reboul@univ-amu.fr](mailto:emmanuelle.reboul@univ-amu.fr) (E.R.)

**Abstract:** (1) Abetalipoproteinemia (FHBL-SD1) and chylomicron retention disease (FHBL-SD3) are rare recessive disorders of lipoprotein metabolism due to mutations in *MTTP* and *SAR1B* genes, respectively, which leads to defective chylomicron formation and secretion. This results in lipid and fat-soluble vitamin malabsorption which induces severe neuro-ophthalmic complications. Currently, treatment combines a low-fat diet with high-dose vitamin A and E supplementation but still fails in normalizing serum vitamin E level and providing complete ophthalmic protection. (2) Methods: To explore these persistent complications, we developed two knock-out cell models of FHBL-SD1 and FHBL-SD3 using the CRISPR/Cas9 technique in Caco-2/TC7 cells. (3) DNA sequencing, RNA quantification and Western-blotting confirmed the introduction of mutations with protein knock-out in four clones associated with i) impaired lipid droplet formation, and ii) defective triglyceride ( $-57.0 \pm 2.6\%$  to  $-83.9 \pm 1.6\%$ ) and cholesterol ( $-35.3 \pm 4.4\%$  to  $-60.6 \pm 3.5\%$ ) secretion. A significant decrease in  $\alpha$ -tocopherol secretion was also observed in these clones ( $-41.5 \pm 3.7\%$  to  $-97.2 \pm 2.8\%$ ), even with the pharmaceutical forms of vitamin E: tocopherol-acetate and tocopherol (vitamin E polyethylene glycol succinate 1000). (4) *MTTP* silencing led to a more severe phenotype than *SAR1B* silencing which is consistent with clinical observations. Our cellular models thus provide an efficient tool to experiment with therapeutic strategies and will allow progress in understanding the mechanisms involved in lipid metabolism.

**Keywords:** Abetalipoproteinemia, Bioavailability, CRISPR/Cas9, Chylomicrons, Chylomicron Retention Disease, Familial Hypobetalipoproteinemia, Lipoproteins, Vitamin E, Tocopherol

**Citation:** To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname  
Lastname

Received: date  
Accepted: date  
Published: date

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Familial hypobetalipoproteinemias (FHBL) related disorders, or monogenic hypobetalipoproteinemia disorders, are classified in two pathophysiological groups: class I lipoprotein assembly and secretion defect (SD) and class 2 enhanced lipoprotein catabolism (EC) [1]. Class I includes intestinal genetic hypocholesterolemia that represents a heterogeneous group of inherited lipoprotein problems characterized by low plasma levels of triacylglycerol (TAG), total cholesterol, very-low density lipoprotein (VLDL), low-density lipoprotein (LDL) and an almost complete absence of apolipoprotein B-100 and B-48. Intestinal recessive FHBL includes abetalipoproteinemia previously called Bassen-Kornzweig syndrome (ABL or FHBL-SD1, OMIM 200100), familial hypobetalipoproteinemia owing to lipoprotein assembly defect 2 (FHBL or FHBL-SD2, OMIM 615558) and chylomicron retention disease or Anderson's disease (CRD or FHBL-SD3, OMIM 246700) - [2,3]. In this work, we focused on abetalipoproteinemia (FHBL-SD1) and chylomicron retention disease (FHBL-SD3). FHBL-SD1 is the consequence of mutations in the Microsomal Triglyceride Transfer Protein (*MTTP*) gene encoding for a protein (MTP) required for the assembly and secretion of apoB-containing lipoproteins: VLDL and chylomicrons from liver or intestine [4]. Similarly, FHBL-SD3 is due to mutations in the *SAR1B* gene that is translated into the Secretion Associated Ras related GTPase 1B (Sar1b). Sar1b is involved in the initiation of chylomicron's intracellular transport via COPII (coat protein)-coated vesicles, which is an essential step before the chylomicron secretion [5,6].

The absence of MTP and Sar1b activity causes the accumulation of large lipid droplets in enterocytes and hepatocytes, leading to the characteristic lipid profile described above with severe clinical consequences. Indeed, the FHBL-SD1 and FHBL-SD3 clinical phenotypes usually consist in intestinal lipid malabsorption, steatorrhea, fat-soluble vitamin (A, D, E, K) deficiency, chronic diarrhea leading to growth retardation during the neonatal period. These phenotypes are worsened by neurological and ophthalmic deterioration during the second decade of life, mainly related to vitamin A and E deficiencies [2]. To prevent such disabling complications, fat-soluble vitamin supplementation has to be started in early childhood together with dietary fat restriction [7]. However, despite early and adapted supplementation, previous studies showed that, unlike vitamins A, D and K, plasma levels of vitamin E are almost never normalized and remain chronically low [8], reaching only one half to two-thirds of normal levels (20 – 40  $\mu\text{mol/L}$ ) [9] despite high doses of oral  $\alpha$ -tocopherol (50–200 IU/kg/day).

Vitamin E, as a fat-soluble vitamin, follows the intestinal absorption, hepatic metabolism, and cellular uptake processes of other lipophilic molecules. Vitamin E absorption thus depends on chylomicrons formation and secretion [7]. Therefore, in the serum of untreated FHBL-SD1 and FHBL-SD3 patients, vitamin E is undetectable [9]. This affects the patients' neurologic system causing complications ranging from peripheral neuropathy to cerebellar ataxia, as well as pigmentary retinitis. These neuro-ophthalmological complications become irreversible without appropriate vitamin E supplementation [10]. Anatomically, deep vitamin E deficiency is characterized by axonopathy with a swollen appearance and reduced myelination as well as neuromuscular lesions with high levels of oxidative stress in neurons



[11]. Functionally, affected neurons display attenuated axonal transport, and altered mitochondrial respiratory control [12]. Thus, because vitamin E has a crucial role in the development and maintenance of the structural integrity of the nervous system, vitamin E deficiency is a major concern in patients with primary FHBL [9]. The mechanisms hampering vitamin E plasma level restoration in treated FHBL-SD1 and FHBL-SD3 patients is still unknown. We previously studied the mechanisms of absorption/secretion of  $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol succinate 1000 (TPGS, i.e., tocofersolan), a water-soluble derivative of  $\alpha$ -tocopherol, compared to tocopherol acetate (TAC), the form usually used in clinical nutrition [13] by human wild-type Caco-2 TC7 cells, known to be a relevant model of intestinal barrier [14]. In this work, we created a relevant knock-out (KO) cellular model of FHBL-SD1 and FHBL-SD3 by invalidating either *MTTP* or *SAR1B* in Caco-2/TC7 cells, using the CRISPR/Cas9 genome-editing system. Our aim was to create and validate an in vitro model of enterocytes mimicking the enterocytes of FHBL-SD1 and FHBL-SD3 patients to explore lipid and vitamin E absorption, in the context of these diseases.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Supplies

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 4.5 g/L glucose and trypsin-EDTA, non-essential amino acids, penicillin/streptomycin and PBS were purchased from Life Technologies (Illkirch, France). Fetal bovine serum (FBS) came from PAA (Vélizy Villacoublay, France). DNA Primers, tracrRNA, crRNA, TrueCut™ Cas9 Protein v2 (Invitrogen™), Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Cas9 Transfection Reagent (Invitrogen™), PureLink™ Genomic DNA kit (Invitrogen™), AmpliTaq Gold® 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems) were and TRIzol reagent from Thermo Fisher Scientific. Guide-RNA (gRNA) were designed by Invitrogen™ (Invitrogen™ by ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) and produced by Synthego (Synthego Corporation, Redwood City, California, USA). Sequences received at the laboratory were the following ones (for DNA sequences targeted by gRNA see Supplementary Data Table S1.):

- *MTTP*-gRNA1: 5' – ACGCUCCUUCAUCUAAUCCA – 3'
- *MTTP*-gRNA2: 5' – UACACGGCCAUUCCCAUUGU – 3'
- *SAR1B*-gRNA1: 5' – UUGACUCU AACAGCCUUUCG – 3'
- *SAR1B*-gRNA2: 5' – UCCGAAGAACUGACCAUGC – 3'
- *HPRT1*-gRNA: 5' – GCAUUUCUCAGUCCUAAACA – 3' (positive control)

RRR- $\alpha$ -tocopherol,  $\alpha$ -tocopherol acetate (TAC) and  $\gamma$ -tocopherol (used as internal standard for vitamin E HPLC analyses) were from Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich Chimie by Merck, Saint-Quentin-Fallavier, France).  $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol succinate 1000 (TPGS) was contained in VEDROP® 50 mg/mL (Orphan Europe, Puteaux, France). All solvents used were HPLC grade from CarloErba Reagents (Peypin, France). Western-blot analyses were performed using either primary mouse monoclonal antibody raised against MTP (C-1, sc-515742), Sar1b (AT1C7, sc-517425) or  $\beta$ -actin (ACTBD11B7, sc-81178) from Santa Cruz Biotechnology INC., Dallas, Texas, USA. Anti-mouse

secondary antibody was HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (goat, cat. No. 62-6620, 1:10000; Zymed, Thermo Fisher Scientific).

## 2.2. Cell culture

Caco-2/TC7 cell line, derived from a human colon adenocarcinoma, naturally differentiate into a cell monolayer expressing several morphological and functional characteristics of enterocytes [15]. Caco-2/TC7 cells were cultured on 25 cm<sup>2</sup> flasks in high-glucose (4.5 g/L) medium with glutamine (DMEM Gibco™ GlutaMAX™; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 16% fetal bovine serum (FBS ref.: S1810-500, Dominique Dutscher SAS, Bernolsheim, France), 1% of non-essential amino acids and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Percentage of FBS in complete medium was reduced from 16% (usual percentage) to 8% to ensure a correct growth of the KO clones. Cells were grown in 37 °C humidified atmosphere 90% air and 10% CO<sub>2</sub>.

For experiments, cells were split with 0.05% Trypsin-EDTA when 80% of confluence was reached and were seeded on permeable Millicell® hanging cell culture filter inserts at a density of 3 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> (24 mm insert, 1 µm pore size PET membrane, Millicell®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in 6-well plates, to reproduce the intestinal barrier. Cells were grown to confluence in complete medium for one week. Cells were then cultured in asymmetric conditions, with 2 ml 8% FBS-medium in the lower compartment and 1.5 ml serum-free medium in the upper compartment until total differentiation (around 21 days after seeding). The medium was changed every 2–3 days.

## 2.3. Genomic primer verification

To confirm specificity of the genomic primers produced by Invitrogen™ (Invitrogen™ by ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA), a conventional genomic PCR protocol was followed. Commercial DNA was used to perform this assay and 2 µL of it was mixed with 25 µL AmpliTaq® Gold 360 Master Mix (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) in the presence of 100 ng of the corresponding forward and reverse primers (see Supplementary Data table S2). The resulting PCR product (2 µL) was mixed with 8 µL of RNase free water and 2 µL of glycerol (30% v/v) and analyzed with a 1% E-gel EX agarose gel using BET as DNA intercalator. For genomic primers sequences used in CRISPR/Cas9 experiment see Supplementary Data table S2.

## 2.4. Optimal confluency test

To establish the optimal conditions for transfection, cells were grown in 24-well cell culture plates to reach different confluency (from 30% to 50%) in each well. The cells were then transfected by the CRISPR/Cas9 gene editing system using Lipofectamine CRISPRMAX® according to the protocol proposed by Invitrogen™. This test was conducted using a gRNA designed by Invitrogen™ to target the HPRT1 housekeeping gene considered as a positive control. Cells were transfected as described below.

### 2.5. Generation of MTPP or SAR1B-KO Caco-2/TC7 cells

Undifferentiated Caco-2/TC7 cells were seeded in 24-well cell culture plates at a density of  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. When they reached 30% confluence, cells were transfected with the TrueCut™ Cas9 V2 Proteins-guide-RNA ribonucleoprotein complexes (cas9-RNP) and Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Cas9 Transfection Reagent according to the manufacturer's instructions. Briefly, Cas9-RNP were prepared by incubating Cas9 protein (1.25 µl) with gRNA (240 ng) at a molar ratio of 5:1 at 25°C for 10 minutes immediately prior to lipofection. Meanwhile, 23.5 µL Opti-MEM medium was added to a separate sterile Eppendorf tube, followed by addition of 1.5 µL of Lipofectamine CRISPRMAX®. After vortexing briefly, the Lipofectamine CRISPRMAX® solution was incubated at room temperature for approximately 1 min. After incubation, the Lipofectamine CRISPRMAX® solution was then added to the Cas9 solution. Upon mixing, the sample was incubated at room temperature 10–15 min to form Cas9 and Lipofectamine CRISPRMAX® complexes and then added to the cells. Cells were transfected for 48 hours with 50µl CRISPR-Cas9/gRNA/transfection reagent complex per well and were then collected by trypsinization. To check for genome modification efficiency, GeneArt® Genomic Cleavage Detection Kit was used to perform cell lysis, genomic PCR, and detection of cleavage, according to the manufacturer's instructions. This method detects locus-specific DNA double-strand breaks formation by direct polymerase chain reaction (PCR) amplification and endonuclease activity that cuts specifically at hetero-duplex mismatches. HPRT1 locus edition was used as a positive control. Briefly, genomic DNA was purified using the PureLink® Genomic DNA kit as described in the manual provided by the manufacturer from previously collected cells and amplified as described above. The resulting PCR product (2 µL) was mixed with the Detection Enzyme according to provided information. The digested product was analyzed with a 2 % E-gel EX agarose. Syngene Genetools ultraviolet imaging system was used to visualize and image the gel. Syngene Genetools 4.03.05.0 (Synoptics Ltd, Cambridge, United-Kingdom) software was used to quantify the optical density of DNA strands. The percentage of cleavage was quantified using the formula given by the manufacturer (% Indel =  $1 - ((1 - \text{fraction cleaved})^{1/2})$ ).

After cleavage confirmation, transfection was again performed using validated gRNA, as described and selection of Caco-2 clones was carried out by limited dilution of KO cells in a 96-well plate. The isolated cell was cultivated and expanded into Petri dish to reach 80% confluence. Cells were collected and the genomic DNA was purified as described above. We then performed a PCR amplification with AmpliTaq® Gold 360 Master Mix in the presence of the corresponding forward and reverse primers (see Supplementary Data) following the manufacturer instructions, with 2 µl of gDNA 20 µl reaction. The annealing temperature was 72°C for all samples. One test reaction (edited gDNA) and one control reaction (unedited gDNA) was run for each gRNA target editing site. Samples were run on an agarose gel to confirm a product of the appropriate size. Clean PCR product was submitted for Sanger sequencing to GenoScreen (Lilles, France) using forward and reverse primers. Sanger results were aligned and analyzed using the Chromas 2.6.6 Software (Technelysium Pty Ltd).

## 2.6. Off-target analysis

Potential unwanted mutations on off-target sites were determined *in silico* using an algorithm designed to identify candidate gRNA target sites after selecting the required PAM sequence (available at <https://cm.jefferson.edu/Off-Spotter/>) [16]. From the results obtained, we extracted 30 potential sites targeted by *MTTP*-gRNA and 15 potential sites targeted by *SAR1B*-gRNA. We then determined off-target probability for each site (Off-Target Scoring) using DeepCRISPR-1.0 R package [17]. This probability, or score, corresponds to cleavage frequency on the off-target site. Data analysis was performed using RStudio 2022.02.0 Build 443. Off-target sites with cleavage frequency below  $10^{-5}$  were considered unlikely. Other off-target sites were amplified in each clone and sequenced by Sanger method to check for mutations (Table S3 in supplementary data). Potential mutations were then spotted by aligning the clones' sequences with the control sequences.

## 2.7. Western-blot analysis

After being cultured in T25 flasks for 21 days (14 days post-confluence), cells were washed twice by PBS and scraped in 2 ml of PBS containing a protease inhibitor mix (1:200 dilution) to be transferred into a sterile Eppendorf tube. Each sample was then vortexed for 15 minutes while being maintained at 4°C. After being sonicated for 15 minutes in ice, cell lysates were centrifuged ( $680 \times g$ , 5 min, 4 °C). Supernatants were collected and transferred into new tubes. The protein content of the cell lysates was measured using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (kit 23225, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA). Equal amounts of proteins (50 µg) were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. Membranes were incubated with a 1:500 dilution of specific primary antibody raised against Sar1b, MTP or β-Actin (Santa Cruz Biotechnology INC., Dallas, Texas, USA) overnight at 4 °C. β-actin was used as a loading control for Western blot analysis. After the membranes were washed three times in TBST, the immunoblots were incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:10000) at room temperature for 1 h. Bands were visualized with enhanced chemiluminescence (ECL; Pierce, Thermo Fisher Scientific) and detected with ImageQuant® LAS-4000 mini (GE Healthcare).

## 2.8. RNA extraction and quantitative RT-PCR

Cell lines were grown on filters as described above. RNA extraction and subsequent quantitative RT-PCR analyses were used to determine *MTTP* and *SAR1B* expression levels and the impact of *MTTP* and *SAR1B* silencing on the expression of other genes related to lipid metabolism in the different clones. Total RNA was extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) according to the manufacturer's instructions. One microgram of total RNA was reverse transcribed into cDNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific) and amplification was achieved using Light Cycler® 480 (Roche Molecular Systems, Inc). 18S rRNA was used as the endogenous control in the comparative cycle threshold (CT) method. Data were analyzed using the LC480 software (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). The mRNA

levels were calculated for each sample using the cycle threshold (Ct) and the  $\Delta$ -CT method. Wild-type cells mRNA levels were assigned a value of 1 and clones mRNA levels are expressed as relative expressions to control. Primers sequences are reported in Supplementary Data Table S4.

### 2.9. Optical microscopy

*FBS-loaded cells imaging* - KO and control cells were grown on 24-well plates for 21 days. One day prior to the experiment the medium used in apical and basolateral chambers was changed for a 16%-FBS DMEM. On the day of the experiment, cell monolayers were washed twice with 0.5 ml of PBS and stained with Oil Red O. Oil Red O solution was prepared from an isopropanol solution saturated with Oil Red O (Sigma ref: O0625-25g [1320-06-5]) diluted in water (2:3 v/v). The cells were then fixed in the culture wells by incubation for 15 minutes with a 10% aqueous solution of acetic acid and 10% methanol. All images were collected with a Nikon Eclipse TS100 (Nikon; Tokyo, Japan) light microscope equipped with a Nikon ELWD 0.3/OD75 C-A-O microscope lens. Images were acquired with the Nikon NIS Elements software (NIS-Elements F 2.3, SP3, Nikon; Tokyo, Japan) at three different magnifications (20X, 100X, 400X). Images were analyzed using ImageJ software (ImageJ, 1.53k, National Institutes of Health, USA).

*Mixed micelle-loaded cells imaging for intracellular lipid quantification* - KO and control cells were grown on cell culture filter inserts as described above. Twenty-four h prior each experiment, both apical and basolateral medium were replaced by FBS-free medium. Cell monolayers were then incubated with synthetic mixed micelles, prepared as described by Reboul et al. [18] or with serum-free medium for 16 hours. On the day of the experiment, cell monolayers were washed twice with 0.5 ml of PBS, fixed with paraformaldehyde, and stained with Oil Red O solution prepared extemporaneously from a saturated isopropanol solution of Oil Red O diluted in water (2:3 v/v), and finally mounted on microscope slides. All images were collected under light microscopy (Olympus BX63, 60 $\times$ 10). Intracellular lipid droplets were quantified as described by Vincent et al. [19] after acquiring 20 images per slide by standard light microscopy. Oil Red O-stained cell images were thresholded for the lipid droplet signal using the freely available imaging software ImageJ. The condition without micelles was used as a basal condition for each clone. The ratio of the augmented Oil Red O staining area between the condition in the presence of micelles and the condition in the absence of micelles was calculated. The number and average droplet size were determined by counting the number of droplets observed in the field of view and expressed as the ratio between the condition in the presence of micelles and the condition in the absence of micelles. All ratios were compared to the ratio calculated for control cells.

### 2.10. Assessment of triglyceride and cholesterol basolateral secretion

Cell lines were grown on filters as described above. Twenty-four h before the experiment, both apical and basolateral medium were replaced by FBS-free medium. On the day of the experiment, cell monolayers were washed twice with 0.5 ml of PBS. The apical side of the cell monolayers then received synthetic mixed micelles [18] made in

DMEM without phenol red, whereas basolateral side received complete serum-free medium made with DMEM without phenol red. After 16h, basolateral medium was harvested. Aliquots were taken extemporaneously to evaluate secreted particle size and zeta-potential with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). To this aim, 10 measurements per sample were carried out at 25°C. Remaining samples were stored at -80°C before cholesterol and triglyceride content was analyzed using fluorimetric quantification assays: Abcam Picoprobe® ab178780 Abcam, Cambridge, MA and Amplite® cholesterol quantification kit 40006; AAT Bioquest, USA, respectively, according to the manufacturer's instructions. The samples were read at Ex/Em = 535/587 and nm Ex/Em = 540/590 nm, respectively, using the Ensign Multimode Plate Reader instrument (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). Experiments were repeated at least twice.

#### *2.11. Assessment of vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol, basolateral secretion)*

Mixed micelles enriched with 100  $\mu$ M vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol, TAC or TPGS) were prepared as previously described [18]. Cell lines were grown on filters as described above. Twenty-four h before the experiment, both apical and basolateral medium were replaced by FBS-free medium. On the day of the experiment, cell monolayers were washed twice with 0.5 ml of PBS. The apical side of the cell monolayers then received mixed micelles, whereas basolateral side received complete serum-free medium. After 6h, media from each side of the cell monolayer were harvested. Cells were carefully rinsed twice with 0.5 ml ice-cold PBS before being and collected in 0.560 ml PBS. All samples were stored at -80°C before further analyses. Experiments were repeated at least twice.

#### *2.12. Vitamin E extraction and HPLC analysis*

Alpha-tocopherol and TAC were extracted from 1000, 500 or 250  $\mu$ L aqueous samples using the following method. Distilled water was added to sample volumes below 500  $\mu$ L to reach a final volume of 500 $\mu$ L. Gamma-tocopherol, which was used as internal standard, was added to the samples in 500  $\mu$ L ethanol. The mixture was extracted twice with two volumes of hexane. The hexane phase obtained after centrifugation (1200  $\times$  g, 10 min, 4 °C) was collected and evaporated to dryness under nitrogen, and the dried extracts were dissolved in 200  $\mu$ L methanol. A volume of 50 - 200  $\mu$ L was used for HPLC analysis. TPGS was assayed indirectly by quantifying  $\alpha$ -tocopherol released after saponification by potassium hydroxide (KOH 5.5% + pyrogallol 1%) for 10 min at room temperature and by subtracting  $\alpha$ -tocopherol determined before saponification as previously described (13).

Compounds were separated using a 250  $\times$  4.6mm, 5 $\mu$ m Zorbax Eclipse XDB-C18 column (Agilent Technologies, Les Ulis, France) preceded by a guard column, maintained at a constant temperature (40 °C). Vitamin E and TAC analysis were performed with a 100% methanol mobile phase (flow rate = 1.5 ml.min<sup>-1</sup>). The HPLC system comprised a separation module, a photodiode array detector and fluorescence detector (Ultimate 3000, Thermo Scientific). Compounds were detected at their maximum absorption wavelengths: 292 nm, and in for fluorometric analysis, they were detected at 325 nm after light excitation

at 292 nm. Vitamins were identified by retention time and absorption spectra coincident with authentic (>95% pure) standards. Quantification was performed using Chromeleon software (version 7.2, ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France).

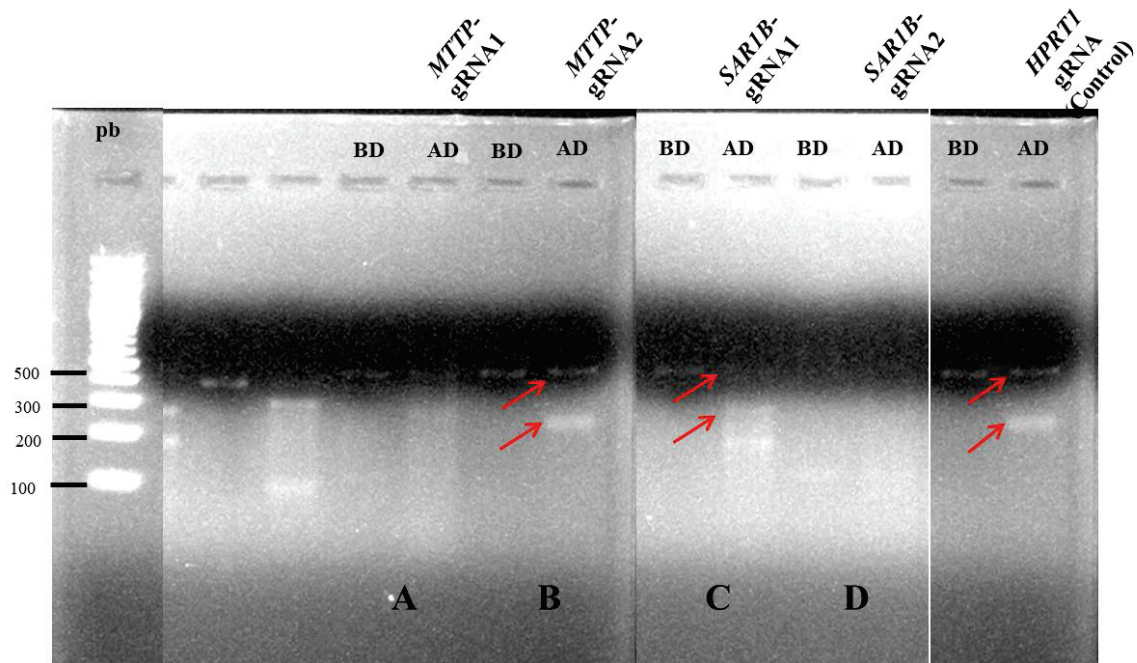
### 2.13. Statistical Analysis

Statistical tests were done using GraphPad Prism software, version 8.4.3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data were expressed as means  $\pm$  SEM and tested, along with residuals (residual plot, homoscedasticity plot and QQ plot), for normal distribution and equality of variances before statistical testing. When appropriate, if heteroscedasticity was detected in the residuals data were log-transformed before further parametric analysis was performed. Each group of unpaired data were compared to the control group using the ANOVA test. Post-hoc Dunnett's test was used to compare means of the different groups. For all tests, the bilateral alpha risk was  $\alpha = 0.05$ . A p-value  $< 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Selection of efficient gRNA for silencing of *MTTP* or *SAR1B* by CRISPR/Cas9 in *Caco-2/TC7* cells

For each gene, we designed two gRNA (*MTTP*-gRNA1 and *MTTP*-gRNA2 and *SAR1B*-gRNA1 and *SAR1B*-gRNA2) and, as a first step, we aimed to select the most efficient one. Thus, four preliminary transfections using either *MTTP*-gRNA1, *MTTP*-gRNA2, *SAR1B*-gRNA1 or *SAR1B*-gRNA2 were performed. We then compared the transfection efficiency using a specific endonuclease. This method detects loci where the gene-specific double-strand breaks occur, by direct polymerase chain reaction (PCR) amplification and endonuclease activity that cleaves DNA specifically at hetero-duplex mismatches. The resultant smaller bands, analyzed by gel electrophoresis, prove that mutated DNA could be targeted and cut by the Digestion Enzyme. Our results showed that only one gRNA led to a mutated DNA for each gene. Transfections were further performed with *MTTP*-gRNA2 targeting the third exon of *MTTP* gene and *SAR1B*-gRNA1 targeting the sixth exon of *SAR1B* gene (Figure 1).



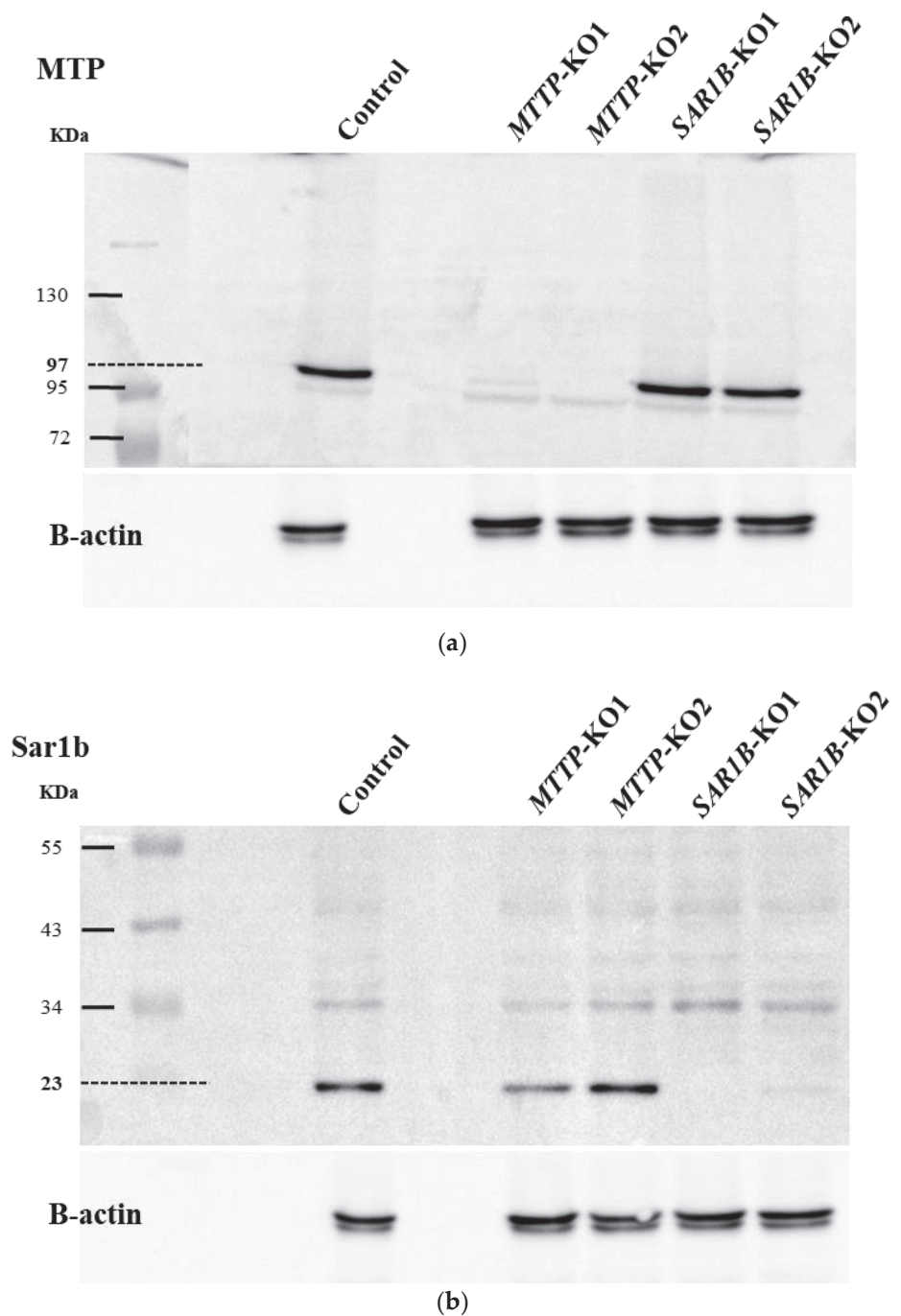
**Figure 1.** Confirmation of gRNA efficiency latter used for transfection and silencing of *MTTP* or *SAR1B* by CRISPR/Cas9. Amplification products detected on 1% E-gel EX agarose of genomic DNA extracted from Caco-2 / TC7 cell line transfected with (A) gRNA1 targeting *MTTP*, (B) gRNA2 targeting *MTTP*, (C) gRNA1 targeting *SAR1B*, (D) gRNA2 targeting *SAR1B*, and (E) gRNA targeting *HPRT1*, used as a control gene, before (BD) the enzymatic digestion efficiency test and after (AD) the enzymatic digestion efficiency test. This method detects locus-specific DNA double-strand breaks formation by direct polymerase chain reaction (PCR) amplification and endonuclease activity that cuts specifically at hetero-duplex mismatches. Only mutated DNA could be targeted and cut by the Digestion Enzyme, as evidenced by the presence of two bands with sizes congruent with the distance between Cas9 cutting sites.

### 3.2. *MTP* and *Sar1b* proteins are not expressed in KO clones

We obtained 47 living clones transfected with the *MTTP*-gRNA and 57 living clones transfected with the *SAR1B*-gRNA. DNA sequencing shows two kinds of results: (1) fully determined sequences with no mutation or (2) several overlapping sequences due to the introduction of mutations in one or two DNA strands. The latter were therefore selected for a wider characterization while the others were considered as non-mutated. At this step, 13 clones transfected with the *MTTP*-gRNA and 12 transfected with the *SAR1B*-gRNA displayed a disrupted sequence.

Western blotting was then performed on the selected clones to detect the effect of mutations introduced with the CRISPR/Cas9 gene editing system on the expression of proteins of interest (Figure 2A and B). No detectable amount of MTP was observed on two clones and no detectable amount of Sar1b was observed on two others clones, indicating a successful *MTTP* or *SAR1B* gene knock-out. These four clones were selected for further work and named clone *MTTP*-KO1 and *MTTP*-KO2, and clone *SAR1B*-KO1 and *SAR1B*-KO2.

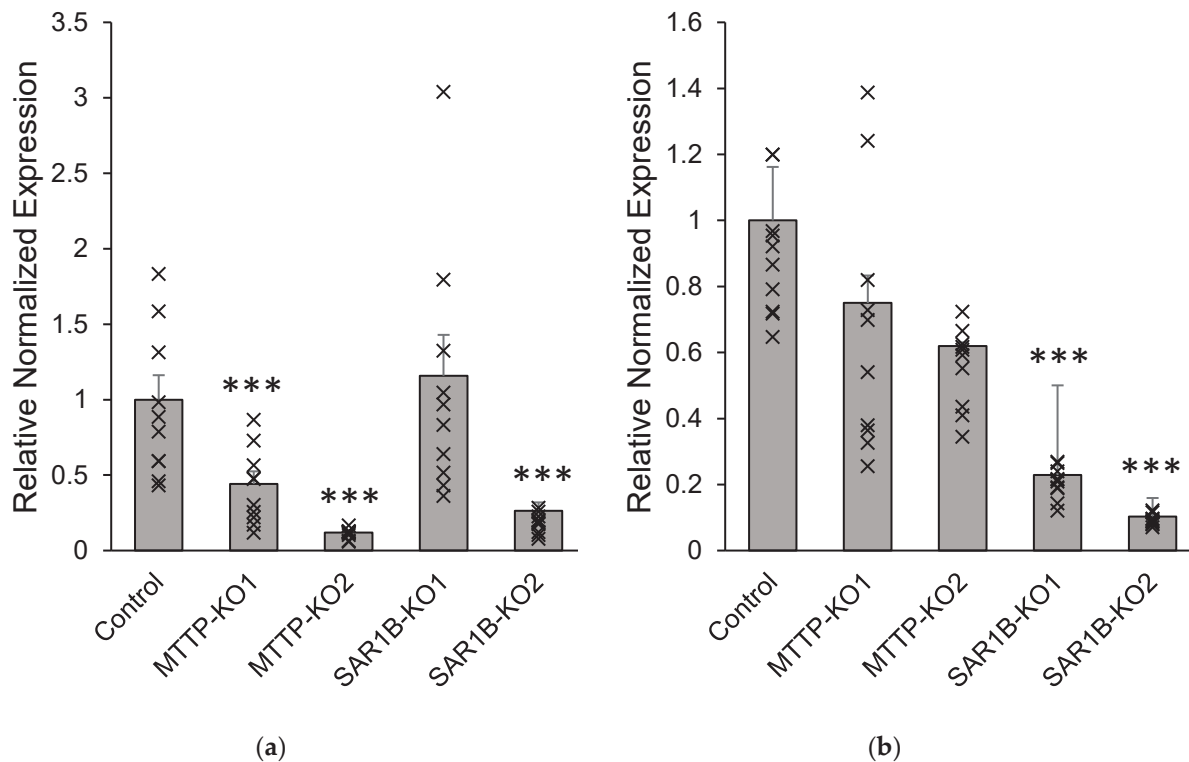




**Figure 2.** Knocking-out confirmation of *MTP* or *SAR1B* by SDS-PAGE (4–10%) and Western-blot analysis. Cells were cultured in T25 flasks for 21 days. Total protein was extracted from each transgenic clone, and wild-type Caco-2/TC7 cells (WT) which was used as a positive control. Fifty  $\mu$ g of extracts was resolved by 10% SDS/PAGE, and the blot was stained with monoclonal antibodies raised against MTP or Sar1b and  $\beta$ -actin to ensure equal lanes loading. (a) Analysis of MTP levels in 2 clones transfected with *MTP*-gRNA (first two band) and two clones transfected with *SAR1B*-gRNA (last two bands), revealing no 97-kDa band for the two first clones while being detected in wild-type cells (positive control) and in clone transfected with *SAR1B*-gRNA, highlighting two clones without protein, named *MTP*-KO1 and *MTP*-KO2. (b) Analysis of Sar1b levels in 2 clones transfected with *MTP*-gRNA (first two band) and two clones transfected with *SAR1B*-gRNA (last two bands), revealing no 23-kDa band for the two last clones while being detected in wild-type cells (positive control) and

in clone transfected with *MTTP*-gRNA, highlighting two clones without protein, named *SAR1B*-KO1 and *SAR1B*-KO2.

We then tested whether the CRISPR/Cas9 mediated mutations of the gene affected mRNA synthesis by RT-qPCR (Figure 3A and B). The two clones with mutations in the *MTTP* gene and no detectable protein showed a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in gene expression with a mean *MTTP* expression level of  $0.95 \pm 0.15$  in wild-type cells, versus  $0.42 \pm 0.08$  (*MTTP*-KO1), and  $0.11 \pm 0.01$  (*MTTP*-KO2) in KO clones (Figure 3A). *SAR1B* gene expression was decreased in the two KO Caco-2/TC7 cells clones selected, as compared to control cells ( $p < 0.05$ ). Indeed, the mean expression level of *SAR1B* gene was  $1.90 \pm 0.06$  in control cells versus  $0.21 \pm 0.02$  (*SAR1B*-KO1) and  $0.09 \pm 0.01$  (*SAR1B*-KO2) in KO clones (Figure 3B).



**Figure 3.** Gene expression measured by RT-qPCR in Caco-2/TC7 cells following CRISPR/Cas9 knock-out. Cells were cultured on inserts for 21 days. (a) *MTTP* and (b) *SAR1B* mRNA expression determined by RT-qPCR in two clones lacking MTP and two clones lacking Sar1b proteins (as seen on Western-blot). Wild-type cells mRNA levels were assigned a value of 1 and *MTTP*- or *SAR1B*-KO mRNA levels are expressed as relative expressions to wild-type cells. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n=10). An asterisk (\*) indicates a statistically significant difference in gene expression levels between control and KO clones (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ ).

### 3.3. No off target has been identified

In silico analyses suggested that i) 5 genes could be the sites of off-target mutations in *MTTP*-KO clones: *BRPF1*, *IL34*, *MAN1A1*, *MCF2L* and *TNBX* and ii) 2 genes could be the sites of off-target mutations in *SAR1B*-KO clones: *CSAD*, *SCUBE3* (Table S4).

Sequences alignment showed 100% alignment between clones' sequences and control sequences meaning that no sequence modifications were observed in potential off-target sites.

### 3.4. Expression of other genes is modulated in knock-out clones compared to control cells

Figure 4 shows the expressions of genes involved in intestinal lipid metabolism and oxidative stress management in the different clones.

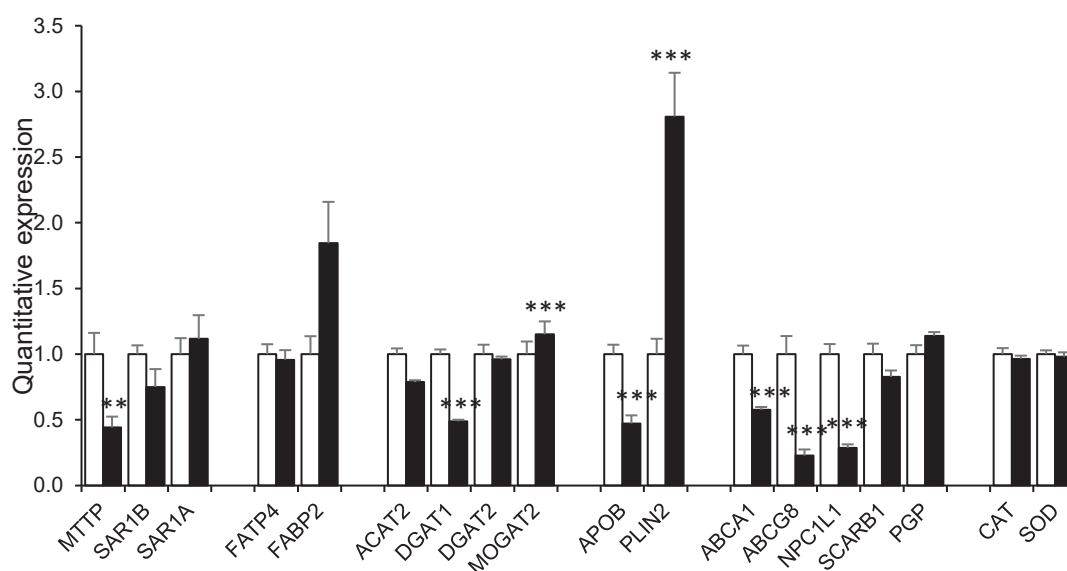
*NPC1L1* expression was significantly decreased ( $p < 0.0001$ ) in all KO clones with a mean of  $1.00 \pm 0.08$  for wild-type cells versus a mean of  $0.29 \pm 0.03$  (*MTTP*-KO1,  $p < 0.0001$ ),  $0.10 \pm 0.01$  (*MTTP*-KO2,  $p < 0.0001$ ),  $0.14 \pm 0.02$  (*SAR1B*-KO1,  $p < 0.0001$ ) and  $0.07 \pm 0.01$  (*SAR1B*-KO2,  $p < 0.0001$ ).

*DGAT1* expression was also slightly but significantly ( $p < 0.05$ ) decreased in all KO clones with a mean of  $1.00 \pm 0.04$  for wild-type cells versus a mean of  $0.49 \pm 0.01$  (*MTTP*-KO1,  $p < 0.0001$ ),  $0.55 \pm 0.02$  (*MTTP*-KO2,  $p < 0.0001$ ),  $0.78 \pm 0.08$  (*SAR1B*-KO1,  $p = 0.0084$ ) and  $0.48 \pm 0.09$  (*SAR1B*-KO2,  $p < 0.0001$ ).

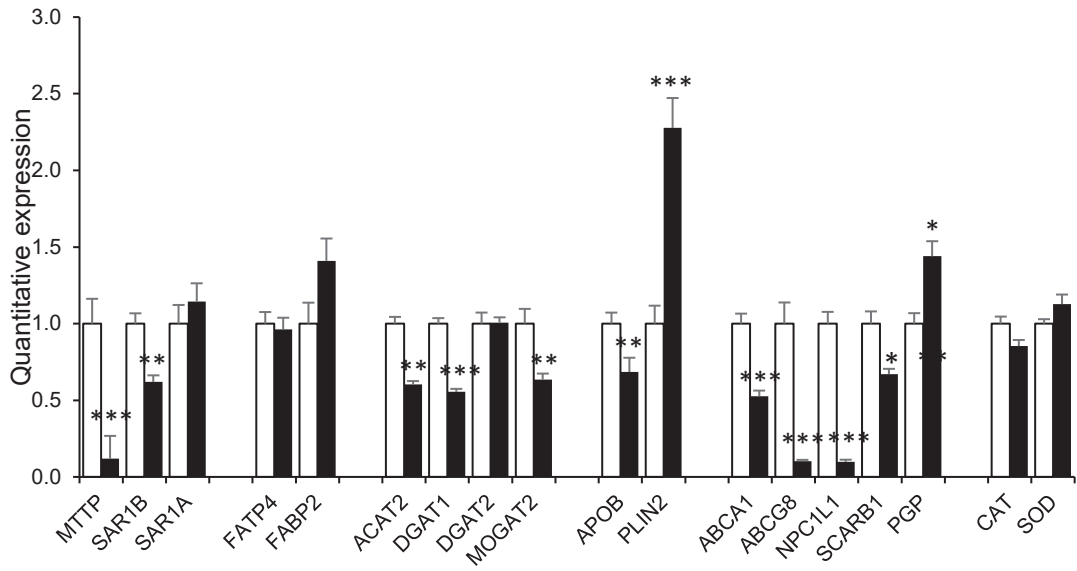
All *MTTP*-KO clones displayed a significant increased expression of *PLIN2* ( $1.00 \pm 0.11$  for the control group vs  $2.81 \pm 0.33$  and  $2.28 \pm 0.20$  for the KO clones,  $p < 0.0001$ ) as well as a significant decrease in *ABCA1* expression ( $1.00 \pm 0.07$  for the control group vs  $0.58 \pm 0.02$  and  $0.53 \pm 0.4$  for the KO groups;  $p < 0.0001$ ).

All KO clones presented a significant decrease of *ABCG8* expression ( $1.00 \pm 0.14$  for the control group vs  $0.23 \pm 0.05$  and  $0.10 \pm 0.01$  for the *MTTP*-KO clones and  $0.55 \pm 0.16$  and  $0.07 \pm 0.01$  for the *SAR1B*-KO,  $p < 0.005$ ). Both *MTTP*-KO clones also showed a significant decrease in *APOB* expression ( $1.00 \pm 0.07$  for the control group vs  $0.47 \pm 0.06$ ,  $p < 0.0001$  and  $0.68 \pm 0.09$ ,  $p = 0.0015$  for *MTTP*-KO1 and *MTTP*-KO2 respectively).

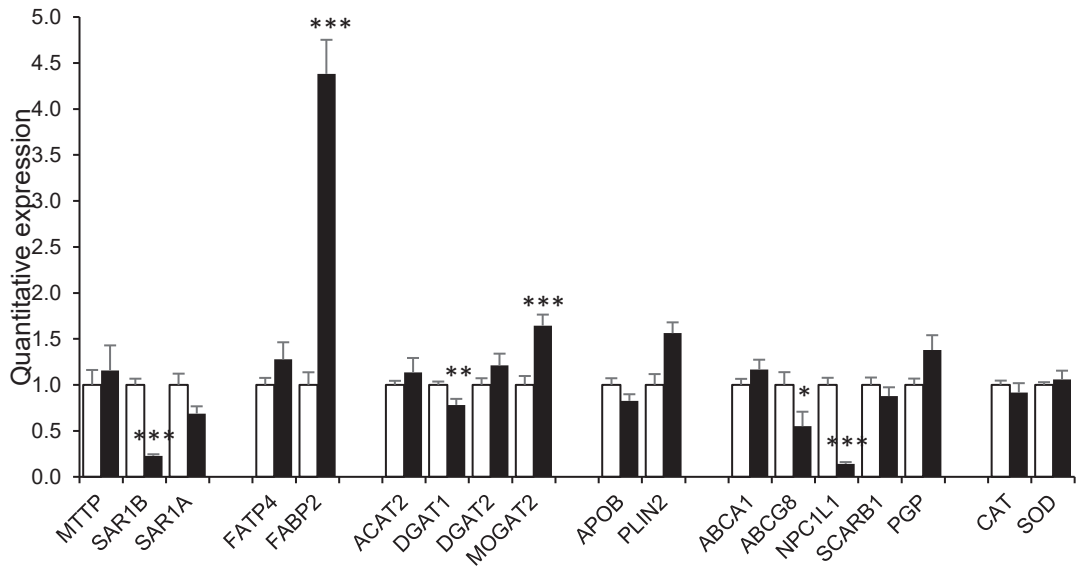
Finally, *SAR1B*-KO1 displayed an increased expression of both *FAPB2* and *MGAT2*, while *SAR1B*-KO2 presented a significant decrease in these genes' expression. Regarding *FATP4*, *ACAT2*, *DGAT2*, *PGP*, *CAT* and *SOD* only one or two clones showed small significant differences in expression compared to wild-type cells, with no particular pattern emerging.



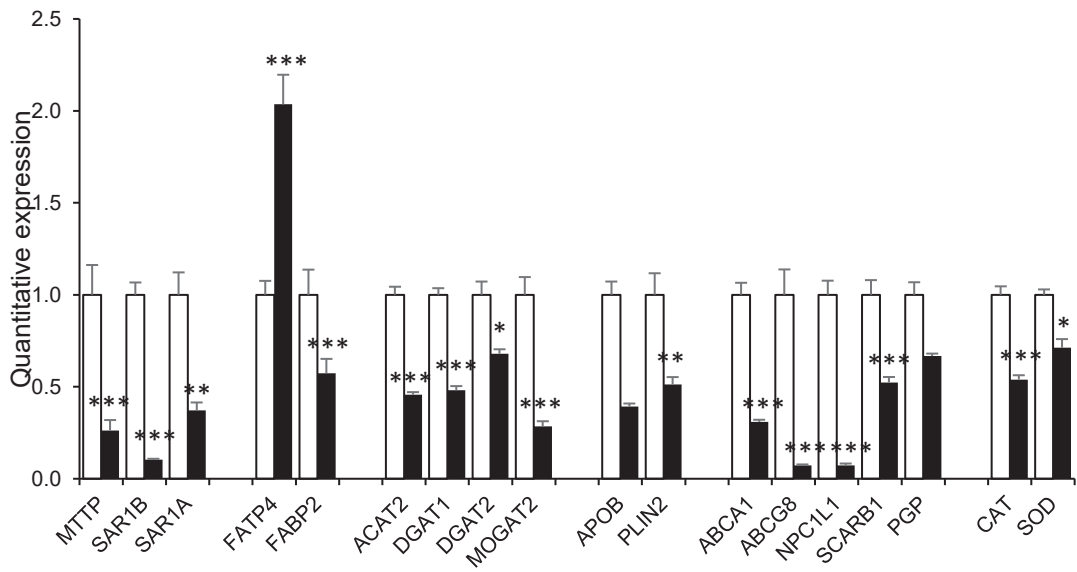
(a)



(b)



(c)



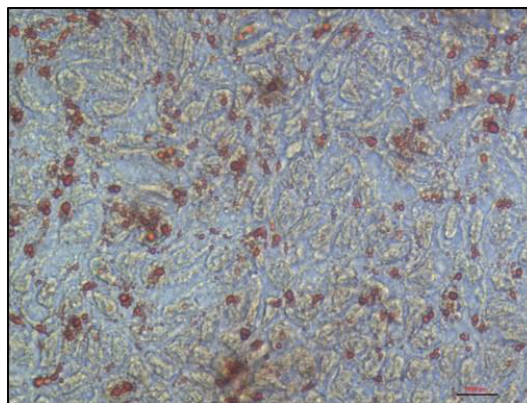
(d)

**Figure 2.** Characterization of clone gene expression. Cells were cultured on inserts for 21 days. We studied genes involved in fatty acid transport (*FATP4*, *FABP2*), intracellular lipid re-synthesis (*ACAT2*, *DGAT1*, *DGAT2*, *MGAT2*), lipid droplet (*PLIN2*) or chylomicron (*APOB*) formation, cholesterol metabolism (*ABCA1*, *ABCG8*, *NPC1L1*, *PGP*, *SCARB1*) and oxidative stress management (*CAT*, *SOD1*) in (a) *MTTP*-KO1, (b) *MTTP*-KO2, (c) *SAR1B*-KO1, (d) *SAR1B*-KO2. Wild-type cells mRNA levels were assigned a value of 1 and clones mRNA levels are expressed as relative expressions to wild-type cells. Gene expression was measured by RT-qPCR in KO and wild-type Caco-2/TC7 cells. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n=10). An asterisk (\*) indicates a statistically significant difference in gene expression levels between control and KO clones (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ ). White bars represent control cells, black bars represent considered clone.

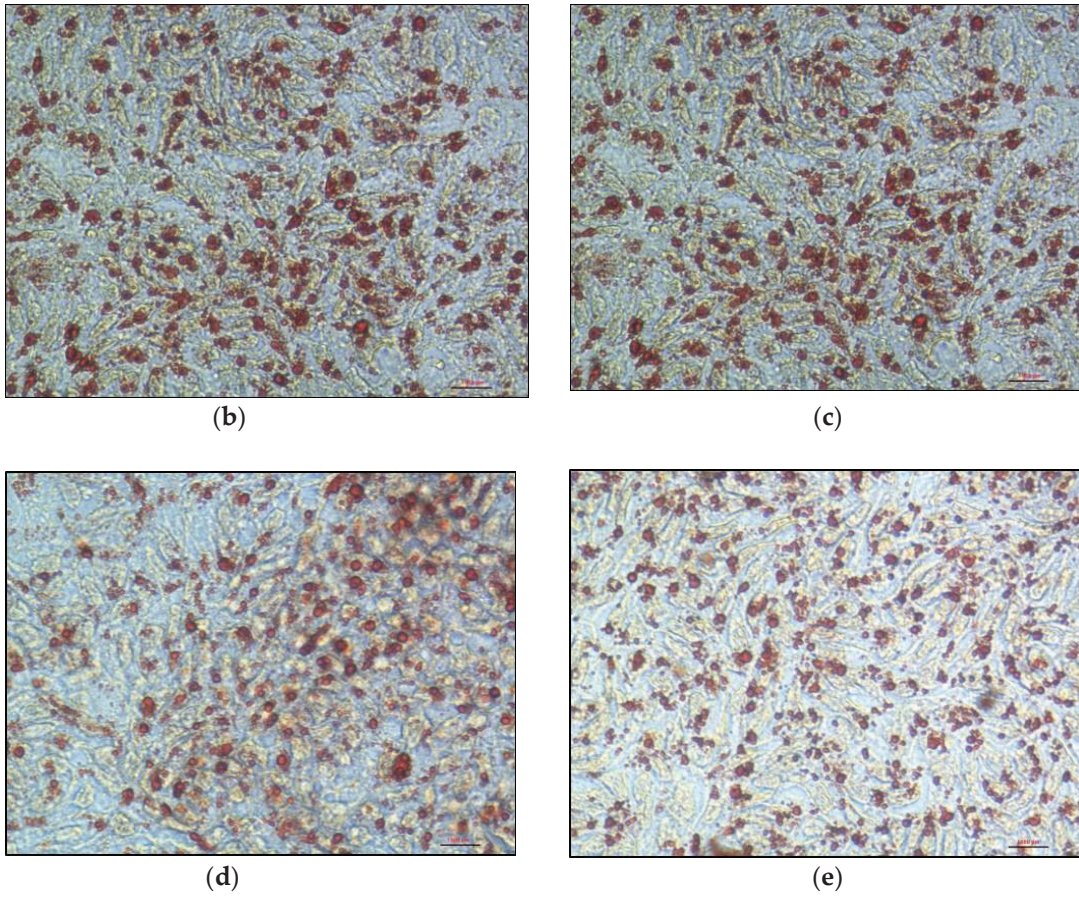
### 3.5. Lipids accumulate in knock-out clones compared to control cells

Oil Red O staining in cells incubated for 24 hours with 16% FBS-complete medium revealed a cytoplasm filled with lipid droplets (Figure 5 A-E). These lipid droplets appeared significantly larger and/or more numerous in KO clones than in control cells.

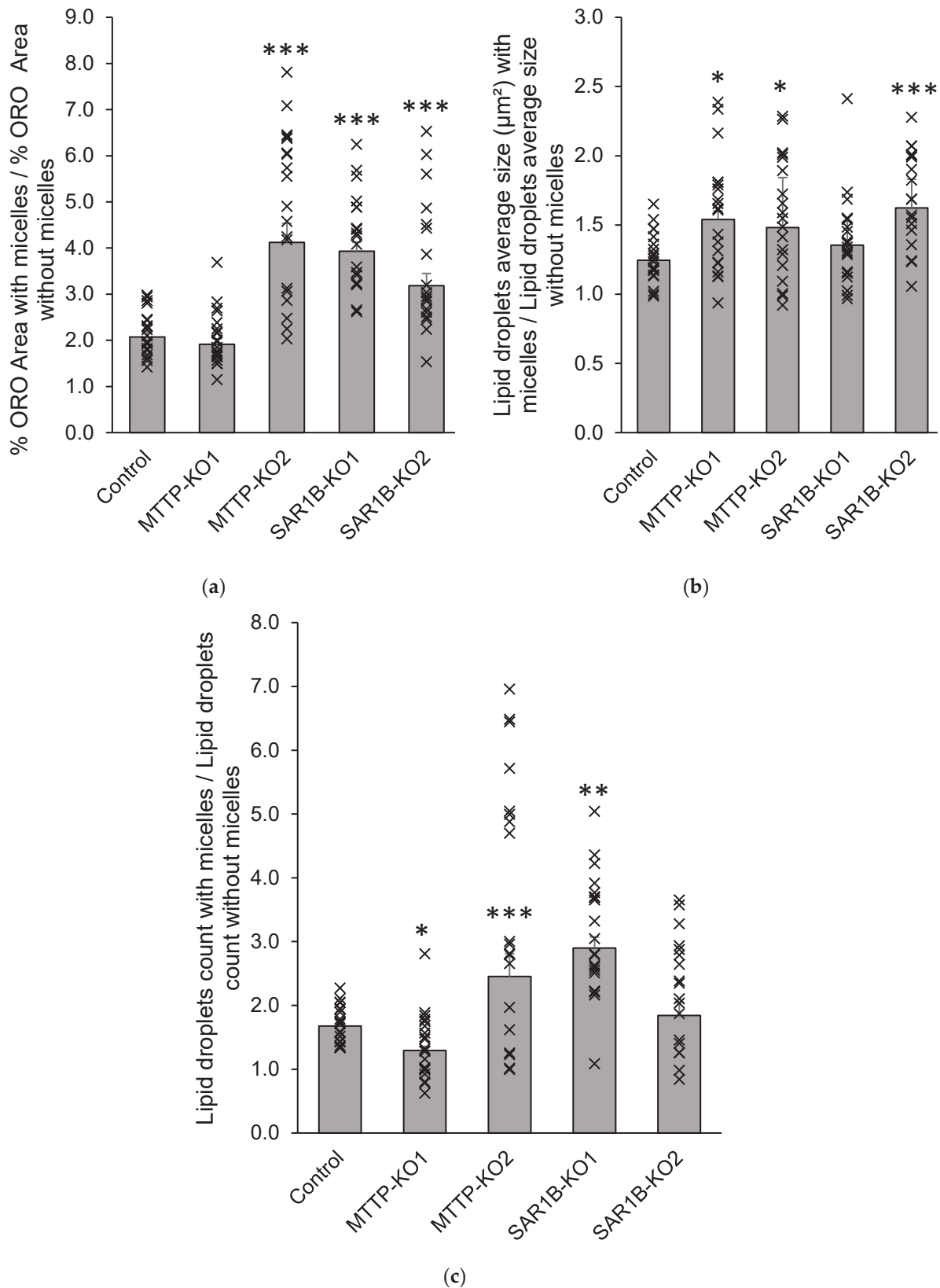
To confirm these observations, we compared and quantified intracellular lipid accumulation in cells after mixed micelle delivery. For the control cells, the ratio of the augmented Oil Red O staining area between the condition in the presence of micelles and the condition in the absence of micelles was of 2.2. For *MTTP*-KO1 clone, this ratio did not significantly differ from that of control cells. For *MTTP*-KO2, *SAR1B*-KO1 and *SAR1B*-KO2 clones, a significant greater lipid accumulation was observed with ratios of 4.8 ( $+122 \pm 18.4\%$ ), 4.1 ( $+89.2 \pm 10.8\%$ ) and 3.6 ( $+67.9 \pm 15.1\%$ ), respectively ( $p < 0.0001$ , Figure 6A). We observed a significant increase in the number of lipid droplets for *MTTP*-KO2 ( $+108.2 \pm 26.4\%$ ,  $p < 0.0001$ ) and *SAR1B*-KO1 clones ( $+80.4 \pm 12.4\%$ ,  $p = 0.0004$ ), but not for *MTTP*-KO1 and *SAR1B*-KO2 clones (Figure 6B). The results also indicate that *MTTP*-KO1, *MTTP*-KO2 and *SAR1B*-KO2 clones displayed a significant increase in cytoplasmic lipid droplet size compared to control cells ( $+24.7 \pm 7.2\%$  for *MTTP*-KO1,  $+23.6 \pm 7, 6\%$  for *MTTP*-KO2 and  $+34.5 \pm 6.3\%$  for *SAR1B*-KO2, respectively,  $p < 0.005$ ; Figure 6C).



(a)



**Figure 5.** Representative images of cytoplasmic lipid droplets observed under inverted microscopy images. Cells were cultured in 24-well plates for 21 days and received a medium containing 16%-FBS (instead of 8% FBS) for 24 h. Oil Red O staining ( $\times 400$  magnification) was performed in (a) Wild-Type Caco-2/TC7 cells, (b) clone *MTP*-KO1, (c) clone *MTP*-KO2, (d) clone *SAR1B*-KO1 and (e) clone *SAR1B*-KO2.

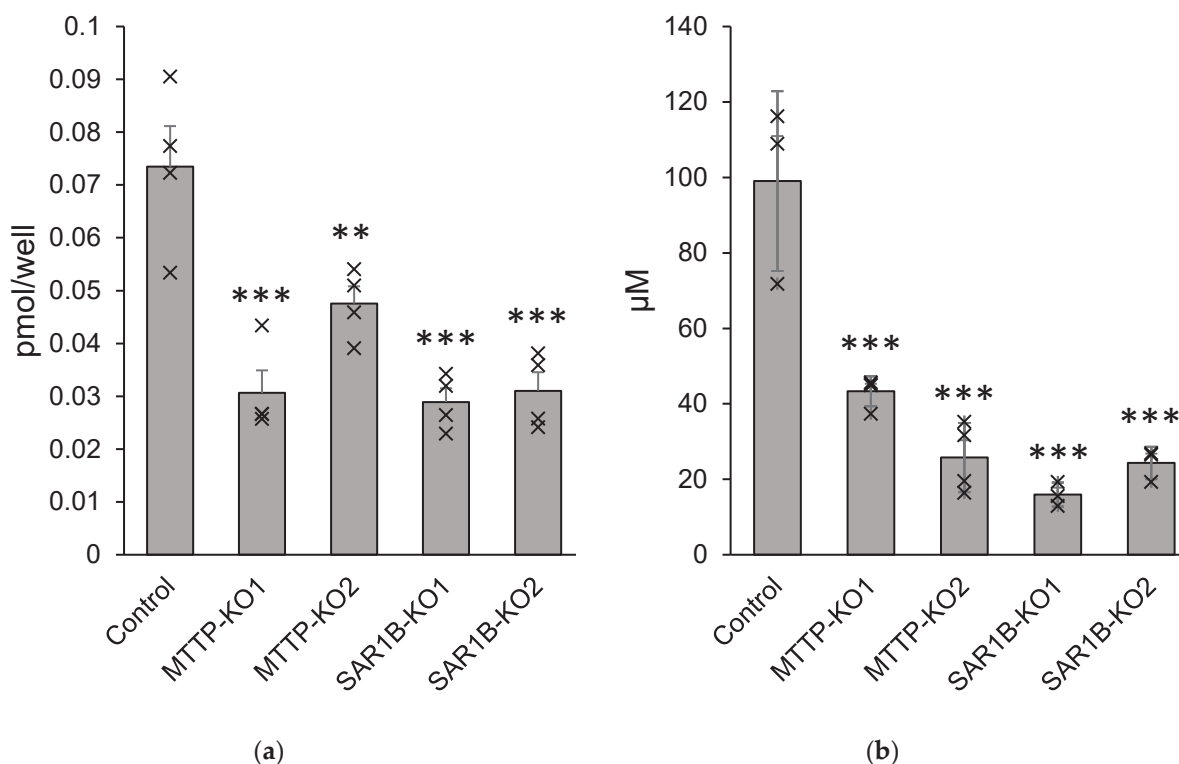


**Figure 6.** Lipid accumulation in KO clones and control cells. Cells were cultured on inserts for 21 days. Quantification of lipid accumulation was assessed by the ratio of increase in (a) red surface area (Oil red O staining), (b) lipid droplets count per field and (c) lipid droplets size between cells incubated without micelles and cells incubated with micelles for 16h. Data are expressed as means  $\pm$

SEM (n=20). An asterisk (\*) indicates a statistically significant difference in between control and KO clones (\* p < 0.05, \*\* p < 0.001, \*\*\* p < 0.0001).

### 3.6. Cholesterol and triglyceride basolateral secretion is decreased in knock-out clones compared to control cells

Compared to control cells, significant decreases in triglyceride and cholesterol secretion were observed after mixed micelles were delivered to KO cells. The mean reduction in cholesterol was of  $-56.5 \pm 7.8\%$  for *MTTP*-KO1 (p < 0.0001),  $-35.3 \pm 4.4\%$  for *MTTP*-KO2 (p = 0.00025),  $-60.6 \pm 3.5\%$  for *SAR1B*-KO1 (p < 0.0001) and  $-57.8 \pm 4.8\%$  for *SAR1B*-KO2 (p < 0.0001) (Figure 7A). The mean reduction in triglycerides was of  $-57.0 \pm 2.6\%$  for *MTTP*-KO1 (p < 0.0001),  $-74.0 \pm 4.6\%$  for *MTTP*-KO2 (p < 0.0001),  $-83.9 \pm 1.6\%$  for *SAR1B*-KO1 (p < 0.0001) and  $-75.4 \pm 2.2\%$  for *SAR1B*-KO2 (p < 0.0001) (Figure 7B). No impact on cholesterol and triglycerides uptake was observed.



**Figure 7.** (a) Cholesterol and (b) triglycerides basolateral secretion in *MTTP* and *SAR1B* KO Caco-2/TC7 cells compared to wild-type Caco-2/TC7 cells. Cells were cultured on inserts for 21 days and were incubated with mixed micelles for 16 hours. Triglyceride and cholesterol levels in the basolateral medium were quantified by fluorimetric assays. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n=4). An asterisk (\*) indicates a statistically significant difference in cholesterol concentrations between control and KO clones (\* p < 0.05, \*\* p < 0.001, \*\*\* p < 0.0001).

Secreted particles were characterized in terms of size and zeta-potential. Results are reported in Table 1. No significant difference in particle size was observed, even though a wider range of size was observed for KO clones.

**Table 1.** Physicochemical characteristics of particles secreted by Caco2 cells



Clones	Size (nm)	Zeta-potential (mv)
	Mean $\pm$ sem [population range]	Mean $\pm$ sem
Control	46 $\pm$ 2.7 [9 – 68]	-9.66 $\pm$ 1.0
<i>MTTP</i> -KO1	59 $\pm$ 14.0 [16 – 91]	-10.74 $\pm$ 0.92 ***
<i>MTTP</i> -KO2	61.9 $\pm$ 14.9 [18 – 122]	-9.56 $\pm$ 1.28
<i>SAR1B</i> -KO1	57.4 $\pm$ 2.5 [18 – 122]	-9.77 $\pm$ 1.0
<i>SAR1B</i> -KO2	61.5 $\pm$ 6.9 [16 – 122]	-8.93 $\pm$ 1.65 *

Cells were incubated for 16 hours with mixed micelles. Basolateral medium was then harvested, and aliquots were taken extemporaneously to evaluate secreted particle size and zeta-potential. An asterisk (\*) indicates a statistically significant difference between control and KO clones (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ ).

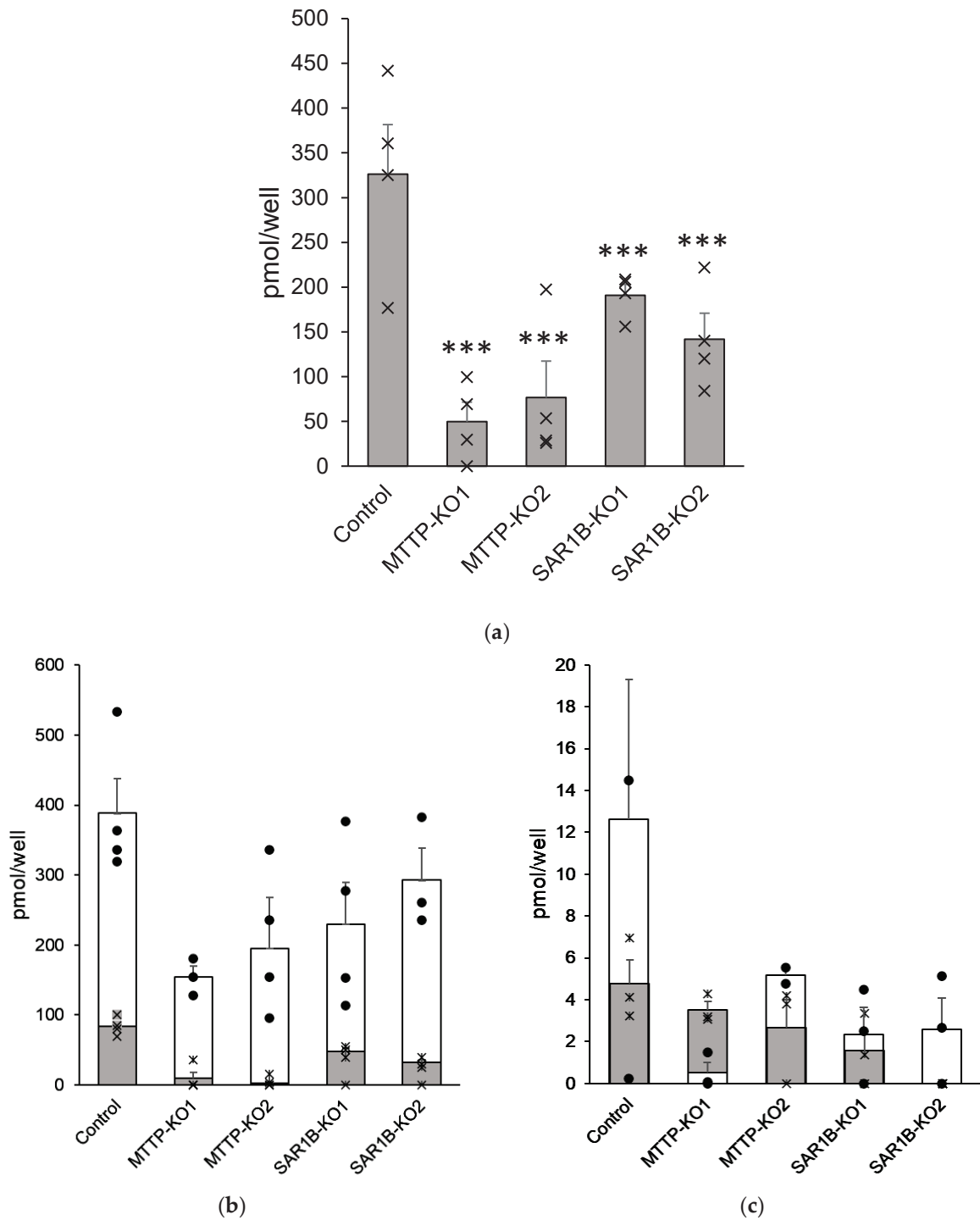
### 3.7. Vitamin E basolateral secretion is decreased in knock-out clones, depending on vitamin E form

Results showed a significant decrease in  $\alpha$ -tocopherol basolateral secretion with a mean reduction of -85  $\pm$  7 % for *MTTP*-KO1 ( $p < 0.0001$ ), -77  $\pm$  12 % for *MTTP*-KO2 ( $p = 0.0002$ ), -42  $\pm$  4 % for *SAR1B*-KO1 ( $p = 0.0338$ ) and -57  $\pm$  9% for *SAR1B*-KO2 ( $p = 0.0034$ ) compared to control cells (Figure 8A). Although secretion was significantly impaired, no cytoplasmic significant difference was observed in vitamin E cytoplasmic levels in KO clones compared to wild-type cells.

We observed a significant decrease in TAC secretion in *MTTP*-KO clones with a mean decrease of -60  $\pm$  3 % in *MTTP*-KO1 ( $p = 0.027$ ), -66  $\pm$  13 % in *MTTP*-KO2 ( $p = 0.046$ ) compared to control cells (Fig 7B). The secretion of free  $\alpha$ -tocopherol originating from TAC was impaired to a greater extent in these clones with a decrease of -76  $\pm$  5 % in *MTTP*-KO2 ( $p < 0.0001$ ), and no detectable amount ( $p < 0.0001$ ) in *MTTP*-KO1 basolateral medium compared to the control. Regarding *SAR1B*-KO clones, TAC basolateral was decreased but the difference remained non-significant: -40  $\pm$  15 % ( $p = 0.132$ ) and -25  $\pm$  10 % ( $p = 0.598$ ) for *SAR1B*-KO1 and *SAR1B*-KO2, respectively. For these two clones, we also observed a significant decrease in free  $\alpha$ -tocopherol secretion compared to wild-type cells: -57  $\pm$  15 % ( $p = 0.0007$ ) and -71  $\pm$  10 % ( $p < 0.0001$ ) for *SAR1B*-KO1 and *SAR1B*-KO2 respectively (Figure 8B).

Finally, we observed no significant difference in TPGS basolateral secretion between control cells and all KO clones after incubation of TPGS diluted in mixed micelles, with a very low secretion for both control and KO cells. The secretion of free  $\alpha$ -tocopherol originating from TPGS was also notably low (4.8  $\pm$  1.1 pmol/well for wild-type cells vs 3.5  $\pm$  0.4 pmol/well for *MTTP*-KO1, 2.7  $\pm$  1.3 pmol/well for *MTTP*-KO2, 1.6  $\pm$  1.0 pmol/well for *SAR1B*-KO1 and no detectable amount for *SAR1B*-KO2), resulting in non-significant differences as well (Figure 8C).

Of note, esterified tocopherol secretion intensity depended on vitamin E source: when given TAC, wild-type Caco-2/TC7 secrete 388  $\pm$  49 pmol/well of TAC, but when given TPGS wild-type Caco-2/TC7 secrete 12.6  $\pm$  6.7 pmol/well of esterified tocopherol, after 6 hours.



**Figure 8.** Vitamin E and its derivative basolateral content after (a) free  $\alpha$ -tocopherol (b) TAC or (c) TPGS acute micellar delivery. Cells were cultured on inserts for 21 days and were incubated with mixed micelles containing  $\alpha$ -tocopherol or TAC or TPGS for 6 hours. Alpha-tocopherol and its derivative levels were measured by HPLC after liquid-liquid extraction with hexane. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n=4).

For figures (b) and (c) grey bars with crosses represent free-tocopherol and white bars with dots represent TAC (b) or TPGS (c). For all figures, an asterisk (\*) indicates a statistically significant difference in TAC concentrations between control and KO clones (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ ). An ash (#) indicates a statistically significant difference in TAC or TPGS concentrations between control and KO clones (#  $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

The objective of this study was to evaluate whether Caco-2/TC7 cells knocked-out for *MTTP* or *SAR1B* genes could constitute relevant models for enterocytes of patients with Monogenic Hypobetalipoproteinemia Disorders. The Caco-2/TC7 sub-clone has shown its ability to absorb dietary lipids [20] and to secrete TAG-rich particles [21], which makes it a relevant cell line to develop a model for studying small intestine of these patients. The CRISPR/Cas9 technique is a relatively simple genome editing system based on the nuclease Cas9 and a single gRNA that has been established in many organisms, from bacteria to higher eukaryotes [22]. Here, we successfully knocked-out *MTTP* in two cell lines (named *MTTP*-KO1 and *MTTP*-KO2) and *SAR1B* in two cell lines (named *SAR1B*-KO1 and *SAR1B*-KO2), as confirmed by DNA sequencing and Western blotting (WB) showing mutated DNA sequences and lack of proteins. Gene expression, assessed by qPCR, revealed a low expression of either *MTTP* or *SAR1B* in the respective KO clones.

The four KO clones were characterized by light microscopy after Oil red O staining (a lipid-soluble dye which stains neutral lipids, including cholesteryl esters). The microscopy experiment with cells loaded with 16% FBS-complete medium showed a significant increase in cytoplasmic lipid droplets number and size in *MTTP*-KO1, *SAR1B*-KO1, and *SAR1B*-KO2 compared to control, in accordance with histological abnormalities observed in intestinal biopsies of patients [9]. Intracellular lipid quantification determined under light microscopy on cells loaded with mixed micelles for 16 hours confirmed the greater lipid accumulation in all KO clones. However, each clone displayed a different type of response to micellar delivery. Clone *MTTP*-KO1 had larger but slightly fewer cytoplasmic droplets, which does not increase the Oil red O staining area compared to control cells, whereas clone *MTTP*-KO2 had both larger and more numerous lipid droplets, which explains the larger increase in staining area compared to the other clones. The *SAR1B*-KO1 clone has lipid droplets comparable in size to control cells but much more numerous, while the *SAR1B*-KO2 clone has lipid droplets comparable in number to control cells but of greater size.

We then studied the impact of knocking-out *MTTP* or *SAR1B* on the expression of different genes involved in lipid metabolism [19] and oxidative stress management. We explored the expressions of genes involved in fatty acid transport (*FATP4*, *FABP2*), intracellular lipid re-synthesis (*ACAT2*, *DGAT1*, *DGAT2*, *MGAT2*), lipid droplet (*PLIN2*) or chylomicron (*APOB*) formation, cholesterol metabolism (*ABCA1*, *ABCG8*, *NPC1L1*, *SCARB1*, *PGP*) and oxidative stress management (*CAT*, *SOD1*). Our results highlight a decrease in *NPC1L1* expression, a gene expressed in the small intestine and required for intestinal cholesterol absorption [23], in all clones. Studies from Xie et al. [24] and Iqbal et al. [25] also reported a subsequent decreased in *NPC1L1* expression in isolated enterocytes obtained from mice with conditional intestine-specific *Mttp* deficiency. *NPC1L1* gene may be downregulated in response to an increase in cellular lipid amounts. Indeed, increased amount of cholesterol or of its esters, known to be unstable in oxidizing conditions, might lead to an elevated risk of oxysterol formation [26]. As a result, the Liver X Receptors (LXRs), which act as oxysterol sensors [27], would induce the transcription of genes that protect cells from cholesterol overload [28]. *NPC1L1* was recently reported to be

downregulated by LXR activation in both mice and in a human enterocyte cell line [29]. The observed *NPC1L1* downregulation may thus be a consequence of LXR activation. However, this hypothesis is inconsistent with the marked *ABCA1* downregulation in three clones, as LXR is also a positive regulator of *ABCA1* [30]. However, *ABCA1* downregulation in the two *MTTP*-KO clones is also in agreement with expression levels reported by Xie et al. in mice with conditional intestine-specific *Mttp* deficiency [24]. Interestingly, the expressions of *ABCG8*, coding a transporter involved in non-esterified sterol intestinal excretion [31], and of *APOB*, coding for the main structural protein of chylomicrons, were significantly decreased in both *MTTP*-KO clones, still in agreement with the study from Xie et al [24]. Intestinal *ABCG8* downregulation was also observed by Iqbal et al. in their in vivo model but authors did not evaluate *APOB* levels [25]. Overall, these results suggest that these two clones are valid models of *MTTP* deficiency.

The increased expression of *PLIN2* in *MTTP*-KO clones is another interesting result. *PLIN2* (Perilipin 2/ adipophilin) is the major and ubiquitous lipid droplet coat protein and plays a major role in the biogenesis, stabilization, and degradation of cytoplasmic lipid droplets. *PLIN2* only exists bound to lipid droplets and is known to be a specific marker of lipid accumulation [32]. Bouchoux et al. showed in Caco-2/TC7 cells that *PLIN2* labelling increased in lipid-loaded cells compared with control cells, after a 24-hour incubation with lipid micelles [33]. *PLIN2* expression was also higher in enterocytes from chronic high-fat challenged mice compared to chow-fed mice [34]. This result is also consistent with the greater lipid droplets size observed during microscopy experiments.

*SAR1B*-KO2 displayed a downexpression of *ABCA1* and *MTTP* genes, which is consistent with a previous study on a *sar1b* mutant mice model [35]. Conversely, *SAR1B*-KO1 showed no alteration in both *ABCA1* and *MTTP* expression. However, both *SAR1B*-KO clones showed a significant reduction of *ABCG8*, *NPC1L1* and *DGAT1* expressions, as observed in *MTTP*-KO clones. Moreover, *SAR1B*-KO1 displayed an increased expression of *FABP2*, encoding for an intestinal fatty acid-binding protein involved in the uptake, intracellular metabolism, and transport of long chain fatty acids [36], and of *MGAT2*, encoding for an intestinal protein that catalyzes the synthesis of diacylglycerols, a precursor of TAG [37], while *SAR1B*-KO2 displayed a decreased expression of these genes. Of note, *SAR1B*-KO2 showed significant decrease in the expression of all tested genes. This variability may come from the selection of each clone from a single cell. Indeed, Caco2/TC7 line present homogenous cells compared to other lines [38], but slight genomic and phenotypic differences still exist between cells from a same culture plate.

The observed lipid intracellular accumulation in both Caco-2/TC7 lacking MTP and Sar1b proteins was consistent with the cholesterol and triglycerides accumulation observed in enterocytes from intestine-specific *Mttp*-KO mice [24,25] and Sar1b mutant mice [35], compared to wild-type mice. We also observed altered basolateral triglycerides and cholesterol secretion that has been observed in both mouse models, with a significant decrease in plasma cholesterol levels in conditional intestine-specific *Mttp*-deficiency mice [24,25], and in Sar1b mutant mice [35].

We then characterized the secretion of  $\alpha$ -tocopherol, TAC and TPGS by wild-type Caco-2 cells compared to KO clones.  $\alpha$ -tocopherol is one of the main dietary form of vitamin E. In clinical nutrition, vitamin E deficiency is usually treated with oral  $\alpha$ -tocopherol-acetate (TAC) to protect the phenol group against oxidation [13,39]. Due to the poor bioavailability of TAC and because of the interest of treating patients with Monogenic Hypobetalipoproteinemia Disorders with TPGS, a drinkable form of tocopherol, we characterized and compared the uptake and secretion of  $\alpha$ -tocopherol, TAC and TPGS in the different clones. Our main results are: (1) free  $\alpha$ -tocopherol secretion was significantly decreased in all KO clones, and to a greater extent in *MTTP*-KO clones compared to *SAR1B*-KO clones; (2) TAC secretion was mildly but significantly decreased in *MTTP*-KO clones but not in *SAR1B*-KO clones; (3) TPGS secretion, which was much lower than those of TAC and  $\alpha$ -tocopherol, was not modified between wild-type cells and KO cells, probably due to the negligible amounts secreted. The fact that we observed a lower  $\alpha$ -tocopherol secretion in *MTTP*-KO clones than in *SAR1B*-KO clones is consistent with clinical observations as FHBL-SD1 patients present more severe vitamin E deficiency than FHBL-SD3 patients [40]. Our results are also consistent with a previous cell-based study designed to characterize the absorption of free-tocopherol, TAC and TPGS [13]. This previous study also reported a basolateral secretion of TAC in its intact form (202 pmol/well after 24 hours of incubation). Both studies showed a greater secretion of tocopherol when micellar tocopherol was in its free form than when it was in its esterified form (TAC). TAC secretion was modestly impacted in our KO clones, while the secretion of tocopherol derived from TAC hydrolysis was significantly reduced. This suggests that free tocopherol secretion is more dependent on intracellular lipid metabolism than its esterified form, likely because TAC secretion is mediated by an alternative (and relatively inefficient) pathway. Finally, TPGS secretion was not significantly modified between control cells and KO clones, probably due to the extremely small amount of TPGS secreted, according to previous observations [13]. These findings are in accordance with a clinical trial [41], which reported that TAC was better absorbed than Tocofersolan-TPGS in healthy adult volunteers after a single oral dose. Authors also observed that supplementation with Tocofersolan-TPGS had minimal effect on plasma  $\alpha$ -tocopherol in normal individuals.

Although our data suggest that our KO clones are relevant model for Monogenic Hypobetalipoproteinemia Disorders, our clones present some limits. Firstly, limitations are linked to the CRISPR/Cas9 technique itself. To date, 75 causal mutations of FHBL-SD1 have been reported throughout the *MTTP* gene [42] and 16 different pathogenic variants of *SAR1B* have been reported [43], in different introns and exons. Here, we could only generate one mutation type in one specific exon of each genes making difficult to reproduce the high variability of genotypes and phenotypes found in the patients. Secondly, CRISPR/Cas9 may have induced unwanted off-target mutations that could not be detected with our in-silico analyses. However, the effects are expected to be reduced because we used a lipid nanoparticle delivery system and appropriate target sites [44]. Thirdly, although disturbed intestinal absorption is a key element in these pathologies, one should not forget the potential role the liver and others tissues that are also affected by the mutations, and

which may interfere with the metabolism and distribution of lipids and vitamin E.

## 5. Conclusions

Overall, we generated enterocyte models to study Monogenic Hypobetalipoproteinemia Disorders. The selected clones showed 1) lipid droplet and cholesterol cellular accumulation; 2) a downregulation of *NPC1L1*, *ABCG8*, *ABCA1* and *APOB* in *MTP*-KO clones and a downregulation of *ABCA1* and *APOB* in one *SAR1B*-KO clone in accordance with in vivo data obtained from conditional *Mttp*-KO mice and *Sar1b*-KO mice, respectively; and 3) a reduced secretory capacity of cholesterol and vitamin E, as observed in FHBL-SD1 and FHBL-SD3 patients. Our KO clones thereby represent interesting tools to further experiment new therapeutic strategies to improve lipid and vitamin E absorption in patients.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Table S1: DNA sequences targeted by guide-RNA used in CRISPR/Cas9 experiment title; Table S2: Genomic primers used in CRISPR/Cas9 experiment and for gene amplification prior to Sanger sequencing; Table S3. Primer sequences used in off-target experiments Table S4. Primer sequences used in RT-qPCR experiments.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.R. and N.P.; Methodology, E.R., N.P., M.N., C.C., F.P. and C.B.; Software, C.B. and; Validation, E.R., N.P., and C.B.; Formal analysis, C.H., D.V. and C.B.; Investigation, D.V., C.H., A.P., A.V.-M., T.G., M.N. and C.B.; Visualization, C.B.; Writing—original draft preparation, C.B.; Writing—review and editing, E.R., N.P., D.V., C.H., F.P., A.P., C.C., M.-C.M., and C.B.; Supervision, E.R. and N.P.; Resources, E.R. and N.P.; Funding acquisition, E.R. and N.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Claire Bordat received a doctoral fellowship (2019-2022) from the Interdisciplinary Doctoral School in Health and Sciences (Doctoral School EDISS 205, Lyon, France) and University of Lyon.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors would like to thanks Mrs Barbara BAKER for improving English and the histology platform or CarMeN Laboratory for optical microscopy image acquisition.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Bredefeld, C.; Peretti, N.; Hussain, M.M.; Medical Advisory Panel New Classification and Management of Abetalipoproteinemia and Related Disorders. *Gastroenterology* **2021**, *160*, 1912–1916, doi:10.1053/j.gastro.2020.11.040.
2. Tarugi, P.; Aversa, M. Hypobetalipoproteinemia: Genetics, Biochemistry, and Clinical Spectrum. *Adv Clin Chem* **2011**, *54*, 81–107.
3. Hooper, A.J.; Burnett, J.R. Update on Primary Hypobetalipoproteinemia. *Curr Atheroscler Rep* **2014**, *16*, 423, doi:10.1007/s11883-014-0423-3.
4. Wetterau, J.R.; Aggerbeck, L.P.; Bouma, M.E.; Eisenberg, C.; Munck, A.; Hermier, M.; Schmitz, J.; Gay, G.; Rader, D.J.; Gregg, R.E. Absence of Microsomal Triglyceride Transfer Protein in Individuals with Abetalipoproteinemia. *Science* **1992**, *258*, 999–1001, doi:10.1126/science.1439810.

5. Sané, A.T.; Seidman, E.; Peretti, N.; Kleme, M.L.; Delvin, E.; Deslandres, C.; Garofalo, C.; Spahis, S.; Levy, E. Understanding Chylomicron Retention Disease Through Sar1b Gtpase Gene Disruption: Insight From Cell Culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2017**, *37*, 2243–2251, doi:10.1161/ATVBAHA.117.310121.
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. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII Vesicles Are Associated with Lipid Absorption Disorders. *Nat Genet* **2003**, *34*, 29–31, doi:10.1038/ng1145.
7. Anwar, K.; Iqbal, J.; Hussain, M.M. Mechanisms Involved in Vitamin E Transport by Primary Enterocytes and in Vivo Absorption. *J Lipid Res* **2007**, *48*, 2028–2038, doi:10.1194/jlr.M700207-JLR200.
8. Aguié, G.A.; Rader, D.J.; Clavey, V.; Traber, M.G.; Torpier, G.; Kayden, H.J.; Fruchart, J.C.; Brewer, H.B.; Castro, G. Lipoproteins Containing Apolipoprotein B Isolated from Patients with Abetalipoproteinemia and Homozygous Hypobetalipoproteinemia: Identification and Characterization. *Atherosclerosis* **1995**, *118*, 183–191, doi:10.1016/0021-9150(95)05605-x.
9. Peretti, N.; Sassolas, A.; Roy, C.C.; Deslandres, C.; Charcosset, M.; Castagnetti, J.; Pugnet-Chardon, L.; Moulin, P.; Labarge, S.; Bouthillier, L.; 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 Journal of Rare Diseases* **2010**, *5*, 24, doi:10.1186/1750-1172-5-24.
10. Sokol, R.J. Vitamin E Deficiency and Neurologic Disease. *Annu Rev Nutr* **1988**, *8*, 351–373, doi:10.1146/annurev.nu.08.070188.002031.
11. Southam, E.; Thomas, P.K.; King, R.H.; Goss-Sampson, M.A.; Muller, D.P. Experimental Vitamin E Deficiency in Rats. Morphological and Functional Evidence of Abnormal Axonal Transport Secondary to Free Radical Damage. *Brain* **1991**, *114* ( Pt 2), 915–936, doi:10.1093/brain/114.2.915.
12. Thomas, P.K.; Cooper, J.M.; King, R.H.; Workman, J.M.; Schapira, A.H.; Goss-Sampson, M.A.; Muller, D.P. Myopathy in Vitamin E Deficient Rats: Muscle Fibre Necrosis Associated with Disturbances of Mitochondrial Function. *Journal of anatomy* **1993**, *183*, 451.
13. Cuercq, C.; Bordat, C.; Halimi, C.; Blond, E.; Nowicki, M.; Peretti, N.; Reboul, E. Comparison of  $\alpha$ -Tocopherol,  $\alpha$ -Tocopherol Acetate, and  $\alpha$ -Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate 1000 Absorption by Caco-2 TC7 Intestinal Cells. *Nutrients* **2020**, *13*, 129, doi:10.3390/nu13010129.
14. Sambuy, Y.; De Angelis, I.; Ranaldi, G.; Scarino, M.L.; Stamatii, A.; Zucco, F. The Caco-2 Cell Line as a Model of the Intestinal Barrier: Influence of Cell and Culture-Related Factors on Caco-2 Cell Functional Characteristics. *Cell Biol Toxicol* **2005**, *21*, 1–26, doi:10.1007/s10565-005-0085-6.
15. Chantret, I.; Rodolosse, A.; Barbat, A.; Dussaulx, E.; Brot-Laroche, E.; Zweibaum, A.; Rousset, M. Differential Expression of Sucrase-Isomaltase in Clones Isolated from Early and Late Passages of the Cell Line Caco-2: Evidence for Glucose-Dependent Negative Regulation. *J Cell Sci* **1994**, *107* ( Pt 1), 213–225, doi:10.1242/jcs.107.1.213.
16. Pliatsika, V.; Rigoutsos, I. “Off-Spotter”: Very Fast and Exhaustive Enumeration of Genomic Lookalikes for Designing CRISPR/Cas Guide RNAs. *Biol Direct* **2015**, *10*, 4, doi:10.1186/s13062-015-0035-z.
17. Fortin, J.; Lun, A. On-Target and Off-Target Scoring Algorithms for CRISPR GRNAs. - *Issues in Jfortin1/crisprScore R package version 1.0.0*.
18. Reboul, E.; Abou, L.; Mikail, C.; Ghiringhelli, O.; André, M.; Portugal, H.; Jourdeuil-Rahmani, D.; Amiot, M.-J.; Lairon, D.; Borel, P. Lutein Transport by Caco-2 TC-7 Cells Occurs Partly by a Facilitated Process Involving the Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI). *Biochem J* **2005**, *387*, 455–461, doi:10.1042/BJ20040554.
19. Vincent, M.; Ménard, O.; Etienne, J.; Ossemond, J.; Durand, A.; Buffin, R.; Loizon, E.; Meugnier, E.; Deglaire, A.; Dupont, D.; et al. Human Milk Pasteurisation Reduces Pre-Lipolysis but Not Digestive Lipolysis and Moderately Decreases Intestinal Lipid Uptake in a Combination of Preterm Infant in Vitro Models. *Food Chem* **2020**, *329*, 126927, doi:10.1016/j.foodchem.2020.126927.
20. Salvini, S.; Charbonnier, M.; Defoort, C.; Alquier, C.; Lairon, D. Functional Characterization of Three Clones of the Human Intestinal Caco-2 Cell Line for Dietary Lipid Processing. *Br J Nutr* **2002**, *87*, 211–217, doi:10.1079/BJNBJN2001507.
21. Nauli, A.M.; Sun, Y.; Whittimore, J.D.; Atyia, S.; Krishnaswamy, G.; Nauli, S.M. Chylomicrons Produced by Caco-2 Cells Contained ApoB-48 with Diameter of 80–200 Nm. *Physiological reports* **2014**, *2*, e12018.

22. Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J.A.; Charpentier, E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **2012**, *337*, 816–821.
23. Altmann, S.W.; Davis, H.R.; Zhu, L.-J.; Yao, X.; Hoos, L.M.; Tetzloff, G.; Iyer, S.P.N.; Maguire, M.; Golovko, A.; Zeng, M.; et al. Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption. *Science* **2004**, *303*, 1201–1204, doi:10.1126/science.1093131.
24. Xie, Y.; Newberry, E.P.; Young, S.G.; Robine, S.; Hamilton, R.L.; Wong, J.S.; Luo, J.; Kennedy, S.; Davidson, N.O. Compensatory Increase in Hepatic Lipogenesis in Mice with Conditional Intestine-Specific Mttp Deficiency. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 4075–4086, doi:10.1074/jbc.M510622200.
25. Iqbal, J.; Parks, J.S.; Hussain, M.M. Lipid Absorption Defects in Intestine-Specific Microsomal Triglyceride Transfer Protein and ATP-Binding Cassette Transporter A1-Deficient Mice. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 30432–30444, doi:10.1074/jbc.M113.501247.
26. Zerbinati, C.; Iuliano, L. Cholesterol and Related Sterols Autoxidation. *Free radical biology & medicine* **2017**, *111*, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.013.
27. Viennois, E.; Mouzat, K.; Dufour, J.; Morel, L.; Lobaccaro, J.-M.; Baron, S. Selective Liver X Receptor Modulators (SLiMs): What Use in Human Health? *Mol Cell Endocrinol* **2012**, *351*, 129–141, doi:10.1016/j.mce.2011.08.036.
28. Peet, D.J.; Turley, S.D.; Ma, W.; Janowski, B.A.; Lobaccaro, J.-M.A.; Hammer, R.E.; Mangelsdorf, D.J. Cholesterol and Bile Acid Metabolism Are Impaired in Mice Lacking the Nuclear Oxysterol Receptor LXR $\alpha$ . *Cell* **1998**, *93*, 693–704.
29. Duval, C.; Touche, V.; Tailleux, A.; Fruchart, J.-C.; Fievet, C.; Clavey, V.; Staels, B.; Lestavel, S. Niemann–Pick C1 like 1 Gene Expression Is down-Regulated by LXR Activators in the Intestine. *Biochemical and biophysical research communications* **2006**, *340*, 1259–1263.
30. Murthy, S.; Born, E.; Mathur, S.N.; Field, F.J. LXR/RXR Activation Enhances Basolateral Efflux of Cholesterol in CaCo-2 Cells. *J Lipid Res* **2002**, *43*, 1054–1064, doi:10.1194/jlr.m100358-jlr200.
31. Patel, S.B.; Graf, G.A.; Temel, R.E. Thematic Review Series: Lipid Transfer Proteins ABCG5 and ABCG8: More than a Defense against Xenosterols. *Journal of lipid research* **2018**, *59*, 1103–1113.
32. Heid, H.W.; Moll, R.; Schwetlick, I.; Rackwitz, H.-R.; Keenan, T.W. Adipophilin Is a Specific Marker of Lipid Accumulation in Diverse Cell Types and Diseases. *Cell and tissue research* **1998**, *294*, 309–321.
33. Bouchoux, J.; Beilstein, F.; Pauquai, T.; Guerrero, I.C.; Chateau, D.; Ly, N.; Alqub, M.; Klein, C.; Chambaz, J.; Rousset, M.; et al. The Proteome of Cytosolic Lipid Droplets Isolated from Differentiated Caco-2/TC7 Enterocytes Reveals Cell-Specific Characteristics. *Biol Cell* **2011**, *103*, 499–517, doi:10.1042/BC20110024.
34. Lee, B.; Zhu, J.; Wolins, N.E.; Cheng, J.-X.; Buhman, K.K. Differential Association of Adipophilin and TIP47 Proteins with Cytoplasmic Lipid Droplets in Mouse Enterocytes during Dietary Fat Absorption. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1791*, 1173–1180, doi:10.1016/j.bbali.2009.08.002.
35. Auclair, N.; Sané, A.T.; Ahmarani, L.; Patey, N.; Beaulieu, J.-F.; Peretti, N.; Spahis, S.; Levy, E. Sar1b Mutant Mice Recapitulate Gastrointestinal Abnormalities Associated with Chylomicron Retention Disease. *J Lipid Res* **2021**, *62*, 100085, doi:10.1016/j.jlr.2021.100085.
36. Besnard, P.; Niot, I.; Poirier, H.; Clément, L.; Bernard, A. New Insights into the Fatty Acid-Binding Protein (FABP) Family in the Small Intestine. *Mol Cell Biochem* **2002**, *239*, 139–147.
37. Yen, C.-L.E.; Farese, R.V. MGAT2, a Monoacylglycerol Acyltransferase Expressed in the Small Intestine. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 18532–18537, doi:10.1074/jbc.M301633200.
38. Zucco, F.; Batto, A.-F.; Bises, G.; Chambaz, J.; Chiusolo, A.; Consalvo, R.; Cross, H.; Dal Negro, G.; de Angelis, I.; Fabre, G.; et al. An Inter-Laboratory Study to Evaluate the Effects of Medium Composition on the Differentiation and Barrier Function of Caco-2 Cell Lines. *Altern Lab Anim* **2005**, *33*, 603–618, doi:10.1177/026119290503300618.
39. Traber, M.G.; Sies, H. Vitamin E in Humans: Demand and Delivery. *Annu Rev Nutr* **1996**, *16*, 321–347, doi:10.1146/annurev.nu.16.070196.001541.



40. Sissaoui, S.; Cochet, M.; Poinot, P.; Bordat, C.; Collardeau-Frachon, S.; Lachaux, A.; Lacaille, F.; Peretti, N. Lipids Responsible for Intestinal or Hepatic Disorder: When to Suspect a Familial Intestinal Hypocholesterolemia? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2021**, *73*, 4–8, doi:10.1097/MPG.0000000000003145.
41. Traber, M.G.; Schiano, T.D.; Steephen, A.C.; Kayden, H.J.; Shike, M. Efficacy of Water-Soluble Vitamin E in the Treatment of Vitamin E Malabsorption in Short-Bowel Syndrome. *Am J Clin Nutr* **1994**, *59*, 1270–1274, doi:10.1093/ajcn/59.6.1270.
42. Rodríguez Gutierrez, P.G.; González García, J.R.; Castillo De Leon, Y.A.; Zarate Guerrero, J.R.; Magaña Torres, M.T. A Novel p. Gly417Valfs\* 12 Mutation in the *MTTP* Gene Causing Abetalipoproteinemia: Presentation of the First Patient in Mexico and Analysis of the Previously Reported Cases. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **2021**, *35*, e23672, doi:10.1002/jcla.23672.
43. Simone, M.L.; Rabacchi, C.; Kuloglu, Z.; Kansu, A.; Ensari, A.; Demir, A.M.; Hizal, G.; Di Leo, E.; Bertolini, S.; Calandra, S.; et al. Novel Mutations of *SAR1B* Gene in Four Children with Chylomicron Retention Disease. *J Clin Lipidol* **2019**, *13*, 554–562, doi:10.1016/j.jacl.2019.05.013.
44. Yu, X.; Liang, X.; Xie, H.; Kumar, S.; Ravinder, N.; Potter, J.; de Mollerat du Jeu, X.; Chesnut, J.D. Improved Delivery of Cas9 Protein/GRNA Complexes Using Lipofectamine CRISPRMAX. *Biotechnol Lett* **2016**, *38*, 919–929, doi:10.1007/s10529-016-2064-9.

#### 4.2.2. Principaux résultats et discussion

Dans ce travail, nous avons réussi à invalider le gène *MTTP* dans deux lignées cellulaires (nommées *MTTP*-KO clone #1 et #2) et le gène *SAR1B* dans deux lignées cellulaires (nommées *SAR1B*-KO clone #1 et #2), comme le confirment le séquençage de l'ADN et le Western-Blot (WB) montrant des séquences d'ADN mutées et l'absence de protéines, respectivement. L'expression génétique, évaluée par RT-qPCR, a également révélé une faible expression de *MTTP* ou de *SAR1B* dans les clones knock-out.

La suite de cette étude se subdivise donc en deux axes :

- La caractérisation génétique et phénotypique des clones mutés,
- L'exploration de l'absorption de la vitamine E et de ses alternatives thérapeutiques.

##### a. Caractérisation des clones

Tout d'abord, les quatre clones knock-out (KO) ont été caractérisés par microscopie optique après coloration à l'Oil Red-O (un colorant liposoluble qui colore les lipides neutres, y compris les esters de cholestérol). Cette analyse en microscopie nous a permis d'observer des cytoplasmes chargés en gouttelettes lipidiques plus larges et/ou plus nombreuses dans les clones KO (Peretti et al. 2010). Pour confirmer ces observations et quantifier l'accumulation intracellulaire de lipides, nous avons réalisé une deuxième expérience de microscopie optique,

avec coloration Oil Red-O, pour observer l'état basal à jeun de chaque clone et le comparer à son état après apport de micelles. La comparaison de paramètres avant et après apport de micelles permet de mesurer le ratio d'augmentation lipidique intracellulaire entre les deux états. Ce ratio permet de caractériser l'accumulation lipidique intracellulaire de chaque clone, et de comparer aux cellules témoins. Nous avons ainsi pu confirmer une plus forte accumulation lipidique dans les clones mutés, que ce soit en termes de nombres et/ou de taille de gouttelettes. L'accumulation intracellulaire de lipides observée dans clones KO est cohérente avec l'accumulation de cholestérol observée dans les entérocytes de souris présentant une déficience conditionnelle en *Mttp* spécifique de l'intestin (Xie et al. 2013) et de souris mutantes *Sar1b*<sup>-/-</sup> (Auclair et al. 2021), par rapport aux souris de type sauvage.

Nous avons ensuite étudié l'impact du knock-out de *MTTP* ou *SARIB* sur l'expression de différents gènes impliqués dans le métabolisme des lipides (Vincent et al. 2020) et la gestion du stress oxydatif. Nous avons exploré l'expression de gènes impliqués dans le transport des acides gras (*FATP4*, *FABP2*), la re-synthèse des lipides intracellulaires (*ACAT2*, *DGAT1*, *DGAT2*, *MGAT2*), la formation de gouttelettes lipidiques (*PLIN2*) ou de chylomicrons (*APOB*), le métabolisme du cholestérol (*ABCA1*, *ABCG8*, *NPC1L1*, *SCARB1*, *PGP*) et la gestion du stress oxydatif (*CAT*, *SOD1*). Nos résultats mettent en évidence :

- Une sous-expression de *NPC1L1*, un gène exprimé dans l'intestin grêle et requis pour l'absorption intestinale du cholestérol (Altmann et al. 2004), dans tous les clones. Les études de Xie et al. (Xie et al. 2013) et Iqbal et al. (Iqbal et al. 2013) ont également rapporté une diminution de l'expression de *NPC1L1* dans les entérocytes de souris présentant une déficience conditionnelle en *MTTP* spécifique à l'intestin.
- Une sous-expression d'*ABCA1*, d'*ABCG8* et d'*APOB* dans les deux clones *MTTP*-KO, ce qui est également en accord avec les niveaux d'expression rapportés par Xie et al. et Iqbal et al. dans leurs modèles murins (Xie et al. 2013; Iqbal et al. 2013). Ces résultats suggèrent que ces deux clones sont des modèles pertinents de déficience en *MTTP*.
- Une forte surexpression de *PLIN2* (Perilipin 2/ adipophilin) dans les clones *MTTP*-KO. Cette protéine entoure la gouttelette lipidique avec les phospholipides et est connue pour être un marqueur spécifique de l'accumulation des lipides (Heid et al. 1998). Ainsi, il a été montré que le marquage de *PLIN2* augmentait dans les cellules chargées en lipides par rapport aux cellules témoins, in vitro sur cellules Caco-2 et in vivo dans les entérocytes de souris (Lee et al. 2009; Bouchoux et al. 2011). Ce résultat

est également en accord avec l'augmentation de taille des gouttelettes lipidiques observées en microscopie.

- Une sous-expression des gènes *ABCA1* et *MTTP*, dans le clone #2 de *SARIB-KO* ce qui est cohérent avec une étude précédente sur un modèle de souris mutantes *Sar1b* (Auclair et al. 2021).
- Une sous-expression des gènes *ABCG8*, *NPC1L1* et *DGATI* dans les deux clones *SARIB-KO*.
- Une surexpression accrue de *FABP2*, codant pour une protéine intestinale de liaison aux AG impliquée dans l'absorption, le métabolisme intracellulaire et le transport des AG à longue chaîne (Besnard et al. 2002), et de *MGAT2*, codant pour une protéine intestinale qui catalyse la synthèse du diacylglycérol, un précurseur des TAG (Yen, Farese 2003), dans les clones *SARIB-KO* #1 tandis que le clone *SARIB-KO* #2 présente une sous-expression de ces gènes. Il est à noter que le clone #2 de *SARIB-KO* a montré une diminution significative de l'expression de tous les gènes testés.

Enfin, pour finaliser la caractérisation phénotypique, nous avons mesuré la sécrétion basolatérale de triglycérides et de cholestérol et nous avons rapporté une diminution significative de cette sécrétion. Cette observation est cohérente avec ce qui est observé en clinique et dans les deux modèles de souris (Xie et al. 2013; Iqbal et al. 2013; Auclair et al. 2021).

#### b. Absorption de la vitamine E et de ses alternatives thérapeutiques

Nous avons ensuite caractérisé la sécrétion d' $\alpha$ -tocophérol, TAC et TPGS par les cellules Caco-2 de type sauvage par rapport aux clones KO. Nos principaux résultats sont : (1) la sécrétion d' $\alpha$ -tocophérol libre était significativement diminuée dans tous les clones KO, et de manière plus importante dans les clones *MTTP-KO* par rapport aux clones *SARIB-KO* ; (2) la sécrétion de TAC était légèrement mais significativement diminuée dans les clones *MTTP-KO* mais pas dans les clones *SARIB-KO* ; (3) la sécrétion de TPGS, qui était beaucoup plus faible que celles de TAC et d' $\alpha$ -tocophérol, n'était pas modifiée entre les cellules de type sauvage et les cellules knock-out, probablement en raison des quantités négligeables sécrétées.

Pour conclure, nous avons généré des modèles cellulaires d'entérocytes humains pour étudier les hypobétalipoprotéïnémies monogéniques. Les clones sélectionnés ont montré 1) une

accumulation de gouttelettes lipidiques dans les cellules ; 2) une régulation négative de *NPC1L1*, *ABCG8*, *ABCA1* et *APOB* dans les clones *MTP*-KO et une régulation négative de *ABCA1* et *APOB* dans un clone *SARIB*-KO, conformément aux données in vivo obtenues à partir de souris *Mtp*-KO conditionnelles et de souris *Sar1b*-KO, respectivement ; et 3) une altération de la sécrétion des triglycérides, du cholestérol et de la vitamine E, comme observé chez les patients ABL FHBL-SD1 et FHBL-SD3, et que le TPGS ne fournit pas une alternative thérapeutique efficace au TAC. Nos clones KO représentent donc des outils intéressants pour expérimenter de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à améliorer l'absorption des lipides et de la vitamine E chez les patients.

## 4.3. Etude 3 : étude de l'absorption-sécrétion des caroténoïdes dans les modèles validés

### 4.3.1. Introduction

Compte tenu des résultats obtenus sur la vitamine E et ses dérivés, et de l'importance des caroténoïdes pro-vitaminique A ou non pour la santé globale et la santé de l'œil, notamment par leur action antioxydantes, et compte tenu des mécanismes d'absorption quasi identiques entre tous ces micronutriments liposolubles, nous avons continué nos investigations avec quatre caroténoïdes majeurs : la lutéine, la zéaxanthine, l' $\alpha$ - et le  $\beta$ -carotène.

### 4.3.2. Résultats

Nos principaux résultats concernant les xanthophylles et notamment la lutéine, une baisse significative de la sécrétion basolatérale a été observée dans tous les clones mutés avec une diminution moyenne de  $91 \pm 4,5$  % pour le clone *MTTP*-KO #1 ( $p < 0,0001$ ), et  $92,7 \pm 2,8$  % pour le clone *MTTP*-KO #2 ( $p < 0,0001$ ),  $96 \pm 2,9$  % ( $p < 0,0001$ ) et  $98 \pm 0,3$  % ( $p < 0,0001$ ) pour les clones *SARIB*-KO #1 et *SARIB*-KO #2, respectivement, par rapport aux cellules contrôles. Aucune différence significative n'a été observée concernant l'absorption et l'accumulation cytoplasmique de lutéine. Pour la zéaxanthine, la sécrétion est également fortement altérée avec une baisse significative des quantités dans le milieu basolatéral de  $97 \pm 1,9$  % pour le clone *MTTP*-KO #1 ( $p < 0,0001$ ),  $88 \pm 0,9$  % pour le clone *MTTP*-KO #2 ( $p < 0,0001$ ),  $65 \pm 3,6$  % pour le clone *SARIB*-KO #1 ( $p = 0,0001$ ) et  $72 \pm 9,6$  % pour le clone *SARIB*-KO #2 ( $p < 0,0001$ ), par rapport aux cellules non mutées. Ici aussi, pas d'accumulation intra-cellulaire n'a été relevée. Ce schéma de sécrétion fortement altérée a également été observée pour les deux carotènes. Pour l' $\alpha$ -carotène, les diminutions significatives sont de  $93 \pm 3,7$  % pour le clone *MTTP*-KO #1 ( $p < 0,0001$ ),  $95 \pm 1,9$  % pour le clone *MTTP*-KO #2 ( $p < 0,0001$ ),  $92 \pm 4,5$  % pour le clone *SARIB*-KO #1 ( $p < 0,0001$ ) et  $89 \pm 2,2$  % pour le clone *SARIB*-KO #2 ( $p < 0,0001$ ), par rapport aux cellules contrôles. Finalement, pour le  $\beta$ -carotène nous avons observé des baisses significatives de  $96 \pm 2,6$  % pour le clone *MTTP*-KO #1 ( $p < 0,0001$ ),  $85 \pm 8,7$  % pour le clone *MTTP*-KO #2 ( $p < 0,0001$ ),  $88 \pm 3,8$  % pour le clone *SARIB*-KO #1 ( $p < 0,0001$ ) et  $79 \pm 4,4$  % pour le clone *SARIB*-KO #2 ( $p < 0,0001$ ), par rapport aux cellules contrôles.

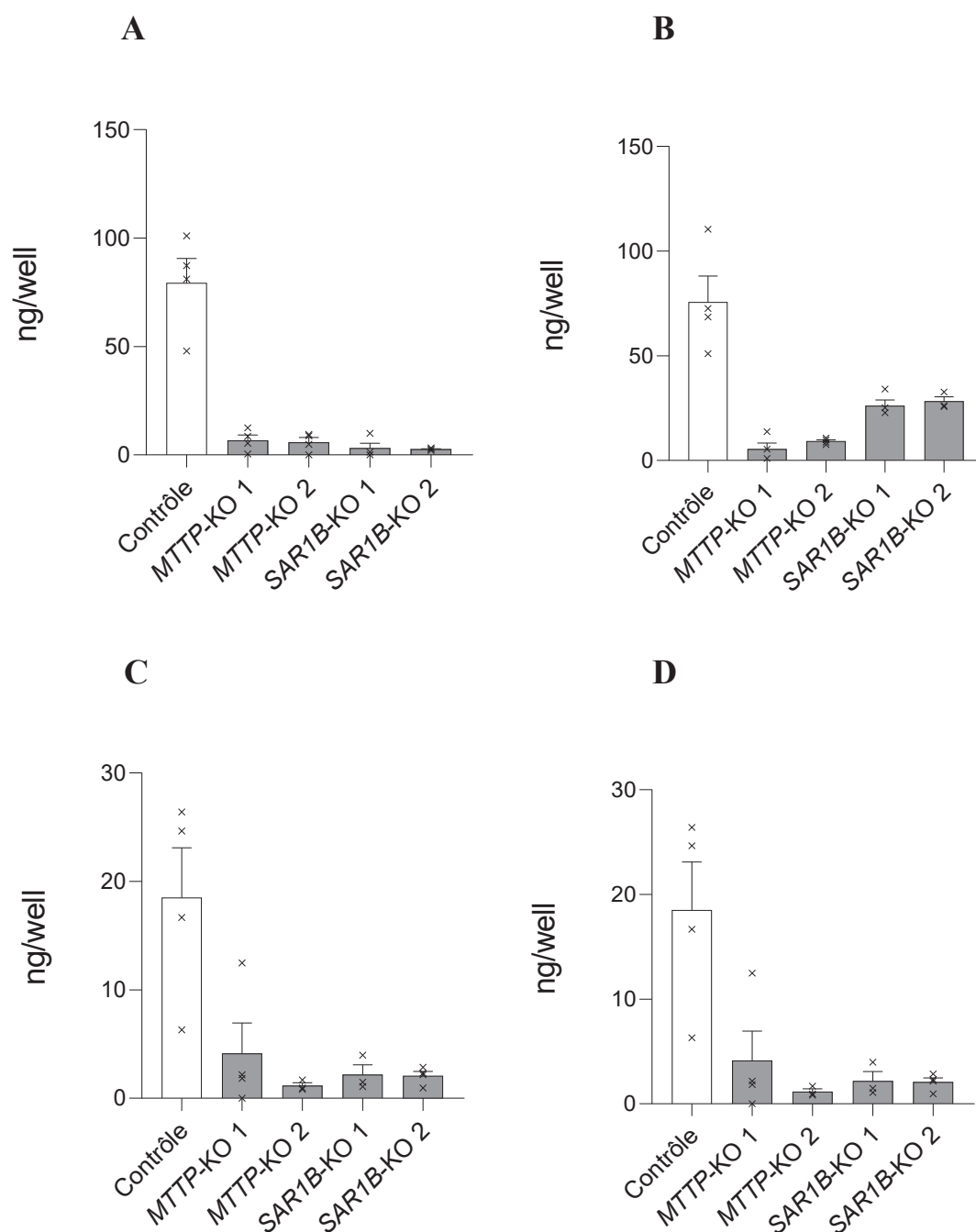


Figure 1. Concentrations basolatérales en caroténoïdes après incubation avec des micelles enrichies en (A) lutéine, (B) zéaxanthine, (C)  $\alpha$ -carotène ou (D)  $\beta$ -carotène.

Pour chaque expérience, les cellules ont été mises en présence de milieu complet sans SVF pendant 24 heures avant l'expérience et incubées avec des micelles mixtes contenant de la lutéine, de la zéaxanthine, de l' $\alpha$ -carotène ou du  $\beta$ -carotène pendant 6 heures. Les quantités de caroténoïdes ont été mesurées par HPLC après double extraction liquide-liquide hexanique. Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Un astérisque (\*) indique une différence statistiquement significative des concentrations de tocophérol libre entre les clones non mutés et les clones knock-out (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ).

En regard des résultats obtenus *in vitro*, nous avons exploré les niveaux plasmatiques en caroténoïdes chez les patients FHBL. Nous avons donc analysé les niveaux plasmatiques en lutéine, zéaxanthine,  $\alpha$ - et  $\beta$ -carotène, étudiés dans nos modèles cellulaires, mais nous avons également mesuré les concentrations en lycopène et  $\beta$ -cryptoxanthine, qui sont deux autres caroténoïdes majeurs dans le plasma humain (figure 2 A-F). Nos résultats indiquent de forts déficits en caroténoïdes, quelle que soit la molécule considérée. En effet, concernant les xanthophylles, les concentrations plasmatiques moyennes significativement ( $p < 0,05$ ) inférieures chez les patients FHBL comparée aux témoins. Ainsi, les résultats montrent une concentration moyenne en lutéine de 0,004  $\mu\text{mol/L}$  chez les patients FHBL contre 0,220  $\mu\text{mol/L}$  pour les témoins (figure 2A,  $p = 0,0014$ ). De même, les niveaux plasmatiques moyen en zéaxanthine étaient de 0,003  $\mu\text{mol/L}$  chez les patients FHBL contre 0,029  $\mu\text{mol/L}$  dans le groupe témoin (figure 2B,  $p = 0,0028$ ). Pour la dernière xanthophylle, la  $\beta$ -cryptoxanthine, nous avons relevé des valeurs moyennes d'environ 0,013  $\mu\text{mol/L}$  dans le groupe de patients pour 0,191  $\mu\text{mol/L}$  chez les témoins (figure 2C,  $p = 0,0091$ ). Concernant les carotènes, nos résultats montrent une concentration plasmatique moyenne de 0,009  $\mu\text{mol/L}$  et 0,030  $\mu\text{mol/L}$  chez les patients contre 0,431  $\mu\text{mol/L}$  et 0,764  $\mu\text{mol/L}$  chez les témoins, pour l' $\alpha$ - et le  $\beta$ -carotène, respectivement ( $p = 0,0014$  et  $p = 0,0098$ ). Enfin, pour le lycopène, le déficit est également évident chez les patients avec une valeur moyenne de 0,003  $\mu\text{mol/L}$  contre 0,094  $\mu\text{mol/L}$  dans le groupe témoin ( $p = 0,0024$ ). Les valeurs sont répertoriées dans le tableau ci-dessous. Les valeurs en dessous du seuil de détectabilité ont été considérées comme nulles pour le calcul des moyennes et de la significativité statistique.

Caroténoïdes (µmol/L)						
	Lutéine	Zéaxanthine	B-Cryptoxanthine	B-Carotène	A-Carotène	Lycopène
Patient 1	0,002	n.a.	0,011	0,007	0,007	0,005
Patient 2	0,005	n.a.	0,013	0,004	0,003	0,001
Patient 3	n.a.	0,001	0,004	0,004	0,003	n.a.
Patient 4	0,001	0,001	0,011	0,102	0,044	0,004
Patient 5	0,019	0,011	0,025	0,024	0,024	n.a.
Patient 6	0,002	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Patient 7	0,004	0,002	0,002	0,010	0,004	0,008
Patient 8	0,002	0,001	0,035	0,119	0,000	0,009
Patient 9	0,003	0,009	0,020	0,003	0,000	n.a.
Moyenne	0,004	0,003	0,004	0,030	0,009	0,003
Témoin 1	0,231	0,028	0,104	0,655	0,414	0,073
Témoin 2	0,219	0,038	0,152	0,912	0,302	0,100
Témoin 3	0,229	0,028	0,509	1,397	0,960	0,081
Témoins 4	0,201	0,020	0,000	0,093	0,046	0,122
Moyenne	0,220	0,029	0,191	0,764	0,431	0,094

Tableau. Concentrations plasmatiques en lutéine, zéaxanthine,  $\beta$ -cryptoxanthine,  $\alpha$ -carotène,  $\beta$ -carotène et lycopène.

9 patients atteints de FHBL (FHBL-SD1 ou FHBL-SD3) et 4 témoins sains.



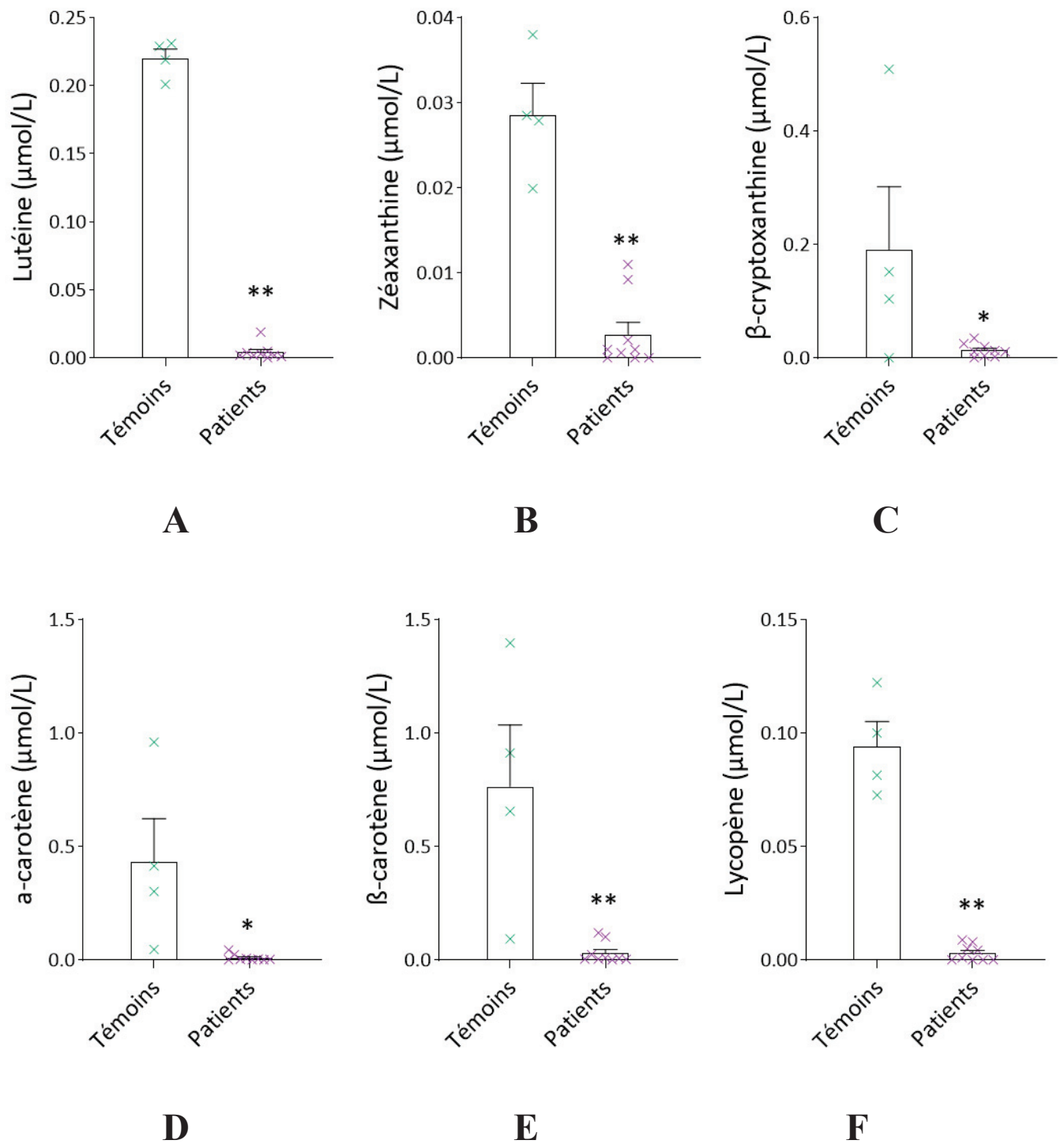


Figure 2. Concentrations plasmatiques en caroténoïdes : (A) lutéine, (B) zéaxanthine, (C)  $\beta$ -cryptoxanthine, (D)  $\alpha$ -carotène, (E)  $\alpha$ -carotène, et (F) lycopène.

Aucun patient ni témoins n'est supplémenté en caroténoïdes. Les quantités de caroténoïdes ont été mesurées par HPLC après double extraction liquide-liquide hexanique. Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 4$  et  $n = 9$ ). Un astérisque (\*) indique une différence statistiquement significative des concentrations de tocophérol libre entre les clones non mutés et les clones knock-out (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ).

### 4.3.1. Discussion

Cette étude *in vitro* dans nos modèles d'entérocytes KO pour les gènes responsables des deux principales hypobêtalipoprotéinémie génétiques confirme la malabsorption des caroténoïdes testés. De plus, les dosages plasmatiques effectués chez les patients régulièrement suivis, indiquent des taux effondrés de caroténoïdes. Les valeurs trouvées chez les volontaires sains sont cohérentes avec de nombreuses études et méta-analyses (Ito et al. 1990; Chung et al. 2009; Xu et al. 2012; Tanprasertsuk et al. 2019; Beydoun et al. 2022).

Au regard de ces données et du rôle critique des caroténoïdes dans la santé humaine et la vision, nous avons émis l'hypothèse que la détérioration ophtalmique observée chez les patients pourrait être expliquée d'une part, par un déficit combiné en vitamine A/E et en caroténoïdes, entraînant une déplétion du pigment maculaire, et d'autre part, par l'accumulation de conditions pro-oxydantes en lien avec un déficit en molécules antioxydantes conduisant à un état de stress oxydant pathologique permanent. Ce stress oxydant pourrait être en cause dans la dégénérescence rétinienne observée et pourrait justifier d'ajuster la prise en charge des patients avec des suppléments complémentaires en caroténoïdes (prioritairement lutéine et zéaxanthine) qui permettrait, à la fois de sauvegarder la densité du pigment maculaire et d'augmenter les capacités antioxydantes. Ainsi, pour aller plus loin dans l'hypothèse d'une éventuelle implication des caroténoïdes dans la physiopathologie des FHBL, il serait nécessaire d'une part de caractériser plus précisément le statut en caroténoïdes des patients, mais également s'il existe un niveau de stress oxydant important susceptible d'induire une destruction accrue, et enfin de rechercher s'il existe une corrélation entre le statut en caroténoïde et la fonction ophtalmique. Pour ces raisons nous avons mis en place une étude clinique avec pour objectifs de répondre à ces questions.

#### 4.4. Caractérisation de la densité du pigment maculaire chez les patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales en lien avec leur statut en caroténoïdes et anti-oxydant : Etude CaCo (CArotenoid in hypoChOlesterolemia)

##### 4.4.1. Présentation de l'étude

La prise en charge des FHBL repose essentiellement sur un régime pauvre en lipides à chaînes longues, associé à une supplémentation en vitamines liposolubles à forte dose et en AGE par voie orale ou éventuellement par voie parentérale pour les formes les plus sévères (Sissaoui et al. 2021). La grande rareté de ces maladies, ainsi que le caractère peu spécifique des symptômes entraînent un retard au diagnostic préjudiciable pour les patients. En effet, la prise en charge se doit d'être précoce afin de prévenir les complications neuro-ophtalmiques invalidantes majoritairement associées aux carences en vitamine A et E (Chowers et al. 2001).

Pourtant, comme discuté dans l'introduction bibliographique de ce travail, malgré une supplémentation précoce et adaptée, une dégradation de la fonction ophtalmique survenant à l'âge adulte est régulièrement observée (Alshareef et al. 2015; Illingworth et al. 1980). Cette dégradation se fait généralement sous la forme d'une rétinite pigmentaire (dite secondaire) caractérisée par une perte progressive des photorécepteurs et un dysfonctionnement de l'épithélium pigmentaire se traduisant par une perte progressive et graduelle de la vision évoluant généralement vers la cécité (Alshareef et al. 2015; Levy et al. 2019). Or, les rétinites pigmentaires primaires (c'est-à-dire d'origine génétique) sont caractérisées par atrophies de la macula lutea (Pagon 1988) composée uniquement de la lutéine et de zéaxanthine (Hartridge 1951). De plus, des études menées par des équipes travaillant spécifiquement sur ces maladies dégénératives rétiniennes ont montré l'association entre atteinte rétinienne et stress oxydant (Campochiaro et al. 2015; Campochiaro, Mir 2018; Kruk et al. 2015).

Or, nos données préliminaires montrent que les patients atteints de FHBL sont carencés en molécules de la famille des caroténoïdes (dont la supplémentation n'est pas envisagée actuellement dans la prise en charge) et les données de la littérature rapportent qu'ils souffrent

également d'un état de stress oxydant chronique potentiellement délétère (Clarke et al. 2006; Burnett, Hooper 2015).

- **Hypothèses de la recherche**

Ainsi, considérant l'ensemble des données bibliographiques et des données de nos études in vitro, plusieurs hypothèses peuvent être émises concernant la dégradation de la fonction ophtalmique observée chez ces patients :

- Il existerait une corrélation entre déficit en caroténoïdes et densité en pigments maculaires. Ainsi, un déficit chronique en caroténoïdes, pourrait être à l'origine d'une diminution progressive de la densité en pigments maculaires conduisant à une dégradation de la fonction ophtalmique, malgré une supplémentation en vitamine A.
- Les nombreuses carences en vitamines et en éléments nutritifs liposolubles entraîneraient, d'une part l'accumulation de conditions pro-oxydantes et d'autres part un déficit en molécules antioxydantes (vitamine E, vitamine A, caroténoïdes, polyphénols, lycopène) conduisant à un état de stress oxydant pathologique. Ce stress oxydant pourrait être en cause dans la dégénérescence rétinienne observée et pourrait justifier d'ajuster la prise en charge des patients avec des supplémentations complémentaires en caroténoïdes (prioritairement lutéine et zéaxanthine).

- a. Objectifs de la recherche

- Objectif principal

Cette étude consiste à caractériser et évaluer la densité du pigment maculaire chez les patients HBL majeurs ou mineurs de plus de 6 ans. La densité du pigment maculaire des patients malades sera mesurée par la méthode de l'imagerie par auto-fluorescence et sera comparée à celle de patients témoins. Cet examen nécessite un fond d'œil avec dilatation pupillaire qui est réalisé normalement durant le bilan de suivi des patients HBL.

- b. Objectifs secondaires

Cette étude comporte quatre objectifs secondaires :

- 1) Caractériser le statut en caroténoïdes des patients.

- 2) Caractériser les niveaux des marqueurs de stress oxydant des patients.
- 3) Etudier la corrélation entre la densité optique du pigment maculaire avec d'une part le statut en caroténoïdes, et d'autre part le niveau de stress oxydant.
- 4) Recherche d'une éventuelle évolution à un an de la densité optique, des statuts vitaminiques et du stress oxydant

L'analyse des données se fera à la fin de l'étude, une fois la dernière visite de chaque patient effectué Le détail du projet est présenté en annexe 9.

#### 4.4.2. Avancées de l'étude

J'ai rédigé et soumis le projet de recherche clinique au comité de protection des personnes (CPP) dont l'accord a été obtenu en janvier 2022 (annexe 10). L'étude a pu débuter juste avant l'été 2022, nous permettant actuellement d'inclure 5 patients et d'obtenir des résultats préliminaires concernant le déficit plasmatique en caroténoïdes et l'état de la rétine. Les analyses biochimiques n'ont pas encore eu lieu.

Le retard de l'étude clinique est la conséquence d'un délai important de finalisation des échanges avec le CPP et d'autre part à plusieurs désistements de patients imposant des reprogrammations. Les inclusions se poursuivront après ma thèse par l'équipe de recherche clinique du Dr Peretti et je participerai à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article l'an prochain.

## V. Discussion générale et perspectives

L'objectif de cette thèse était d'étudier l'absorption entérocytaire de vitamines liposolubles au cours des maladies rares que sont les hypobêtalipoprotéïnémies. Pour cela nous avons réalisé 4 étapes de recherche : dans un premier temps, nous avons mesuré les cinétiques d'absorption-sécrétion in vitro dans un modèle standard entérocytaire de différentes formes thérapeutiques de vitamine E disponibles. Puis pour nous rapprocher des situations cliniques pathologiques, nous avons créé un modèle cellulaire d'entérocyte Caco-2 TC7 mimant certaines hypobêtalipoprotéïnémies récessives par invalidation des gènes *MTTP* ou *SARIB* via la technique CRISPR-Cas9. Ce nouveau modèle nous a permis d'évaluer l'absorption spécifique des formes thérapeutiques de vitamine E. Par la suite, nous avons formulé l'hypothèse que les caroténoïdes, qui jouent un rôle connu dans diverses pathologies ophtalmiques, pourraient participer par leur déficit à la rétinopathie décrite chez les patients HBL. Afin d'étayer cette conclusion il convenait de confirmer une malabsorption intestinale dans le modèle cellulaire créé. Enfin, nous avons complété notre travail par une étude clinique cherchant à mesurer précisément le statut en caroténoïdes des patients HBL et à rechercher s'il existait d'une part un niveau de stress oxydant élevé susceptible d'expliquer une baisse des caroténoïdes par hyperconsommation, d'autre part s'il existait une corrélation entre le statut vitaminiq ue en caroténoïde des sujets et leur fonction ophtalmique.

### 5.1. Création des modèles

L'un des objectifs de ce travail était la création d'un modèle cellulaire pertinent pour étudier les FHBL, à partir de cellules Caco-2/TC7, grâce à la technique CRISPR/Cas9. Les modèles cellulaires, utilisant des cellules d'origine humaine présentent l'avantage de pouvoir étudier les mécanismes moléculaires d'une manière simple et reproductible tout en réduisant l'expérimentation animale. Les cellules Caco-2, dérivées d'un adénocarcinome colorectal humain, ont la capacité de se différencier spontanément en monocouche d'entérocytes polarisés exprimant plusieurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles spécifiques de l'épithélium intestinal humain. Elles sont donc capables d'exprimer la bordure en brosse, les jonctions serrées, les transporteurs d'efflux et d'absorption intestinaux et les enzymes impliquées dans le transport des xénobiotiques et des micronutriments de la lumière

intestinale à la circulation systémique (Hidalgo et al. 1989; Artursson et al. 2001). Différentes études ont comparé les coefficients de perméabilité des aliments et médicaments à travers les cellules Caco-2 avec les données d'absorption orale chez l'homme et ont montré une corrélation significative, en particulier pour les substances transportées par voie transcellulaire passive (Artursson, Karlsson 1991; Yee 1997; Cheng et al. 2008). En raison de ces propriétés favorables, cette lignée cellulaire fait l'objet d'un consensus et est devenue un modèle *in vitro* standard pour l'évaluation de la perméabilité et de l'absorption intestinale. Cependant, il a été démontré que la lignée Caco-2 originale tend à être hétérogène et est sensible aux conditions de culture (Delie, Rubas 1997; Briske-Anderson et al. 1997). Afin de diminuer cette hétérogénéité, plusieurs clones ont été isolés de la lignée Caco-2. Parmi eux, le clone TC7 a été obtenu à partir d'un passage tardif (198) de la lignée parentale et est caractérisé pour sa capacité à transporter le mannitol par voie paracellulaire, la testostérone par diffusion passive, et l'acide taurocholique en raison de la présence de transporteurs actifs d'acides biliaires (Chantret et al. 1994). Seules des différences mineures ont été observées entre la lignée cellulaire parentale et le clone TC7 en termes de transport paracellulaire et de diffusion passive. En revanche, de grandes différences ont été observées dans le transport actif de l'acide taurocholique, l'efflux actif médié par la P-glycoprotéine (plus faible que dans la lignée cellulaire parentale), dans l'expression de l'hydrolase sucrase isomaltase et des UDP-glucuronyltransférases (plus proche des niveaux d'expression du jéjunum humain) (Grès et al. 1998). De plus, une étude visant à comparer les caractéristiques de quatre lignées cellulaires Caco-2 a conclu que le clone TC7 est constitué d'une population plus homogène, et se différencie plus rapidement que la lignée parentale (20 jours vs 30 jours) donnant lieu à des résultats moins variables et présentant des jonctions intercellulaires plus développées (Zucco et al. 2005). Ces caractéristiques en font donc un clone de choix pour modéliser un épithélium intestinal homogène et robuste.

Afin de reproduire au mieux la muqueuse intestinale, les cellules Caco-2 sont généralement cultivées sur des inserts de culture cylindrique nichés au sein d'un puits de plaque de culture cellulaire, tapissés d'une surface semi-perméable en polycarbonate, avec une taille de pores définie, établissant des chambres apicales et basolatérales. Ces deux chambres ne sont séparées que par la monocouche de cellules. Les pôles apicaux et basolatéraux représentent le côté luminal et sanguin/lymphatique du tractus gastro-intestinal, respectivement. Ainsi, lorsque les cellules arrivent à confluence et se différencient (en 21 jours), la surface cellulaire qui fait face au milieu supérieur prend la forme d'une bordure en brosse et ressemble à la

membrane luminale de l'épithélium intestinal humain tandis que la membrane basolatérale repose sur la membrane perméable et modélise le pôle cellulaire en contact avec le compartiment sanguin (Hilgers et al. 1990). Cette technique de culture permet d'accéder aux deux pôles de la cellule, et donc d'étudier l'absorption intestinale des micronutriments. Ainsi, grâce à cet outil largement validé dans la littérature, de nombreuses études ont montré la capacité des cellules Caco-2 et particulièrement le clone TC7 à absorber et sécréter des molécules d'intérêt. En ce qui concerne les molécules liposolubles et particulièrement les lipides : les AG libres sont efficacement absorbés et incorporés dans les phospholipides et les triacylglycérols tandis que le cholestérol est efficacement absorbé sous forme micellaire (Trotter et al. 1996; Mehran et al. 1997; Compassi et al. 1997; Homan, Hamelehle 1998). Elles ont également démontré leur capacité à absorber les caroténoïdes (Garrett et al. 1999; 2000) et la vitamine E (Traber et al. 1990), ce qui en fait un modèle pertinent pour notre étude en termes d'absorption. De plus, les cellules Caco-2 sont capables d'éditer l'ARNm de l'apoB dans certaines conditions définies, permettant la sécrétion à la fois de l'apoB-48 et de l'apoB-100 (van Greevenbroek et al. 2000). Enfin, une caractéristique clé des cellules Caco-2/TC7 est leur capacité à sécréter des particules lipoprotéiques riches en lipides. En effet, Salvini et al. (2002) ont montré que le clone TC7, particulièrement, sécrète des lipides exogènes au niveau basolatéral plus efficacement que la lignée cellulaire parentale, ce qui en fait un modèle idéal pour étudier l'absorption intestinale des lipides (Salvini et al. 2002). De même, de nombreuses études ont établi la capacité des cellules Caco-2 à synthétiser et sécréter les principaux produits intracellulaires, c'est-à-dire les triglycérides, les phospholipides et les esters de cholestérol sous forme de lipoprotéines (Traber et al. 1987; Field et al. 1987; Dashti et al. 1990; Ranheim et al. 1992). Ainsi, en conditions de culture basales, les cellules Caco-2 produisent principalement des LDL (20-28 nm) ainsi que des HDL discoïdales ( $15,6 \pm 3,9$  nm) et sphériques ( $10,2 \pm 3,9$  nm), et de petites quantités de VLDL (28-90 nm) (Hughes et al. 1987). Toutes ces caractéristiques justifient l'utilisation des cellules Caco-2/TC7 et en fait une lignée cellulaire pertinente et robuste pour développer un modèle d'étude in vitro de l'intestin grêle des patients atteints de FHBL.

Afin de créer nos modèles, nous avons choisis l'inactivation des gènes *SARIB* et *MTTP*, par le système d'édition du génome CRISPR/Cas9. En effet, l'inactivation d'un gène permet d'étudier spécifiquement une voie métabolique contrairement aux inhibiteurs chimiques souvent capable de cibler plusieurs protéines au sein d'une cellule. De plus, cette technique s'est considérablement améliorée au cours des dix dernières années, permettant l'inactivation



des gènes de façon plus efficace et à moindre coût. L'avantage substantiel de cette technologie par rapport à la technologie des TALENs est sa mise en place plus simple. En effet, alors que la technique des TALENs repose sur le design et la création d'une protéine recombinante spécifique à chaque cible génomique sensible à la méthylation de l'ADN, la technique du CRISPR/Cas9 repose sur une nucléase Cas9 inchangée, insensible à la présence ou non d'un groupement méthyle, et un simple ARN guide spécifique, plus simple à produire (Chuang, Lin 2021). Cette technique permet également une invalidation permanente et stable d'un gène, à l'inverse des siRNA dont l'effet n'est que transitoire.

Ainsi, au cours de ce travail nous avons réussi à créer, à partir d'une souche cellulaire faisant consensus pour l'étude de la muqueuse intestinale, un modèle knock-out stable, dont l'absence de protéine, largement démontrée en Western-Blot, persiste au cours du temps. La persistance et l'homogénéité du modèle assure une reproductibilité des résultats au fil du temps. De plus, les effets de cette invalidation sur le profil phénotypique (observé en microscopie optique) et sur l'expression génique (évaluée par qPCR), est comparable et concorde avec ce qui a été observé dans des modèles murins (Xie et al. 2013; Auclair et al. 2021). Ainsi, l'accumulation lipidique intracellulaire observée dans les clones dépourvus des protéines MTP et Sar1b est cohérente avec l'accumulation de cholestérol et de triglycérides observée dans les entérocytes de souris *Mttp*<sup>-/-</sup> et de souris mutantes Sar1b (Xie et al. 2013; Auclair et al. 2021), par rapport aux souris sauvages. De même, l'altération de la sécrétion de TG et de cholestérol par nos clones mutés, est cohérent avec la diminution significative des taux de cholestérol et de TG plasmatique chez les souris présentant une déficience en *Mttp* spécifique de l'intestin et chez les souris mutantes Sar1b (Xie et al. 2013; Auclair et al. 2021). La concordance phénotypique de notre modèle avec les modèles murins et avec les anomalies histologiques observées dans les biopsies intestinales des patients offre donc une combinaison de modèles pertinents pour l'étude de ces pathologies.

Les cellules Caco-2/TC7 *MTTP*<sup>-</sup> ou *SAR1B*-KO représentent donc un modèle pratique, facile à utiliser, peu coûteux et reproductible pour l'étude de l'épithélium intestinal de patients FHBL. Cependant, comme tout modèle, il présente plusieurs limites. Tout d'abord, un modèle cellulaire ne reflète pas la physiologie in vivo. En effet, l'épithélium humain est constitué de plusieurs types cellulaires, et non uniquement d'entérocytes, qui communiquent entre elles. Par exemple, l'absence de lymphocytes peut ne pas refléter l'état inflammatoire de l'intestin retrouvé en clinique, pouvant également perturber les entérocytes. De plus, une monocouche de cellules Caco-2 n'est pas recouverte de mucus comme le sont les entérocytes humains. Or,

cette couche glycoprotéique viscoélastique insoluble dans l'eau, présente dans l'épithélium intestinal, joue un rôle très important en tant que barrière physique et peut impacter l'absorption de certains micronutriments et molécules thérapeutiques. Ainsi, le transport des molécules lipophiles est fortement influencé par la présence d'acides biliaires et de phospholipides, et la solubilité d'un composé dans la couche de mucus ainsi que dans la couche d'eau non agitée proche de l'épithélium influencera fortement l'absorption in vivo. De plus, notre modèle possède une limitation importante inhérente aux cellules Caco-2/TC7 qui sont dites « mauvaises sécrétrices ». En effet, Levy et al. ont constaté que ces cellules sécrètent moins de 10 % des lipides absorbés et synthétisés quelles que soient les conditions de culture, la concentration et le type d'AG exogènes, ou la période d'incubation (Levy et al. 1995). Il s'agit là d'une limitation non négligeable, car ce taux de sécrétion, relativement éloigné de la réalité physiologique, suppose des contraintes techniques en termes de détection et d'analyse des résultats. Enfin, une des limitations de la création d'un modèle unique est qu'il ne peut pas permettre de reproduire la grande variabilité des génotypes trouvés chez les patients FHBL. En effet, comme discuté en introduction, au moins 75 mutations causales de FHBL-SD3 ont été rapportées et 16 variants pathogènes de *SARIB* ont été rapportées or la technique CRISPR/Cas9 ne permet de générer qu'un seul type de mutation aléatoire dans un exon spécifique, préalablement choisis en fonction des possibilités de design du gRNA. Pourtant, on ne peut écarter l'hypothèse qu'une mutation entraînant la synthèse d'une protéine de 854 AA non fonctionnelle, n'a pas les mêmes conséquences en termes de stress intracellulaire et d'encombrement du réticulum endoplasmique, par rapport à la synthèse d'une protéine de 233 AA (cf. Annexe 1). Pour finir, il ne faut pas oublier le rôle potentiel du foie et d'autres tissus qui sont également affectés par les mutations, et qui peuvent interférer avec le métabolisme et la distribution des lipides et des micronutriments liposolubles. Ainsi, bien que les cellules Caco-2 constituent en général un outil puissant pour étudier les propriétés de l'épithélium intestinal, il convient d'être prudent dans l'extrapolation des données de ces modèles in vitro à la situation in vivo.

## 5.2. Des résultats innovants

Bien qu'il existe, à l'instar de tout modèle, des limitations à nos clones KO, ils n'en restent pas moins des modèles pertinents nous permettant de mieux comprendre les problématiques d'absorption des micronutriments liposolubles des patients FHBL. En effet, une fois caractérisés et validés, nos modèles nous ont permis d'étudier la sécrétion d' $\alpha$ -tocophérol,

d'acétate de tocophérol (TAC) et d' $\alpha$ -tocophéryl polyéthylène glycol succinate 1000 (TPGS). Le TPGS est une molécule amphiphile de synthèse issue de l'estérification d'une molécule de succinate d' $\alpha$ -tocophérol, formant une tête hydrophobe, par un groupement polyéthylène glycol 1000 (PEG 1000, molécule comportant environ 23 unités d'oxyde d'éthylène), formant une chaîne hydrophile (le PEG 1000). Cette molécule a été envisagée par Cuerq et al. (2018) comme alternative au TAC, très peu absorbé en raison de sa faible biodisponibilité, pour la supplémentation des patients FHBL en vitamine E. Nous avons montré que : (1) la sécrétion de l' $\alpha$ -tocophérol est significativement diminuée dans tous les clones knock-out, et de manière plus importante dans les clones *MTTP-KO* par rapport aux clones *SARIB-KO*, (2) la sécrétion de TAC est légèrement mais significativement diminuée dans les clones *MTTP-KO* mais pas dans les clones *SARIB-KO* et (3) la sécrétion de TPGS, en très faibles quantités plus faible n'est pas significativement différente entre les cellules non mutées et les cellules knock-out.

Tout d'abord, ces résultats confirment l'altération de la sécrétion de vitamine E par les cellules intestinales de patients FHBL. Le fait que nous ayons observé une sécrétion d' $\alpha$ -tocophérol plus faible dans les clones *MTTP-KO* par rapport aux clones *SARIB-KO* est cohérent avec les observations cliniques mettant en évidence que les patients ABL FHBL-SD1 présentent une carence en vitamine E plus sévère que les patients FHBL-SD3 (Sissaoui et al. 2021). Cependant, la sécrétion n'étant pas nulle, ces données sont en accord avec les études montrant que la voie HDL, théoriquement non altérée chez les patients FHBL, est impliquée dans l'absorption intestinale de la vitamine E (Anwar et al. 2007; Iqbal, Hussain 2009; Reboul 2017; 2019b). Nos résultats sont également cohérents avec notre étude *in vitro* (Cuerq et al. 2021) visant à caractériser l'absorption de l' $\alpha$ -tocophérol, du TAC et du TPGS dans les cellules Caco-2/TC7. Cette étude a rapporté une sécrétion basolatérale de TAC sous sa forme intacte, ce que nous avons confirmé, à la fois dans les cellules sauvages et dans les cellules mutées. Ces deux études ont également montré une sécrétion de tocophérol, dans les cellules caco-2 non mutées, plus importante lorsqu'il est apporté sous forme libre par rapport à un apport sous forme estérifiée (TAC). Ce profil s'observe également dans les clones mutés, bien que les quantités absolues soient inférieures par rapport aux cellules contrôles. Par ailleurs, la sécrétion de TAC a été modestement affectée dans nos clones knock-out, tandis que la sécrétion d' $\alpha$ -tocophérol dérivé de l'hydrolyse du TAC a été significativement réduite. Ceci suggère que la sécrétion d' $\alpha$ -tocophérol libre est plus dépendante du métabolisme lipidique intracellulaire que sa forme estérifiée, probablement parce que la sécrétion de TAC est médiée par une voie alternative (et relativement inefficace). Enfin, la sécrétion de TPGS

n'a pas été significativement modifiée entre les cellules témoins et les clones knock-out, probablement en raison de la quantité extrêmement faible de TPGS sécrétée qui ne permet pas de mettre en évidence une différence significative, conformément à nos observations précédentes (Cuerq et al. 2021). Ces résultats sont en accord avec un essai clinique rapportant que le TAC est mieux absorbé que le TPGS chez des volontaires adultes sains après une dose orale unique et que ce dernier avait un effet minime sur l' $\alpha$ -tocophérol plasmatique (Traber, Schiano, et al. 1994).

Un deuxième axe important de ce travail sont les données concernant les caroténoïdes. En effet, ces micronutriments fortement lipophiles, bien que jouant un rôle physiologique majeur, n'ont jamais été réellement envisagés dans la prise en charge des patients FHBL. Cette mise à l'écart est probablement dû au fait, qu'à ce jour, aucun des caroténoïdes n'est considéré comme directement impliqué dans une voie métabolique vitale et ne sont donc pas considérés comme essentiels. De ce fait, ils ne font l'objet d'aucune recommandation officielle de consommation, à l'inverse des micronutriments, et aucune définition de carence n'existe à leur égard. Pourtant, quelques études recensées dans la littérature ont rapporté des taux faibles de caroténoïdes, et particulièrement de  $\beta$ -carotène (cf. annexe 5). Connaissant, le mécanisme d'absorption de ces molécules, il était intéressant d'étudier l'impact de l'altération de la voie des chylomicrons sur l'absorption de quatre caroténoïdes majeurs. Ainsi, nos modèles cellulaires ont permis de montrer une diminution significative, mais non nulle, de l'absorption intestinale d' $\alpha/\beta$ -carotène, de lutéine et de zéaxanthine. Ces micronutriments n'ayant jamais été étudiés dans ce contexte, ces résultats ouvrent une piste de réflexion. En effet, ces résultats additionnés aux quelques données de la littérature, encore trop peu nombreuses, sur les potentiels déficits plasmatiques en caroténoïdes chez les patients FHBL, nous a amené à vouloir rechercher et caractériser ces taux plasmatiques afin d'apporter des données récentes et claires. Nos dosages ont donc montré de façon claire, l'existence d'un effondrement des taux plasmatiques en caroténoïdes.

Ces résultats nous ont amené à émettre l'hypothèse d'une éventuelle implication des caroténoïdes dans la physiopathologie des FHBL. Ceci est actuellement investiguée dans une étude clinique visant à caractériser plus le statut en caroténoïdes et en stress oxydant des patients, afin de rechercher une potentielle corrélation entre déficits plasmatiques et la fonction ophtalmique.

### 5.3. Perspectives

Ces travaux ouvrent la voie à plusieurs axes de réflexion et de recherche. Tout d'abord, la création des modèles cellulaires représentatifs de la FHBL-SD1 et de la FHBL-SD3 ayant été concluante, il serait à présent intéressant d'envisager la mise en place d'un modèle APOB-KO de FHBL-SD2 qui permettrait de compléter nos résultats *in vitro* avec des résultats spécifiques à cette mutation. Par ailleurs, il pourrait être intéressant, de compléter la caractérisation des clones avec des expériences de réexpression de MTP ou de Sar1b par transfection plasmidique afin de s'assurer de la restauration partielle ou totale de l'activité de transfert des TAG et de la sécrétion d'apoB, et surtout de déterminer les conséquences directes de la déficience en MTP ou Sar1b, par comparaison phénotypique. Ces lignées cellulaires stables déficientes en MTP et Sar1b offrent des outils pertinents pour étudier la stabilité des protéines et les défauts de transfert des lipides, et sont également utiles pour identifier les partenaires qui peuvent interagir avec ces protéines, par exemple avec des analyses de colocalisation en microscopie de fluorescence. Ces modèles peuvent également permettre d'identifier des protéines éventuellement dépendantes de la MTP ou de Sar1b pour leur synthèse et leur sécrétion. En outre, ces cellules offrent aussi la possibilité d'identifier les mécanismes et processus métaboliques compensatoires secondaires à la perte de la fonction de chacune de ces protéines, notamment l'importance et l'efficacité de la voie HDL. En plus de fournir des possibilités d'approfondissements mécanistiques du transport et de la synthèse intra-entérocytaire des lipides, ces cellules sont applicables à la recherche de l'impact de ses mutations sur les voies métaboliques des vitamines et micronutriments liposolubles, notamment les caroténoïdes n'ayant pas été étudié *in vitro* dans ce travail (lycopène et  $\beta$ -cryptoxanthine), et à l'identification de voies métaboliques alternatives.

Concernant les enjeux cliniques des FHBL, les données sur la vitamine E et ses dérivés ont apporté un élément d'explication aux difficultés de supplémentation chez les patients FHBL et ont montré les faiblesses de l'utilisation du TPGS en tant qu'alternative thérapeutique au TAC. Pourtant, cette forme présente un intérêt majeur d'être présentée sous forme buvable et non sous forme gélule, ce qui facilite la compliance du patient compte tenu des quantités à ingérer. Il serait donc à présent intéressant d'utiliser nos modèles pour rechercher et tester différentes formulations de vitamine E alliant efficacité et facilité de prise pour le patient. De même, les résultats sur les caroténoïdes devraient ouvrir une réflexion sur l'importance de supplémenter les patients, et de tester également différentes formulations ou vecteurs de caroténoïdes pour assurer une supplémentation efficace et peu contraignante pour les patients.

D'ailleurs, la suite directe de notre étude pilote sera la mise en place d'une étude clinique permettant d'étudier l'intérêt d'un apport de caroténoïdes en sus du traitement actuel des patients FHBL.

De façon plus générale, ces modèles de pathologies offrent une opportunité de comprendre les mécanismes d'absorption et le métabolisme intra-entérocytaire des vitamines et micronutriments liposolubles ainsi que leurs importances dans le maintien de fonctions physiologiques telles que la vision.

En conclusion, ce travail de thèse nous a permis d'étudier différents points et les principaux résultats de nos travaux montrent que :

- Les cellules Caco-2 sauvages sont capable d'absorber et de sécréter le TPGS et le TAC, en partie sous forme entière et partie sous forme hydrolysée, montrant que la vitamine E peut être sécrétée du côté basolatéral sous formes estérifiées,
- L'absorption et la sécrétion du TPGS sont beaucoup plus faibles que celles du TAC et de l' $\alpha$ -tocophérol, indiquant que le TPGS n'est malheureusement pas une alternative thérapeutique efficace pour la supplémentation en vitamine E,
- L'étude in vitro dans nos modèles d'entérocytes KO confirme la malabsorption des caroténoïdes testés,
- Les dosages plasmatiques effectués chez les patients régulièrement suivis, indiquent des taux effondrés de caroténoïdes.
- Finalement, nous avons confirmé le statut déficitaire en caroténoïdes de nos patients. Malheureusement, l'étude clinique n'a pas pu être finalisée du fait des difficultés d'organisation des plages de consultation spécifiques et de plusieurs désistements de patients. Nous prévoyons de terminer l'étude clinique au cours des prochains mois.

# BIBLIOGRAPHIE

- ABUASAL, Bilal, SYLVESTER, Paul W. et KADDOUMI, Amal, 2010. Intestinal absorption of gamma-tocotrienol is mediated by Niemann-Pick C1-like 1: in situ rat intestinal perfusion studies. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. juin 2010. Vol. 38, n° 6, pp. 939-945. DOI 10.1124/dmd.109.031567.
- ABUMRAD, N. A., EL-MAGHRABI, M. R., AMRI, E. Z., LOPEZ, E. et GRIMALDI, P. A., 1993. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *The Journal of Biological Chemistry*. 25 août 1993. Vol. 268, n° 24, pp. 17665-17668.
- ABUMRAD, Nada A. et DAVIDSON, Nicholas O., 2012. Role of the gut in lipid homeostasis. *Physiological Reviews*. juillet 2012. Vol. 92, n° 3, pp. 1061-1085. DOI 10.1152/physrev.00019.2011.
- ACAR, Sezer, 2020. Novel MTTP Gene Mutation in a Case of Abetalipoproteinemia with Central Hypothyroidism. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. 3 juin 2020. Vol. 12, n° 2, pp. 223-224. DOI 10.4274/jcrpe.galenos.2020.2020.0015.
- ACTON, S. L., SCHERER, P. E., LODISH, H. F. et KRIEGER, M., 1994. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 19 août 1994. Vol. 269, n° 33, pp. 21003-21009.
- ACTON, S., RIGOTTI, A., LANDSCHULZ, K. T., XU, S., HOBBS, H. H. et KRIEGER, M., 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science (New York, N.Y.)*. 26 janvier 1996. Vol. 271, n° 5248, pp. 518-520. DOI 10.1126/science.271.5248.518.
- AGARWAL, S. et RAO, A. V., 2000. Carotenoids and chronic diseases. *Drug Metabolism and Drug Interactions*. 2000. Vol. 17, n° 1-4, pp. 189-210. DOI 10.1515/dmdi.2000.17.1-4.189.
- AGE-RELATED EYE DISEASE STUDY 2 (AREDS2) RESEARCH, 2013. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *Jama*. 2013. Vol. 309, n° 19, pp. 2005-2015.
- AGE-RELATED EYE DISEASE STUDY RESEARCH, 2001a. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*. octobre 2001. Vol. 119, n° 10, pp. 1417-1436. DOI 10.1001/archophth.119.10.1417.
- AGE-RELATED EYE DISEASE STUDY RESEARCH, 2001b. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E and beta carotene for age-related cataract and vision loss: AREDS report no. 9. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*. octobre 2001. Vol. 119, n° 10, pp. 1439-1452. DOI 10.1001/archophth.119.10.1439.
- AGE-RELATED EYE DISEASE STUDY RESEARCH, 2001c. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E and beta carotene for age-related cataract and vision loss: AREDS report no. 9. *Archives of Ophthalmology*. 2001. Vol. 119, n° 10, pp. 1439-1452.
- AGE-RELATED EYE DISEASE STUDY RESEARCH GROUP, 1999. The Age-Related Eye Disease Study (AREDS): design implications. AREDS report no. 1. *Controlled Clinical Trials*. décembre 1999. Vol. 20, n° 6, pp. 573-600. DOI 10.1016/s0197-2456(99)00031-8.
- AGUGLIA, U., ANNESI, G., PASQUINELLI, G., SPADAFORA, P., GAMBARDELLA, A., ANNESI, F., PASQUA, A. A., CAVALCANTI, F., CRESCIBENE, L., BAGALÀ, A., BONO, F., OLIVERI, R. L., VALENTINO, P., ZAPPIA, M. et QUATTRONE, A., 2000. Vitamin E deficiency due to chylomicron retention disease in Marinesco-Sjögren syndrome. *Annals of Neurology*. février 2000. Vol. 47, n° 2, pp. 260-264.
- AHMED, Shazia S., LOTT, McGregor N. et MARCUS, Dennis M., 2005. The macular xanthophylls. *Survey of Ophthalmology*. avril 2005. Vol. 50, n° 2, pp. 183-193. DOI 10.1016/j.survophthal.2004.12.009.
- AKAMATSU, K., SAKAUE, H., TADA, K., MIZUKAMI, Y., YAMAGUCHI, S., TANAKA, A. et OHTA, Y., 1983. A case report of abetalipoproteinemia (Bassen-Kornzweig syndrome)--the first case in Japan. *Japanese Journal of Medicine*. août 1983. Vol. 22, n° 3, pp. 231-236. DOI 10.2169/internalmedicine1962.22.231.

- AKUFFO, Kwadwo Owusu, BEATTY, Stephen, PETO, Tunde, STACK, Jim, STRINGHAM, Jim, KELLY, David, LEUNG, Irene, CORCORAN, Laura et NOLAN, John M., 2017. The impact of supplemental antioxidants on visual function in nonadvanced age-related macular degeneration: a head-to-head randomized clinical trial. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2017. Vol. 58, n° 12, pp. 5347-5360.
- AKUFFO, Kwadwo Owusu, NOLAN, John M., HOWARD, Alan N., MORAN, Rachel, STACK, J., KLEIN, R., KLEIN, B. E., MEUER, S. M., SABOUR-PICKETT, S. et THURNHAM, D. I., 2015. Sustained supplementation and monitored response with differing carotenoid formulations in early age-related macular degeneration. *Eye*. 2015. Vol. 29, n° 7, pp. 902-912.
- ALBANES, D., HEINONEN, O. P., TAYLOR, P. R., VIRTAMO, J., EDWARDS, B. K., RAUTALAHTI, M., HARTMAN, A. M., PALMGREN, J., FREEDMAN, L. S., HAAPAKOSKI, J., BARRETT, M. J., PIETINEN, P., MALILA, N., TALA, E., LIIPPO, K., SALOMAA, E. R., TANGREA, J. A., TEPPONEN, L., ASKIN, F. B., TASKINEN, E., EROZAN, Y., GREENWALD, P. et HUTTUNEN, J. K., 1996. Alpha-Tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: effects of base-line characteristics and study compliance. *Journal of the National Cancer Institute*. 6 novembre 1996. Vol. 88, n° 21, pp. 1560-1570. DOI 10.1093/jnci/88.21.1560.
- ALDER, V. A., CRINGLE, S. J. et CONSTABLE, I. J., 1983. The retinal oxygen profile in cats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. janvier 1983. Vol. 24, n° 1, pp. 30-36.
- AL-MAHDILI, Huda A., HOOPER, Amanda J., SULLIVAN, David R., STEWART, Peter M. et BURNETT, John R., 2006. A mild case of abetalipoproteinemia in association with subclinical hypothyroidism. *Annals of Clinical Biochemistry*. novembre 2006. Vol. 43, n° Pt 6, pp. 516-519. DOI 10.1258/000456306778904650.
- ALSHAREEF, Rayan A., BANSAL, Alok S., CHIANG, Allen et KAISER, Richard S., 2015. Macular atrophy in a case of abetalipoproteinemia as only ocular clinical feature. *Canadian Journal of Ophthalmology. Journal Canadien D'ophtalmologie*. juin 2015. Vol. 50, n° 3, pp. e43-46. DOI 10.1016/j.cjco.2014.12.016.
- ALTMAN, J., 1972. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *The Journal of Comparative Neurology*. août 1972. Vol. 145, n° 4, pp. 399-463. DOI 10.1002/cne.901450402.
- ALTMANN, Scott W., DAVIS, Harry R., YAO, Xiaorui, LAVERTY, Maureen, COMPTON, Douglas S., ZHU, Li-ji, CRONA, James H., CAPLEN, Mary Ann, HOOS, Lizbeth M., TETZLOFF, Glen, PRIESTLEY, Tony, BURNETT, Duane A., STRADER, Catherine D. et GRAZIANO, Michael P., 2002. The identification of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) by expression cloning and its role in cholesterol absorption. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 30 janvier 2002. Vol. 1580, n° 1, pp. 77-93. DOI 10.1016/s1388-1981(01)00190-1.
- ALTMANN, Scott W., DAVIS, Harry R., ZHU, Li-ji, YAO, Xiaorui, HOOS, Lizbeth M., TETZLOFF, Glen, IYER, Sai Prasad N., MAGUIRE, Maureen, GOLOVKO, Andrei et ZENG, Ming, 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*. 2004. Vol. 303, n° 5661, pp. 1201-1204.
- AMENGUAL, Jaume, LOBO, Glenn P., GOLCZAK, Marcin, LI, Hua Nan M., KLIMOVA, Tatyana, HOPPEL, Charles L., WYSS, Adrian, PALCZEWSKI, Krzysztof et VON LINTIG, Johannes, 2011. A mitochondrial enzyme degrades carotenoids and protects against oxidative stress. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. mars 2011. Vol. 25, n° 3, pp. 948-959. DOI 10.1096/fj.10-173906.
- ANDERSON, C. M., TOWNLEY, R. R., FREEMAN, null et JOHANSEN, P., 1961. Unusual causes of steatorrhea in infancy and childhood. *The Medical Journal of Australia*. 14 octobre 1961. Vol. 48(2), pp. 617-622. DOI 10.5694/j.1326-5377.1961.tb69860.x.
- ANDERSON, Charlotte M., TOWNLEY, R. R. W., FREEMAN, Mavis et JOHANSEN, Patricia, 1961. Unusual causes of steatorrhea in infancy and childhood. *Medical Journal of Australia*. 1961. Vol. 2, n° 16, pp. 617-622.
- ANTONARAKIS, Stylianos E. et COOPER, David N., 2001. Mutations in human genetic disease. *e LS*. 2001.
- ANTONNY, B., BERAUD-DUFOUR, S., CHARDIN, P. et CHABRE, M., 1997. N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry*. 15 avril 1997. Vol. 36, n° 15, pp. 4675-4684. DOI 10.1021/bi962252b.
- ANWAR, Kamran, IQBAL, Jahangir et HUSSAIN, M. Mahmood, 2007. Mechanisms involved in vitamin E transport by primary enterocytes and in vivo absorption. *Journal of Lipid Research*. septembre 2007. Vol. 48, n° 9, pp. 2028-2038. DOI 10.1194/jlr.M700207-JLR200.



- ANWAR, Kamran, KAYDEN, Herbert J. et HUSSAIN, M. Mahmood, 2006. Transport of vitamin E by differentiated Caco-2 cells. *Journal of Lipid Research*. juin 2006. Vol. 47, n° 6, pp. 1261-1273. DOI 10.1194/jlr.M500523-JLR200.
- ARITA, Makoto, NOMURA, Kazuhiro, ARAI, Hiroyuki et INOUE, Keizo, 1997.  $\alpha$ -Tocopherol transfer protein stimulates the secretion of  $\alpha$ -tocopherol from a cultured liver cell line through a brefeldin A-insensitive pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997. Vol. 94, n° 23, pp. 12437-12441. DOI 10.1073/pnas.94.23.12437.
- ARMAND, M., BOREL, P., DUBOIS, C., SENFT, M., PEYROT, J., SALDUCCI, J., LAFONT, H. et LAIRON, D., 1994. Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. *The American Journal of Physiology*. mars 1994. Vol. 266, n° 3 Pt 1, pp. G372-381. DOI 10.1152/ajpgi.1994.266.3.G372.
- ARTURSSON, P. et KARLSSON, J., 1991. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 29 mars 1991. Vol. 175, n° 3, pp. 880-885. DOI 10.1016/0006-291x(91)91647-u.
- ARTURSSON, P., PALM, K. et LUTHMAN, K., 2001. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1 mars 2001. Vol. 46, n° 1-3, pp. 27-43. DOI 10.1016/s0169-409x(00)00128-9.
- ASTNER, S., WU, A., CHEN, J., PHILIPS, N., RIUS-DIAZ, F., PARRADO, C., MIHM, M. C., GOUKASSIAN, D. A., PATHAK, M. A. et GONZÁLEZ, S., 2007. Dietary lutein/zeaxanthin partially reduces photoaging and photocarcinogenesis in chronically UVB-irradiated Skh-1 hairless mice. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2007. Vol. 20, n° 6, pp. 283-291. DOI 10.1159/000107576.
- ATTIE, Alan D., 2007. ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis. *Trends in Biochemical Sciences*. avril 2007. Vol. 32, n° 4, pp. 172-179. DOI 10.1016/j.tibs.2007.02.001.
- ATZEL, A. et WETTERAU, J. R., 1993. Mechanism of microsomal triglyceride transfer protein catalyzed lipid transport. *Biochemistry*. 5 octobre 1993. Vol. 32, n° 39, pp. 10444-10450. DOI 10.1021/bi00090a021.
- ATZEL, A. et WETTERAU, J. R., 1994. Identification of two classes of lipid molecule binding sites on the microsomal triglyceride transfer protein. *Biochemistry*. 27 décembre 1994. Vol. 33, n° 51, pp. 15382-15388. DOI 10.1021/bi00255a019.
- AUCLAIR, Nickolas, SANÉ, Alain T., AHMARANI, Lena, PATEY, Nathalie, BEAULIEU, Jean-François, PERETTI, Noel, SPAHIS, Schohrya et LEVY, Emile, 2021. Sar1b mutant mice recapitulate gastrointestinal abnormalities associated with chylomicron retention disease. *Journal of lipid research*. 2021. Vol. 62.
- AULETTA, F. J. et GULBRANDSEN, C. L., 1974. Transport of beta-carotene in serum of individuals with carotenemia. *Clinical Chemistry*. décembre 1974. Vol. 20, n° 12, pp. 1578-1579.
- BAHRAMI, Hossein, MELIA, Michele et DAGNELIE, Gislin, 2006. Lutein supplementation in retinitis pigmentosa: PC-based vision assessment in a randomized double-masked placebo-controlled clinical trial [NCT00029289]. *BMC ophthalmology*. 2006. Vol. 6, n° 1, pp. 1-12.
- BAKILLAH, A. et HUSSAIN, M. M., 2001. Binding of microsomal triglyceride transfer protein to lipids results in increased affinity for apolipoprotein B: evidence for stable microsomal MTP-lipid complexes. *The Journal of Biological Chemistry*. 17 août 2001. Vol. 276, n° 33, pp. 31466-31473. DOI 10.1074/jbc.M100390200.
- BAKILLAH, A., NAYAK, N., SAXENA, U., MEDFORD, R. M. et HUSSAIN, M. M., 2000. Decreased secretion of ApoB follows inhibition of ApoB-MTP binding by a novel antagonist. *Biochemistry*. 25 avril 2000. Vol. 39, n° 16, pp. 4892-4899. DOI 10.1021/bi9924009.
- BAKILLAH, Ahmed et HUSSAIN, M. Mahmood, 2016. Mice subjected to aP2-Cre mediated ablation of microsomal triglyceride transfer protein are resistant to high fat diet induced obesity. *Nutrition & Metabolism*. 2016. Vol. 13, pp. 1. DOI 10.1186/s12986-016-0061-6.
- BALAZS, Zoltan, PANZENBOECK, Ute, HAMMER, Astrid, SOVIC, Andrea, QUEHENBERGER, Oswald, MALLE, Ernst et SATTLER, Wolfgang, 2004. Uptake and transport of high-density lipoprotein (HDL) and HDL-associated alpha-tocopherol by an in vitro blood-brain barrier model. *Journal of Neurochemistry*. mai 2004. Vol. 89, n° 4, pp. 939-950. DOI 10.1111/j.1471-4159.2004.02373.x.
- BALDERMANN, Susanne, KATO, Masaya, FUJITA, Akira, FLEISCHMANN, Peter, WINTERHALTER, Peter et WATANABE, Naoharu, 2013. Biodegradation of Carotenoids-An Important Route to Scent Formation. In : *Carotenoid Cleavage Products*. ACS Publications. pp. 65-72.

- BANNYKH, S. I., ROWE, T. et BALCH, W. E., 1996. The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *The Journal of Cell Biology*. octobre 1996. Vol. 135, n° 1, pp. 19-35. DOI 10.1083/jcb.135.1.19.
- BARLOWE, C., D'ENFERT, C. et SCHEKMAN, R., 1993. Purification and characterization of SAR1p, a small GTP-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*. 15 janvier 1993. Vol. 268, n° 2, pp. 873-879.
- BARLOWE, C., ORCI, L., YEUNG, T., HOSOBUCHI, M., HAMAMOTO, S., SALAMA, N., REXACH, M. F., RAVAZZOLA, M., AMHERDT, M. et SCHEKMAN, R., 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*. 17 juin 1994. Vol. 77, n° 6, pp. 895-907. DOI 10.1016/0092-8674(94)90138-4.
- BASSEN, F. A. et KORNZWEIG, A. L., 1950. Malformation of the erythrocytes in a case of atypical retinitis pigmentosa. *Blood*. avril 1950. Vol. 5, n° 4, pp. 381-387.
- BEATTY, Stephen, CHAKRAVARTHY, Usha, NOLAN, John M., MULDREW, Katherine A., WOODSIDE, Jayne V., DENNY, Frances et STEVENSON, Michael R., 2013. Secondary outcomes in a clinical trial of carotenoids with coantioxidants versus placebo in early age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2013. Vol. 120, n° 3, pp. 600-606.
- BEATTY, Stephen, MURRAY, Ian J., HENSON, David B., CARDEN, Dave, KOH, Hui-Hiang et BOULTON, Michael E., 2001. Macular pigment and risk for age-related macular degeneration in subjects from a Northern European population. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2001. Vol. 42, n° 2, pp. 439-446.
- BEDNAREK, S. Y., ORCI, L. et SCHEKMAN, R., 1996. Traffic COPs and the formation of vesicle coats. *Trends in Cell Biology*. décembre 1996. Vol. 6, n° 12, pp. 468-473. DOI 10.1016/0962-8924(96)84943-9.
- BEN AMEUR, S., ALOULOU, H., JLIDI, N., KAMOUN, F., CHABCHOUB, I., DI FILIPPO, M., SFAIHI, L. et HACHICHA, M., 2016. Chylomicron retention disease: A rare cause of chronic diarrhea. *Archives De Pédiatrie: Organe Officiel De La Société Française De Pédiatrie*. juillet 2016. Vol. 23, n° 7, pp. 735-737. DOI 10.1016/j.arcped.2016.04.010.
- BEN-DOR, Anat, STEINER, Michael, GHEBER, Larisa, DANILENKO, Michael, DUBI, Noga, LINNEWIEL, Karin, ZICK, Anat, SHARONI, Yoav et LEVY, Joseph, 2005. Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system. *Molecular Cancer Therapeutics*. janvier 2005. Vol. 4, n° 1, pp. 177-186.
- BENOIST, F. et GRAND-PERRET, T., 1997. Co-translational degradation of apolipoprotein B100 by the proteasome is prevented by microsomal triglyceride transfer protein. Synchronized translation studies on HepG2 cells treated with an inhibitor of microsomal triglyceride transfer protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 15 août 1997. Vol. 272, n° 33, pp. 20435-20442. DOI 10.1074/jbc.272.33.20435.
- BERNARD, Geneviève, PANISSET, Michel, SADIKOT, Abbas F. et CHOUNARD, Sylvain, 2010. Chylomicron retention disease: dystonia as a new clinical feature. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*. 15 août 2010. Vol. 25, n° 11, pp. 1755-1756. DOI 10.1002/mds.23165.
- BERNSTEIN, Paul S., KHACHIK, Frederick, CARVALHO, Lorena S., MUIR, Garth J., ZHAO, Da-You et KATZ, Nikita B., 2001. Identification and quantitation of carotenoids and their metabolites in the tissues of the human eye. *Experimental eye research*. 2001. Vol. 72, n° 3, pp. 215-223.
- BERRIOT-VARQUEAUX, N., AGGERBECK, L. P., SAMSON-BOUMA, M. et WETTERAU, J. R., 2000. The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *Annual Review of Nutrition*. 2000. Vol. 20, pp. 663-697. DOI 10.1146/annurev.nutr.20.1.663.
- BERRIOT-VARQUEAUX, N., DANNOURA, A. H., MOREAU, A., VERTHIER, N., SASSOLAS, A., CADIOT, G., LACHAUX, A., MUNCK, A., SCHMITZ, J., AGGERBECK, L. P. et SAMSON-BOUMA, M. E., 2001. Apolipoprotein B48 glycosylation in abetalipoproteinemia and Anderson's disease. *Gastroenterology*. novembre 2001. Vol. 121, n° 5, pp. 1101-1108. DOI 10.1053/gast.2001.29331.
- BERROW, Emma J., BARTLETT, Hannah E., EPERJESI, Frank et GIBSON, Jonathan M., 2013. The effects of a lutein-based supplement on objective and subjective measures of retinal and visual function in eyes with age-related maculopathy—a randomised controlled trial. *British journal of nutrition*. 2013. Vol. 109, n° 11, pp. 2008-2014.
- BERSON, Eliot L., ROSNER, Bernard, SANDBERG, Michael A., WEIGEL-DIFRANCO, Carol, BROCKHURST, Robert J., HAYES, K. C., JOHNSON, Elizabeth J., ANDERSON, Ellen J., JOHNSON, Chris A. et GAUDIO, Alexander R., 2010. Clinical trial of lutein in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A. *Archives of ophthalmology*. 2010. Vol. 128, n° 4, pp. 403-411.

- BESNARD, Philippe, NIOT, Isabelle, POIRIER, Hélène, CLÉMENT, Lionel et BERNARD, André, 2002. New insights into the fatty acid-binding protein (FABP) family in the small intestine. *Cellular Lipid Binding Proteins*. 2002. pp. 139-147.
- BEYDOUN, May A., BEYDOUN, Hind A., FANELLI-KUCZMARSKI, Marie T., WEISS, Jordan, HOSSAIN, Sharmin, CANAS, Jose Atilio, EVANS, Michele Kim et ZONDERMAN, Alan B., 2022. Association of Serum Antioxidant Vitamins and Carotenoids With Incident Alzheimer Disease and All-Cause Dementia Among US Adults. *Neurology*. 24 mai 2022. Vol. 98, n° 21, pp. e2150-e2162. DOI 10.1212/WNL.0000000000200289.
- BHOSALE, Prakash et BERNSTEIN, Paul S., 2005. Synergistic effects of zeaxanthin and its binding protein in the prevention of lipid membrane oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2005. Vol. 1740, n° 2, pp. 116-121.
- BI, Xiping, CORPINA, Richard A. et GOLDBERG, Jonathan, 2002. Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature*. 19 septembre 2002. Vol. 419, n° 6904, pp. 271-277. DOI 10.1038/nature01040.
- BIELLI, Anna, HANEY, Charles J., GABRESKI, Gavin, WATKINS, Simon C., BANNYKH, Sergei I. et ARIDOR, Meir, 2005. Regulation of Sar1 NH2 terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission. *The Journal of Cell Biology*. 19 décembre 2005. Vol. 171, n° 6, pp. 919-924. DOI 10.1083/jcb.200509095.
- BIERI, J. G. et EVARTS, R. P., 1974. Vitamin E activity of gamma-tocopherol in the rat, chick and hamster. *The Journal of Nutrition*. 1974. Vol. 104, n° 7, pp. 850-857. DOI 10.1093/jn/104.7.850.
- BISHARA, S., MERIN, S., COOPER, M., AZIZI, E., DELPRE, G. et DECKELBAUM, R. J., 1982. Combined vitamin A and E therapy prevents retinal electrophysiological deterioration in abetalipoproteinaemia. *The British Journal of Ophthalmology*. décembre 1982. Vol. 66, n° 12, pp. 767-770. DOI 10.1136/bjo.66.12.767.
- BJELAKOVIC, Goran, NIKOLOVA, Dimitrinka, GLUUD, Lise Lotte, SIMONETTI, Rosa G. et GLUUD, Christian, 2012. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 14 mars 2012. N° 3, pp. CD007176. DOI 10.1002/14651858.CD007176.pub2.
- BLACK, Dennis D., HAY, Rick V., ROHWER-NUTTER, Patricia L., ELLINAS, Herodotos, STEPHENS, Janet K., SHERMAN, Helayne, TENG, Ba-Bie, WHITINGTON, Peter F. et DAVIDSON, Nicholas O., 1991. Intestinal and hepatic apolipoprotein B gene expression in abetalipoproteinemia. *Gastroenterology*. 1991. Vol. 101, n° 2, pp. 520-528. DOI 10.5555/uri:pii:001650859190033H.
- BLOT, W. J., LI, J. Y., TAYLOR, P. R., GUO, W., DAWSEY, S. M. et LI, B., 1995. The Linxian trials: mortality rates by vitamin-mineral intervention group. *The American Journal of Clinical Nutrition*. décembre 1995. Vol. 62, n° 6 Suppl, pp. 1424S-1426S. DOI 10.1093/ajcn/62.6.1424S.
- BÖHM, Volker, LIETZ, Georg, OLMEDILLA-ALONSO, Begoña, PHELAN, David, REBOUL, Emmanuelle, BÁNATI, Diana, BOREL, Patrick, CORTE-REAL, Joana, DE LERA, Angel R, DESMARCHELIER, Charles, DULINSKA-LITEWKA, Joanna, LANDRIER, Jean-Francois, MILISAV, Irina, NOLAN, John, PORRINI, Marisa, RISO, Patrizia, ROOB, Johannes M, VALANOU, Elisavet, WAWRZYNIAK, Agata, WINKLHOFFER-ROOB, Brigitte M, RÜHL, Ralph et BOHN, Torsten, 2020. From carotenoid intake to carotenoid blood and tissue concentrations – implications for dietary intake recommendations. *Nutrition Reviews*. 7 août 2020. Vol. 79, n° 5, pp. 544-573. DOI 10.1093/nutrit/nuaa008.
- BOHN, Torsten, 2017. Bioactivity of Carotenoids - Chasms of Knowledge. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition*. mars 2017. Vol. 87, n° 1-2, pp. 5-9. DOI 10.1024/0300-9831/a000400.
- BOLDRINI, R., BISELLI, R. et BOSMAN, C., 2001. Chylomicron retention disease--the role of ultrastructural examination in differential diagnosis. *Pathology, Research and Practice*. 2001. Vol. 197, n° 11, pp. 753-757. DOI 10.1078/0344-0338-00154.
- BONE, R. A. et LANDRUM, J. T., 1992. Distribution of macular pigment components, zeaxanthin and lutein, in human retina. *Methods in Enzymology*. 1992. Vol. 213, pp. 360-366. DOI 10.1016/0076-6879(92)13137-m.
- BONE, R. A., LANDRUM, J. T., DIXON, Z., CHEN, Y. et LLERENA, C. M., 2000. Lutein and zeaxanthin in the eyes, serum and diet of human subjects. *Experimental Eye Research*. septembre 2000. Vol. 71, n° 3, pp. 239-245. DOI 10.1006/exer.2000.0870.

- BONE, R. A., LANDRUM, J. T., FERNANDEZ, L. et TARSIS, S. L., 1988. Analysis of the macular pigment by HPLC: retinal distribution and age study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. juin 1988. Vol. 29, n° 6, pp. 843-849.
- BONE, R. A., LANDRUM, J. T., HIME, G. W., CAINS, A. et ZAMOR, J., 1993. Stereochemistry of the human macular carotenoids. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. mai 1993. Vol. 34, n° 6, pp. 2033-2040.
- BONE, R. A., LANDRUM, J. T. et TARSIS, S. L., 1985. Preliminary identification of the human macular pigment. *Vision Research*. 1985. Vol. 25, n° 11, pp. 1531-1535. DOI 10.1016/0042-6989(85)90123-3.
- BONE, Richard A., LANDRUM, John T., CAO, Yisi, HOWARD, Alan N. et ALVAREZ-CALDERON, Francesca, 2007. Macular pigment response to a supplement containing meso-zeaxanthin, lutein and zeaxanthin. *Nutrition & Metabolism*. 11 mai 2007. Vol. 4, pp. 12. DOI 10.1186/1743-7075-4-12.
- BONE, Richard A., LANDRUM, John T., MAYNE, Susan T., GOMEZ, Christina M., TIBOR, Susan E. et TWAROSKA, Ewa E., 2001. Macular pigment in donor eyes with and without AMD: a case-control study. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2001. Vol. 42, n° 1, pp. 235-240.
- BONET, M. Luisa, CANAS, Jose A., RIBOT, Joan et PALOU, Andreu, 2015. Carotenoids and their conversion products in the control of adipocyte function, adiposity and obesity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 15 avril 2015. Vol. 572, pp. 112-125. DOI 10.1016/j.abb.2015.02.022.
- BONNARDEL, J. A. et DAVIS, R. A., 1995. In HepG2 cells, translocation, not degradation, determines the fate of the de novo synthesized apolipoprotein B. *The Journal of Biological Chemistry*. 1 décembre 1995. Vol. 270, n° 48, pp. 28892-28896. DOI 10.1074/jbc.270.48.28892.
- BOREL, P., GROLIER, P., ARMAND, M., PARTIER, A., LAFONT, H., LAIRON, D. et AZAIS-BRAESCO, V., 1996. Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. *Journal of Lipid Research*. février 1996. Vol. 37, n° 2, pp. 250-261.
- BOREL, Patrick, LIETZ, Georg, GONCALVES, Aurélie, SZABO DE EDELENYI, Fabien, LECOMPTE, Sophie, CURTIS, Peter, GOUMIDI, Louisa, CASLAKE, Muriel J., MILES, Elizabeth A., PACKARD, Christopher, CALDER, Philip C., MATHERS, John C., MINIHANE, Anne M., TOURNIAIRE, Franck, KESSE-GUYOT, Emmanuelle, GALAN, Pilar, HERCBERG, Serge, BREIDENASSEL, Christina, GONZÁLEZ GROSS, Marcela, MOUSSA, Myriam, MEIRHAEGHE, Aline et REBOUL, Emmanuelle, 2013. CD36 and SR-BI are involved in cellular uptake of provitamin A carotenoids by Caco-2 and HEK cells, and some of their genetic variants are associated with plasma concentrations of these micronutrients in humans. *The Journal of Nutrition*. avril 2013. Vol. 143, n° 4, pp. 448-456. DOI 10.3945/jn.112.172734.
- BOUCHOUX, Julien, BEILSTEIN, Frauke, PAUQUAI, Thomas, GUERRERA, I. Chiara, CHATEAU, Danielle, LY, Nathalie, ALQUB, Malik, KLEIN, Christophe, CHAMBAZ, Jean et ROUSSET, Monique, 2011. The proteome of cytosolic lipid droplets isolated from differentiated Caco-2/TC7 enterocytes reveals cell-specific characteristics. *Biology of the Cell*. 2011. Vol. 103, n° 11, pp. 499-517.
- BOUMA, M. E., BEUCLER, I., AGGERBECK, L. P., INFANTE, R. et SCHMITZ, J., 1986. Hypobetalipoproteinemia with accumulation of an apoprotein B-like protein in intestinal cells. Immunoenzymatic and biochemical characterization of seven cases of Anderson's disease. *The Journal of Clinical Investigation*. août 1986. Vol. 78, n° 2, pp. 398-410. DOI 10.1172/JCI112590.
- BOVIER, Emily R., LEWIS, Richard D. et HAMMOND, Billy R., 2013. The Relationship between Lutein and Zeaxanthin Status and Body Fat. *Nutrients*. 8 mars 2013. Vol. 5, n° 3, pp. 750-757. DOI 10.3390/nu5030750.
- BOWEN, Phyllis, CHEN, Longwen, STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, Maria, DUNCAN, Claudine, SHARIFI, Roohollah, GHOSH, Luna, KIM, Hyung-Sook, CHRISTOV-TZELKOV, Konstantin et VAN BREEMEN, Richard, 2002. Tomato sauce supplementation and prostate cancer: lycopene accumulation and modulation of biomarkers of carcinogenesis. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*. novembre 2002. Vol. 227, n° 10, pp. 886-893. DOI 10.1177/153537020222701008.
- BRAAKHUIS, Andrea J., DONALDSON, Caitlin I., LIM, Julie C. et DONALDSON, Paul J., 2019. Nutritional strategies to prevent lens cataract: current status and future strategies. *Nutrients*. 2019. Vol. 11, n° 5, pp. 1186.
- BRADBURY, P., MANN, C. J., KÖCHL, S., ANDERSON, T. A., CHESTER, S. A., HANCOCK, J. M., RITCHIE, P. J., AMEY, J., HARRISON, G. B., LEVITT, D. G., BANASZAK, L. J., SCOTT, J. et SHOULDERS, C. C., 1999. A common binding site on the microsomal triglyceride transfer protein for apolipoprotein B and protein disulfide isomerase. *The Journal of Biological Chemistry*. 29 janvier 1999. Vol. 274, n° 5, pp. 3159-3164. DOI 10.1074/jbc.274.5.3159.

- BRAEGGER, C. P., BELLI, D. C., MENTHA, G. et STEINMANN, B., 1998. Persistence of the intestinal defect in abetalipoproteinemia after liver transplantation. *European Journal of Pediatrics*. juillet 1998. Vol. 157, n° 7, pp. 576-578. DOI 10.1007/s004310050882.
- BREDEFELD, Cindy, PERETTI, Noel, HUSSAIN, M. Mahmood, et MEDICAL ADVISORY PANEL, 2021. New Classification and Management of Abetalipoproteinemia and Related Disorders. *Gastroenterology*. mai 2021. Vol. 160, n° 6, pp. 1912-1916. DOI 10.1053/j.gastro.2020.11.040.
- BRESLOW, J. L., 1985. Human apolipoprotein molecular biology and genetic variation. *Annual Review of Biochemistry*. 1985. Vol. 54, pp. 699-727. DOI 10.1146/annurev.bi.54.070185.003411.
- BREVIK, A., ANDERSEN, L. F., KARLSEN, A., TRYGG, K. U., BLOMHOFF, R. et DREVON, C. A., 2004. Six carotenoids in plasma used to assess recommended intake of fruits and vegetables in a controlled feeding study. *European Journal of Clinical Nutrition*. août 2004. Vol. 58, n° 8, pp. 1166-1173. DOI 10.1038/sj.ejcn.1601945.
- BRIN, M. F., PEDLEY, T. A., LOVELACE, R. E., EMERSON, R. G., GOURAS, P., MACKAY, C., KAYDEN, H. J., LEVY, J. et BAKER, H., 1986. Electrophysiologic features of abetalipoproteinemia: functional consequences of vitamin E deficiency. *Neurology*. mai 1986. Vol. 36, n° 5, pp. 669-673. DOI 10.1212/wnl.36.5.669.
- BRINGMANN, Andreas, SYRBE, Steffen, GÖRNER, Katja, KACZA, Johannes, FRANCKE, Mike, WIEDEMANN, Peter et REICHENBACH, Andreas, 2018. The primate fovea: Structure, function and development. *Progress in Retinal and Eye Research*. septembre 2018. Vol. 66, pp. 49-84. DOI 10.1016/j.preteyeres.2018.03.006.
- BRISKE-ANDERSON, M. J., FINLEY, J. W. et NEWMAN, S. M., 1997. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*. mars 1997. Vol. 214, n° 3, pp. 248-257. DOI 10.3181/00379727-214-44093.
- BRISSON, Lydie, CASTAN, Stéphane, FONTBONNE, Hervé, NICOLETTI, Cendrine, PUIGSERVER, Antoine et AJANDOUZ, El Hassan, 2008. Alpha-tocopheryl acetate is absorbed and hydrolyzed by Caco-2 cells comparative studies with alpha-tocopherol. *Chemistry and Physics of Lipids*. juillet 2008. Vol. 154, n° 1, pp. 33-37. DOI 10.1016/j.chemphyslip.2008.04.002.
- BRITTON, G., 1989. Carotenoids and polyterpenoids. *Natural Product Reports*. 1989. Vol. 6, n° 4, pp. 359-392. DOI 10.1039/np9890600359.
- BRITTON, G., 1993. Structure and nomenclature of carotenoids. In : YOUNG, Andrew J. et BRITTON, George (éd.), *Carotenoids in Photosynthesis* [en ligne]. Dordrecht : Springer Netherlands. pp. 1-15. ISBN 978-94-011-2124-8. Disponible à l'adresse : [https://doi.org/10.1007/978-94-011-2124-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2124-8_1)
- BRITTON, G., 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1995. Vol. 9, n° 15, pp. 1551-1558.
- BRITTON, George, 1995. UV/visible spectroscopy. *Carotenoids, Vol 1B: Spectroscopy*. 1995. pp. 20-21.
- BRITTON, George, ARMITT, Gillian M., LAU, Stephen YM, PATEL, Ashvin K. et SHONE, Clifford C., 1982. Carotenoproteins. *Carotenoid chemistry and biochemistry*. 1982. pp. 237-251.
- BRITTON, George, LIAAEN-JENSEN, Synnove et PFANDER, Hanspeter, 2012. *Carotenoids: Handbook*. Birkhäuser. ISBN 978-3-0348-7836-4.
- BROWN, Lisa, RIMM, Eric B., SEDDON, Johanna M., GIOVANNUCCI, Edward L., CHASAN-TABER, Lisa, SPIEGELMAN, Donna, WILLETT, Walter C. et HANKINSON, Susan E., 1999. A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract extraction in US men. *The American journal of clinical nutrition*. 1999. Vol. 70, n° 4, pp. 517-524.
- BROZOVIC, Suzana, NAGAISHI, Takashi, YOSHIDA, Masaru, BETZ, Stephanie, SALAS, Azucena, CHEN, Daohong, KASER, Arthur, GLICKMAN, Jonathan, KUO, Timothy, LITTLE, Alicia, MORRISON, Jamin, CORAZZA, Nadia, KIM, Jin Yong, COLGAN, Sean P., YOUNG, Stephen G., EXLEY, Mark et BLUMBERG, Richard S., 2004. CD1d function is regulated by microsomal triglyceride transfer protein. *Nature Medicine*. mai 2004. Vol. 10, n° 5, pp. 535-539. DOI 10.1038/nm1043.
- BRUNK, Ulf T. et TERMAN, Alexei, 2002. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002. Vol. 33, n° 5, pp. 611-619.

- BUETTNER, Garry R, 1993. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation,  $\alpha$ -Tocopherol, and Ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993. Vol. 300, n° 2, pp. 535-543. DOI 10.1006/abbi.1993.1074.
- BUIJSSE, Brian, FESKENS, Edith JM, KWAPE, Lemogang, KOK, Frans J. et KROMHOUT, Daan, 2008. Both  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene, but not tocopherols and vitamin C, are inversely related to 15-year cardiovascular mortality in Dutch elderly men. *The Journal of nutrition*. 2008. Vol. 138, n° 2, pp. 344-350.
- BURCK, U., GOEBEL, H. H., KUHLEND AHL, H. D., MEIER, C. et GOEBEL, K. M., 1981. Neuromyopathy and vitamin E deficiency in man. *Neuropediatrics*. août 1981. Vol. 12, n° 3, pp. 267-278. DOI 10.1055/s-2008-1059657.
- BURKEY, B. F., STUART, W. D. et HARMONY, J. A., 1992. Hepatic apolipoprotein J is secreted as a lipoprotein. *Journal of Lipid Research*. octobre 1992. Vol. 33, n° 10, pp. 1517-1526.
- BURNETT, John R., BELL, Damon A., HOOPER, Amanda J. et HEGELE, Robert A., 2012. Clinical utility gene card for: Abetalipoproteinaemia. *European journal of human genetics: EJHG*. 2012. Vol. 20, n° 8. DOI 10.1038/ejhg.2012.30.
- BURNETT, John R. et HOOPER, Amanda J., 2015. Vitamin E and oxidative stress in abetalipoproteinemia and familial hypobetalipoproteinemia. *Free Radical Biology & Medicine*. 2015. Vol. 88, n° Pt A, pp. 59-62. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.044.
- BURNETT, John R., HOOPER, Amanda J. et HEGELE, Robert A., 2018. *Abetalipoproteinemia*. University of Washington, Seattle.
- BURNETT, John R., SHAN, Jing, MISKIE, Brooke A., WHITFIELD, Amanda J., YUAN, Jane, TRAN, Khai, MCKNIGHT, C. James, HEGELE, Robert A. et YAO, Zemin, 2003. A novel nontruncating APOB gene mutation, R463W, causes familial hypobetalipoproteinemia. *The Journal of Biological Chemistry*. 11 avril 2003. Vol. 278, n° 15, pp. 13442-13452. DOI 10.1074/jbc.M300235200.
- BURTON, G.W., JOYCE, Anne et INGOLD, K.U., 1982. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *The Lancet*. 1982. Vol. 320, n° 8293, pp. 327. DOI 10.1016/S0140-6736(82)90293-8.
- CABOT, Florence, SAAD, Alain, MCALINDEN, Colm, HADDAD, Nour Maya, GRISE-DULAC, Alice et GATINEL, Damien, 2013. Objective assessment of crystalline lens opacity level by measuring ocular light scattering with a double-pass system. *American journal of ophthalmology*. 2013. Vol. 155, n° 4, pp. 629-635.
- CAI, Jiyang, NELSON, Kasey C., WU, Mei, STERNBERG JR, Paul et JONES, Dean P., 2000. Oxidative damage and protection of the RPE. *Progress in retinal and eye research*. 2000. Vol. 19, n° 2, pp. 205-221.
- CALVO, D. et VEGA, M. A., 1993. Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *The Journal of Biological Chemistry*. 5 septembre 1993. Vol. 268, n° 25, pp. 18929-18935.
- CAMONT, Laurent, CHAPMAN, M. John et KONTUSH, Anatol, 2011. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends in Molecular Medicine*. octobre 2011. Vol. 17, n° 10, pp. 594-603. DOI 10.1016/j.molmed.2011.05.013.
- CAMPOCHIARO, Peter A. et MIR, Tahreem A., 2018. The mechanism of cone cell death in Retinitis Pigmentosa. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2018. Vol. 62, pp. 24-37. DOI 10.1016/j.preteyeres.2017.08.004.
- CAMPOCHIARO, Peter A., STRAUSS, Rupert W., LU, Lili, HAFIZ, Gulnar, WOLFSON, Yulia, SHAH, Syed M., SOPHIE, Raafay, MIR, Tahreem A. et SCHOLL, Hendrik P., 2015. Is There Excess Oxidative Stress and Damage in Eyes of Patients with Retinitis Pigmentosa? *Antioxidants & Redox Signaling*. 2015. Vol. 23, n° 7, pp. 643-648. DOI 10.1089/ars.2015.6327.
- CANGEMI, Francis E., 2007. TOZAL Study: an open case control study of an oral antioxidant and omega-3 supplement for dry AMD. *BMC ophthalmology*. 2007. Vol. 7, n° 1, pp. 1-10.
- CARTWRIGHT, I. J. et HIGGINS, J. A., 2001. Direct evidence for a two-step assembly of ApoB48-containing lipoproteins in the lumen of the smooth endoplasmic reticulum of rabbit enterocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 21 décembre 2001. Vol. 276, n° 51, pp. 48048-48057. DOI 10.1074/jbc.M104229200.
- CASTENMILLER, J. J. et WEST, C. E., 1998. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Review of Nutrition*. 1998. Vol. 18, pp. 19-38. DOI 10.1146/annurev.nutr.18.1.19.

- CAVELIER, L. B., QIU, Y., BIELICKI, J. K., AFZAL, V., CHENG, J. F. et RUBIN, E. M., 2001. Regulation and activity of the human ABCA1 gene in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*. 25 mai 2001. Vol. 276, n° 21, pp. 18046-18051. DOI 10.1074/jbc.M100565200.
- CEFALÙ, Angelo B., CALVO, Pier L., NOTO, Davide, BALDI, Maurizio, VALENTI, Vincenza, LERRO, Pietro, TRAMUTO, Fabio, LEZO, Antonella, MORRA, Isabella, CENACCHI, Giovanna, BARBERA, Cristiana et AVERNA, Maurizio R., 2010. Variable phenotypic expression of chylomicron retention disease in a kindred carrying a mutation of the Sara2 gene. *Metabolism: Clinical and Experimental*. avril 2010. Vol. 59, n° 4, pp. 463-467. DOI 10.1016/j.metabol.2009.07.042.
- CERDA, Alvaro, HIRATA, Mario Hiroyuki et HIRATA, Rosario Dominguez Crespo, 2012. Molecular mechanisms underlying statin effects on genes involved in the reverse cholesterol transport. *Drug Metabolism and Drug Interactions*. 31 mai 2012. Vol. 27, n° 2, pp. 101-111. DOI 10.1515/dmdi-2012-0007.
- CÉSARINI, J. P., MICHEL, L., MAURETTE, J. M., ADHOUTE, H. et BÉJOT, M., 2003. Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. août 2003. Vol. 19, n° 4, pp. 182-189. DOI 10.1034/j.1600-0781.2003.00044.x.
- CHAN, L., 1992. Apolipoprotein B, the major protein component of triglyceride-rich and low density lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 25 décembre 1992. Vol. 267, n° 36, pp. 25621-25624.
- CHANDLER, L. A. et SCHWARTZ, S. J., 1987. HPLC separation of cis-trans carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables. *Journal of Food Science*. 1987. Vol. 52, n° 3, pp. 669-672.
- CHANTRET, I., RODOLOSSE, A., BARBAT, A., DUSSAULX, E., BROT-LAROCHE, E., ZWEIBAUM, A. et ROUSSET, M., 1994. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *Journal of Cell Science*. janvier 1994. Vol. 107 ( Pt 1), pp. 213-225. DOI 10.1242/jcs.107.1.213.
- CHARDON, Laurence, SASSOLAS, Agnès, DINGEON, Bernard, MICHEL-CALEMARD, Laurence, BOVIER-LAPIERRE, Michel, MOULIN, Philippe et LACHAUX, Alain, 2009. Identification of two novel mutations and long-term follow-up in abetalipoproteinemia: a report of four cases. *European Journal of Pediatrics*. août 2009. Vol. 168, n° 8, pp. 983-989. DOI 10.1007/s00431-008-0888-6.
- CHASAN-TABER, Lisa, WILLETT, Walter C., SEDDON, Johanna M., STAMPFER, Meir J., ROSNER, Bernard, COLDITZ, Graham A., SPEIZER, Frank E. et HANKINSON, Susan E., 1999. A prospective study of carotenoid and vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women. *The American journal of clinical nutrition*. 1999. Vol. 70, n° 4, pp. 509-516.
- CHASSE, Gregory A., MAK, Melody L., DERETÉY, Eugen, FARKAS, Imre, TORDAY, Ladislaus L., PAPP, Julius G., SARMA, Dittakavi SR, AGARWAL, Anita, CHAKRAVARTHI, Sujatha et AGARWAL, Sanjiv, 2001. An ab initio computational study on selected lycopene isomers. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 2001. Vol. 571, n° 1-3, pp. 27-37.
- CHEN, M., YANG, Y., BRAUNSTEIN, E., GEORGESON, K. E. et HARMON, C. M., 2001. Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2001. Vol. 281, n° 5, pp. E916-923. DOI 10.1152/ajpendo.2001.281.5.E916.
- CHEN, Peiqing, LI, Lin, GAO, Yongfeng, XIE, Zhuqing, ZHANG, Yin, PAN, Zhoujia, TU, Yingxin, WANG, Hu, HAN, Qiuqin, HU, Xiamin et XIN, Xiaoming, 2019.  $\beta$ -carotene provides neuro protection after experimental traumatic brain injury via the Nrf2-ARE pathway. *Journal of Integrative Neuroscience*. 30 juin 2019. Vol. 18, n° 2, pp. 153-161. DOI 10.31083/j.jin.2019.02.120.
- CHEN, S. H., HABIB, G., YANG, C. Y., GU, Z. W., LEE, B. R., WENG, S. A., SILBERMAN, S. R., CAI, S. J., DESLYPERE, J. P. et ROSSENEU, M., 1987. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science (New York, N.Y.)*. 16 octobre 1987. Vol. 238, n° 4825, pp. 363-366. DOI 10.1126/science.3659919.
- CHENG, K.-C., LI, Cheng et USS, Annette S., 2008. Prediction of oral drug absorption in humans--from cultured cell lines and experimental animals. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. mai 2008. Vol. 4, n° 5, pp. 581-590. DOI 10.1517/17425255.4.5.581.
- CHEUNG, M. C. et ALBERS, J. J., 1982. Distribution of high density lipoprotein particles with different apoprotein composition: particles with A-I and A-II and particles with A-I but no A-II. *Journal of Lipid Research*. juillet 1982. Vol. 23, n° 5, pp. 747-753.

- CHEW, Emily Y., CLEMONS, Traci, SANGIOVANNI, John Paul, DANIS, Ronald, DOMALPALLY, Amitha, MCBEE, Wendy, SPERDUTO, Robert, FERRIS, Frederick L. et GROUP, AREDS2 Research, 2012. The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2): study design and baseline characteristics (AREDS2 report number 1). *Ophthalmology*. 2012. Vol. 119, n° 11, pp. 2282-2289.
- CHO, Soon Ok, KIM, Min-Hyun et KIM, Hyeyoung, 2018.  $\beta$ -Carotene Inhibits Activation of NF- $\kappa$ B, Activator Protein-1, and STAT3 and Regulates Abnormal Expression of Some Adipokines in 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of Cancer Prevention*. mars 2018. Vol. 23, n° 1, pp. 37-43. DOI 10.15430/JCP.2018.23.1.37.
- CHOWERS, I., BANIN, E., MERIN, S., COOPER, M. et GRANOT, E., 2001. Long-term assessment of combined vitamin A and E treatment for the prevention of retinal degeneration in abetalipoproteinaemia and hypobetalipoproteinaemia patients. *Eye (London, England)*. août 2001. Vol. 15, n° Pt 4, pp. 525-530. DOI 10.1038/eye.2001.167.
- CHRISTEN, William G., LIU, Simin, GLYNN, Robert J., GAZIANO, J. Michael et BURING, Julie E., 2008. Dietary carotenoids, vitamins C and E, and risk of cataract in women: a prospective study. *Archives of Ophthalmology*. 2008. Vol. 126, n° 1, pp. 102-109.
- CHRONI, Angeliki, LIU, Tong, FITZGERALD, Michael L., FREEMAN, Mason W. et ZANNIS, Vassilis I., 2004. Cross-linking and lipid efflux properties of apoA-I mutants suggest direct association between apoA-I helices and ABCA1. *Biochemistry*. 24 février 2004. Vol. 43, n° 7, pp. 2126-2139. DOI 10.1021/bi035813p.
- CHUANG, Chin-Kai et LIN, Wei-Ming, 2021. Points of View on the Tools for Genome/Gene Editing. *International Journal of Molecular Sciences*. 13 septembre 2021. Vol. 22, n° 18, pp. 9872. DOI 10.3390/ijms22189872.
- CHUNG, Hae-Yun, FERREIRA, Ana Lucia Anjos, EPSTEIN, Susanna, PAIVA, Sergio A. R., CASTANEDA-SCEPPA, Carmen et JOHNSON, Elizabeth J., 2009. Site-specific concentrations of carotenoids in adipose tissue: relations with dietary and serum carotenoid concentrations in healthy adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. septembre 2009. Vol. 90, n° 3, pp. 533-539. DOI 10.3945/ajcn.2009.27712.
- CIULLA, Thomas A., CURRAN-CELANTANO, Joanne, COOPER, Dale A., HAMMOND JR, Billy R., DANIS, Ronald P., PRATT, Linda M., RICCARDI, Karen A. et FILLOON, Thomas G., 2001. Macular pigment optical density in a midwestern sample. *Ophthalmology*. 2001. Vol. 108, n° 4, pp. 730-737.
- CLARKE, Michael W., HOOPER, Amanda J., HEADLAM, Henrietta A., WU, Jason H. Y., CROFT, Kevin D. et BURNETT, John R., 2006. Assessment of tocopherol metabolism and oxidative stress in familial hypobetalipoproteinemia. *Clinical Chemistry*. 2006. Vol. 52, n° 7, pp. 1339-1345. DOI 10.1373/clinchem.2006.068692.
- CLEVIDENCE, B. A. et BIERI, J. G., 1993. Association of carotenoids with human plasma lipoproteins. In : *Methods in enzymology* [en ligne]. Lester Packer. Lester Packer. pp. 33-46. Carotenoids Part B: Metabolism, Genetics, and Biosynthesis. Disponible à l'adresse : [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)14051-J](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)14051-J)
- COGAN, David G., RODRIGUES, Merlyn, CHU, Fred C. et SCHAEFER, Ernst J., 1984. Ocular abnormalities in abetalipoproteinemia: a clinicopathologic correlation. *Ophthalmology*. 1984. Vol. 91, n° 8, pp. 991-998.
- COLEMAN, Hanna R., CHAN, Chi-Chao, FERRIS III, Frederick L. et CHEW, Emily Y., 2008. Age-related macular degeneration. *The Lancet*. 2008. Vol. 372, n° 9652, pp. 1835-1845.
- COLIJN, Johanna M., MEESTER-SMOOR, Magda, VERZIJDEN, Timo, DE BREUK, Anita, SILVA, Rufino, MERLE, Benedicte M. J., COUGNARD-GRÉGOIRE, Audrey, HOYNG, Carel B., FAUSER, Sascha, COOLEN, Anthonius, CREUZOT-GARCHER, Catherine, HENSE, Hans-Werner, UEFFING, Marius, DELCOURT, Cecile, DEN HOLLANDER, Anneke I., KLAVER, Caroline C. W., et EYE-RISK CONSORTIUM, 2021. Genetic Risk, Lifestyle, and Age-Related Macular Degeneration in Europe: The EYE-RISK Consortium. *Ophthalmology*. juillet 2021. Vol. 128, n° 7, pp. 1039-1049. DOI 10.1016/j.optha.2020.11.024.
- COLLINS, J. C., SCHEINBERG, I. H., GIBLIN, D. R. et STERNLIEB, I., 1989. Hepatic peroxisomal abnormalities in abetalipoproteinemia. *Gastroenterology*. septembre 1989. Vol. 97, n° 3, pp. 766-770. DOI 10.1016/0016-5085(89)90651-3.
- COMMITTEE ON DIAGNOSTIC ERROR IN HEALTH CARE, BOARD ON HEALTH CARE SERVICES, INSTITUTE OF MEDICINE, et THE NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE, 2015. *Improving Diagnosis in Health Care* [en ligne]. Washington, D.C. : National Academies Press. [Consulté le 21 juillet 2022]. ISBN 978-0-309-37769-0. Disponible à l'adresse : <http://www.nap.edu/catalog/21794>



- COMPASSI, S., WERDER, M., WEBER, F. E., BOFFELLI, D., HAUSER, H. et SCHULTHESS, G., 1997. Comparison of cholesterol and sitosterol uptake in different brush border membrane models. *Biochemistry*. 3 juin 1997. Vol. 36, n° 22, pp. 6643-6652. DOI 10.1021/bi9620666.
- CONNOR, William E., DUELL, P. Barton, KEAN, Ron et WANG, Yingming, 2007. The prime role of HDL to transport lutein into the retina: evidence from HDL-deficient WHAM chicks having a mutant ABCA1 transporter. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. septembre 2007. Vol. 48, n° 9, pp. 4226-4231. DOI 10.1167/iovs.06-1275.
- COOPER, Dale A., 2004. Carotenoids in health and disease: recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *The Journal of Nutrition*. janvier 2004. Vol. 134, n° 1, pp. 221S-224S. DOI 10.1093/jn/134.1.221S.
- COTTRILL, C., GLUECK, C. J., LEUBA, V., MILLETT, F., PUPPIONE, D. et BROWN, W. V., 1974. Familial homozygous hypobetalipoproteinemia. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 1974. Vol. 23, n° 8, pp. 779-791. DOI 10.1016/0026-0495(74)90010-9.
- CRABTREE, D. V., OJIMA, I., GENG, X. et ADLER, A. J., 2001. Tubulins in the primate retina: evidence that xanthophylls may be endogenous ligands for the paclitaxel-binding site. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. août 2001. Vol. 9, n° 8, pp. 1967-1976. DOI 10.1016/s0968-0896(01)00103-1.
- CUDDIHY, Sarah L., ALI, Sameh S., MUSIEK, Erik S., LUCERO, Jacinta, KOPP, Sarah J., MORROW, Jason D. et DUGAN, Laura L., 2008. Prolonged alpha-tocopherol deficiency decreases oxidative stress and unmasks alpha-tocopherol-dependent regulation of mitochondrial function in the brain. *The Journal of Biological Chemistry*. 14 mars 2008. Vol. 283, n° 11, pp. 6915-6924. DOI 10.1074/jbc.M702572200.
- CUERQ, Charlotte, BORDAT, Claire, HALIMI, Charlotte, BLOND, Emilie, NOWICKI, Marion, PERETTI, Noël et REBOUL, Emmanuelle, 2021. Comparison of  $\alpha$ -Tocopherol,  $\alpha$ -Tocopherol Acetate, and  $\alpha$ -Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate 1000 Absorption by Caco-2 TC7 Intestinal Cells. *Nutrients*. 2021. Vol. 13, n° 1, pp. 129.
- CUERQ, Charlotte, HENIN, Emilie, RESTIER, Lioara, BLOND, Emilie, DRAI, Jocelyne, MARÇAIS, Christophe, DI FILIPPO, Mathilde, LAVEILLE, Christian, MICHALSKI, Marie-Caroline, POINSOT, Pierre, CAUSSY, Cyrielle, SASSOLAS, Agnès, MOULIN, Philippe, REBOUL, Emmanuelle, CHARRIERE, Sybil, LEVY, Emile, LACHAUX, Alain et PERETTI, Noël, 2018. Efficacy of two vitamin E formulations in patients with abetalipoproteinemia and chylomicron retention disease. *Journal of Lipid Research*. 2018. Vol. 59, n° 9, pp. 1640-1648. DOI 10.1194/jlr.M085043.
- CURRAN-CELENTANO, Joanne, HAMMOND JR, Billy R., CIULLA, Thomas A., COOPER, Dale A., PRATT, Linda M. et DANIS, Ronald B., 2001. Relation between dietary intake, serum concentrations, and retinal concentrations of lutein and zeaxanthin in adults in a Midwest population. *The American journal of clinical nutrition*. 2001. Vol. 74, n° 6, pp. 796-802.
- DABHOLKAR, A. S., 1981. Vitamin E deficiency as hepatic peroxisomal proliferator: electron microscopic evidence. *Cell Biology International Reports*. septembre 1981. Vol. 5, n° 9, pp. 851-855. DOI 10.1016/0309-1651(81)90199-5.
- DANNOURA, A. H., BERRIOT-VAROQUEAUX, N., AMATI, P., ABADIE, V., VERTHIER, N., SCHMITZ, J., WETTERAU, J. R., SAMSON-BOUMA, M. E. et AGGERBECK, L. P., 1999. Anderson's disease: exclusion of apolipoprotein and intracellular lipid transport genes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1999. Vol. 19, n° 10, pp. 2494-2508. DOI 10.1161/01.atv.19.10.2494.
- DARVIN, Maxim E., STERRY, Wolfram, LADEMANN, Juergen et VERGOU, Theognosia, 2011. The role of carotenoids in human skin. *Molecules*. 2011. Vol. 16, n° 12, pp. 10491-10506.
- DASHTI, N., SMITH, E. A. et ALAUPOVIC, P., 1990. Increased production of apolipoprotein B and its lipoproteins by oleic acid in Caco-2 cells. *Journal of Lipid Research*. janvier 1990. Vol. 31, n° 1, pp. 113-123.
- DAVIES, Joanna P., SCOTT, Catherine, OISHI, Kimihiko, LIAPIS, Anastasia et IOANNOU, Yiannis A., 2005. Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. *The Journal of Biological Chemistry*. 1 avril 2005. Vol. 280, n° 13, pp. 12710-12720. DOI 10.1074/jbc.M409110200.
- DAVIS, Harry R., ZHU, Li-ji, HOOS, Lizbeth M., TETZLOFF, Glen, MAGUIRE, Maureen, LIU, Jianjun, YAO, Xiaorui, IYER, Sai Prasad N., LAM, My-Hanh, LUND, Erik G., DETMERS, Patricia A., GRAZIANO, Michael P. et ALTMANN, Scott W., 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) Is the Intestinal Phytosterol and

- Cholesterol Transporter and a Key Modulator of Whole-body Cholesterol Homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*. 2004. Vol. 279, n° 32, pp. 33586-33592. DOI 10.1074/jbc.M405817200.
- DAWCZYNSKI, Jens, JENTSCH, Susanne, SCHWEITZER, Dietrich, HAMMER, Martin, LANG, Gabriele E. et STROBEL, Jürgen, 2013. Long term effects of lutein, zeaxanthin and omega-3-LCPUFAs supplementation on optical density of macular pigment in AMD patients: the LUTEGA study. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*. décembre 2013. Vol. 251, n° 12, pp. 2711-2723. DOI 10.1007/s00417-013-2376-6.
- DE GROEF, Lies et CORDEIRO, Maria Francesca, 2018. Is the Eye an Extension of the Brain in Central Nervous System Disease? *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics: The Official Journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*. février 2018. Vol. 34, n° 1-2, pp. 129-133. DOI 10.1089/jop.2016.0180.
- DEAN, M., RZHETSKY, A. et ALLIKMETS, R., 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*. juillet 2001. Vol. 11, n° 7, pp. 1156-1166. DOI 10.1101/gr.184901.
- DELCOURT, Cécile, CARRIERE, Isabelle, DELAGE, Martine, BARBERGER-GATEAU, Pascale, SCHALCH, Wolfgang et GROUP, POLA Study, 2006. Plasma lutein and zeaxanthin and other carotenoids as modifiable risk factors for age-related maculopathy and cataract: the POLA Study. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006. Vol. 47, n° 6, pp. 2329-2335.
- DELIE, F. et RUBAS, W., 1997. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 1997. Vol. 14, n° 3, pp. 221-286.
- DELPRE, G., KADISH, U., GLANTZ, I. et AVIDOR, I., 1978. Endoscopic assessment in abetalipoproteinemia (Bassen-Kornzweig-syndrome). *Endoscopy*. février 1978. Vol. 10, n° 1, pp. 59-62. DOI 10.1055/s-0028-1098264.
- DESALDELEER, Cécile, HENNO, Sebastien, BRUNEAU, Bertrand et DABADIE, Alain, 2013. Chylomicron retention disease. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. février 2013. Vol. 45, n° 2, pp. e3. DOI 10.1016/j.dld.2012.08.003.
- DESCHAMPS, Valérie, SAVANOVITCH, Chantal, ARNAULT, Nathalie, CASTETBON, Katia, BERTRAIS, Sandrine, MENNEN, Louise, GALAN, Pilar et HERCBERG, Serge, 2005. Evolution des apports en nutriments dans l'étude SU. VI. MAX (1995-2002). *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 2005. Vol. 40, n° 3, pp. 166-171.
- DESOMER, Lobke, DE VOS, Martine et DE LOOZE, Danny, 2015. Fat accumulation in enterocytes: a key to the diagnosis of abetalipoproteinemia or homozygous hypobetalipoproteinemia. *Endoscopy*. 2015. Vol. 47 Suppl 1 UCTN, pp. E223-224. DOI 10.1055/s-0034-1391832.
- DHERANI, Mukesh, MURTHY, Gudlavalleti VS, GUPTA, Sanjeev K., YOUNG, Ian S., MARAINI, Giovanni, CAMPARINI, Monica, PRICE, Gill M., JOHN, Neena, CHAKRAVARTHY, Usha et FLETCHER, Astrid E., 2008. Blood levels of vitamin C, carotenoids and retinol are inversely associated with cataract in a North Indian population. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008. Vol. 49, n° 8, pp. 3328-3335.
- DI FILIPPO, Mathilde, CRÉHALET, Hervé, SAMSON-BOUMA, Marie Elisabeth, BONNET, Véronique, AGGERBECK, Lawrence P., RABÈS, Jean-Pierre, GOTTRAND, Frederic, LUC, Gérald, BOZON, Dominique et SASSOLAS, Agnès, 2012. Molecular and functional analysis of two new MTTP gene mutations in an atypical case of abetalipoproteinemia. *Journal of Lipid Research*. mars 2012. Vol. 53, n° 3, pp. 548-555. DOI 10.1194/jlr.M020024.
- DI FILIPPO, Mathilde, VARRET, Mathilde, BOEHM, Vanessa, RABÈS, Jean-Pierre, FERKDADJI, Latifa, ABRAMOWITZ, Laurent, DUMONT, Sabrina, LENAERTS, Catherine, BOILEAU, Catherine, JOLY, Francisca, SCHMITZ, Jacques, SAMSON-BOUMA, Marie-Elisabeth et BONNEFONT-ROUSSELOT, Dominique, 2019. Postprandial lipid absorption in seven heterozygous carriers of deleterious variants of MTTP in two abetalipoproteinemic families. *Journal of Clinical Lipidology*. février 2019. Vol. 13, n° 1, pp. 201-212. DOI 10.1016/j.jacl.2018.10.003.
- DIMITROV, N. V., MEYER-LEECE, C., MCMILLAN, J., GILLILAND, D., PERLOFF, M. et MALONE, W., 1996. Plasma alpha-tocopherol concentrations after supplementation with water- and fat-soluble vitamin E. *The American Journal of Clinical Nutrition*. septembre 1996. Vol. 64, n° 3, pp. 329-335. DOI 10.1093/ajcn/64.3.329.
- DONALDSON, Michael S., 2011. A Carotenoid Health Index Based on Plasma Carotenoids and Health Outcomes. *Nutrients*. 8 décembre 2011. Vol. 3, n° 12, pp. 1003-1022. DOI 10.3390/nu3121003.

- DOUGAN, Stephanie K., SALAS, Azucena, RAVA, Paul, AGYEMANG, Amma, KASER, Arthur, MORRISON, Jamin, KHURANA, Archana, KRONENBERG, Mitchell, JOHNSON, Caroline, EXLEY, Mark, HUSSAIN, M. Mahmood et BLUMBERG, Richard S., 2005. Microsomal triglyceride transfer protein lipidation and control of CD1d on antigen-presenting cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 15 août 2005. Vol. 202, n° 4, pp. 529-539. DOI 10.1084/jem.20050183.
- DOYA, Leen Jamel, MOHAMMAD, Lava, OMRAN, Razan, IBRAHIM, Alexander Ali, YOUSEF, Nizar, IBRAHIM, Ali et HOUREIH, Mohammad Adib, 2021. Chylomicron retention disease caused by a new pathogenic variant in sar1b protein: a rare case report from Syria. *BMC pediatrics*. 11 octobre 2021. Vol. 21, n° 1, pp. 449. DOI 10.1186/s12887-021-02897-5.
- DRUEZ, G., 1959. [New case of acanthocytosis: congenital erythrocytic abnormalities with retinitis, neurological disorders & degenerative stigmata]. *Revue D'hematologie*. mars 1959. Vol. 14, n° 1, pp. 3-11.
- DUPIN, Henri, ABRAHAM, Jean, GIACHETTI, Ismène, GUEGUEN, L., LEMARCHAL, Ph et POTIER DE COURCY, G., 1992. *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*. Editions Tec & Doc.
- DURING, Alexandrine, DAWSON, Harry D. et HARRISON, Earl H., 2005. Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe. *The Journal of Nutrition*. octobre 2005. Vol. 135, n° 10, pp. 2305-2312. DOI 10.1093/jn/135.10.2305.
- DURING, Alexandrine, DORAISWAMY, Sundari et HARRISON, Earl H., 2008. Xanthophylls are preferentially taken up compared with  $\beta$ -carotene by retinal cells via a SRBI-dependent mechanism. *Journal of lipid research*. 2008. Vol. 49, n° 8, pp. 1715-1724.
- DURING, Alexandrine, HUSSAIN, M. Mahmood, MOREL, Diane W. et HARRISON, Earl H., 2002. Carotenoid uptake and secretion by Caco-2 cells:  $\beta$ -carotene isomer selectivity and carotenoid interactions. *Journal of lipid research*. 2002. Vol. 43, n° 7, pp. 1086-1095.
- DUSZKA, C., GROLIER, P., AZIM, E. M., ALEXANDRE-GOUABAU, M. C., BOREL, P. et AZAIS-BRAESCO, V., 1996. Rat intestinal beta-carotene dioxygenase activity is located primarily in the cytosol of mature jejunal enterocytes. *The Journal of Nutrition*. octobre 1996. Vol. 126, n° 10, pp. 2550-2556. DOI 10.1093/jn/126.10.2550.
- DUTTON, Herbert J. et MANNING, Winston M., 1941. Evidence for carotenoid-sensitized photosynthesis in the diatom *Nitzschia closterium*. *American Journal of Botany*. 1941. pp. 516-526.
- EFSA PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, 2015. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin E as alpha-tocopherol. *European Food Safety Authority*. 9 juillet 2015. Vol. 13, n° 7, pp. 4149.
- EL-GORAB, M. I., UNDERWOOD, B. A. et LOERCH, J. D., 1975. The roles of bile salts in the uptake of beta-carotene and retinol by rat everted gut sacs. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 20 août 1975. Vol. 401, n° 2, pp. 265-277. DOI 10.1016/0005-2736(75)90310-7.
- EL-QUDAH, Jafar M., 2009. Identification and quantification of major carotenoids in some vegetables. *American Journal of Applied Sciences*. 2009. Vol. 6, n° 3, pp. 492.
- ENZELL, C. R., 1985. Biodegradation of carotenoids-an important route to aroma compounds. *Pure and Applied Chemistry*. 1985. Vol. 57, n° 5, pp. 693-700.
- EVANS, Herbert M. et BISHOP, K. Scott, 1922. On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction. *Science*. 8 décembre 1922. Vol. 56, n° 1458, pp. 650-651. DOI 10.1126/science.56.1458.650.
- EVANS, Herbert M., EMERSON, Oliver H. et EMERSON, Gladys A., 1974. The Isolation from Wheat Germ Oil of an Alcohol,  $\alpha$ -Tocopherol, Having the Properties of Vitamin E. *Nutrition Reviews*. 1974. Vol. 32, n° 3, pp. 80-82. DOI 10.1111/j.1753-4887.1974.tb06280.x.
- EYE DISEASE CASE-CONTROL STUDY GROUP, 1993. Antioxidant status and neovascular age-related macular degeneration. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*. janvier 1993. Vol. 111, n° 1, pp. 104-109. DOI 10.1001/archophth.1993.01090010108035.
- FARNSWORTH, C. C. et DRATZ, E. A., 1976. Oxidative damage of retinal rod outer segment membranes and the role of vitamin E. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 7 septembre 1976. Vol. 443, n° 3, pp. 556-570. DOI 10.1016/0005-2736(76)90473-9.
- FARQUHAR, J. W. et WAYS, P. Abetalipoproteinemia, 1966. *In The Metabolic Basis of Inherited Disease*. Edited by JB Stanbury, JB Wyngaarden and DS Fredrickson. 1966. New York: McGraw-Hill.

- FAURE, H., FAYOL, V., GALABERT, C., GROLIER, P., LE MOËL, G., STEGHENS, J. P., VAN KAPPEL, A. et NABET, F., 1999. [Carotenoids: 1. Metabolism and physiology]. *Annales De Biologie Clinique*. avril 1999. Vol. 57, n° 2, pp. 169-183.
- FAVIER, A., 1997. Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Annales de Biologie Clinique*. 1997. Vol. 55, n° 1, pp. 9-16.
- FERNHOLZ, E., 1938. On the Constitution of «-Tocopherol. . 1938. Vol. 60, pp. 6.
- FERREIRA, Helena, RAMOS, Raquel Nuñez, QUAN, Cinthia Flores, FERREIRO, Susana Redecillas, RUIZ, Vanessa Cabello, JUAMPÉREZ GOÑI, Javi, QUINTERO BERNABEU, Jesus, SEGARRA CANTÓN, Oscar et ÁLVAREZ BELTRAN, Marina, 2018. Chylomicron Retention Disease: a Description of a New Mutation in a Very Rare Disease. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*. avril 2018. Vol. 21, n° 2, pp. 134-140. DOI 10.5223/pghn.2018.21.2.134.
- FERRUCCI, Luigi, PERRY, John R.B., MATTEINI, Amy, PEROLA, Markus, TANAKA, Toshiko, SILANDER, Kaisa, RICE, Neil, MELZER, David, MURRAY, Anna, CLUETT, Christie, FRIED, Linda P., ALBANES, Demetrius, CORSI, Anna-Maria, CHERUBINI, Antonio, GURALNIK, Jack, BANDINELLI, Stefania, SINGLETON, Andrew, VIRTAMO, Jarmo, WALSTON, Jeremy, SEMBA, Richard D. et FRAYLING, Timothy M., 2009. Common Variation in the  $\beta$ -Carotene 15,15'-Monooxygenase 1 Gene Affects Circulating Levels of Carotenoids: A Genome-wide Association Study. *American Journal of Human Genetics*. 13 février 2009. Vol. 84, n° 2, pp. 123-133. DOI 10.1016/j.ajhg.2008.12.019.
- FIELD, F. J., ALBRIGHT, E. et MATHUR, S. N., 1987. Regulation of cholesterol esterification by micellar cholesterol in CaCo-2 cells. *Journal of Lipid Research*. septembre 1987. Vol. 28, n° 9, pp. 1057-1066.
- FLIESLER, Steven J. et BRETILLON, Lionel, 2010. The ins and outs of cholesterol in the vertebrate retina. *Journal of Lipid Research*. décembre 2010. Vol. 51, n° 12, pp. 3399-3413. DOI 10.1194/jlr.R010538.
- FOLMER, Britta M., BARRON, Denis, HUGHES, Eric, MIGUET, Laurence, SANCHEZ, Belén, HEUDI, Olivier, ROUVET, Martine, SAGALOWICZ, Laurent, CALLIER, Philippe, MICHEL, Martin et WILLIAMSON, Gary, 2009. Monocomponent hexa- and dodecaethylene glycol succinyl-tocopherol esters: self-assembly structures, cellular uptake and sensitivity to enzyme hydrolysis. *Biochemical Pharmacology*. 15 décembre 2009. Vol. 78, n° 12, pp. 1464-1474. DOI 10.1016/j.bcp.2009.07.009.
- FORTIN, J. et LUN, A., [sans date]. On-Target and Off-Target Scoring Algorithms for CRISPR gRNAs. [en ligne]. Vol. R package version 1.0.0,. [Consulté le 22 mai 2022]. Disponible à l'adresse : <https://github.com/Jfortin1/crisprScore>
- FRANCONE, O. L., ROYER, L. et HAGHPASSAND, M., 1996. Increased prebeta-HDL levels, cholesterol efflux, and LCAT-mediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenes. *Journal of Lipid Research*. juin 1996. Vol. 37, n° 6, pp. 1268-1277.
- FRASER, R., DOBBS, B. R. et ROGERS, G. W., 1995. Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. mars 1995. Vol. 21, n° 3, pp. 863-874.
- FREZAL, J., REY, J., POLONOVSKI, J., LEVY, G. et LAMY, M., 1961. [Congenital absence of beta-lipoproteins: study of fat absorption after exsanguinotransfusion measuring the half-life of injected beta-lipoproteins]. *Revue Francaise D'etudes Cliniques Et Biologiques*. septembre 1961. Vol. 6, pp. 677-683.
- FRIELING, U. M., SCHAUMBERG, D. A., KUPPER, T. S., MUNTWYLER, J. et HENNEKENS, C. H., 2000. A randomized, 12-year primary-prevention trial of beta carotene supplementation for nonmelanoma skin cancer in the physician's health study. *Archives of Dermatology*. février 2000. Vol. 136, n° 2, pp. 179-184. DOI 10.1001/archderm.136.2.179.
- FROMME, J. Christopher, RAVAZZOLA, Mariella, HAMAMOTO, Susan, AL-BALWI, Mohammed, EY AID, Wafaa, BOYADJIEV, Simeon A., COSSON, Pierre, SCHEKMAN, Randy et ORCI, Lelio, 2007. The genetic basis of a craniofacial disease provides insight into COPII coat assembly. *Developmental Cell*. 2007. Vol. 13, n° 5, pp. 623-634. DOI 10.1016/j.devcel.2007.10.005.
- FUJIMURA, Shigeto, UEDA, Kohei, NOMURA, Yoko et YANAGI, Yasuo, 2016. Preliminary analysis of the relationship between serum lutein and zeaxanthin levels and macular pigment optical density. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)*. 2016. Vol. 10, pp. 2149.
- FUKI, I. V., KUHN, K. M., LOMAZOV, I. R., ROTHMAN, V. L., TUSZYNSKI, G. P., IOZZO, R. V., SWENSON, T. L., FISHER, E. A. et WILLIAMS, K. J., 1997. The syndecan family of proteoglycans. Novel

receptors mediating internalization of atherogenic lipoproteins in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*. 15 septembre 1997. Vol. 100, n° 6, pp. 1611-1622. DOI 10.1172/JCI119685.

GALE, Catharine R., HALL, Nigel F., PHILLIPS, David IW et MARTYN, Christopher N., 2003. Lutein and zeaxanthin status and risk of age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003. Vol. 44, n° 6, pp. 2461-2465.

GANGLOFF, Anne, BERGERON, Jean, COUTURE, Patrick, MARTINS, Rebecca, HEGELE, Robert A. et GAGNÉ, Claude, 2011. A novel mutation of apolipoprotein B in a French Canadian family with homozygous hypobetalipoproteinemia. *Journal of Clinical Lipidology*. octobre 2011. Vol. 5, n° 5, pp. 414-417. DOI 10.1016/j.jacl.2011.06.014.

GARCIA-CALVO, Margarita, LISNOCK, JeanMarie, BULL, Herbert G., HAWES, Brian E., BURNETT, Duane A., BRAUN, Matthew P., CRONA, James H., DAVIS, Harry R., DEAN, Dennis C., DETMERS, Patricia A., GRAZIANO, Michael P., HUGHES, Meredith, MACINTYRE, D. Euan, OGAWA, Anthony, O'NEILL, Kim A., IYER, Sai Prasad N., SHEVELL, Diane E., SMITH, Marsha M., TANG, Yui S., MAKAREWICZ, Amanda M., UJJAINWALLA, Feroze, ALTMANN, Scott W., CHAPMAN, Kevin T. et THORNBERRY, Nancy A., 2005. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 7 juin 2005. Vol. 102, n° 23, pp. 8132-8137. DOI 10.1073/pnas.0500269102.

GARRETT, Dean A., FAILLA, Mark L., SARAMA, Robert J. et CRAFT, Neal, 1999. Accumulation and retention of micellar  $\beta$ -carotene and lutein by Caco-2 human intestinal cells. *The Journal of nutritional biochemistry*. 1999. Vol. 10, n° 10, pp. 573-581.

GARRETT, null, FAILLA, null et SARAMA, null, 2000. Estimation of carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. novembre 2000. Vol. 11, n° 11-12, pp. 574-580. DOI 10.1016/s0955-2863(00)00122-4.

GAUDET, Laura M., MACKENZIE, Jennifer et SMITH, Graeme N., 2006. Fat-soluble vitamin deficiency in pregnancy: a case report and review of abetalipoproteinemia. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada: JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada: JOGC*. 2006. Vol. 28, n° 8, pp. 716-719. DOI 10.1016/S1701-2163(16)32235-6.

GAUTHIER, S. et SNIDERMAN, A., 1983. Action tremor as a manifestation of chylomicron retention disease. *Annals of Neurology*. novembre 1983. Vol. 14, n° 5, pp. 591. DOI 10.1002/ana.410140517.

GE, Liang, WANG, Jing, QI, Wei, MIAO, Hong-Hua, CAO, Jian, QU, Yu-Xiu, LI, Bo-Liang et SONG, Bao-Liang, 2008. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. *Cell Metabolism*. juin 2008. Vol. 7, n° 6, pp. 508-519. DOI 10.1016/j.cmet.2008.04.001.

GILBERT, Clare, 2013. The eye signs of vitamin A deficiency. *Community Eye Health*. 2013. Vol. 26, n° 84, pp. 66-67.

GILMORE, Adam M., 1999. How higher plants respond to excess light: Energy dissipation in photosystem II. In : *Concepts in Photobiology*. Springer. pp. 513-548.

GINSBERG, H. N., 1997. Role of lipid synthesis, chaperone proteins and proteasomes in the assembly and secretion of apoprotein B-containing lipoproteins from cultured liver cells. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. mai 1997. Vol. 24, n° 5, pp. A29-32. DOI 10.1111/j.1440-1681.1997.tb03051.x.

GIORDANO, Paola, SCICCHITANO, Pietro, LOCOROTONDO, Manuela, MANDURINO, Cosimo, RICCI, Gabriella, CARBONARA, Santa, GESUALDO, Michele, ZITO, Annapaola, DACHILLE, Annamaria, CAPUTO, Paola, RICCARDI, Roberta, FRASSO, Giulia, LASSANDRO, Giuseppe, DI MAURO, Antonio et CICCONE, Marco Matteo, 2012. Carotenoids and cardiovascular risk. *Current Pharmaceutical Design*. 2012. Vol. 18, n° 34, pp. 5577-5589. DOI 10.2174/138161212803307527.

GO, V. L., HOFMANN, A. F. et SUMMERSKILL, W. H., 1970. Pancreozymin bioassay in man based on pancreatic enzyme secretion: potency of specific amino acids and other digestive products. *The Journal of Clinical Investigation*. août 1970. Vol. 49, n° 8, pp. 1558-1564. DOI 10.1172/JCI106373.

GOETTSCHE, Marianne et PAPPENHEIMER, Alwin M., 1931. Nutritional Muscular Dystrophy in the Guinea Pig and Rabbit. *Journal of Experimental Medicine*. 1931. Vol. 54, n° 2, pp. 145-165. DOI 10.1084/jem.54.2.145.

GOLDBERG, J., 1998. Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell*. 16 octobre 1998. Vol. 95, n° 2, pp. 237-248. DOI 10.1016/s0092-8674(00)81754-7.

- GOLDBERG, Jack, FLOWERDEW, Gordon, SMITH, Ellen, BRODY, Jacob A. et TSO, Mark OM, 1988. Factors associated with age-related macular degeneration: An ANALYSIS of DATA from THE first NATIONAL health AND nutrition EXAMINATION survey. *American journal of epidemiology*. 1988. Vol. 128, n° 4, pp. 700-710.
- GOLTZ, Shellen R., CAMPBELL, Wayne W., CHITCHUMROONCHOKCHAI, Chureeporn, FAILLA, Mark L. et FERRUZZI, Mario G., 2012. Meal triacylglycerol profile modulates postprandial absorption of carotenoids in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*. juin 2012. Vol. 56, n° 6, pp. 866-877. DOI 10.1002/mnfr.201100687.
- GONCALVES, Aurélie, ROI, Stéphanie, NOWICKI, Marion, NIOT, Isabelle et REBOUL, Emmanuelle, 2014. Cluster-determinant 36 (CD36) impacts on vitamin E postprandial response. *Molecular Nutrition & Food Research*. décembre 2014. Vol. 58, n° 12, pp. 2297-2306. DOI 10.1002/mnfr.201400339.
- GOODWIN, T. W., 1986. Metabolism, nutrition, and function of carotenoids. *Annual Review of Nutrition*. 1986. Vol. 6, pp. 273-297. DOI 10.1146/annurev.nu.06.070186.001421.
- GORDON, D. A., JAMIL, H., SHARP, D., MULLANEY, D., YAO, Z., GREGG, R. E. et WETTERAU, J., 1994. Secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from HeLa cells is dependent on expression of the microsomal triglyceride transfer protein and is regulated by lipid availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2 août 1994. Vol. 91, n° 16, pp. 7628-7632. DOI 10.1073/pnas.91.16.7628.
- GORIN, M. B., PAUL, T. O. et RADER, D. J., 1994. Angioid streaks associated with abetalipoproteinemia. *Ophthalmic Genetics*. décembre 1994. Vol. 15, n° 3-4, pp. 151-159. DOI 10.3109/13816819409057843.
- GORUSUPUDI, Aruna, SHYAM, Rajalekshmy, LI, Binxing, VACHALI, Preejith, SUBHANI, Yumna K., NELSON, Kelly et BERNSTEIN, Paul S., 2016. Developmentally regulated production of meso-zeaxanthin in chicken retinal pigment epithelium/choroid and retina. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016. Vol. 57, n° 4, pp. 1853-1861.
- GOSS-SAMPSON, M. A., MACEVILLY, C. J. et MULLER, D. P., 1988. Longitudinal studies of the neurobiology of vitamin E and other antioxidant systems, and neurological function in the vitamin E deficient rat. *Journal of the Neurological Sciences*. octobre 1988. Vol. 87, n° 1, pp. 25-35. DOI 10.1016/0022-510x(88)90051-2.
- GOTTO, A. M., LEVY, R. I., JOHN, K. et FREDRICKSON, D. S., 1971. On the protein defect in abetalipoproteinemia. *The New England Journal of Medicine*. 15 avril 1971. Vol. 284, n° 15, pp. 813-818. DOI 10.1056/NEJM197104152841503.
- GREEN, Beverley, PARSON, William W. et PARSON, William W., 2003. *Light-harvesting antennas in photosynthesis*. Springer Science & Business Media.
- GRÈS, M. C., JULIAN, B., BOURRIÉ, M., MEUNIER, V., ROQUES, C., BERGER, M., BOULENC, X., BERGER, Y. et FABRE, G., 1998. Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharmaceutical Research*. mai 1998. Vol. 15, n° 5, pp. 726-733. DOI 10.1023/a:1011919003030.
- GRETCH, D. G., STURLEY, S. L., WANG, L., LIPTON, B. A., DUNNING, A., GRUNWALD, K. A., WETTERAU, J. R., YAO, Z., TALMUD, P. et ATTIE, A. D., 1996. The amino terminus of apolipoprotein B is necessary but not sufficient for microsomal triglyceride transfer protein responsiveness. *The Journal of Biological Chemistry*. 12 avril 1996. Vol. 271, n° 15, pp. 8682-8691. DOI 10.1074/jbc.271.15.8682.
- GROBER, Jacques, LUCAS, Stéphanie, SÖRHEDE-WINZELL, Maria, ZAGHINI, Isabelle, MAIRAL, Aline, CONTRERAS, Juan-Antonio, BESNARD, Philippe, HOLM, Cecilia et LANGIN, Dominique, 2003. Hormone-sensitive lipase is a cholesterol esterase of the intestinal mucosa. *The Journal of Biological Chemistry*. 21 février 2003. Vol. 278, n° 8, pp. 6510-6515. DOI 10.1074/jbc.M208513200.
- GRUSZECKI, W. I. et SIELEWIESIUK, J., 1990. Orientation of xanthophylls in phosphatidylcholine multibilayers. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 30 avril 1990. Vol. 1023, n° 3, pp. 405-412. DOI 10.1016/0005-2736(90)90133-9.
- GRUSZECKI, Wieslaw I., 2009. *Carotenoids in lipid membranes*. CRC Press: New York, NY, USA.
- GUIL-GUERRERO, J. L., MARTÍNEZ-GUIRADO, C., DEL MAR REBOLLOSO-FUENTES, Ma et CARRIQUE-PÉREZ, A., 2006. Nutrient composition and antioxidant activity of 10 pepper (*Capsicum annuum*) varieties. *European Food Research and Technology*. 2006. Vol. 224, n° 1, pp. 1-9.

- GÜNDÜZ, Mehmet, ÖZAYDIN, Eda, ATAR, Müge Büyüktaşlı, KOÇ, Nevra, KIRSAÇLIOĞLU, Ceyda, KÖSE, Gülşen, CEFALÜ, Angelo Baldassare, AVERNA, Maurizio et TARUGI, Patrizia, 2016. Microsomal triglyceride transfer protein gene mutations in Turkish children: A novel mutation and clinical follow up. *Indian Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Indian Society of Gastroenterology*. mai 2016. Vol. 35, n° 3, pp. 236-241. DOI 10.1007/s12664-016-0654-z.
- HAGHPASSAND, M., WILDER, D. et MOBERLY, J. B., 1996. Inhibition of apolipoprotein B and triglyceride secretion in human hepatoma cells (HepG2). *Journal of Lipid Research*. juillet 1996. Vol. 37, n° 7, pp. 1468-1480.
- HAMEL, Johanna et LOGIGIAN, Eric L., 2019. The clinical spectrum of acute nutritional axonal neuropathy (ANAN) (S42.009). *Neurology*. 2019. Vol. 92, n° 15 Supplement, pp. S42.009.
- HAMER, Mark et CHIDA, Yoichi, 2007. Intake of fruit, vegetables, and antioxidants and risk of type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *Journal of Hypertension*. décembre 2007. Vol. 25, n° 12, pp. 2361-2369. DOI 10.1097/HJH.0b013e3282efc214.
- HAMMER, Monia Benhamed, EL EUCH-FAYACHE, Ghada, NEHDI, Houda, FEKI, Moncef, MAAMOURI-HICHERI, Wieme, HENTATI, Fayçal et AMOURI, Rim, 2014. Clinical features and molecular genetics of two Tunisian families with abetalipoproteinemia. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. février 2014. Vol. 21, n° 2, pp. 311-315. DOI 10.1016/j.jocn.2013.04.016.
- HAMMOND, B. R., JOHNSON, Elizabeth J., RUSSELL, Robert M., KRINSKY, Norman I., YEUM, Kyung-Jin, EDWARDS, Ross B. et SNODDERLY, D. Max, 1997. Dietary modification of human macular pigment density. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1997. Vol. 38, n° 9, pp. 1795-1801.
- HAMMOND, Billy R., 2015. Dietary Carotenoids and the Nervous System. *Foods (Basel, Switzerland)*. 10 décembre 2015. Vol. 4, n° 4, pp. 698-701. DOI 10.3390/foods4040698.
- HAMMOND, Billy R., FLETCHER, Laura M. et ELLIOTT, James G., 2013. Glare disability, photostress recovery, and chromatic contrast: relation to macular pigment and serum lutein and zeaxanthin. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 17 janvier 2013. Vol. 54, n° 1, pp. 476-481. DOI 10.1167/iovs.12-10411.
- HAMMOND, Billy R. et WOOTEN, Billy R., 2005. CFF thresholds: relation to macular pigment optical density. *Ophthalmic & Physiological Optics: The Journal of the British College of Ophthalmic Opticians (Optometrists)*. juillet 2005. Vol. 25, n° 4, pp. 315-319. DOI 10.1111/j.1475-1313.2005.00271.x.
- HAMMOND JR, Billy R., CURRAN-CELENTANO, J., JUDD, Stephen, FULD, Kenneth, KRINSKY, Norman I., WOOTEN, B. R. et SNODDERLY, D. Max, 1996. Sex Differences in Macular Pigment Optical Density:: Relation to Plasma Carotenoid Concentrations and Dietary Patterns. *Vision research*. 1996. Vol. 36, n° 13, pp. 2001-2012.
- HANDELMAN, G. J., DRATZ, E. A., REAY, C. C. et VAN KUIJK, J. G., 1988. Carotenoids in the human macula and whole retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. juin 1988. Vol. 29, n° 6, pp. 850-855.
- HANDELMAN, G. J., NIGHTINGALE, Z. D., LICHTENSTEIN, A. H., SCHAEFER, E. J. et BLUMBERG, J. B., 1999. Lutein and zeaxanthin concentrations in plasma after dietary supplementation with egg yolk. *The American Journal of Clinical Nutrition*. août 1999. Vol. 70, n° 2, pp. 247-251. DOI 10.1093/ajcn.70.2.247.
- HANDELMAN, G. J., PACKER, L. et CROSS, C. E., 1996. Destruction of tocopherols, carotenoids, and retinol in human plasma by cigarette smoke. *The American Journal of Clinical Nutrition*. avril 1996. Vol. 63, n° 4, pp. 559-565. DOI 10.1093/ajcn/63.4.559.
- HANDELMAN, Garry J. et DRATZ, Edward A., 1986. The role of antioxidants in the retina and retinal pigment epithelium and the nature of prooxidant-induced damage. *Advances in Free Radical Biology & Medicine*. 1986. Vol. 2, n° 1, pp. 1-89.
- HANKINSON, Susan E., STAMPFER, Meir J., SEDDON, Johanna M., COLDITZ, Graham A., ROSNER, Bernard, SPEIZER, Frank E. et WILLETT, Walter C., 1992. Nutrient intake and cataract extraction in women: a prospective study. *British Medical Journal*. 1992. Vol. 305, n° 6849, pp. 335-339.
- HANNA, Michael G., MELA, Ioanna, WANG, Lei, HENDERSON, Robert M., CHAPMAN, Edwin R., EDWARDSON, J. Michael et AUDHYA, Anjon, 2016. Sar1 GTPase Activity Is Regulated by Membrane Curvature. *The Journal of Biological Chemistry*. 15 janvier 2016. Vol. 291, n° 3, pp. 1014-1027. DOI 10.1074/jbc.M115.672287.

- HANSEN, G. H., NIELS-CHRISTIANSEN, L.-L., IMMERSDAL, L. et DANIELSEN, E. M., 2003. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in pig enterocytes: trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption. *Gut*. octobre 2003. Vol. 52, n° 10, pp. 1424-1431. DOI 10.1136/gut.52.10.1424.
- HARDING, A. E., MATTHEWS, S., JONES, S., ELLIS, C. J. K., BOOTH, I. W. et MULLER, D. P. R., 2010. Spinocerebellar Degeneration Associated with a Selective Defect of Vitamin E Absorption. [https://dx-doi-org.docadis.ups-tlse.fr/10.1056/NEJM198507043130107](https://dx.doi.org/docadis.ups-tlse.fr/10.1056/NEJM198507043130107) [en ligne]. 14 janvier 2010. [Consulté le 17 septembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://www-nejm-org-s.docadis.ups-tlse.fr/doi/pdf/10.1056/NEJM198507043130107>
- HARDING, A. E., MULLER, D. P. R., THOMAS, P. K. et WILLISON, H. J., 1982. Spinocerebellar degeneration secondary to chronic intestinal malabsorption: A vitamin E deficiency syndrome. *Annals of Neurology*. 1982. Vol. 12, n° 5, pp. 419-424. DOI 10.1002/ana.410120503.
- HARRISON, Earl H., 2012. Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *Biochimica Et Biophysica Acta*. janvier 2012. Vol. 1821, n° 1, pp. 70-77. DOI 10.1016/j.bbali.2011.06.002.
- HARRISON, Earl H., 2019. Mechanisms of Transport and Delivery of Vitamin A and Carotenoids to the Retinal Pigment Epithelium. *Molecular Nutrition & Food Research*. août 2019. Vol. 63, n° 15, pp. e1801046. DOI 10.1002/mnfr.201801046.
- HARRISON, Earl H. et CURLEY, Robert W., 2016. Carotenoids and retinoids: nomenclature, chemistry, and analysis. *The Biochemistry of Retinoid Signaling II*. 2016. pp. 1-19.
- HARTRIDGE, H., 1951. Macular pigment. *Nature*. 13 janvier 1951. Vol. 167, n° 4237, pp. 76-77. DOI 10.1038/167076b0.
- HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ, 2021. Hypocholestérolémies génétiques intestinales. *Haute Autorité de Santé* [en ligne]. 20 octobre 2021. [Consulté le 29 septembre 2022]. Disponible à l'adresse : [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3272490/fr/hypocholesterolemies-genetiques-intestinales](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3272490/fr/hypocholesterolemies-genetiques-intestinales)
- HAXO, Francis, 1950. Carotenoids of the mushroom *Cantharellus cinnabarinus*. *Botanical gazette*. 1950. Vol. 112, n° 2, pp. 228-232. DOI <https://doi.org/10.1086/335653>.
- HB, SALT, JK, LLOYD, AS, FOSBROOKE et DV, HUBBLE, 1960. On having no beta-lipoprotein. A syndrome comprising a-beta-lipoproteinaemia, acanthocytosis, and steatorrhoea. *Lancet (London, England)*. 1960. Vol. 2, n° 7146, pp. 325-329.
- HEEREN, Joerg, BEISIEGEL, Ulrike et GREWAL, Thomas, 2006. Apolipoprotein E recycling: implications for dyslipidemia and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. mars 2006. Vol. 26, n° 3, pp. 442-448. DOI 10.1161/01.ATV.0000201282.64751.47.
- HEGELE, R. A. et ANGEL, A., 1985. Arrest of neuropathy and myopathy in abetalipoproteinemia with high-dose vitamin E therapy. *Canadian Medical Association Journal*. 1 janvier 1985. Vol. 132, n° 1, pp. 41-44.
- HEID, Hans W., MOLL, Roland, SCHWETLICK, Ina, RACKWITZ, Hans-Richard et KEENAN, Thomas W., 1998. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell and tissue research*. 1998. Vol. 294, n° 2, pp. 309-321.
- HEINRICH, Ulrike, GÄRTNER, Christine, WIEBUSCH, Mathilde, EICHLER, Olaf, SIES, Helmut, TRONNIER, Hagen et STAHL, Wilhelm, 2003. Supplementation with beta-carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. *The Journal of Nutrition*. janvier 2003. Vol. 133, n° 1, pp. 98-101. DOI 10.1093/jn/133.1.98.
- HENNEKENS, C. H., BURING, J. E., MANSON, J. E., STAMPFER, M., ROSNER, B., COOK, N. R., BELANGER, C., LAMOTTE, F., GAZIANO, J. M., RIDKER, P. M., WILLETT, W. et PETO, R., 1996. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine*. 2 mai 1996. Vol. 334, n° 18, pp. 1145-1149. DOI 10.1056/NEJM199605023341801.
- HERCBERG, Serge, GALAN, Pilar, PREZIOSI, Paul, BERTRAIS, Sandrine, MENNEN, Louise, MALVY, Denis, ROUSSEL, Anne-Marie, FAVIER, Alain et BRIANÇON, Serge, 2004. The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Archives of Internal Medicine*. 22 novembre 2004. Vol. 164, n° 21, pp. 2335-2342. DOI 10.1001/archinte.164.21.2335.
- HERR, F. M. et ONG, D. E., 1992. Differential interaction of lecithin-retinol acyltransferase with cellular retinol binding proteins. *Biochemistry*. 28 juillet 1992. Vol. 31, n° 29, pp. 6748-6755. DOI 10.1021/bi00144a014.



- HIDALGO, I. J., RAUB, T. J. et BORCHARDT, R. T., 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*. mars 1989. Vol. 96, n° 3, pp. 736-749.
- HIGUCHI, I., YAMANO, T., KURIYAMA, M., NIINA, K., NAKASE, M., UMEMOTO, M., TAKE, H. et OSAME, M., 1993. Histochemical and ultrastructural pathology of skeletal muscle in a patient with abetalipoproteinemia. *Acta Neuropathologica*. 1993. Vol. 86, n° 5, pp. 529-531. DOI 10.1007/BF00228592.
- HIGUCHI, K., HOSPATTANKAR, A. V., LAW, S. W., MEGLIN, N., CORTRIGHT, J. et BREWER, H. B., 1988. Human apolipoprotein B (apoB) mRNA: identification of two distinct apoB mRNAs, an mRNA with the apoB-100 sequence and an apoB mRNA containing a premature in-frame translational stop codon, in both liver and intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. mars 1988. Vol. 85, n° 6, pp. 1772-1776. DOI 10.1073/pnas.85.6.1772.
- HILGERS, A. R., CONRADI, R. A. et BURTON, P. S., 1990. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmaceutical Research*. septembre 1990. Vol. 7, n° 9, pp. 902-910. DOI 10.1023/a:1015937605100.
- HOLLANDER, D., 1981. Intestinal absorption of vitamins A, E, D, and K. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. avril 1981. Vol. 97, n° 4, pp. 449-462.
- HOLLANDER, D. et RUBLE, P. E., 1978. beta-carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport. *The American Journal of Physiology*. décembre 1978. Vol. 235, n° 6, pp. E686-691. DOI 10.1152/ajpendo.1978.235.6.E686.
- HOMAN, Reynold et HAMELEHLE, Katherine L., 1998. Phospholipase A2 relieves phosphatidylcholine inhibition of micellar cholesterol absorption and transport by human intestinal cell line Caco-21. *Journal of Lipid Research*. 1998. Vol. 39, n° 6, pp. 1197-1209.
- HOSOMI, A., GOTO, K., KONDO, H., IWATSUBO, T., YOKOTA, T., OGAWA, M., ARITA, M., AOKI, J., ARAI, H. et INOUE, K., 1998. Localization of alpha-tocopherol transfer protein in rat brain. *Neuroscience Letters*. 13 novembre 1998. Vol. 256, n° 3, pp. 159-162. DOI 10.1016/s0304-3940(98)00785-x.
- HOZAWA, Atsushi, JACOBS, David R., STEFFES, Michael W., GROSS, Myron D., STEFFEN, Lyn M. et LEE, Duk-Hee, 2009. Circulating carotenoid concentrations and incident hypertension: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Journal of Hypertension*. février 2009. Vol. 27, n° 2, pp. 237-242. DOI 10.1097/HJH.0b013e32832258c9.
- HSU, Michael C. et ITKIN, Maxim, 2016. Lymphatic Anatomy. *Techniques in Vascular and Interventional Radiology*. décembre 2016. Vol. 19, n° 4, pp. 247-254. DOI 10.1053/j.tvir.2016.10.003.
- HU, Bo-Jie, HU, Ya-Nan, LIN, Song, MA, Wen-Jiang et LI, Xiao-Rong, 2011. Application of Lutein and Zeaxanthin in nonproliferative diabetic retinopathy. *International Journal of Ophthalmology*. 18 juin 2011. Vol. 4, n° 3, pp. 303-306. DOI 10.3980/j.issn.2222-3959.2011.03.19.
- HUANG, Chin-Shiu, FAN, Yang-En, LIN, Chen-Yu et HU, Miao-Lin, 2007. Lycopene inhibits matrix metalloproteinase-9 expression and down-regulates the binding activity of nuclear factor-kappa B and stimulatory protein-1. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. juillet 2007. Vol. 18, n° 7, pp. 449-456. DOI 10.1016/j.jnutbio.2006.08.007.
- HUANG, Fong-Chin, HORVÁTH, Györgyi, MOLNÁR, Péter, TURCSI, Erika, DELI, József, SCHRADER, Jens, SANDMANN, Gerhard, SCHMIDT, Holger et SCHWAB, Wilfried, 2009. Substrate promiscuity of RdCCD1, a carotenoid cleavage oxygenase from *Rosa damascena*. *Phytochemistry*. mars 2009. Vol. 70, n° 4, pp. 457-464. DOI 10.1016/j.phytochem.2009.01.020.
- HUANG, Mingdong, WEISSMAN, Jacques T., BÉRAUD-DUFOUR, Sophie, LUAN, Peng, WANG, Chenqian, CHEN, Wei, ARIDOR, Meir, WILSON, Ian A. et BALCH, William E., 2001. Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH2 terminus in ER export. *The Journal of Cell Biology*. 10 décembre 2001. Vol. 155, n° 6, pp. 937-948. DOI 10.1083/jcb.200106039.
- HUANG, Yang-Mu, DOU, Hong-Liang, HUANG, Fei-Fei, XU, Xian-Rong, ZOU, Zhi-Yong et LIN, Xiao-Ming, 2015. Effect of supplemental lutein and zeaxanthin on serum, macular pigmentation, and visual performance in patients with early age-related macular degeneration. *BioMed Research International*. 2015. Vol. 2015, pp. 564738. DOI 10.1155/2015/564738.
- HUANG, Yang-Mu, DOU, Hong-Liang, HUANG, Fei-Fei, XU, Xian-Rong, ZOU, Zhi-Yong, LU, Xin-Rong et LIN, Xiao-Ming, 2015. Changes following supplementation with lutein and zeaxanthin in retinal function in

- eyes with early age-related macular degeneration: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *British Journal of Ophthalmology*. 2015. Vol. 99, n° 3, pp. 371-375.
- HUGHES, T. E., SASAKI, W. V., ORDOVAS, J. M., FORTE, T. M., LAMON-FAVA, S. et SCHAEFER, E. J., 1987. A novel cell line (Caco-2) for the study of intestinal lipoprotein synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 15 mars 1987. Vol. 262, n° 8, pp. 3762-3767.
- HUI, David Y. et HOWLES, Philip N., 2005. Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. avril 2005. Vol. 16, n° 2, pp. 183-192. DOI 10.1016/j.semcdb.2005.01.003.
- HUSSAIN, M. M., 2000. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis*. janvier 2000. Vol. 148, n° 1, pp. 1-15. DOI 10.1016/s0021-9150(99)00397-4.
- HUSSAIN, M. M., KANCHA, R. K., ZHOU, Z., LUCHOOMUN, J., ZU, H. et BAKILLAH, A., 1996. Chylomicron assembly and catabolism: role of Apolipoproteins and Receptors. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1996. Vol. 1300, n° 3, pp. 151-170. DOI 10.1016/0005-2760(96)00041-0.
- HUSSAIN, M. M., ZHAO, Y., KANCHA, R. K., BLACKHART, B. D. et YAO, Z., 1995. Characterization of recombinant human apoB-48-containing lipoproteins in rat hepatoma McA-RH7777 cells transfected with apoB-48 cDNA. Overexpression of apoB-48 decreases synthesis of endogenous apoB-100. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. avril 1995. Vol. 15, n° 4, pp. 485-494. DOI 10.1161/01.atv.15.4.485.
- HUSSAIN, M. Mahmood, FATMA, Sumbul, PAN, Xiaoyue et IQBAL, Jahangir, 2005. Intestinal lipoprotein assembly. *Current Opinion in Lipidology*. juin 2005. Vol. 16, n° 3, pp. 281-285. DOI 10.1097/01.mol.0000169347.53568.5a.
- HUSSAIN, M. Mahmood, RAVA, Paul, WALSH, Meghan, RANA, Muhammad et IQBAL, Jahangir, 2012. Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutrition & Metabolism*. 21 février 2012. Vol. 9, pp. 14. DOI 10.1186/1743-7075-9-14.
- HUSSAIN, M. Mahmood, SHI, Jason et DREIZEN, Paul, 2003. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *Journal of Lipid Research*. 2003. Vol. 44, n° 1, pp. 22-32. DOI 10.1194/jlr.R200014-JLR200.
- IGIELSKA-KALWAT, Joanna, GOŚCIAŃSKA, Joanna et NOWAK, Izabela, 2015. [Carotenoids as natural antioxidants]. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)*. 7 avril 2015. Vol. 69, pp. 418-428. DOI 10.5604/17322693.1148335.
- ILLINGWORTH, D. R., CONNOR, W. E. et MILLER, R. G., 1980. Abetalipoproteinemia. Report of two cases and review of therapy. *Archives of Neurology*. octobre 1980. Vol. 37, n° 10, pp. 659-662. DOI 10.1001/archneur.1980.00500590083015.
- INGRAM, Norianne T., SAMPATH, Alapakkam P. et FAIN, Gordon L., 2016. Why are rods more sensitive than cones? *The Journal of Physiology*. 1 octobre 2016. Vol. 594, n° 19, pp. 5415-5426. DOI 10.1113/JP272556.
- IQBAL, Jahangir et HUSSAIN, M. Mahmood, 2005. Evidence for multiple complementary pathways for efficient cholesterol absorption in mice. *Journal of Lipid Research*. 2005. Vol. 46, n° 7, pp. 1491-1501. DOI 10.1194/jlr.M500023-JLR200.
- IQBAL, Jahangir et HUSSAIN, M. Mahmood, 2009. Intestinal lipid absorption. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. juin 2009. Vol. 296, n° 6, pp. E1183-E1194. DOI 10.1152/ajpendo.90899.2008.
- IQBAL, Jahangir, PARKS, John S. et HUSSAIN, M. Mahmood, 2013. Lipid absorption defects in intestine-specific microsomal triglyceride transfer protein and ATP-binding cassette transporter A1-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2013. Vol. 288, n° 42, pp. 30432-30444.
- ISSELBACHER, K. J., SCHEIG, R., PLOTKIN, G. R. et CAULFIELD, J. B., 1964. Congenital Beta-Lipoprotein Deficiency: An hereditary disorder involving a defect in the Absorption and transport of Lipids. *Medicine*. mai 1964. Vol. 43, pp. 347-361.
- ITO, Y., OCHIAI, J., SASAKI, R., SUZUKI, S., KUSUHARA, Y., MORIMITSU, Y., OTANI, M. et AOKI, K., 1990. Serum concentrations of carotenoids, retinol, and alpha-tocopherol in healthy persons determined by high-performance liquid chromatography. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 24 décembre 1990. Vol. 194, n° 2-3, pp. 131-144. DOI 10.1016/0009-8981(90)90128-f.
- IUPAC, Comm et COMM, IUPAC-IUB, 1971. Tentative rules for the nomenclature of carotenoids. *Biochemistry*. 1971. Vol. 10, n° 26, pp. 4827-4837.

- JACQUES, Paul F. et CHYLACK JR, Leo T., 1991. Epidemiologic evidence of a role for the antioxidant vitamins and carotenoids in cataract prevention. *The American journal of clinical nutrition*. 1991. Vol. 53, n° 1, pp. 352S-355S.
- JACQUES, Paul F., HARTZ, S. C., CHYLACK JR, Leo T., MCGANDY, R. B. et SADOWSKI, James A., 1988. Nutritional status in persons with and without senile cataract: blood vitamin and mineral levels. *The American journal of clinical nutrition*. 1988. Vol. 48, n° 1, pp. 152-158.
- JAHNS, Peter et HOLZWARTH, Alfred R., 2012. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica Et Biophysica Acta*. janvier 2012. Vol. 1817, n° 1, pp. 182-193. DOI 10.1016/j.bbabo.2011.04.012.
- JAMIL, H., GORDON, D. A., EUSTICE, D. C., BROOKS, C. M., DICKSON, J. K., CHEN, Y., RICCI, B., CHU, C. H., HARRITY, T. W., CIOSEK, C. P., BILLER, S. A., GREGG, R. E. et WETTERAU, J. R., 1996. An inhibitor of the microsomal triglyceride transfer protein inhibits apoB secretion from HepG2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 15 octobre 1996. Vol. 93, n° 21, pp. 11991-11995. DOI 10.1073/pnas.93.21.11991.
- JAMPEL, R. S. et FALLS, H. F., 1958. Atypical retinitis pigmentosa, acanthrocytosis, and hereditary degenerative neuromuscular disease. *A.M.A. Archives of Ophthalmology*. juin 1958. Vol. 59, n° 6, pp. 818-820. DOI 10.1001/archoph.1958.00940070032002.
- JARAMILLO, Melba C. et ZHANG, Donna D., 2013. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes & Development*. 15 octobre 2013. Vol. 27, n° 20, pp. 2179-2191. DOI 10.1101/gad.225680.113.
- JI, Z. S., FAZIO, S., LEE, Y. L. et MAHLEY, R. W., 1994. Secretion-capture role for apolipoprotein E in remnant lipoprotein metabolism involving cell surface heparan sulfate proteoglycans. *The Journal of Biological Chemistry*. 28 janvier 1994. Vol. 269, n° 4, pp. 2764-2772.
- JIA, Lin, BETTERS, Jenna L. et YU, Liqing, 2011. Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) Protein in Intestinal and Hepatic Cholesterol Transport. *Annual review of physiology*. 2011. Vol. 73, pp. 239-259. DOI 10.1146/annurev-physiol-012110-142233.
- JOHNSON, Elizabeth J., 2014. Role of lutein and zeaxanthin in visual and cognitive function throughout the lifespan. *Nutrition Reviews*. septembre 2014. Vol. 72, n° 9, pp. 605-612. DOI 10.1111/nure.12133.
- JOHNSON, Leonard R. et GERWIN, Thomas A., 2007. *Gastrointestinal physiology*. Mosby Elsevier Philadelphia, PA.
- JOMOVA, Klaudia et VALKO, Marian, 2013. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013. Vol. 70, pp. 102-110. DOI 10.1016/j.ejmech.2013.09.054.
- JONES, Bethan, JONES, Emma L., BONNEY, Stephanie A., PATEL, Hetal N., MENSENKAMP, Arjen R., EICHENBAUM-VOLINE, Sophie, RUDLING, Mats, MYRDAL, Urban, ANNESI, Grazia, NAIK, Sandhya, MEADOWS, Nigel, QUATTRONE, Aldo, ISLAM, Suhail A., NAOUMOVA, Rossitza P., ANGELIN, Bo, INFANTE, Recaredo, LEVY, Emile, ROY, Claude C., FREEMONT, Paul S., SCOTT, James et SHOULDERS, Carol C., 2003. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nature Genetics*. mai 2003. Vol. 34, n° 1, pp. 29-31. DOI 10.1038/ng1145.
- JUTURU, Vijaya, BOWMAN, James P et DESHPANDE, Jayant, 2016. Overall skin tone and skin-lightening-improving effects with oral supplementation of lutein and zeaxanthin isomers: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 7 octobre 2016. Vol. 9, pp. 325-332. DOI 10.2147/CCID.S115519.
- KABAGAMBE, Edmond K., BAYLIN, Ana, SILES, Xinia et CAMPOS, Hannia, 2002. Comparison of dietary intakes of micro- and macronutrients in rural, suburban and urban populations in Costa Rica. *Public Health Nutrition*. décembre 2002. Vol. 5, n° 6A, pp. 835-842. DOI 10.1079/PHN2002372.
- KANE, JP, 1995. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B Apolipoproteins. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 1995.
- KAPLAN, Henry J., 2007. Anatomy and function of the eye. *Chemical Immunology and Allergy*. 2007. Vol. 92, pp. 4-10. DOI 10.1159/000099236.
- KAPLAN, L. A., LAU, J. M. et STEIN, E. A., 1990. Carotenoid composition, concentrations, and relationships in various human organs. *Clinical Physiology and Biochemistry*. 1990. Vol. 8, n° 1, pp. 1-10.

- KARPE, F., HAMSTEN, A., UFFELMAN, K. et STEINER, G., 1996. Apolipoprotein B-48. *Methods in Enzymology*. 1996. Vol. 263, pp. 95-104. DOI 10.1016/s0076-6879(96)63007-9.
- KARPPI, Jouni, LAUKKANEN, Jari A. et KURL, Sudhir, 2012. Plasma lutein and zeaxanthin and the risk of age-related nuclear cataract among the elderly Finnish population. *British Journal of Nutrition*. 2012. Vol. 108, n° 1, pp. 148-154.
- KARRER, P. et HELFENSTEIN, A., 1933. Plant pigments. *Annual Review of Biochemistry*. 1933. Vol. 2, n° 1, pp. 397-418.
- KAULMANN, Anouk et BOHN, Torsten, 2014. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress--implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*. novembre 2014. Vol. 34, n° 11, pp. 907-929. DOI 10.1016/j.nutres.2014.07.010.
- KAYDEN, H. J., 1972. Abetalipoproteinemia. *Annual Review of Medicine*. 1972. Vol. 23, pp. 285-296. DOI 10.1146/annurev.me.23.020172.001441.
- KAYDEN, H. J., SILBER, R. et KOSSMANN, C. E., 1965. The role of vitamin E deficiency in the abnormal autohemolysis of acanthocytosis. *Transactions of the Association of American Physicians*. 1965. Vol. 78, pp. 334-342.
- KEIDAR, S., ETZIONI, A., BROOK, J. G., GERSHONI-BARUCH, R. et AVIRAM, M., 1990. Compound heterozygosity for abetalipoproteinemia and familial hypobetalipoproteinemia. *Journal of Medical Genetics*. février 1990. Vol. 27, n° 2, pp. 133-134. DOI 10.1136/jmg.27.2.133.
- KEIL, B et WHELAN, J, 1982. Nomenclature of Tocopherols and Related Compounds. *European Journal of Biochemistry*. 1982. Vol. 123, n° 3, pp. 473-475. DOI 10.1111/j.1432-1033.1982.tb06554.x.
- KHACHIK, F., SPANGLER, C. J., SMITH, J. C., CANFIELD, L. M., STECK, A. et PFANDER, H., 1997. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Analytical Chemistry*. 15 mai 1997. Vol. 69, n° 10, pp. 1873-1881. DOI 10.1021/ac961085i.
- KHACHIK, Frederick, DE MOURA, Fabiana F., ZHAO, Da-You, AEBISCHER, Claude-Pierre et BERNSTEIN, Paul S., 2002. Transformations of selected carotenoids in plasma, liver, and ocular tissues of humans and in nonprimate animal models. *Investigative ophthalmology & visual science*. novembre 2002. Vol. 43, n° 11, pp. 3383-3392.
- KHAN, Arif O., BASAMH, Omar et ALKATAN, Hind M., 2019. Ophthalmic diagnosis and optical coherence tomography of abetalipoproteinemia, a treatable form of pediatric retinal dystrophy. *Journal of AAPOS: the official publication of the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*. juin 2019. Vol. 23, n° 3, pp. 176-177. DOI 10.1016/j.jaapos.2019.01.005.
- KHAN, Usman Mir, SEVINDIK, Mustafa, ZARRABI, Ali, NAMI, Mohammad, OZDEMIR, Betul, KAPLAN, Dilara Nur, SELAMOGLU, Zeliha, HASAN, Muzaffar, KUMAR, Manoj, ALSHEHRI, Mohammed M. et SHARIFI-RAD, Javad, 2021. Lycopene: Food Sources, Biological Activities, and Human Health Benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021. Vol. 2021, pp. 2713511. DOI 10.1155/2021/2713511.
- KHATUN, Irani, ZEISSIG, Sebastian, IQBAL, Jahangir, WANG, Minghui, CURIEL, David, SHELNESS, Gregory S., BLUMBERG, Richard S. et HUSSAIN, M. Mahmood, 2012. Phospholipid transfer activity of microsomal triglyceride transfer protein produces apolipoprotein B and reduces hepatosteatosis while maintaining low plasma lipids in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. mai 2012. Vol. 55, n° 5, pp. 1356-1368. DOI 10.1002/hep.25504.
- KIDMOSE, Ulla, YANG, R.-Y., THILSTED, S. H., CHRISTENSEN, Lars Porskjær et BRANDT, Kirsten, 2006. Content of carotenoids in commonly consumed Asian vegetables and stability and extractability during frying. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006. Vol. 19, n° 6-7, pp. 562-571.
- KIEFER, Cornelia, SUMSER, Emerich, WERNET, Mathias F. et VON LINTIG, Johannes, 2002. A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 6 août 2002. Vol. 99, n° 16, pp. 10581-10586. DOI 10.1073/pnas.162182899.
- KIM, Young-Nam et CHO, Youn-Ok, 2015. Vitamin E status of 20- to 59-year-old adults living in the Seoul metropolitan area of South Korea. *Nutrition Research and Practice*. avril 2015. Vol. 9, n° 2, pp. 192-198. DOI 10.4162/nrp.2015.9.2.192.
- KIMURA, Mieko et RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B., 2003. Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003. Vol. 51, n° 9, pp. 2603-2607.

- KINGWELL, Bronwyn A., CHAPMAN, M. John, KONTUSH, Anatol et MILLER, Norman E., 2014. HDL-targeted therapies: progress, failures and future. *Nature Reviews. Drug Discovery*. juin 2014. Vol. 13, n° 6, pp. 445-464. DOI 10.1038/nrd4279.
- KIVLEN, M. H., DORSEY, C. A., LINGAPPA, V. R. et HEGDE, R. S., 1997. Asymmetric distribution of pause transfer sequences in apolipoprotein B-100. *Journal of Lipid Research*. juin 1997. Vol. 38, n° 6, pp. 1149-1162.
- KLEIN, Ronald, KLEIN, Barbara EK, JENSEN, Susan C., MARES-PERLMAN, Julie A., CRUICKSHANKS, Karen J. et PALTA, Mari, 1999. Age-related maculopathy in a multiracial United States population: the National Health and Nutrition Examination Survey III. *Ophthalmology*. 1999. Vol. 106, n° 6, pp. 1056-1065.
- KLJAK, Kristina, CAROVIĆ-STANKO, Klaudija, KOS, Ivica, JANJEČIĆ, Zlatko, KIŠ, Goran, DUVNJAK, Marija, SAFNER, Toni et BEDEKOVIC, Dalibor, 2021. Plant Carotenoids as Pigment Sources in Laying Hen Diets: Effect on Yolk Color, Carotenoid Content, Oxidative Stability and Sensory Properties of Eggs. *Foods (Basel, Switzerland)*. 29 mars 2021. Vol. 10, n° 4, pp. 721. DOI 10.3390/foods10040721.
- KNEKT, Paul, HELIÖVAARA, Markku, RISSANEN, Aila, AROMAA, Arpo et AARAN, Ritva-Kaarina, 1992. Serum antioxidant vitamins and risk of cataract. *British Medical Journal*. 1992. Vol. 305, n° 6866, pp. 1392-1394.
- KOBAYASHI, M. et SAKAMOTO, YJBL, 1999. Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters*. 1999. Vol. 21, n° 4, pp. 265-269.
- KOENIG, Michel, 2003. Rare forms of autosomal recessive neurodegenerative ataxia. In : *Seminars in pediatric neurology*. Elsevier. 2003. pp. 183-192.
- KOPSELL, Dean A., KOPSELL, David E. et CURRAN-CELENTANO, Joanne, 2007. Carotenoid pigments in kale are influenced by nitrogen concentration and form. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007. Vol. 87, n° 5, pp. 900-907.
- KORNZWEIG, A. L. et BASSEN, F. A., 1957. Retinitis pigmentosa, acanthocytosis, and hereditary degenerative neuromuscular disease. *A.M.A. Archives of Ophthalmology*. août 1957. Vol. 58, n° 2, pp. 183-187. DOI 10.1001/archoph.1957.00940010195004.
- KOROBELNIK, Jean-François, ROUGIER, Marie-Bénédicte, DELYFER, Marie-Noëlle, BRON, Alain, MERLE, Bénédicte M. J., SAVEL, Hélène, CHÈNE, Geneviève, DELCOURT, Cécile et CREUZOT-GARCHER, Catherine, 2017. Effect of Dietary Supplementation With Lutein, Zeaxanthin, and  $\omega$ -3 on Macular Pigment: A Randomized Clinical Trial. *JAMA ophthalmology*. 1 novembre 2017. Vol. 135, n° 11, pp. 1259-1266. DOI 10.1001/jamaophthalmol.2017.3398.
- KOROBELNIK, Jean-François, ROUGIER, Marie-Bénédicte, DELYFER, Marie-Noëlle, BRON, Alain, MERLE, Bénédicte MJ, SAVEL, Hélène, CHÈNE, Geneviève, DELCOURT, Cécile et CREUZOT-GARCHER, Catherine, 2017. Effect of dietary supplementation with lutein, zeaxanthin, and  $\omega$ -3 on macular pigment: a randomized clinical trial. *JAMA ophthalmology*. 2017. Vol. 135, n° 11, pp. 1259-1266.
- KOSTNER, G. M., OETTL, K., JAUHAINEN, M., EHNHOLM, C., ESTERBAUER, H. et DIEPLINGER, H., 1995. Human plasma phospholipid transfer protein accelerates exchange/transfer of  $\alpha$ -tocopherol between lipoproteins and cells. *Biochemical Journal*. 1995. Vol. 305, n° 2, pp. 659-667. DOI 10.1042/bj3050659.
- KOTT, E., DELPRE, G., KADISH, U., DZIATELOVSKY, M. et SANDBANK, U., 1977. Abetalipoproteinemia (Bassen-Kornzweig syndrome). *Acta neuropathologica*. 1977. Vol. 37, n° 3, pp. 255-258.
- KRINSKY, N. I., CRONWELL, D. G. et ONCLEY, J. L., 1958. The transport of vitamin A and carotenoids in human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. janvier 1958. Vol. 73, n° 1, pp. 233-246. DOI 10.1016/0003-9861(58)90259-5.
- KRINSKY, Norman I., 1998. The Antioxidant and Biological Properties of the Carotenoids a. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998. Vol. 854, n° 1, pp. 443-447.
- KRINSKY, Norman I., BEECHER, G. R., BURK, R. F., CHAN, A. C., ERDMAN, J. W., JACOB, R. A., JIALAL, I., KOLONEL, L. N., MARSHALL, J. R. et TAYLOR MAYNE, P. R., 2000. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. *Institute of Medicine*. 2000.
- KRITCHEVSKY, S. B., BUSH, A. J., PAHOR, M. et GROSS, M. D., 2000. Serum carotenoids and markers of inflammation in nonsmokers. *American Journal of Epidemiology*. 1 décembre 2000. Vol. 152, n° 11, pp. 1065-1071. DOI 10.1093/aje/152.11.1065.

- KRUK, Joanna, KUBASIK-KLADNA, Katarzyna et ABOUL-ENEIN, Hassan Y., 2015. The Role Oxidative Stress in the Pathogenesis of Eye Diseases: Current Status and a Dual Role of Physical Activity. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2015. Vol. 16, n° 3, pp. 241-257. DOI 10.2174/1389557516666151120114605.
- KULINSKI, Agnes, RUSTAEUS, Sabina et VANCE, Jean E., 2002. Microsomal triacylglycerol transfer protein is required for luminal accretion of triacylglycerol not associated with ApoB, as well as for ApoB lipidation. *The Journal of Biological Chemistry*. 30 août 2002. Vol. 277, n° 35, pp. 31516-31525. DOI 10.1074/jbc.M202015200.
- KUMAR, Sohail, NANJIANI, Deedar, TAHIR, Faryal, AZIM, Dua et PARKASH, Oam, 2020. Chylomicron Retention Disease in A Male Infant: A Rare Case from Pakistan. *Cureus*. 5 mars 2020. Vol. 12, n° 3, pp. e7184. DOI 10.7759/cureus.7184.
- KUNITAKE, S. T., MENDEL, C. M. et HENNESSY, L. K., 1992. Interconversion between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities. *Journal of Lipid Research*. décembre 1992. Vol. 33, n° 12, pp. 1807-1816.
- LACAILLE, F., BRATOS, M., BOUMA, M. E., JOS, J., SCHMITZ, J. et REY, J., 1989. [Anderson's disease. Clinical and morphologic study of 7 cases]. *Archives Francaises De Pediatrie*. septembre 1989. Vol. 46, n° 7, pp. 491-498.
- LAKKARAJU, Aparna, UMAPATHY, Ankita, TAN, Li Xuan, DANIELE, Lauren, PHILP, Nancy J., BOESZEBATTAGLIA, Kathleen et WILLIAMS, David S., 2020. The cell biology of the retinal pigment epithelium. *Progress in retinal and eye research*. 24 février 2020. pp. 100846. DOI 10.1016/j.preteyeres.2020.100846.
- LAKSHMAN, M. R., ASHER, K. A., ATTLESEY, M. G., SATCHITHANANDAM, S., MYCHKOVSKY, I. et COUTLAKIS, P. J., 1989. Absorption, storage, and distribution of beta-carotene in normal and beta-carotene-fed rats: roles of parenchymal and stellate cells. *Journal of Lipid Research*. octobre 1989. Vol. 30, n° 10, pp. 1545-1550.
- LAKSHMINARAYANA, Rangaswamy, RAJU, Marisiddaiah, KRISHNAKANTHA, Thirumalai Parthasarathy et BASKARAN, Vallikannan, 2007. Lutein and zeaxanthin in leafy greens and their bioavailability: olive oil influences the absorption of dietary lutein and its accumulation in adult rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 25 juillet 2007. Vol. 55, n° 15, pp. 6395-6400. DOI 10.1021/jf070482z.
- LAMB, Trevor D. et PUGH, Edward N., 2006. Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. décembre 2006. Vol. 47, n° 12, pp. 5137-5152. DOI 10.1167/iovs.06-0849.
- LAMBERG, A., JAUHAINEN, M., METSO, J., EHNHOLM, C., SHOULDERS, C., SCOTT, J., PIHLAJANIEMI, T. et KIVIRIKKO, K. I., 1996. The role of protein disulphide isomerase in the microsomal triacylglycerol transfer protein does not reside in its isomerase activity. *The Biochemical Journal*. 15 avril 1996. Vol. 315 ( Pt 2), pp. 533-536. DOI 10.1042/bj3150533.
- LAMY, M., FREZAL, J., POLONOVSKI, J., DRUEZ, G. et REY, J., 1963. Congenital absence of beta-lipoproteins. *Pediatrics*. février 1963. Vol. 31, pp. 277-289.
- LANDRUM, J. T., BONE, R. A., JOA, H., KILBURN, M. D., MOORE, L. L. et SPRAGUE, K. E., 1997. A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. *Experimental Eye Research*. juillet 1997. Vol. 65, n° 1, pp. 57-62. DOI 10.1006/exer.1997.0309.
- LANDRUM, John T., 2013. Reactive oxygen and nitrogen species in biological systems: reactions and regulation by carotenoids. In : *Carotenoids and Human Health*. Springer. pp. 57-101.
- LEE, Bonggi, ZHU, Jiabin, WOLINS, Nathan E., CHENG, Ji-Xin et BUHMAN, Kimberly K., 2009. Differential association of adipophilin and TIP47 proteins with cytoplasmic lipid droplets in mouse enterocytes during dietary fat absorption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2009. Vol. 1791, n° 12, pp. 1173-1180.
- LEE, Jooho et HEGELE, Robert A., 2014. Abetalipoproteinemia and homozygous hypobetalipoproteinemia: a framework for diagnosis and management. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. mai 2014. Vol. 37, n° 3, pp. 333-339. DOI 10.1007/s10545-013-9665-4.
- LEE, Marcus C. S. et MILLER, Elizabeth A., 2007. Molecular mechanisms of COPII vesicle formation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. août 2007. Vol. 18, n° 4, pp. 424-434. DOI 10.1016/j.semcdb.2007.06.007.

- LEERMAKERS, Elisabeth Tm, DARWEESH, Sirwan KI, BAENA, Cristina P., MOREIRA, Eduardo M., MELO VAN LENT, Debora, TIELEMANS, Myrte J., MUKA, Taulant, VITEZOVA, Anna, CHOWDHURY, Rajiv, BRAMER, Wichor M., KIEFTE-DE JONG, Jessica C., FELIX, Janine F. et FRANCO, Oscar H., 2016. The effects of lutein on cardiometabolic health across the life course: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*. février 2016. Vol. 103, n° 2, pp. 481-494. DOI 10.3945/ajcn.115.120931.
- LEHNER, Richard, LIAN, Jihong et QUIROGA, Ariel D., 2012. Lumenal lipid metabolism: implications for lipoprotein assembly. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. mai 2012. Vol. 32, n° 5, pp. 1087-1093. DOI 10.1161/ATVBAHA.111.241497.
- LEIPER, J. M., BAYLISS, J. D., PEASE, R. J., BRETT, D. J., SCOTT, J. et SHOULDERS, C. C., 1994. Microsomal triglyceride transfer protein, the abetalipoproteinemia gene product, mediates the secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from heterologous cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2 septembre 1994. Vol. 269, n° 35, pp. 21951-21954.
- LEPPÄLÄ, J. M., VIRTAMO, J., FOGELHOLM, R., HUTTUNEN, J. K., ALBANES, D., TAYLOR, P. R. et HEINONEN, O. P., 2000. Controlled trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on stroke incidence and mortality in male smokers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. janvier 2000. Vol. 20, n° 1, pp. 230-235. DOI 10.1161/01.atv.20.1.230.
- LESEVE, J. F., PERRIN, J., GEORGES, A. et MORALI, A., 2009. Acanthocytosis in Anderson's disease. *British Journal of Haematology*. avril 2009. Vol. 145, n° 1, pp. 1. DOI 10.1111/j.1365-2141.2008.07422.x.
- LESKE, M. Cristina, CHYLACK, Leo T. et WU, Suh-Yuh, 1991. The lens opacities case-control study: risk factors for cataract. *Archives of ophthalmology*. 1991. Vol. 109, n° 2, pp. 244-251.
- LETH, Torben, JAKOBSEN, Jette et ANDERSEN, Niels Lyhne, 2000. The intake of carotenoids in Denmark. *European journal of lipid science and technology*. 2000. Vol. 102, n° 2, pp. 128-132.
- LEVY, E., MEHRAN, M. et SEIDMAN, E., 1995. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. mai 1995. Vol. 9, n° 8, pp. 626-635. DOI 10.1096/fasebj.9.8.7768354.
- LEVY, Emile, 2015. Insights from human congenital disorders of intestinal lipid metabolism. *Journal of Lipid Research*. mai 2015. Vol. 56, n° 5, pp. 945-962. DOI 10.1194/jlr.R052415.
- LEVY, Emile, POINSOT, Pierre et SPAHIS, Schohraya, 2019. Chylomicron retention disease: genetics, biochemistry, and clinical spectrum. *Current Opinion in Lipidology*. avril 2019. Vol. 30, n° 2, pp. 134-139. DOI 10.1097/MOL.0000000000000578.
- LEVY, Emile, STAN, Simona, DELVIN, Edgard, MENARD, Daniel, SHOULDERS, Carol, GAROFALO, Carole, SLIGHT, Isabelle, SEIDMAN, Ernest, MAYER, Gaetan et BENDAYAN, Moise, 2002. Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. *The Journal of Biological Chemistry*. 10 mai 2002. Vol. 277, n° 19, pp. 16470-16477. DOI 10.1074/jbc.M102385200.
- LI, Binxing, GEORGE, Evan W., ROGNON, Gregory T., GORUSUPUDI, Aruna, RANGANATHAN, Arunkumar, CHANG, Fu-Yen, SHI, Linjia, FREDERICK, Jeanne M. et BERNSTEIN, Paul S., 2020. Imaging lutein and zeaxanthin in the human retina with confocal resonance Raman microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2 juin 2020. Vol. 117, n° 22, pp. 12352-12358. DOI 10.1073/pnas.1922793117.
- LI, Zhaoping, WONG, Angela, HENNING, Susanne M., ZHANG, Yanjun, JONES, Alexis, ZERLIN, Alona, THAMES, Gail, BOWERMAN, Susan, TSENG, Chi-Hong et HEBER, David, 2013. Hass avocado modulates postprandial vascular reactivity and postprandial inflammatory responses to a hamburger meal in healthy volunteers. *Food & Function*. 26 février 2013. Vol. 4, n° 3, pp. 384-391. DOI 10.1039/c2fo30226h.
- LIAANEN-JENSEN, Synnöve, 1973. Structural elucidation of carotenoids—a progress report. *Pure and Applied Chemistry*. 1973. Vol. 35, n° 1, pp. 81-112.
- LIAN, Fuzhi et WANG, Xiang-Dong, 2008. Enzymatic metabolites of lycopene induce Nrf2-mediated expression of phase II detoxifying/antioxidant enzymes in human bronchial epithelial cells. *International Journal of Cancer*. 15 septembre 2008. Vol. 123, n° 6, pp. 1262-1268. DOI 10.1002/ijc.23696.
- LIANG, S., WU, X., FISHER, E. A. et GINSBERG, H. N., 2000. 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. *The Journal of Biological Chemistry*. 13 octobre 2000. Vol. 275, n° 41, pp. 32003-32010. DOI 10.1074/jbc.M004646200.
- LINDBERGH, Cutter A., RENZI-HAMMOND, Lisa M., HAMMOND, Billy R., TERRY, Douglas P., MEWBORN, Catherine M., PUENTE, Antonio N. et MILLER, L. Stephen, 2018. Lutein and Zeaxanthin Influence Brain Function in Older Adults: A Randomized Controlled Trial. *Journal of the International Neuropsychological Society: JINS*. janvier 2018. Vol. 24, n° 1, pp. 77-90. DOI 10.1017/S1355617717000534.
- LINNEWIEL-HERMONI, Karin, MOTRO, Yair, MILLER, Yifat, LEVY, Joseph et SHARONI, Yoav, 2014. Carotenoid derivatives inhibit nuclear factor kappa B activity in bone and cancer cells by targeting key thiol groups. *Free Radical Biology & Medicine*. octobre 2014. Vol. 75, pp. 105-120. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.024.
- LINTHORST, J. M., CLARK, S. Bennett et HOLT, P. R., 1977. Triglyceride emulsification by amphipaths present in the intestinal lumen during digestion of fat. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1977. Vol. 60, n° 1, pp. 1-10.
- LIU, Ruijie, IQBAL, Jahangir, YEANG, Calvin, WANG, David Q.-H., HUSSAIN, M. Mahmood et JIANG, Xian-Cheng, 2007. Phospholipid transfer protein-deficient mice absorb less cholesterol. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. septembre 2007. Vol. 27, n° 9, pp. 2014-2021. DOI 10.1161/ATVBAHA.107.149914.
- LIU, Ying, CONLON, Donna M., BI, Xin, SLOVIK, Katherine J., SHI, Jianting, EDELSTEIN, Hailey I., MILLAR, John S., JAVAHERI, Ali, CUCHEL, Marina, PASHOS, Evanthia E., IQBAL, Jahangir, HUSSAIN, M. Mahmood, HEGELE, Robert A., YANG, Wenli, DUNCAN, Stephen A., RADER, Daniel J. et MORRISSEY, Edward E., 2017. Lack of MTTP Activity in Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocytes and Cardiomyocytes Abolishes apoB Secretion and Increases Cell Stress. *Cell Reports*. 16 mai 2017. Vol. 19, n° 7, pp. 1456-1466. DOI 10.1016/j.celrep.2017.04.064.
- LOBO, Glenn P., AMENGUAL, Jaume, PALCZEWSKI, Grzegorz, BABINO, Darwin et VON LINTIG, Johannes, 2012. Carotenoid-oxygenases: Key Players for Carotenoid Function and Homeostasis in Mammalian Biology. *Biochimica et biophysica acta*. janvier 2012. Vol. 1821, n° 1, pp. 78-87. DOI 10.1016/j.bbali.2011.04.010.
- LONDON, Anat, BENHAR, Inbal et SCHWARTZ, Michal, 2013. The retina as a window to the brain-from eye research to CNS disorders. *Nature Reviews. Neurology*. janvier 2013. Vol. 9, n° 1, pp. 44-53. DOI 10.1038/nrneuro.2012.227.
- LONG, Kimberly R., YAMAMOTO, Yasunori, BAKER, Adam L., WATKINS, Simon C., COYNE, Carolyn B., CONWAY, James F. et ARIDOR, Meir, 2010. Sar1 assembly regulates membrane constriction and ER export. *The Journal of Cell Biology*. 12 juillet 2010. Vol. 190, n° 1, pp. 115-128. DOI 10.1083/jcb.201004132.
- LUO, Jie, YANG, Hongyuan et SONG, Bao-Liang, 2020. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. avril 2020. Vol. 21, n° 4, pp. 225-245. DOI 10.1038/s41580-019-0190-7.
- LYLE, Barbara J., MARES-PERLMAN, Julie A., KLEIN, Barbara EK, KLEIN, Ronald et GREGER, Janet L., 1999. Antioxidant intake and risk of incident age-related nuclear cataracts in the Beaver Dam Eye Study. *American journal of epidemiology*. 1999. Vol. 149, n° 9, pp. 801-809.
- MA, Le, YAN, Shao-Fang, HUANG, Yang-Mu, LU, Xin-Rong, QIAN, Fang, PANG, Hong-Lei, XU, Xian-Rong, ZOU, Zhi-Yong, DONG, Peng-Cheng et XIAO, Xin, 2012. Effect of lutein and zeaxanthin on macular pigment and visual function in patients with early age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2012. Vol. 119, n° 11, pp. 2290-2297.
- MACDONALD, P. N. et ONG, D. E., 1988. Evidence for a lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *The Journal of Biological Chemistry*. 5 septembre 1988. Vol. 263, n° 25, pp. 12478-12482.
- MACGILCHRIST, A. J., MILLS, P. R., NOBLE, M., FOULDS, W. S., SIMPSON, J. A. et WATKINSON, G., 1988. Abetalipoproteinemia in adults: role of vitamin therapy. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 1988. Vol. 11, n° 2, pp. 184-190. DOI 10.1007/BF01799870.
- MAGNOLO, Lucia, NAJAH, Mohamed, FANCELLO, Tatiana, DI LEO, Enza, PINOTTI, Elisa, BRINI, Ines, GUEDDICHE, Neji M., CALANDRA, Sebastiano, SLIMENE, Naceur M. et TARUGI, Patrizia, 2013. Novel mutations in SAR1B and MTTP genes in Tunisian children with chylomicron retention disease and abetalipoproteinemia. *Gene*. 1 janvier 2013. Vol. 512, n° 1, pp. 28-34. DOI 10.1016/j.gene.2012.09.117.



- MAIANI, Giuseppe, PERIAGO CASTÓN, María Jesús, CATASTA, Giovina, TOTI, Elisabetta, CAMBRODÓN, Isabel Goñi, BYSTED, Anette, GRANADO-LORENCIO, Fernando, OLMEDILLA-ALONSO, Begoña, KNUTHSEN, Pia et VALOTI, Massimo, 2009. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular nutrition & food research*. 2009. Vol. 53, n° S2, pp. S194-S218.
- MAMMIS, Antonios, POURFAR, Michael, FEIGIN, Andrew et MOGILNER, Alon Y., 2012. Deep brain stimulation for the treatment of tremor and ataxia associated with abetalipoproteinemia. *Tremor and Other Hyperkinetic Movements (New York, N.Y.)*. 2012. Vol. 2, pp. tre-02-45-228-1. DOI 10.7916/D8542M96.
- MANGELS, A. R., HOLDEN, J. M., BEECHER, G. R., FORMAN, M. R. et LANZA, E., 1993. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. *Journal of the American Dietetic Association*. mars 1993. Vol. 93, n° 3, pp. 284-296. DOI 10.1016/0002-8223(93)91553-3.
- MANN, C. J., ANDERSON, T. A., READ, J., CHESTER, S. A., HARRISON, G. B., KÖCHL, S., RITCHIE, P. J., BRADBURY, P., HUSSAIN, F. S., AMEY, J., VANLOO, B., ROSSENEU, M., INFANTE, R., HANCOCK, J. M., LEVITT, D. G., BANASZAK, L. J., SCOTT, J. et SHOULDERS, C. C., 1999. The structure of vitellogenin provides a molecular model for the assembly and secretion of atherogenic lipoproteins. *Journal of Molecular Biology*. 8 janvier 1999. Vol. 285, n° 1, pp. 391-408. DOI 10.1006/jmbi.1998.2298.
- MÄNNISTÖ, Satu, SMITH-WARNER, Stephanie A., SPIEGELMAN, Donna, ALBANES, Demetrius, ANDERSON, Kristin, VAN DEN BRANDT, Piet A., CERHAN, James R., COLDITZ, Graham, FESKANICH, Diane, FREUDENHEIM, Jo L., GIOVANNUCCI, Edward, GOLDBOHM, R. Alexandra, GRAHAM, Saxon, MILLER, Anthony B., ROHAN, Thomas E., VIRTAMO, Jarmo, WILLETT, Walter C. et HUNTER, David J., 2004. Dietary carotenoids and risk of lung cancer in a pooled analysis of seven cohort studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. janvier 2004. Vol. 13, n° 1, pp. 40-48. DOI 10.1158/1055-9965.epi-038-3.
- MANSBACH, C. M. et DOWELL, R., 2000. Effect of increasing lipid loads on the ability of the endoplasmic reticulum to transport lipid to the Golgi. *Journal of Lipid Research*. avril 2000. Vol. 41, n° 4, pp. 605-612.
- MANSBACH, C. M. et NEVIN, P., 1998. Intracellular movement of triacylglycerols in the intestine. *Journal of Lipid Research*. mai 1998. Vol. 39, n° 5, pp. 963-968.
- MANSBACH, Charles M. et GORELICK, Fred, 2007. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. octobre 2007. Vol. 293, n° 4, pp. G645-650. DOI 10.1152/ajpgi.00299.2007.
- MANSBACH, Charles M. et SIDDIQI, Shadab A., 2010. The Biogenesis of Chylomicrons. *Annual review of physiology*. 2010. Vol. 72, pp. 315-333. DOI 10.1146/annurev-physiol-021909-135801.
- MANSBACH, Charles M. et SIDDIQI, Shahzad, 2016. Control of chylomicron export from the intestine. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1 mai 2016. Vol. 310, n° 9, pp. G659-668. DOI 10.1152/ajpgi.00228.2015.
- MANT, M. J. et FARAGHER, B. S., 1972. The haematology of anorexia nervosa. *British Journal of Haematology*. décembre 1972. Vol. 23, n° 6, pp. 737-749. DOI 10.1111/j.1365-2141.1972.tb03488.x.
- MARDONES, Pablo, STROBEL, Pablo, MIRANDA, Soledad, LEIGHTON, Federico, QUIÑONES, Verónica, AMIGO, Ludwig, ROZOWSKI, Jaime, KRIEGER, Monty et RIGOTTI, Attilio, 2002. Alpha-tocopherol metabolism is abnormal in scavenger receptor class B type I (SR-BI)-deficient mice. *The Journal of Nutrition*. mars 2002. Vol. 132, n° 3, pp. 443-449. DOI 10.1093/jn/132.3.443.
- MARES-PERLMAN, J. A., BRADY, W. E., KLEIN, R., KLEIN, B. E., BOWEN, P., STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M. et PALTA, M., 1995. Serum antioxidants and age-related macular degeneration in a population-based case-control study. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*. décembre 1995. Vol. 113, n° 12, pp. 1518-1523. DOI 10.1001/archoph.1995.01100120048007.
- MARSE-PERLMAN, Julie A., FISHER, Alicia I., KLEIN, Ronald, PALTA, Mari, BLOCK, Gladys, MILLEN, Amy E. et WRIGHT, Jacqueline D., 2001. Lutein and zeaxanthin in the diet and serum and their relation to age-related maculopathy in the third national health and nutrition examination survey. *American journal of epidemiology*. 2001. Vol. 153, n° 5, pp. 424-432.

- MASSACESI, A. L., 2001. The effect of oral supplementation of macular carotenoids (lutein and zeaxanthin) on the prevention of age-related macular degeneration: 18 months of follow up study. *Assoc. Res. Vision Ophthalmol.* 2001. Vol. 42, pp. 128-135.
- MATHIS, Thibaud et KODJIKIAN, Laurent, 2022. Age-Related Macular Degeneration: New Insights in Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Journal of Clinical Medicine.* 18 février 2022. Vol. 11, n° 4, pp. 1064. DOI 10.3390/jcm11041064.
- MEHRAN, M., LEVY, E., BENDAYAN, M. et SEIDMAN, E., 1997. Lipid, apolipoprotein, and lipoprotein synthesis and secretion during cellular differentiation in Caco-2 cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal.* février 1997. Vol. 33, n° 2, pp. 118-128. DOI 10.1007/s11626-997-0032-3.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, Antonio J., PAULINO, Margot, STINCO, Carla M., MAPELLI-BRAHM, Paula et WANG, Xiang-Dong, 2014. Study of the time-course of cis/trans (Z/E) isomerization of lycopene, phytoene, and phytofluene from tomato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 24 décembre 2014. Vol. 62, n° 51, pp. 12399-12406. DOI 10.1021/jf5041965.
- MELVILLE, David, S, Studer et R, Schekman, 2020. Small sequence variations between two mammalian paralogs of the small GTPase SAR1 underlie functional differences in coat protein complex II assembly. *The Journal of biological chemistry* [en ligne]. 19 juin 2020. Vol. 295, n° 25. [Consulté le 7 septembre 2022]. DOI 10.1074/jbc.RA120.012964. Disponible à l'adresse : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32358066/>
- MEYERS, Kristin J., MARES, Julie A., IGO, Robert P., TRUITT, Barbara, LIU, Zhe, MILLEN, Amy E., KLEIN, Michael, JOHNSON, Elizabeth J., ENGELMAN, Corinne D., KARKI, Chitra K., BLODI, Barbara, GEHRS, Karen, TINKER, Lesley, WALLACE, Robert, ROBINSON, Jennifer, LEBLANC, Erin S., SARTO, Gloria, BERNSTEIN, Paul S., SANGIOVANNI, John Paul et IYENGAR, Sudha K., 2014. Genetic Evidence for Role of Carotenoids in Age-Related Macular Degeneration in the Carotenoids in Age-Related Eye Disease Study (CAREDS). *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* janvier 2014. Vol. 55, n° 1, pp. 587-599. DOI 10.1167/iovs.13-13216.
- MICOZZI, M. S., BROWN, E. D., EDWARDS, B. K., BIERI, J. G., TAYLOR, P. R., KHACHIK, F., BEECHER, G. R. et SMITH, J. C., 1992. Plasma carotenoid response to chronic intake of selected foods and beta-carotene supplements in men. *The American Journal of Clinical Nutrition.* juin 1992. Vol. 55, n° 6, pp. 1120-1125. DOI 10.1093/ajcn/55.6.1120.
- MIGNARD, S., CALON, E., HESPEL, J. P. et LE, A. Treut, 2004. A severely disturbed lipid profile. In : *Annales de Biologie Clinique.* 2004. pp. 330-333.
- MILLER, Elizabeth A., BEILHARZ, Traude H., MALKUS, Per N., LEE, Marcus C. S., HAMAMOTO, Susan, ORCI, Lelio et SCHEKMAN, Randy, 2003. Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell.* 22 août 2003. Vol. 114, n° 4, pp. 497-509. DOI 10.1016/s0092-8674(03)00609-3.
- MILLER, Elizabeth, ANTONNY, Bruno, HAMAMOTO, Susan et SCHEKMAN, Randy, 2002. Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *The EMBO journal.* 15 novembre 2002. Vol. 21, n° 22, pp. 6105-6113. DOI 10.1093/emboj/cdf605.
- MITCHELL, Simon, VARGAS, Jesse et HOFFMANN, Alexander, 2016. Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine.* mai 2016. Vol. 8, n° 3, pp. 227-241. DOI 10.1002/wsbm.1331.
- MOELLER, Suzen M., PAREKH, Niyati, TINKER, Lesley, RITENBAUGH, Cheryl, BLODI, Barbara, WALLACE, Robert B., MARES, Julie A. et GROUP, CAREDS Research Study, 2006. Associations between intermediate age-related macular degeneration and lutein and zeaxanthin in the Carotenoids in Age-related Eye Disease Study (CAREDS): ancillary study of the Women's Health Initiative. *Archives of ophthalmology.* 2006. Vol. 124, n° 8, pp. 1151-1162.
- MONSEN, E. R., 2000. Dietary reference intakes for the antioxidant nutrients: vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association.* juin 2000. Vol. 100, n° 6, pp. 637-640. DOI 10.1016/S0002-8223(00)00189-9.
- MOORE, Amy C., GUGGER, Eric T. et ERDMAN JR, John W., 1996. Brush border membrane vesicles from rats and gerbils can be utilized to evaluate the intestinal uptake of all-trans and 9-cis β-carotene. *The Journal of nutrition.* 1996. Vol. 126, n° 11, pp. 2904-2912.

- MORAN, Nancy A. et JARVIK, Tyler, 2010. Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. *Science (New York, N.Y.)*. 30 avril 2010. Vol. 328, n° 5978, pp. 624-627. DOI 10.1126/science.1187113.
- MORTIMER, B. C., BEVERIDGE, D. J., MARTINS, I. J. et REDGRAVE, T. G., 1995. Intracellular localization and metabolism of chylomicron remnants in the livers of low density lipoprotein receptor-deficient mice and apoE-deficient mice. Evidence for slow metabolism via an alternative apoE-dependent pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 1 décembre 1995. Vol. 270, n° 48, pp. 28767-28776. DOI 10.1074/jbc.270.48.28767.
- MOUSSA, Myriam, LANDRIER, Jean-François, REBOUL, Emmanuelle, GHIRINGHELLI, Odette, COMÈRA, Christine, COLLET, Xavier, FRÖHLICH, Kati, BÖHM, Volker et BOREL, Patrick, 2008. Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1. *The Journal of Nutrition*. août 2008. Vol. 138, n° 8, pp. 1432-1436. DOI 10.1093/jn/138.8.1432.
- MOUZAKI, Marialena, VRESK, Laura et GONSKA, Tanja, 2014. An infant with vomiting, diarrhea, and failure to thrive. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology*. avril 2014. Vol. 146, n° 4, pp. 912, 1137-1138. DOI 10.1053/j.gastro.2013.11.035.
- MULLER, D. P., LLOYD, J. K. et BIRD, A. C., 1977. Long-term management of abetalipoproteinaemia. Possible role for vitamin E. *Archives of Disease in Childhood*. 1977. Vol. 52, n° 3, pp. 209-214. DOI 10.1136/adc.52.3.209.
- MULLER, D. P. R., LLOYD, J. K. et WOLFF, O. H., 1985. The role of vitamin E in the treatment of the neurological features of abetalipoproteinaemia and other disorders of fat absorption. In : *Inherited Disorders of Vitamins and Cofactors*. Springer. pp. 88-92.
- MUMFORD, Sunni L., BROWNE, Richard W., SCHLIEP, Karen C., SCHMELZER, Jonathan, PLOWDEN, Torie C., MICHELS, Kara A., SJAARDA, Lindsey A., ZAREK, Shvetha M., PERKINS, Neil J., MESSER, Lynne C., RADIN, Rose G., WACTAWSKI-WENDE, Jean et SCHISTERMAN, Enrique F., 2016. Serum Antioxidants Are Associated with Serum Reproductive Hormones and Ovulation among Healthy Women. *The Journal of Nutrition*. janvier 2016. Vol. 146, n° 1, pp. 98-106. DOI 10.3945/jn.115.217620.
- MURKOVIC, M., GAMS, K., DRAXL, S. et PFANNHAUSER, W., 2000. Development of an Austrian carotenoid database. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2000. Vol. 13, n° 4, pp. 435-440.
- MURRAY, Ian J., MAKRIDAKI, Maria, VAN DER VEEN, Rob L. P., CARDEN, David, PARRY, Neil R. A. et BERENDSCHOT, Tos T. J. M., 2013. Lutein supplementation over a one-year period in early AMD might have a mild beneficial effect on visual acuity: the CLEAR study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 11 mars 2013. Vol. 54, n° 3, pp. 1781-1788. DOI 10.1167/iovs.12-10715.
- MUŠINOVIĆ, Hana, BONET, M. Luisa, GRANADOS, Nuria, AMENGUAL, Jaume, VON LINTIG, Johannes, RIBOT, Joan et PALOU, Andreu, 2014.  $\beta$ -Carotene during the suckling period is absorbed intact and induces retinoic acid dependent responses similar to preformed vitamin A in intestine and liver, but not adipose tissue of young rats. *Molecular Nutrition & Food Research*. novembre 2014. Vol. 58, n° 11, pp. 2157-2165. DOI 10.1002/mnfr.201400457.
- MUZANDU, Kaampwe, EL BOHI, Khlood, SHABAN, Zein, ISHIZUKA, Mayumi, KAZUSAKA, Akio et FUJITA, Shoichi, 2005. Lycopene and beta-carotene ameliorate catechol estrogen-mediated DNA damage. *The Japanese Journal of Veterinary Research*. février 2005. Vol. 52, n° 4, pp. 173-184.
- NAGAPPA, Madhu, BINDU, Parayil S., ADWANI, Sikandar, SESHAGIRI, Sangeeta K., SAINI, Jitender, SINHA, Sanjib et TALY, Arun B., 2014. Clinical, hematological, and imaging observations in a 25-year-old woman with abetalipoproteinemia. *Annals of Indian Academy of Neurology*. janvier 2014. Vol. 17, n° 1, pp. 113-116. DOI 10.4103/0972-2327.128574.
- NAJAH, Mohamed, DI LEO, Enza, AWATEF, Jelassi, MAGNOLO, Lucia, IMENE, Jgurim, PINOTTI, Elisa, BAHRI, Mahjoub, BARSAOUI, Sihem, BRINI, Ines, FEKIH, Moncef, SLIMANE, Mohamed Naceur et TARUGI, Patrizia, 2009. Identification of patients with abetalipoproteinemia and homozygous familial hypobetalipoproteinemia in Tunisia. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. mars 2009. Vol. 401, n° 1-2, pp. 51-56. DOI 10.1016/j.cca.2008.11.012.
- NAJAH, Mohamed, YOUSSEF, Sarraj Mohamed, YAHIA, Hrira Mohamed, AFEF, Slimani, AWATEF, Jelassi, SABER, Hammami, FADHEL, Najjar Mohamed, SASSOLAS, Agnès et NACEUR, Slimane Mohamed, 2013. Molecular characterization of Tunisian families with abetalipoproteinemia and identification of a novel mutation in MTP gene. *Diagnostic Pathology*. 4 avril 2013. Vol. 8, pp. 54. DOI 10.1186/1746-1596-8-54.

- NAKAÑO, A. et MURAMATSU, M., 1989. A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *The Journal of Cell Biology*. décembre 1989. Vol. 109, n° 6 Pt 1, pp. 2677-2691. DOI 10.1083/jcb.109.6.2677.
- NAKANO, Akihiko et MURAMATSU, Masaaki, 1989. A novel GTP-binding protein, Sar1b, is involved in transport from the Endoplasmic Reticulum to the Golgi Apparatus. *The Journal of cell biology*. 1989. Vol. 109, n° 6, pp. 2677-2691.
- NAMITHA, K. K. et NEGI, P. S., 2010. Chemistry and biotechnology of carotenoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. septembre 2010. Vol. 50, n° 8, pp. 728-760. DOI 10.1080/10408398.2010.499811.
- NARCISI, T. M., SHOULDERS, C. C., CHESTER, S. A., READ, J., BRETT, D. J., HARRISON, G. B., GRANTHAM, T. T., FOX, M. F., POVEY, S. et DE BRUIN, T. W., 1995. Mutations of the microsomal triglyceride-transfer-protein gene in abetalipoproteinemia. *American Journal of Human Genetics*. décembre 1995. Vol. 57, n° 6, pp. 1298-1310.
- NARUSHIMA, Kazuya, TAKADA, Tappei, YAMANASHI, Yoshihide et SUZUKI, Hiroshi, 2008. Niemann-pick C1-like 1 mediates alpha-tocopherol transport. *Molecular Pharmacology*. juillet 2008. Vol. 74, n° 1, pp. 42-49. DOI 10.1124/mol.107.043034.
- NASSIR, Fatiha, WILSON, Brody, HAN, Xianlin, GROSS, Richard W. et ABUMRAD, Nada A., 2007. CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *The Journal of Biological Chemistry*. 6 juillet 2007. Vol. 282, n° 27, pp. 19493-19501. DOI 10.1074/jbc.M703330200.
- NEELAM, Kumari, HOGG, Ruth E., STEVENSON, Michael R., JOHNSTON, Elinor, ANDERSON, Roger, BEATTY, Stephen et CHAKRAVARTHY, Usha, 2008. Carotenoids and co-antioxidants in age-related maculopathy: design and methods. *Ophthalmic Epidemiology*. 2008. Vol. 15, n° 6, pp. 389-401.
- NEELI, Indira, SIDDIQI, Shadab A., SIDDIQI, Shahzad, MAHAN, James, LAGAKOS, William S., BINAS, Bert, GHEYI, Tarun, STORCH, Judith et MANSBACH, Charles M., 2007. Liver fatty acid-binding protein initiates budding of pre-chylomicron transport vesicles from intestinal endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*. 22 juin 2007. Vol. 282, n° 25, pp. 17974-17984. DOI 10.1074/jbc.M610765200.
- NEMETH, A., MYRDAL, U., VERESS, B., RUDLING, M., BERGLUND, L. et ANGELIN, B., 1995. Studies on lipoprotein metabolism in a family with jejunal chylomicron retention. *European Journal of Clinical Investigation*. avril 1995. Vol. 25, n° 4, pp. 271-280. DOI 10.1111/j.1365-2362.1995.tb01559.x.
- NGUYEN, Truyen, NIOI, Paul et PICKETT, Cecil B., 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 15 mai 2009. Vol. 284, n° 20, pp. 13291-13295. DOI 10.1074/jbc.R900010200.
- NIESOR, Eric J., CHAPUT, Evelyne, MARY, Jean-Luc, STAEMPFLI, Andreas, TOPP, Andreas, STAUFFER, Andrea, WANG, Haiyan et DURRWELL, Alexandre, 2014. Effect of compounds affecting ABCA1 expression and CETP activity on the HDL pathway involved in intestinal absorption of lutein and zeaxanthin. *Lipids*. décembre 2014. Vol. 49, n° 12, pp. 1233-1243. DOI 10.1007/s11745-014-3958-8.
- NIESOR, Eric J., MAGG, Christine, OGAWA, Naoto, OKAMOTO, Hiroshi, VON DER MARK, Elisabeth, MATILE, Hugues, SCHMID, Georg, CLERC, Roger G., CHAPUT, Evelyne, BLUM-KAELIN, Denise, HUBER, Walter, THOMA, Ralf, PFLIEGER, Philippe, KAKUTANI, Makoto, TAKAHASHI, Daisuke, DERNICK, Gregor et MAUGEAIS, Cyrille, 2010. Modulating cholesteryl ester transfer protein activity maintains efficient pre- $\beta$ -HDL formation and increases reverse cholesterol transport. *Journal of Lipid Research*. décembre 2010. Vol. 51, n° 12, pp. 3443-3454. DOI 10.1194/jlr.M008706.
- NIIZU, Patricia Y. et RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B., 2005. New data on the carotenoid composition of raw salad vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2005. Vol. 18, n° 8, pp. 739-749.
- NILSSON-EHLE, P., GARFINKEL, A. S. et SCHOTZ, M. C., 1980. Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism. *Annual Review of Biochemistry*. 1980. Vol. 49, pp. 667-693. DOI 10.1146/annurev.bi.49.070180.003315.
- NIU, Guoqi, GUO, Qi, WANG, Jia, ZHAO, Shun, HE, Yikun et LIU, Lin, 2020. Structural basis for plant lutein biosynthesis from  $\alpha$ -carotene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 23 juin 2020. Vol. 117, n° 25, pp. 14150-14157. DOI 10.1073/pnas.2001806117.
- Nombre de cas par maladie rare dans la BNDMR | Banque Nationale de Données Maladies Rares, [sans date]. [en ligne]. [Consulté le 5 septembre 2022]. Disponible à l'adresse : <https://www.bndmr.fr/publications/nombre-de-cas-par-mr/>

- NOY, N., 2000. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *The Biochemical Journal*. 15 juin 2000. Vol. 348 Pt 3, pp. 481-495.
- O'CALLAGHAN, Yvonne et O'BRIEN, Nora, 2004. The effect of carotenoids and tocopherols in the protection of human fibroblast cells against UVA-induced DNA damage. *Journal of Dermatological Science*. mai 2004. Vol. 34, n° 3, pp. 231-233. DOI 10.1016/j.jdermsci.2004.02.002.
- O'HARE, Tim J., FANNING, Kent J. et MARTIN, Ian F., 2015. Zeaxanthin biofortification of sweet-corn and factors affecting zeaxanthin accumulation and colour change. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 15 avril 2015. Vol. 572, pp. 184-187. DOI 10.1016/j.abb.2015.01.015.
- OHASHI, K., ISHIBASHI, S., OSUGA, J., TOZAWA, R., HARADA, K., YAHAGI, N., SHIONOIRI, F., IIZUKA, Y., TAMURA, Y., NAGAI, R., ILLINGWORTH, D. R., GOTODA, T. et YAMADA, N., 2000. Novel mutations in the microsomal triglyceride transfer protein gene causing abetalipoproteinemia. *Journal of Lipid Research*. août 2000. Vol. 41, n° 8, pp. 1199-1204.
- OKADA, Tomoo, MIYASHITA, Michio, FUKUHARA, Junji, SUGITANI, Masahiko, UENO, Takahiro, SAMSON-BOUMA, Marie-Elisabeth et AGGERBECK, Lawrence P., 2011. Anderson's disease/chylomicron retention disease in a Japanese patient with uniparental disomy 7 and a normal SAR1B gene protein coding sequence. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2011. Vol. 6, pp. 78. DOI 10.1186/1750-1172-6-78.
- OLANOW, C. W., 1990. Oxidation reactions in Parkinson's disease. *Neurology*. octobre 1990. Vol. 40, n° 10 Suppl 3, pp. suppl 32-37; discussion 37-39.
- OLIVARES-GONZÁLEZ, Lorena, SALOM, David, GONZÁLEZ-GARCÍA, Emilio, HERVÁS, David, MEJÍA-CHIQUI, Natalia, MELERO, Mar, VELASCO, Sheyla, MURESAN, Bianca Tabita, CAMPILLO, Isabel, VILA-CLÉRIGUES, Nieves, LÓPEZ-BRIZ, Eduardo, MERINO-TORRES, Juan Francisco, MILLÁN, José María, SORIANO DEL CASTILLO, José Miguel et RODRIGO, Regina, 2022. NUTRARET: Effect of 2-Year Nutraceutical Supplementation on Redox Status and Visual Function of Patients With Retinitis Pigmentosa: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Frontiers in Nutrition*. 2022. Vol. 9, pp. 847910. DOI 10.3389/fnut.2022.847910.
- OLIVIER, Maryline, BOTTG, Remain, FRISDAL, Eric, NOWICK, Marion, PLENGPANICH, Wane, DESMARCHELIER, Charles, ROI, Stéphanie, QUINN, Carmel M., GELISSEN, Ingrid, JESSUP, Wendy, VAN ECK, Miranda, GUÉRIN, Maryse, LE GOFF, Wilfried et REBOUL, Emmanuelle, 2014. ABCG1 is involved in vitamin E efflux. *Biochimica Et Biophysica Acta*. décembre 2014. Vol. 1841, n° 12, pp. 1741-1751. DOI 10.1016/j.bbali.2014.10.003.
- OLMEDILLA, B., GRANADO, F., BLANCO, I. et VAQUERO, M., 2003. Lutein, but not  $\alpha$ -tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-y double-blind, placebo-controlled pilot study. *Nutrition*. 2003. Vol. 19, n° 1, pp. 21-24.
- OLMEDILLA, B., GRANADO, F., BLANCO, I., VAQUERO, M. et CAJIGAL, C., 2001. Lutein in patients with cataracts and age-related macular degeneration: a long-term supplementation study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2001. Vol. 81, n° 9, pp. 904-909.
- OLSON, James A., 1996. Biochemistry of vitamin A and carotenoids. *Vitamin A Deficiency: Health, Survival, and Vision*. 1996. pp. 221-250.
- OMENN, G. S., GOODMAN, G. E., THORNQUIST, M. D., BALMES, J., CULLEN, M. R., GLASS, A., KEOGH, J. P., MEYSKENS, F. L., VALANIS, B., WILLIAMS, J. H., BARNHART, S., CHERNIACK, M. G., BRODKIN, C. A. et HAMMAR, S., 1996. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *Journal of the National Cancer Institute*. 6 novembre 1996. Vol. 88, n° 21, pp. 1550-1559. DOI 10.1093/jnci/88.21.1550.
- O'NEILL, M. E. et THURNHAM, D. I., 1998. Intestinal absorption of  $\beta$ -carotene, lycopene and lutein in men and women following a standard meal: response curves in the triacylglycerol-rich lipoprotein fraction. *British Journal of Nutrition*. 1998. Vol. 79, n° 2, pp. 149-159.
- ORAM, John F., 2002. ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. *Current Opinion in Lipidology*. août 2002. Vol. 13, n° 4, pp. 373-381. DOI 10.1097/00041433-200208000-00004.
- ORAM, John F. et HEINECKE, Jay W., 2005. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiological Reviews*. octobre 2005. Vol. 85, n° 4, pp. 1343-1372. DOI 10.1152/physrev.00005.2005.

- ORAM, John F., VAUGHAN, Ashley M. et STOCKER, Roland, 2001. ATP-binding Cassette Transporter A1 Mediates Cellular Secretion of  $\alpha$ -Tocopherol. *Journal of Biological Chemistry*. 2001. Vol. 276, n° 43, pp. 39898-39902. DOI 10.1074/jbc.M106984200.
- ORSÓ, Evelyn, BROCCARDO, Cyril, KAMINSKI, Wolfgang E., BÖTTCHER, Alfred, LIEBISCH, Gerhard, DROBNIK, Wolfgang, GÖTZ, Alexandra, CHAMBENOIT, Olivier, DIEDERICH, Wendy, LANGMANN, Thomas, SPRUSS, Thilo, LUCIANI, Marie-Francoise, ROTHE, Gregor, LACKNER, Karl J., CHIMINI, Giovanna et SCHMITZ, Gerd, 2000. Transport of lipids from Golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients and Abcl1 -deficient mice. *Nature Genetics*. 2000. Vol. 24, n° 2, pp. 192-196. DOI 10.1038/72869.
- OSGANIAN, Stavroula K., STAMPFER, Meir J., RIMM, Eric, SPIEGELMAN, Donna, MANSON, JoAnn E. et WILLETT, Walter C., 2003. Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women. *The American Journal of Clinical Nutrition*. juin 2003. Vol. 77, n° 6, pp. 1390-1399. DOI 10.1093/ajcn/77.6.1390.
- OUGUERRAM, Khadija, ZAÏR, Yassine, KASBI-CHADLI, Fatima, NAZIH, Hassane, BLIGNY, Dominique, SCHMITZ, Jacques, APARICIO, Thomas, CHÉTIVEAUX, Maud, MAGOT, Thierry, AGGERBECK, Laurence P., SAMSON-BOUMA, Marie Elisabeth et KREMPE, Michel, 2012. Low rate of production of apolipoproteins B100 and AI in 2 patients with Anderson disease (chylomicron retention disease). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. juin 2012. Vol. 32, n° 6, pp. 1520-1525. DOI 10.1161/ATVBAHA.112.245076.
- OZAWA, Yoko, SASAKI, Mariko, TAKAHASHI, Noriko, KAMOSHITA, Mamoru, MIYAKE, Seiji et TSUBOTA, Kazuo, 2012. Neuroprotective Effects of Lutein in the Retina. *Current Pharmaceutical Design*. janvier 2012. Vol. 18, n° 1, pp. 51-56. DOI 10.2174/138161212798919101.
- PACKER, L., 1991. Protective role of vitamin E in biological systems. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1991. Vol. 53, n° 4, pp. 1050S-1055S. DOI 10.1093/ajcn/53.4.1050S.
- PAGON, R. A., 1988. Retinitis pigmentosa. *Survey of Ophthalmology*. 1988. Vol. 33, n° 3, pp. 137-177. DOI 10.1016/0039-6257(88)90085-9.
- PAIVA, Sergio AR et RUSSELL, Robert M., 1999.  $\beta$ -carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American college of nutrition*. 1999. Vol. 18, n° 5, pp. 426-433.
- PALOMBO, P., FABRIZI, G., RUOCCO, V., RUOCCO, E., FLUHR, J., ROBERTS, R. et MORGANTI, P., 2007. Beneficial long-term effects of combined oral/topical antioxidant treatment with the carotenoids lutein and zeaxanthin on human skin: a double-blind, placebo-controlled study. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2007. Vol. 20, n° 4, pp. 199-210. DOI 10.1159/000101807.
- PALOZZA, Paola, SERINI, Simona, TORSELLO, Angela, DI NICUOLO, Fiorella, MAGGIANO, Nicola, RANELLETTI, Franco O., WOLF, Federica I. et CALVIELLO, Gabriella, 2003. Mechanism of activation of caspase cascade during beta-carotene-induced apoptosis in human tumor cells. *Nutrition and Cancer*. 2003. Vol. 47, n° 1, pp. 76-87. DOI 10.1207/s15327914nc4701\_10.
- PALOZZA, Paola, SERINI, Simona, TORSELLO, Angela, DI NICUOLO, Fiorella, PICCIONI, Elisabetta, UBALDI, Vanessa, PIOLI, Claudio, WOLF, Federica I. et CALVIELLO, Gabriella, 2003. Beta-carotene regulates NF-kappaB DNA-binding activity by a redox mechanism in human leukemia and colon adenocarcinoma cells. *The Journal of Nutrition*. février 2003. Vol. 133, n° 2, pp. 381-388. DOI 10.1093/jn/133.2.381.
- PANDOLFO, Massimo, 2008. Friedreich ataxia. *Archives of neurology*. 2008. Vol. 65, n° 10, pp. 1296-1303.
- PAPADOGEORGOU, Paraskevi, ROMA, Eleftheria, SASSOLAS, Agnès, ORFANO, Irene, MALLIAROU, Adamantia, SAKKA, Sophia et CHOULIARAS, Giorgos, 2012. Chylomicron retention disease: report of two cases from a Greek Island. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM*. 2012. Vol. 25, n° 11-12, pp. 1191-1194. DOI 10.1515/jpem-2012-0243.
- PAPPENHEIMER, Alwin M., GOETTSCHE, Marianne et PAPPENHEIMER, With the Assistance of Anne, 1931. A Cerebellar Disorder in Chicks, Apparently of Nutritional Origin. *Journal of Experimental Medicine*. 1931. Vol. 53, n° 1, pp. 11-26. DOI 10.1084/jem.53.1.11.
- PAQUETTE, Martine, DUFOUR, Robert, HEGELE, Robert A. et BAASS, Alexis, 2016. A tale of 2 cousins: An atypical and a typical case of abetalipoproteinemia. *Journal of Clinical Lipidology*. août 2016. Vol. 10, n° 4, pp. 1030-1034. DOI 10.1016/j.jacl.2016.01.003.
- PARISI, Vincenzo, TEDESCHI, Massimiliano, GALLINARO, Geltrude, VARANO, Monica, SAVIANO, Sandro, PIERMAROCCHI, Stefano et GROUP, CARMIS Study, 2008. Carotenoids and antioxidants in age-

- related maculopathy italian study: multifocal electroretinogram modifications after 1 year. *Ophthalmology*. 2008. Vol. 115, n° 2, pp. 324-333.
- PARK, Sung-Woo, 2013. Intestinal and Hepatic Niemann-Pick C1-Like 1. *Diabetes & Metabolism Journal*. août 2013. Vol. 37, n° 4, pp. 240-248. DOI 10.4093/dmj.2013.37.4.240.
- PARK, Yun Ok, HWANG, Eun-Sun et MOON, Tae Wha, 2005. The effect of lycopene on cell growth and oxidative DNA damage of Hep3B human hepatoma cells. *BioFactors (Oxford, England)*. 2005. Vol. 23, n° 3, pp. 129-139. DOI 10.1002/biof.5520230302.
- PARKER, R. S., 1996. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. avril 1996. Vol. 10, n° 5, pp. 542-551.
- PAROMOV, Viktor M. et MORTON, Richard E., 2003. Lipid transfer inhibitor protein defines the participation of high density lipoprotein subfractions in lipid transfer reactions mediated by cholesterol ester transfer protein (CETP). *The Journal of Biological Chemistry*. 17 octobre 2003. Vol. 278, n° 42, pp. 40859-40866. DOI 10.1074/jbc.M306580200.
- PARTIN, J. S., PARTIN, J. C., SCHUBERT, W. K. et MCADAMS, A. J., 1974. Liver ultrastructure in abetalipoproteinemia: Evolution of micronodular cirrhosis. *Gastroenterology*. juillet 1974. Vol. 67, n° 1, pp. 107-118.
- PATEL, S., PESSAH, M., BEUCLER, I., NAVARRO, J. et INFANTE, R., 1994. Chylomicron retention disease: exclusion of apolipoprotein B gene defects and detection of mRNA editing in an affected family. *Atherosclerosis*. août 1994. Vol. 108, n° 2, pp. 201-207. DOI 10.1016/0021-9150(94)90115-5.
- PAUTLER, Denise, EASLEY, David et POHL, John F., 2008. Abetalipoproteinemia. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. avril 2008. Vol. 46, n° 4, pp. 355. DOI 10.1097/MPG.0b013e3181677082.
- PENNOCK, JF, 1964. A reassessment of Tocopherol chemistry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1964. Vol. 17, n° 5, pp. 542-548. DOI 10.1016/0006-291X(64)90062-2.
- PENTSCHEW, Angel et SCHWARZ, Klaus, 1962. Systemic axonal dystrophy in vitamin E deficient adult rats. *Acta Neuropathologica*. 1962. Vol. 1, n° 4, pp. 313-334. DOI 10.1007/BF00687729.
- PERDOMO, German et HENRY DONG, H., 2009. Apolipoprotein D in lipid metabolism and its functional implication in atherosclerosis and aging. *Aging*. janvier 2009. Vol. 1, n° 1, pp. 17-27. DOI 10.18632/aging.100004.
- PERETTI, Noel et MAS, Emmanuel, 2022. Congenital disorders of intestinal digestion and absorption (sugars, proteins, lipids, ions). *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*. mars 2022. Vol. 56-57, pp. 101785. DOI 10.1016/j.bpg.2022.101785.
- PERETTI, Noel, ROY, Claude C., SASSOLAS, Agnès, DESLANDRES, Colette, DROUIN, Eric, RASQUIN, Andrée, SEIDMAN, Ernest, BROCHU, Pierre, VOHL, Marie-Claude, LABARGE, Sylvie, BOUVIER, Raymonde, SAMSON-BOUMA, Marie-Elizabeth, CHARCOSSET, Mathilde, LACHAUX, Alain et LEVY, Emile, 2009. Chylomicron retention disease: a long term study of two cohorts. *Molecular Genetics and Metabolism*. juin 2009. Vol. 97, n° 2, pp. 136-142. DOI 10.1016/j.ymgme.2009.02.003.
- PERETTI, Noel, SASSOLAS, Agnès, ROY, Claude C., DESLANDRES, Colette, CHARCOSSET, Mathilde, CASTAGNETTI, Justine, PUGNET-CHARDON, Laurence, MOULIN, Philippe, LABARGE, Sylvie, BOUTHILLIER, Lise, LACHAUX, Alain et LEVY, Emile, 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 Journal of Rare Diseases*. 2010. Vol. 5, n° 1, pp. 24. DOI 10.1186/1750-1172-5-24.
- PÉTER, Szabolcs, FRIEDEL, Angelika, ROOS, Franz F., WYSS, Adrian, EGGERSDORFER, Manfred, HOFFMANN, Kristina et WEBER, Peter, 2015. A systematic review of global  $\alpha$ -Tocopherol status as assessed by Nutritional Intake Levels and Blood Serum Concentrations. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2015. Vol. 85, n° 5-6, pp. 261-281. DOI 10.1024/0300-9831/a000281.
- PHAN, Binh An P, DAYSPRING, Thomas D et TOTH, Peter P, 2012. Ezetimibe therapy: mechanism of action and clinical update. *Vascular Health and Risk Management*. 2012. Vol. 8, pp. 415-427. DOI 10.2147/VHRM.S33664.
- PLIATSIKA, Venetia et RIGOUTSOS, Isidore, 2015. « Off-Spotter »: very fast and exhaustive enumeration of genomic lookalikes for designing CRISPR/Cas guide RNAs. *Biology Direct*. 29 janvier 2015. Vol. 10, pp. 4. DOI 10.1186/s13062-015-0035-z.

- POHL, Jürgen, RING, Axel, HERMANN, Thomas et STREMMEL, W., 2004. Role of FATP in parenchymal cell fatty acid uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2004. Vol. 1686, n° 1-2, pp. 1-6. DOI 10.1016/j.bbalip.2004.06.004.
- POIRIER, H., DEGRACE, P., NIOT, I., BERNARD, A. et BESNARD, P., 1996. Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP). *European Journal of Biochemistry*. 1 juin 1996. Vol. 238, n° 2, pp. 368-373. DOI 10.1111/j.1432-1033.1996.0368z.x.
- PONS, Véronique, ROLLAND, Corinne, NAUZE, Michel, DANJOUX, Marie, GAIBELET, Gérald, DURANDY, Anne, SASSOLAS, Agnès, LÉVY, Emile, TERCÉ, François, COLLET, Xavier et MAS, Emmanuel, 2011. A severe form of abetalipoproteinemia caused by new splicing mutations of microsomal triglyceride transfer protein (MTTP). *Human Mutation*. juillet 2011. Vol. 32, n° 7, pp. 751-759. DOI 10.1002/humu.21494.
- POOL-ZOBEL, B. L., BUB, A., MÜLLER, H., WOLLOWSKI, I. et RECHKEMMER, G., 1997. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*. septembre 1997. Vol. 18, n° 9, pp. 1847-1850. DOI 10.1093/carcin/18.9.1847.
- POWELL, L. M., WALLIS, S. C., PEASE, R. J., EDWARDS, Y. H., KNOTT, T. J. et SCOTT, J., 1987. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell*. 11 septembre 1987. Vol. 50, n° 6, pp. 831-840. DOI 10.1016/0092-8674(87)90510-1.
- PRÉVÉRAUD, D. P., DESMARCHELIER, C., ROUFFINEAU, F., DEVILLARD, E. et BOREL, P., 2015. A meta-analysis to assess the effect of the composition of dietary fat on  $\alpha$ -tocopherol blood and tissue concentration in pigs. *Journal of Animal Science*. mars 2015. Vol. 93, n° 3, pp. 1177-1186. DOI 10.2527/jas.2014-8422.
- PROVIS, Jan M., PENFOLD, Philip L., CORNISH, Elisa E., SANDERCOE, Trent M. et MADIGAN, Michele C., 2005. Anatomy and development of the macula: specialisation and the vulnerability to macular degeneration. *Clinical & Experimental Optometry*. septembre 2005. Vol. 88, n° 5, pp. 269-281. DOI 10.1111/j.1444-0938.2005.tb06711.x.
- PUCADYIL, Thomas J. et SCHMID, Sandra L., 2009. Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science (New York, N.Y.)*. 4 septembre 2009. Vol. 325, n° 5945, pp. 1217-1220. DOI 10.1126/science.1171004.
- QIAN, Jinghui, MORLEY, Samantha, WILSON, Kathleen, NAVA, Phil, ATKINSON, Jeffrey et MANOR, Danny, 2005. Intracellular trafficking of vitamin E in hepatocytes: the role of tocopherol transfer protein. *Journal of Lipid Research*. 2005. Vol. 46, n° 10, pp. 2072-2082. DOI 10.1194/jlr.M500143-JLR200.
- RAABE, M., VÉNIANT, M. M., SULLIVAN, M. A., ZLOT, C. H., BJÖRKEGREN, J., NIELSEN, L. B., WONG, J. S., HAMILTON, R. L. et YOUNG, S. G., 1999. Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *The Journal of Clinical Investigation*. mai 1999. Vol. 103, n° 9, pp. 1287-1298. DOI 10.1172/JCI6576.
- RAJU, Marisiddaiah, VARAKUMAR, Sadineni, LAKSHMINARAYANA, Rangaswamy, KRISHNAKANTHA, Thirumalai Parthasarathy et BASKARAN, Vallikannan, 2007. Carotenoid composition and vitamin A activity of medicinally important green leafy vegetables. *Food Chemistry*. 2007. Vol. 101, n° 4, pp. 1598-1605.
- RANARD, Katherine M., JEON, Sookyoung, MOHN, Emily S., GRIFFITHS, James C., JOHNSON, Elizabeth J. et ERDMAN, John W., 2017. Dietary guidance for lutein: consideration for intake recommendations is scientifically supported. *European Journal of Nutrition*. décembre 2017. Vol. 56, n° Suppl 3, pp. 37-42. DOI 10.1007/s00394-017-1580-2.
- RANHEIM, T., GEDDE-DAHL, A., RUSTAN, A. C. et DREVON, C. A., 1992. Influence of eicosapentaenoic acid (20:5, n-3) on secretion of lipoproteins in CaCo-2 cells. *Journal of Lipid Research*. septembre 1992. Vol. 33, n° 9, pp. 1281-1293.
- RASMUSSEN, Helen M., MUZHINGI, Tawanda, EGGERT, Emily MR et JOHNSON, Elizabeth J., 2012. Lutein, zeaxanthin, meso-zeaxanthin content in egg yolk and their absence in fish and seafood. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2012. Vol. 27, n° 2, pp. 139-144.
- RAVA, Paul, OJAKIAN, George K., SHELNESS, Gregory S. et HUSSAIN, M. Mahmood, 2006. Phospholipid transfer activity of microsomal triacylglycerol transfer protein is sufficient for the assembly and secretion of



apolipoprotein B lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 21 avril 2006. Vol. 281, n° 16, pp. 11019-11027. DOI 10.1074/jbc.M512823200.

READ, J., ANDERSON, T. A., RITCHIE, P. J., VANLOO, B., AMEY, J., LEVITT, D., ROSSENEU, M., SCOTT, J. et SHOULDERS, C. C., 2000. A mechanism of membrane neutral lipid acquisition by the microsomal triglyceride transfer protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 29 septembre 2000. Vol. 275, n° 39, pp. 30372-30377. DOI 10.1074/jbc.C000364200.

REBOUL, Emmanuelle, 2017. Vitamin E Bioavailability: Mechanisms of Intestinal Absorption in the Spotlight. *Antioxidants*. 22 novembre 2017. Vol. 6, n° 4, pp. 95. DOI 10.3390/antiox6040095.

REBOUL, Emmanuelle, 2019a. Mechanisms of carotenoid intestinal absorption: where do we stand? *Nutrients*. 2019. Vol. 11, n° 4, pp. 838.

REBOUL, Emmanuelle, 2019b. Vitamin E intestinal absorption: Regulation of membrane transport across the enterocyte. *IUBMB life*. avril 2019. Vol. 71, n° 4, pp. 416-423. DOI 10.1002/iub.1955.

REBOUL, Emmanuelle, ABOU, Lydia, MIKAIL, Céline, GHIRINGHELLI, Odette, ANDRÉ, Marc, PORTUGAL, Henri, JOURDHEUIL-RAHMANI, Dominique, AMIOT, Marie-Josèphe, LAIRON, Denis et BOREL, Patrick, 2005. Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *Biochemical Journal*. 2005. Vol. 387, n° 2, pp. 455-461.

REBOUL, Emmanuelle et BOREL, Patrick, 2011. Proteins involved in uptake, intracellular transport and basolateral secretion of fat-soluble vitamins and carotenoids by mammalian enterocytes. *Progress in Lipid Research*. 2011. Vol. 50, n° 4, pp. 388-402. DOI 10.1016/j.plipres.2011.07.001.

REBOUL, Emmanuelle, KLEIN, Alexis, BIETRIX, Florence, GLEIZE, Béatrice, MALEZET-DESMOULINS, Christiane, SCHNEIDER, Martina, MARGOTAT, Alain, LAGROST, Laurent, COLLET, Xavier et BOREL, Patrick, 2006. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006. Vol. 281, n° 8, pp. 4739-4745. DOI 10.1074/jbc.M509042200.

REBOUL, Emmanuelle, TROMPIER, Doriane, MOUSSA, Myriam, KLEIN, Alexis, LANDRIER, Jean-François, CHIMINI, Giovanna et BOREL, Patrick, 2009. ATP-binding cassette transporter A1 is significantly involved in the intestinal absorption of alpha- and gamma-tocopherol but not in that of retinyl palmitate in mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*. janvier 2009. Vol. 89, n° 1, pp. 177-184. DOI 10.3945/ajcn.2008.26559.

REHBERG, Edward F., SAMSON-BOUMA, Marie-Elisabeth, KIENZLE, Bernadette, BLINDERMAN, Laura, JAMIL, Haris, WETTERAU, John R., AGGERBECK, Lawrence P. et GORDON, David A., 1996. A novel abetalipoproteinemia genotype : Identification of a missense mutation in the 97-kDa subunit of the Microsomal Triglyceride Transfer Protein that prevents complex formation with Protein Disulfide Isomerase. *Journal of Biological Chemistry*. 1996. Vol. 271, n° 47, pp. 29945-29952. DOI 10.1074/jbc.271.47.29945.

REIL, Jo Christ, 1797. The Plait, the Yellow Spot, and the Transparent Portion of the Retina of the Eye. *Annals of Medicine, for the Year ...: Exhibiting a Concise View of the Latest and Most Important Discoveries in Medicine and Medical Philosophy*. 1797. Vol. 2, pp. 19-23.

RENZI, Lisa M. et HAMMOND, Billy R., 2010. The effect of macular pigment on heterochromatic luminance contrast. *Experimental Eye Research*. décembre 2010. Vol. 91, n° 6, pp. 896-900. DOI 10.1016/j.exer.2010.09.015.

RIBAYA-MERCADO, Judy D. et BLUMBERG, Jeffrey B., 2004. Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*. décembre 2004. Vol. 23, n° 6 Suppl, pp. 567S-587S. DOI 10.1080/07315724.2004.10719427.

RIBOLI, E., HUNT, K. J., SLIMANI, N., FERRARI, P., NORAT, T., FAHEY, M., CHARRONDIÈRE, U. R., HÉMON, B., CASAGRANDE, C., VIGNAT, J., OVERVAD, K., TJØNNELAND, A., CLAVEL-CHAPELON, F., THIÉBAUT, A., WAHRENDORF, J., BOEING, H., TRICHOPOULOS, D., TRICHOPOULOU, A., VINEIS, P., PALLI, D., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., PEETERS, P. H. M., LUND, E., ENGESET, D., GONZÁLEZ, C. A., BARRICARTE, A., BERGLUND, G., HALLMANS, G., DAY, N. E., KEY, T. J., KAAKS, R. et SARACCI, R., 2002. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): study populations and data collection. *Public Health Nutrition*. décembre 2002. Vol. 5, n° 6B, pp. 1113-1124. DOI 10.1079/PHN2002394.

RICCI, B., SHARP, D., O'ROURKE, E., KIENZLE, B., BLINDERMAN, L., GORDON, D., SMITH-MONROY, C., ROBINSON, G., GREGG, R. E. et RADER, D. J., 1995. A 30-amino acid truncation of the microsomal triglyceride transfer protein large subunit disrupts its interaction with protein disulfide-isomerase

- and causes abetalipoproteinemia. *The Journal of Biological Chemistry*. 16 juin 1995. Vol. 270, n° 24, pp. 14281-14285. DOI 10.1074/jbc.270.24.14281.
- RICHER, Stuart, 1999. ARMD-pilot (case series) environmental intervention data. *Journal of the American Optometric Association*. 1999. Vol. 70, n° 1, pp. 24-36.
- RICHER, Stuart P., STILES, William, GRAHAM-HOFFMAN, Kelly, LEVIN, Marc, RUSKIN, Dennis, WROBEL, James, PARK, Dong-Wouk et THOMAS, Carla, 2011. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of zeaxanthin and visual function in patients with atrophic age-related macular degeneration: the Zeaxanthin and Visual Function Study (ZVF) FDA IND #78, 973. *Optometry (St. Louis, Mo.)*. novembre 2011. Vol. 82, n° 11, pp. 667- 680.e6. DOI 10.1016/j.optm.2011.08.008.
- RICHER, Stuart, STILES, William, STATKUTE, Laisvyde, PULIDO, Jose, FRANKOWSKI, James, RUDY, David, PEI, Kevin, TSIPURSKY, Michael et NYLAND, Jill, 2004. Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: the Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial). *Optometry-Journal of the American Optometric Association*. 2004. Vol. 75, n° 4, pp. 216-229.
- RIGOTTI, Attilio, 2007. Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine*. décembre 2007. Vol. 28, n° 5-6, pp. 423-436. DOI 10.1016/j.mam.2007.01.002.
- RIGTRUP, K. M., MCEWEN, L. R., SAID, H. M. et ONG, D. E., 1994. Retinyl ester hydrolytic activity associated with human intestinal brush border membranes. *The American Journal of Clinical Nutrition*. juillet 1994. Vol. 60, n° 1, pp. 111-116. DOI 10.1093/ajcn/60.1.111.
- RODRIGUEZ GUTIERREZ, Perla Graciela, GONZÁLEZ GARCÍA, Juan Ramón, CASTILLO DE LEON, Yolanda Alicia, ZARATE GUERRERO, Juan Rafael et MAGAÑA TORRES, María Teresa, 2021. A novel p. Gly417Valfs\* 12 mutation in the MTTP gene causing abetalipoproteinemia: Presentation of the first patient in Mexico and analysis of the previously reported cases. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2021. Vol. 35, n° 3, pp. e23672.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., 2001. In : *A guide to carotenoid analysis in foods*. ILSI PRESS ISBN 1-57881-072-8. Washington : OMNI Research. ISBN ISBN 1-57881-072-8.
- ROSENTHAL, Julie M., KIM, Jonghyeon, DE MONASTARIO, Francisco, THOMPSON, Darby JS, BONE, Richard A., LANDRUM, John T., DE MOURA, Fabiana F., KHACHIK, Frederick, CHEN, Huiping et SCHLEICHER, Rosemary L., 2006. Dose-ranging study of lutein supplementation in persons aged 60 years or older. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006. Vol. 47, n° 12, pp. 5227-5233.
- ROUSSET, Xavier, VAISMAN, Boris, AMAR, Marcelo, SETHI, Amar A. et REMALEY, Alan T., 2009. Lecithin: cholesterol acyltransferase--from biochemistry to role in cardiovascular disease. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*. avril 2009. Vol. 16, n° 2, pp. 163-171. DOI 10.1097/med.0b013e328329233b.
- ROWLES, Joe L. et ERDMAN, John W., 2020. Carotenoids and their role in cancer prevention. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*. novembre 2020. Vol. 1865, n° 11, pp. 158613. DOI 10.1016/j.bbali.2020.158613.
- 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., MARCEL, Y. et DECKELBAUM, R. J., 1987. Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology*. 1987. Vol. 92, n° 2, pp. 390-399. DOI 10.1016/0016-5085(87)90133-8.
- RUNGE, P., MULLER, D. P., MCALLISTER, J., CALVER, D., LLOYD, J. K. et TAYLOR, D., 1986. Oral vitamin E supplements can prevent the retinopathy of abetalipoproteinemia. *British Journal of Ophthalmology*. 1986. Vol. 70, n° 3, pp. 166-173. DOI 10.1136/bjo.70.3.166.
- RUSIÑOL, A. E., HEGDE, R. S., CHUCK, S. L., LINGAPPA, V. R. et VANCE, J. E., 1998. Translocational pausing of apolipoprotein B can be regulated by membrane lipid composition. *Journal of Lipid Research*. juin 1998. Vol. 39, n° 6, pp. 1287-1294.
- RUSTAEUS, S., LINDBERG, K., STILLEMAR, P., CLAESSEON, C., ASP, L., LARSSON, T., BORÉN, J. et OLOFSSON, S. O., 1999. Assembly of very low density lipoprotein: a two-step process of apolipoprotein B core lipidation. *The Journal of Nutrition*. février 1999. Vol. 129, n° 2S Suppl, pp. 463S-466S. DOI 10.1093/jn/129.2.463S.

- RUTLEDGE, Angela C., SU, Qiaozhu et ADELI, Khosrow, 2010. Apolipoprotein B100 biogenesis: a complex array of intracellular mechanisms regulating folding, stability, and lipoprotein assembly. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*. avril 2010. Vol. 88, n° 2, pp. 251-267. DOI 10.1139/o09-168.
- RUTZ, Josiane K., BORGES, Caroline D., ZAMBAZI, Rui C., DA ROSA, Cleonice G. et DA SILVA, Médelin M., 2016. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. *Food chemistry*. 2016. Vol. 202, pp. 324-333.
- RYDÉN, M., LEANDERSON, P., KASTBOM, K.-O. et JONASSON, L., 2012. Effects of simvastatin on carotenoid status in plasma. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD*. janvier 2012. Vol. 22, n° 1, pp. 66-71. DOI 10.1016/j.numecd.2010.04.009.
- RYE, K. A., CLAY, M. A. et BARTER, P. J., 1999. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis*. août 1999. Vol. 145, n° 2, pp. 227-238. DOI 10.1016/s0021-9150(99)00150-1.
- RYE, Kerry-Anne et BARTER, Philip J., 2004. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. mars 2004. Vol. 24, n° 3, pp. 421-428. DOI 10.1161/01.ATV.0000104029.74961.f5.
- SABESIN, S. M., CLARK, S. B. et HOLT, P. R., 1977. Ultrastructural features of regional differences in chylomicron secretion by rat intestine. *Experimental and Molecular Pathology*. avril 1977. Vol. 26, n° 2, pp. 277-289. DOI 10.1016/0014-4800(77)90055-7.
- SABOUR-PICKETT, Sarah, BEATTY, Stephen, CONNOLLY, Eithne, LOUGHMAN, James, STACK, Jim, HOWARD, Alan, KLEIN, Ronald, KLEIN, Barbara E., MEUER, Stacy M. et MYERS, Chelsea E., 2014. Supplementation with three different macular carotenoid formulations in patients with early age-related macular degeneration. *Retina*. 2014. Vol. 34, n° 9, pp. 1757-1766.
- SAKAMOTO, Osamu, ABUKAWA, Daiki, TAKEYAMA, Junji, ARAI, Nobuhiro, NAGANO, Makoto, HATTORI, Hiroaki, EGASHIRA, Tohru, SAKAI, Naohiko, YAMASHITA, Shizuya, IINUMA, Kazuie et OHURA, Toshihiro, 2006. An atypical case of abetalipoproteinaemia with severe fatty liver in the absence of steatorrhea or acanthocytosis. *European Journal of Pediatrics*. janvier 2006. Vol. 165, n° 1, pp. 68-70. DOI 10.1007/s00431-005-1751-7.
- SALVINI, Séverine, CHARBONNIER, Monique, DEFOORT, Catherine, ALQUIER, Christian et LAIRON, Denis, 2002. Functional characterization of three clones of the human intestinal Caco-2 cell line for dietary lipid processing. *British journal of nutrition*. 2002. Vol. 87, n° 3, pp. 211-217.
- SANÉ, Alain, SEIDMAN, Ernest, SPAHIS, Schohraya, LAMANTIA, Valérie, GAROFALO, Carole, MONTOUDIS, Alain, MARCIL, Valérie et LEVY, Emile, 2015. New Insights In Intestinal Sar1B GTPase Regulation and Role in Cholesterol Homeostasis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2015. Vol. 116, n° 10, pp. 2270-2282. DOI 10.1002/jcb.25177.
- SANÉ, Alain Théophile, SINNETT, Daniel, DELVIN, Edgard, BENDAYAN, Moise, MARCIL, Valérie, MÉNARD, Daniel, BEAULIEU, Jean-François et LEVY, Emile, 2006. Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *Journal of Lipid Research*. octobre 2006. Vol. 47, n° 10, pp. 2112-2120. DOI 10.1194/jlr.M600174-JLR200.
- SASAMOTO, Yuzuru, GOMI, Fumi, SAWA, Miki, TSUJIKAWA, Motokazu et NISHIDA, Kohji, 2011. Effect of 1-year lutein supplementation on macular pigment optical density and visual function. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2011. Vol. 249, n° 12, pp. 1847-1854.
- SASS-KISS, A., KISS, J., MILOTAY, P., KEREK, M. M. et TOTH-MARKUS, M., 2005. Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International*. 2005. Vol. 38, n° 8-9, pp. 1023-1029.
- SASSOLAS, A., DI FILIPPO, M., AGGERBECK, L. P., PERETTI, N. et SAMSON-BOUMA, M. E., 2012. Anderson's disease/chylomicron retention disease and mutations in the SAR1B gene. *Mutations in Human Genetic Disease. D. Cooper and JM. Chen, editors. InTechOpen, London, UK*. 2012. pp. 251-272.
- SAVION, N. et KOTEV-EMETH, S., 1993. Role of apolipoproteins A-I, A-II and C-I in cholesterol efflux from endothelial and smooth muscle cells. *European Heart Journal*. juillet 1993. Vol. 14, n° 7, pp. 930-935. DOI 10.1093/eurheartj/14.7.930.
- SCHAEFFER, J. L., TYCZKOWSKI, J. K., PARKHURST, C. R. et HAMILTON, P. B., 1988. Carotenoid composition of serum and egg yolks of hens fed diets varying in carotenoid composition. *Poultry Science*. avril 1988. Vol. 67, n° 4, pp. 608-614. DOI 10.3382/ps.0670608.

- SCHMITZ, H. H., POOR, C. L., WELLMAN, R. B. et ERDMAN, J. W., 1991. Concentrations of selected carotenoids and vitamin A in human liver, kidney and lung tissue. *The Journal of Nutrition*. octobre 1991. Vol. 121, n° 10, pp. 1613-1621. DOI 10.1093/jn/121.10.1613.
- SCHWAB, Sigrid, ZIERER, Astrid, HEIER, Margit, FISCHER, Beate, HUTH, Cornelia, BAUMERT, Jens, MEISINGER, Christa, PETERS, Annette et THORAND, Barbara, 2015. Intake of Vitamin and Mineral Supplements and Longitudinal Association with HbA1c Levels in the General Non-Diabetic Population--Results from the MONICA/KORA S3/F3 Study. *PLoS One*. 2015. Vol. 10, n° 10, pp. e0139244. DOI 10.1371/journal.pone.0139244.
- SCHWARTZ, J. F., ROWLAND, L. P., EDER, H. A., MARKS, P. M., OSSERMAN, E., ANDERSON, H. et HIRSCHBERG, E., 1961. Bassen-Kornweig syndrome. Neuromuscular disorder resembling Friedreich's ataxia associated with retinitis pigmentosa, acanthocytosis, steatorrhea, and an abnormality of lipid metabolism. *Transactions of the American Neurological Association*. 1961. Vol. 86, pp. 49-53.
- SCHWEIGGERT, Ralf M., STEINGASS, Christof B., HELLER, Annerose, ESQUIVEL, Patricia et CARLE, Reinhold, 2011. Characterization of chromoplasts and carotenoids of red- and yellow-fleshed papaya (*Carica papaya* L.). *Planta*. novembre 2011. Vol. 234, n° 5, pp. 1031-1044. DOI 10.1007/s00425-011-1457-1.
- Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin E as  $\alpha$ -tocopherol, 2015. *EFSA Journal*. Vol. 13, n° 7, pp. 4149. DOI 10.2903/j.efsa.2015.4149.
- SCITA, Giorgio, APONTE, Gregory W. et WOLF, George, 1992. Uptake and cleavage of  $\beta$ -carotene by cultures of rat small intestinal cells and human lung fibroblasts. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 1992. Vol. 3, n° 3, pp. 118-123.
- SCOAZEC, J. Y., BOUMA, M. E., ROCHE, J. F., BLACHE, D., VERTHIER, N., FELDMANN, G. et GAY, G., 1992. Liver fibrosis in a patient with familial homozygous hypobetalipoproteinaemia: possible role of vitamin supplementation. *Gut*. 1992. Vol. 33, n° 3, pp. 414-417.
- SCOTT, B. B., MILLER, J. P. et LOSOWSKY, M. S., 1979. Hypobetalipoproteinaemia--a variant of the Bassen-Kornzweig syndrome. *Gut*. février 1979. Vol. 20, n° 2, pp. 163-168. DOI 10.1136/gut.20.2.163.
- SEDDON, Johanna M., AJANI, Umed A., SPERDUTO, Robert D., HILLER, Rita, BLAIR, Norman, BURTON, Thomas C., FARBER, Marilyn D., GRAGOUDAS, Evangelos S., HALLER, Julia et MILLER, Dayton T., 1994. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. *Jama*. 1994. Vol. 272, n° 18, pp. 1413-1420.
- SEGAL, Shaun et SHARMA, Sanjay, 2005. Ophthalmology. Vitamin A and vitamin E. *Canadian Family Physician Medecin De Famille Canadien*. 2005. Vol. 51, pp. 1079, 1085-1086.
- SEGREST, J. P., JONES, M. K., MISHRA, V. K., ANANTHARAMAIAH, G. M. et GARBER, D. W., 1994. apoB-100 has a pentameric structure composed of three amphipathic  $\alpha$ -helical domains alternating with two amphipathic  $\beta$ -strand domains. Detection by the computer program LOCATE. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*. octobre 1994. Vol. 14, n° 10, pp. 1674-1685. DOI 10.1161/01.atv.14.10.1674.
- SELLERS, Jeremy A., HOU, Li, ATHAR, Humra, HUSSAIN, M. Mahmood et SHELNESS, Gregory S., 2003. A Drosophila microsomal triglyceride transfer protein homolog promotes the assembly and secretion of human apolipoprotein B. Implications for human and insect transport and metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*. 30 mai 2003. Vol. 278, n° 22, pp. 20367-20373. DOI 10.1074/jbc.M300271200.
- SEMBA, R. D. et DAGNELIE, G., 2003. Are lutein and zeaxanthin conditionally essential nutrients for eye health? *Medical Hypotheses*. octobre 2003. Vol. 61, n° 4, pp. 465-472. DOI 10.1016/s0306-9877(03)00198-1.
- SHARP, D., BLINDERMAN, L., COMBS, K. A., KIENZLE, B., RICCI, B., WAGER-SMITH, K., GIL, C. M., TURCK, C. W., BOUMA, M. E. et RADER, D. J., 1993. Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinaemia. *Nature*. 2 septembre 1993. Vol. 365, n° 6441, pp. 65-69. DOI 10.1038/365065a0.
- SHILS, M. E., OLSON, J. A. et SHIKE, M., 1994. *Modern nutrition in health and disease*.
- SHMARAKOV, Igor, FLESHMAN, Matthew K., D'AMBROSIO, Diana N., PIANTEDOSI, Roseann, RIEDL, Ken M., SCHWARTZ, Steven J., CURLEY, Robert W., VON LINTIG, Johannes, RUBIN, Lewis P., HARRISON, Earl H. et BLANER, William S., 2010. Hepatic stellate cells are an important cellular site for  $\beta$ -carotene conversion to retinoid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1 décembre 2010. Vol. 504, n° 1, pp. 3-10. DOI 10.1016/j.abb.2010.05.010.

- SHOULDERS, C. C., BRETT, D. J., BAYLISS, J. D., NARCISI, T. M., JARMUZ, A., GRANTHAM, T. T., LEONI, P. R., BHATTACHARYA, S., PEASE, R. J. et CULLEN, P. M., 1993. Abetalipoproteinemia is caused by defects of the gene encoding the 97 kDa subunit of a microsomal triglyceride transfer protein. *Human Molecular Genetics*. décembre 1993. Vol. 2, n° 12, pp. 2109-2116. DOI 10.1093/hmg/2.12.2109.
- SHOULDERS, C. C., NARCISI, T. M., READ, J., CHESTER, A., BRETT, D. J., SCOTT, J., ANDERSON, T. A., LEVITT, D. G. et BANASZAK, L. J., 1994. The abetalipoproteinemia gene is a member of the vitellogenin family and encodes an alpha-helical domain. *Nature Structural Biology*. mai 1994. Vol. 1, n° 5, pp. 285-286. DOI 10.1038/nsb0594-285.
- SHOULDERS, Carol C., STEPHENS, David J. et JONES, Bethan, 2004. The intracellular transport of chylomicrons requires the small GTPase, Sar1b. *Current Opinion in Lipidology*. avril 2004. Vol. 15, n° 2, pp. 191-197. DOI 10.1097/00041433-200404000-00012.
- SIDDIQI, Shadab A., GORELICK, Fred S., MAHAN, James T. et MANSBACH, Charles M., 2003. COPII proteins are required for Golgi fusion but not for Endoplasmic Reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *Journal of Cell Science*. 2003. Vol. 116, n° 2, pp. 415-427. DOI 10.1242/jcs.00215.
- SIDDIQI, Shadab A., SIDDIQI, Shahzad, MAHAN, James, PEGGS, Kiffany, GORELICK, Fred S. et MANSBACH, Charles M., 2006. The Identification of a Novel Endoplasmic Reticulum to Golgi SNARE Complex Used by the Prechylomicron Transport Vesicle. *The Journal of biological chemistry*. 28 juillet 2006. Vol. 281, n° 30, pp. 20974-20982. DOI 10.1074/jbc.M601401200.
- SIDDIQI, Shahzad et MANSBACH, Charles M., 2012. 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*. 23 mars 2012. Vol. 287, n° 13, pp. 10178-10188. DOI 10.1074/jbc.M111.327247.
- SIDDIQI, Shahzad, SALEEM, Umair, ABUMRAD, Nada A., DAVIDSON, Nicholas O., STORCH, Judith, SIDDIQI, Shadab A. et MANSBACH, Charles M., 2010. A novel multiprotein complex is required to generate the prechylomicron transport vesicle from intestinal ER. *Journal of Lipid Research*. juillet 2010. Vol. 51, n° 7, pp. 1918-1928. DOI 10.1194/jlr.M005611.
- SIES, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 1997. Vol. 82, n° 2, pp. 291-295. DOI 10.1113/expphysiol.1997.sp004024.
- SIES, Helmut, 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1986. Vol. 25, n° 12, pp. 1058-1071.
- SILVAIN, M., BLIGNY, D., APARICIO, T., LAFORÊT, P., GRODET, A., PERETTI, N., MÉNARD, D., DJOUADI, F., JARDEL, C., BÉGUÉ, J. M., WALKER, F., SCHMITZ, J., LACHAUX, A., AGGERBECK, L. P. et SAMSON-BOUMA, M. E., 2008. Anderson's disease (chylomicron retention disease): a new mutation in the SARA2 gene associated with muscular and cardiac abnormalities. *Clinical Genetics*. décembre 2008. Vol. 74, n° 6, pp. 546-552. DOI 10.1111/j.1399-0004.2008.01069.x.
- SIMONE, Maria Luisa, RABACCHI, Claudio, KULOGLU, Zarife, KANSU, Aydan, ENSARI, Arzu, DEMIR, Arzu Meltem, HIZAL, Gulin, DI LEO, Enza, BERTOLINI, Stefano et CALANDRA, Sebastiano, 2019. Novel mutations of SAR1B gene in four children with chylomicron retention disease. *Journal of Clinical Lipidology*. 2019. Vol. 13, n° 4, pp. 554-562.
- SINGARAJA, R. R., BOCHER, V., JAMES, E. R., CLEE, S. M., ZHANG, L. H., LEAVITT, B. R., TAN, B., BROOKS-WILSON, A., KWOK, A., BISSADA, N., YANG, Y. Z., LIU, G., TAFURI, S. R., FIEVET, C., WELLINGTON, C. L., STAELS, B. et HAYDEN, M. R., 2001. Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoAI-dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron 1. *The Journal of Biological Chemistry*. 7 septembre 2001. Vol. 276, n° 36, pp. 33969-33979. DOI 10.1074/jbc.M102503200.
- SINGER, K., FISHER, B. et PERLSTEIN, M. A., 1952. Acanthocytosis; a genetic erythrocytic malformation. *Blood*. juin 1952. Vol. 7, n° 6, pp. 577-591.
- SISSAOUI, Samira, COCHET, Manon, POINSOT, Pierre, BORDAT, Claire, COLLARDEAU-FRACHON, Sophie, LACHAUX, Alain, LACAILLE, Florence et PERETTI, Noël, 2021. Lipids Responsible for Intestinal or Hepatic Disorder: When to Suspect a Familial Intestinal Hypocholesterolemia? *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2021. Vol. 73, n° 1, pp. 4-8.
- SIVAMURUKAN, Palanisamy, BODDU, Deepthi, PULIMOOD, Anna et AGARWAL, Indira, 2021. An Unusual Presentation of Hemorrhagic Disease in an Infant: A Probable Case of Abetalipoproteinemia. *Journal of*

- Pediatric Hematology/Oncology*. 1 avril 2021. Vol. 43, n° 3, pp. e429-e430. DOI 10.1097/MPH.0000000000001831.
- SNELLEN, E. L. M., VERBEEK, A. L. M., VAN DEN HOOGEN, G. W. P., CRUYSSBERG, J. R. M. et HOYNG, C. B., 2002. Neovascular age-related macular degeneration and its relationship to antioxidant intake. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. 2002. Vol. 80, n° 4, pp. 368-371.
- SNODDERLY, D. M., 1995. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *The American Journal of Clinical Nutrition*. décembre 1995. Vol. 62, n° 6 Suppl, pp. 1448S-1461S. DOI 10.1093/ajcn/62.6.1448S.
- SNODDERLY, D. M., AURAN, J. D. et DELORI, F. C., 1984. The macular pigment. II. Spatial distribution in primate retinas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. juin 1984. Vol. 25, n° 6, pp. 674-685.
- SNODDERLY, D. M., BROWN, P. K., DELORI, F. C. et AURAN, J. D., 1984. The macular pigment. I. Absorbance spectra, localization, and discrimination from other yellow pigments in primate retinas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. juin 1984. Vol. 25, n° 6, pp. 660-673.
- SNODDERLY, D. M., HANDELMAN, G. J. et ADLER, A. J., 1991. Distribution of individual macular pigment carotenoids in central retina of macaque and squirrel monkeys. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. février 1991. Vol. 32, n° 2, pp. 268-279.
- SOBREVILLA, L. A., GOODMAN, M. L. et KANE, C. A., 1964. Demyelinating Central nervous System disease, macular Atrophy and Acanthocytosis (Bassen-Kornzweig Syndrome). *The American Journal of Medicine*. novembre 1964. Vol. 37, pp. 821-828. DOI 10.1016/0002-9343(64)90030-0.
- SOKOL, R. J., 1988. Vitamin E deficiency and neurologic disease. *Annual Review of Nutrition*. 1988. Vol. 8, pp. 351-373. DOI 10.1146/annurev.nu.08.070188.002031.
- SOUTAR, A. K., GARNER, C. W., BAKER, H. N., SPARROW, J. T., JACKSON, R. L., GOTTO, A. M. et SMITH, L. C., 1975. Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochemistry*. 15 juillet 1975. Vol. 14, n° 14, pp. 3057-3064. DOI 10.1021/bi00685a003.
- SOUTHAM, E., THOMAS, P. K., KING, R. H., GOSS-SAMPSON, M. A. et MULLER, D. P., 1991. Experimental vitamin E deficiency in rats. Morphological and functional evidence of abnormal axonal transport secondary to free radical damage. *Brain: A Journal of Neurology*. avril 1991. Vol. 114 ( Pt 2), pp. 915-936. DOI 10.1093/brain/114.2.915.
- SPERDUTO, Robert D., HU, Tian-Sheng, MILTON, Roy C., ZHAO, Jia-Liang, EVERETT, Donald F., CHENG, Qiu-Fang, BLOT, William J., BING, Li, TAYLOR, Philip R. et JUN-YAO, Li, 1993. The Linxian cataract studies: two nutrition intervention trials. *Archives of ophthalmology*. 1993. Vol. 111, n° 9, pp. 1246-1253.
- STAGG, Scott M., LAPOINTE, Paul, RAZVI, Abbas, GÜRKAN, Cemal, POTTER, Clinton S., CARRAGHER, Bridget et BALCH, William E., 2008. Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly. *Cell*. 8 août 2008. Vol. 134, n° 3, pp. 474-484. DOI 10.1016/j.cell.2008.06.024.
- STAHL, W. et SIES, H., 2001. Effects of carotenoids and retinoids on gap junctional communication. *BioFactors (Oxford, England)*. 2001. Vol. 15, n° 2-4, pp. 95-98. DOI 10.1002/biof.5520150209.
- STAHL, Wilhelm et SIES, Helmut, 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 30 mai 2005. Vol. 1740, n° 2, pp. 101-107. DOI 10.1016/j.bbadis.2004.12.006.
- STEGHENS, J. P., VAN KAPPEL, A. L., RIBOLI, E. et COLLOMBEL, C., 1997. Simultaneous measurement of seven carotenoids, retinol and alpha-tocopherol in serum by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*. 20 juin 1997. Vol. 694, n° 1, pp. 71-81. DOI 10.1016/S0378-4347(97)00140-0.
- STRINGHAM, James M., STRINGHAM, Nicole T. et O'BRIEN, Kevin J., 2017. Macular Carotenoid Supplementation Improves Visual Performance, Sleep Quality, and Adverse Physical Symptoms in Those with High Screen Time Exposure. *Foods (Basel, Switzerland)*. 29 juin 2017. Vol. 6, n° 7, pp. E47. DOI 10.3390/foods6070047.
- STUETZ, Wolfgang, WEBER, Daniela, DOLLÉ, Martijn E. T., JANSEN, Eugène, GRUBECK-LOEBENSTEIN, Beatrix, FIEGL, Simone, TOUSSAINT, Olivier, BERNHARDT, Juergen, GONOS, Efstathios S., FRANCESCHI, Claudio, SIKORA, Ewa, MORENO-VILLANUEVA, María, BREUSING, Nicolle, GRUNE, Tilman et BÜRKLE, Alexander, 2016. Plasma Carotenoids, Tocopherols, and Retinol in the Age-

- Stratified (35–74 Years) General Population: A Cross-Sectional Study in Six European Countries. *Nutrients*. 30 septembre 2016. Vol. 8, n° 10, pp. 614. DOI 10.3390/nu8100614.
- SUGAWARA, T., KUSHIRO, M., ZHANG, H., NARA, E., ONO, H. et NAGAO, A., 2001. Lysophosphatidylcholine enhances carotenoid uptake from mixed micelles by Caco-2 human intestinal cells. *The Journal of Nutrition*. novembre 2001. Vol. 131, n° 11, pp. 2921-2927. DOI 10.1093/jn/131.11.2921.
- SUNDARAM, Meenakshi et YAO, Zemin, 2012. Intrahepatic role of exchangeable apolipoproteins in lipoprotein assembly and secretion. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. mai 2012. Vol. 32, n° 5, pp. 1073-1078. DOI 10.1161/ATVBAHA.111.241455.
- SUNG, Joo Ho, PARK, Se Hwa, MASTRI, Angeline R. et WARWICK, Warren J., 1980. Axonal Dystrophy in the Gracile Nucleus in Congenital Biliary Atresia and Cystic Fibrosis (Mucoviscidosis): Beneficial Effect of Vitamin E Therapy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 1980. Vol. 39, n° 5, pp. 584-597. DOI 10.1097/00005072-198009000-00007.
- SWIFT, Larry L., LOVE, Joseph D., HARRIS, Carla M., CHANG, Benny H. et JEROME, W. Gray, 2017. Microsomal triglyceride transfer protein contributes to lipid droplet maturation in adipocytes. *PLoS One*. 2017. Vol. 12, n° 8, pp. e0181046. DOI 10.1371/journal.pone.0181046.
- TACHIKAWA, Masanori, OKAYASU, Shun et HOSOYA, Ken-ichi, 2007. Functional involvement of scavenger receptor class B, type I, in the uptake of alpha-tocopherol using cultured rat retinal capillary endothelial cells. *Mol Vis*. 2007. Vol. 13, pp. 2041-7.
- TAN, Jennifer SL, WANG, Jie Jin, FLOOD, Victoria, ROCHTCHINA, Elena, SMITH, Wayne et MITCHELL, Paul, 2008. Dietary antioxidants and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 2008. Vol. 115, n° 2, pp. 334-341.
- TANG, Bor Luen, ONG, Yan Shan, HUANG, Bin, WEI, Shunhui, WONG, Ee Tsin, QI, Robert, HORSTMANN, Heinrich et HONG, Wanjin, 2001. A Membrane Protein Enriched in Endoplasmic Reticulum Exit Sites Interacts with COPII. *Journal of Biological Chemistry*. 2001. Vol. 276, n° 43, pp. 40008-40017. DOI 10.1074/jbc.M106189200.
- TANPRASERTSUK, Jirayu, MOHN, Emily S., MATTHAN, Nirupa R., LICHTENSTEIN, Alice H., BARGER, Kathryn, VISHWANATHAN, Rohini, JOHNSON, Mary Ann, POON, Leonard W. et JOHNSON, Elizabeth J., 2019. Serum Carotenoids, Tocopherols, Total n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, and n-6/n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Ratio Reflect Brain Concentrations in a Cohort of Centenarians. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*. 15 février 2019. Vol. 74, n° 3, pp. 306-314. DOI 10.1093/gerona/gly125.
- TANYEL, M. C. et MANCANO, L. D., 1997. Neurologic findings in vitamin E deficiency. *American Family Physician*. janvier 1997. Vol. 55, n° 1, pp. 197-201.
- TARUGI, P., LONARDO, A., BALLARINI, G., ERSPAMER, L., TONDELLI, E., BERTOLINI, S. et CALANDRA, S., 2000. A study of fatty liver disease and plasma lipoproteins in a kindred with familial hypobetalipoproteinemia due to a novel truncated form of apolipoprotein B (APO B-54.5). *Journal of Hepatology*. septembre 2000. Vol. 33, n° 3, pp. 361-370. DOI 10.1016/s0168-8278(00)80270-6.
- TARUGI, Patrizia et AVERNA, Maurizio, 2011a. Hypobetalipoproteinemia: genetics, biochemistry, and clinical spectrum. *Advances in Clinical Chemistry*. 2011. Vol. 54, pp. 81-107.
- TARUGI, Patrizia et AVERNA, Maurizio, 2011b. Hypobetalipoproteinemia: genetics, biochemistry, and clinical spectrum. In : *Advances in clinical chemistry*. Elsevier. pp. 81-107.
- TAVANI, Alessandra, NEGRI, Eva et LA VECCHIA, Carlo, 1996. Food and nutrient intake and risk of cataract. *Annals of epidemiology*. 1996. Vol. 6, n° 1, pp. 41-46.
- TAYLOR, Allen, JACQUES, Paul F., CHYLACK, Leo T., HANKINSON, Susan E., KHU, Patricia M., ROGERS, Gail, FRIEND, Judith, TUNG, William, WOLFE, John K., PADHYE, Nita et WILLETT, Walter C., 2002. Long-term intake of vitamins and carotenoids and odds of early age-related cortical and posterior subcapsular lens opacities. *The American Journal of Clinical Nutrition*. mars 2002. Vol. 75, n° 3, pp. 540-549. DOI 10.1093/ajcn/75.3.540.
- THOMAS, Sara E. et HARRISON, Earl H., 2016. Mechanisms of selective delivery of xanthophylls to retinal pigment epithelial cells by human lipoproteins. *Journal of Lipid Research*. octobre 2016. Vol. 57, n° 10, pp. 1865-1878. DOI 10.1194/jlr.M070193.

- TIWARI, Samata et SIDDIQI, Shadab A., 2012. Intracellular trafficking and secretion of VLDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. mai 2012. Vol. 32, n° 5, pp. 1079-1086. DOI 10.1161/ATVBAHA.111.241471.
- TÖRNWALL, Markareetta E., VIRTAMO, Jarmo, KORHONEN, Pasi A., VIRTANEN, Mikko J., TAYLOR, Philip R., ALBANES, Demetrius et HUTTUNEN, Jussi K., 2004. Effect of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on coronary heart disease during the 6-year post-trial follow-up in the ATBC study. *European Heart Journal*. juillet 2004. Vol. 25, n° 13, pp. 1171-1178. DOI 10.1016/j.ehj.2004.05.007.
- TOWFIGHI, J., 1981. Effects of chronic vitamin E deficiency on the nervous system of the rat. *Acta Neuropathologica*. 1981. Vol. 54, n° 4, pp. 261-267. DOI 10.1007/BF00696998.
- TRABER, M. G., GOLDBERG, I., DAVIDSON, E., LAGMAY, N. et KAYDEN, H. J., 1990. Vitamin E uptake by human intestinal cells during lipolysis in vitro. *Gastroenterology*. janvier 1990. Vol. 98, n° 1, pp. 96-103. DOI 10.1016/0016-5085(90)91296-i.
- TRABER, M. G., KAYDEN, H. J. et RINDLER, M. J., 1987. Polarized secretion of newly synthesized lipoproteins by the Caco-2 human intestinal cell line. *Journal of Lipid Research*. novembre 1987. Vol. 28, n° 11, pp. 1350-1363.
- TRABER, M. G., RAMAKRISHNAN, R. et KAYDEN, H. J., 1994. Human plasma vitamin E kinetics demonstrate rapid recycling of plasma RRR-alpha-tocopherol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994. Vol. 91, n° 21, pp. 10005-10008. DOI 10.1073/pnas.91.21.10005.
- TRABER, M. G., SCHIANO, T. D., STEEPHEN, A. C., KAYDEN, H. J. et SHIKE, M., 1994. Efficacy of water-soluble vitamin E in the treatment of vitamin E malabsorption in short-bowel syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1994. Vol. 59, n° 6, pp. 1270-1274. DOI 10.1093/ajcn/59.6.1270.
- TRABER, M. G., THELLMAN, C. A., RINDLER, M. J. et KAYDEN, H. J., 1988. Uptake of intact TPGS (d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate) a water-miscible form of vitamin E by human cells in vitro. *The American Journal of Clinical Nutrition*. septembre 1988. Vol. 48, n° 3, pp. 605-611. DOI 10.1093/ajcn/48.3.605.
- TRABER, Maret G., 2013. Mechanisms for the prevention of vitamin E excess. *Journal of Lipid Research*. 2013. Vol. 54, n° 9, pp. 2295-2306. DOI 10.1194/jlr.R032946.
- TRABER, Maret G., BURTON, Graham W. et HAMILTON, Robert L., 2004. Vitamin E trafficking. *Annals of the New York Academy of Sciences*. décembre 2004. Vol. 1031, pp. 1-12. DOI 10.1196/annals.1331.001.
- TRABER, Maret G., LANE, Jerome C., LAGMAY, Nora R. et KAYDEN, Herbert J., 1992. Studies on the transfer of tocopherol between lipoproteins. *Lipids*. 1992. Vol. 27, n° 9, pp. 657-663. DOI 10.1007/BF02536020.
- TREEPONGKARUNA, Suporn, CHONGVIRIYAPHAN, Naline, SUTHUTVORAVUT, Umaporn, CHAROENPIPOP, Dussadee, CHOUBTUM, Lulin et WATTANASIRICHAIGOON, Duangrurdee, 2009. Novel missense mutations of SAR1B gene in an infant with chylomicron retention disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. mars 2009. Vol. 48, n° 3, pp. 370-373. DOI 10.1097/mpg.0b013e318183188f.
- TREKLI, Marika C., RISS, George, GORALCZYK, Regina et TYRRELL, Rex M., 2003. Beta-carotene suppresses UVA-induced HO-1 gene expression in cultured FEK4. *Free Radical Biology & Medicine*. 15 février 2003. Vol. 34, n° 4, pp. 456-464. DOI 10.1016/s0891-5849(02)01303-5.
- TRIANAFILLIDIS, J. K., KOTTARAS, G., PEROS, G., MERIKAS, E., GIKAS, A., CONDILIS, N. et KONSTANTELOU, E., 2004. Endocrine function in abetalipoproteinemia: a study of a female patient of Greek origin. *Annali Italiani Di Chirurgia*. décembre 2004. Vol. 75, n° 6, pp. 683-690.
- TROESCH, Barbara, HOEFT, Birgit, MCBURNEY, Michael, EGGERSDORFER, Manfred et WEBER, Peter, 2012. Dietary surveys indicate vitamin intakes below recommendations are common in representative Western countries. *The British Journal of Nutrition*. 2012. Vol. 108, n° 4, pp. 692-698. DOI 10.1017/S0007114512001808.
- TROTTER, P. J., HO, S. Y. et STORCH, J., 1996. Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. *Journal of Lipid Research*. février 1996. Vol. 37, n° 2, pp. 336-346.
- TRUMBO, P., YATES, A. A., SCHLICKER, S. et POOS, M., 2001. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *Journal of the American Dietetic Association*. mars 2001. Vol. 101, n° 3, pp. 294-301. DOI 10.1016/S0002-8223(01)00078-5.



- TSERENTSOODOL, Nomingere, GORDIYENKO, Natalya V., PASCUAL, Iranzu, LEE, Jung Wha, FLIESLER, Steven J. et RODRIGUEZ, Ignacio R., 2006. Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors. *Mol Vis*. 2006. Vol. 12, n° 1319, pp. e1333.
- TYSSANDIER, Viviane, CARDINAULT, Nicolas, CARIS-VEYRAT, Catherine, AMIOT, Marie-Josèphe, GROLIER, Pascal, BOUTELOUP, Corinne, AZAIS-BRAESCO, Véronique et BOREL, Patrick, 2002. Vegetable-borne lutein, lycopene, and beta-carotene compete for incorporation into chylomicrons, with no adverse effect on the medium-term (3-wk) plasma status of carotenoids in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. mars 2002. Vol. 75, n° 3, pp. 526-534. DOI 10.1093/ajcn/75.3.526.
- TYSSANDIER, Viviane, CHOUBERT, Georges, GROLIER, Pascal et BOREL, Patrick, 2002. Carotenoids, mostly the xanthophylls, exchange between plasma lipoproteins. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition*. octobre 2002. Vol. 72, n° 5, pp. 300-308. DOI 10.1024/0300-9831.72.5.300.
- ULATOWSKI, L., PARKER, R., WARRIER, G., SULTANA, R., BUTTERFIELD, D. A. et MANOR, D., 2014. Vitamin E is essential for Purkinje neuron integrity. *Neuroscience*. 28 février 2014. Vol. 260, pp. 120-129. DOI 10.1016/j.neuroscience.2013.12.001.
- ULATOWSKI, Lynn et MANOR, Danny, 2013. Vitamin E trafficking in neurologic health and disease. *Annual Review of Nutrition*. 2013. Vol. 33, pp. 87-103. DOI 10.1146/annurev-nutr-071812-161252.
- VACHALI, Preejith P., BESCH, Brian M., GONZALEZ-FERNANDEZ, Federico et BERNSTEIN, Paul S., 2013. Carotenoids as possible interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) ligands: a surface plasmon resonance (SPR) based study. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2013. Vol. 539, n° 2, pp. 181-186.
- VAISMAN, B. L., LAMBERT, G., AMAR, M., JOYCE, C., ITO, T., SHAMBUREK, R. D., CAIN, W. J., FRUCHART-NAJIB, J., NEUFELD, E. D., REMALEY, A. T., BREWER, H. B. et SANTAMARINA-FOJO, S., 2001. ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *The Journal of Clinical Investigation*. juillet 2001. Vol. 108, n° 2, pp. 303-309. DOI 10.1172/JCI12517.
- VAN GOSSUM, A., 1988. Decrease in lipid peroxidation measured by breath pentane output in normals after oral supplementation with vitamin E. *Clinical Nutrition*. 1988. Vol. 7, n° 1, pp. 53-57. DOI 10.1016/0261-5614(88)90012-X.
- VAN BENNEKUM, Ariëtte, WERDER, Moritz, THUAHNAI, Stephen T., HAN, Chang-Hoon, DUONG, Phu, WILLIAMS, David L., WETTSTEIN, Philipp, SCHULTHESS, Georg, PHILLIPS, Michael C. et HAUSER, Helmut, 2005. Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary beta-carotene and cholesterol. *Biochemistry*. 22 mars 2005. Vol. 44, n° 11, pp. 4517-4525. DOI 10.1021/bi0484320.
- VANDENLANGENBERG, Gina M., MARES-PERLMAN, Julie A., KLEIN, Ronald, KLEIN, Barbara EK, BRADY, William E. et PALTA, Mari, 1998. Associations between antioxidant and zinc intake and the 5-year incidence of early age-related maculopathy in the Beaver Dam Eye Study. *American journal of epidemiology*. 1998. Vol. 148, n° 2, pp. 204-214.
- VAN GREEVENBROEK, M. M., ERKELENS, D. W. et DE BRUIN, T. W., 2000. Caco-2 cells secrete two independent classes of lipoproteins with distinct density: effect of the ratio of unsaturated to saturated fatty acid. *Atherosclerosis*. mars 2000. Vol. 149, n° 1, pp. 25-31. DOI 10.1016/s0021-9150(99)00289-0.
- VANHOLLEBEKE, B. et PAYS, E., 2006. The function of apolipoproteins L. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. septembre 2006. Vol. 63, n° 17, pp. 1937-1944. DOI 10.1007/s00018-006-6091-x.
- VARADI, Mihaly, ANYANGO, Stephen, DESHPANDE, Mandar, NAIR, Sreenath, NATASSIA, Cindy, YORDANOVA, Galabina, YUAN, David, STROE, Oana, WOOD, Gemma, LAYDON, Agata, ŽIDEK, Augustin, GREEN, Tim, TUNYASUVUNAKOOL, Kathryn, PETERSEN, Stig, JUMPER, John, CLANCY, Ellen, GREEN, Richard, VORA, Ankur, LUTFI, Mira, FIGURNOV, Michael, COWIE, Andrew, HOBBS, Nicole, KOHLI, Pushmeet, KLEYWEGT, Gerard, BIRNEY, Ewan, HASSABIS, Demis et VELANKAR, Sameer, 2022. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*. 7 janvier 2022. Vol. 50, n° D1, pp. D439-D444. DOI 10.1093/nar/gkab1061.
- VATASSERY, Govind T., FAHN, Stanley et KUSKOWSKI, Michael A., 1998. Alpha-Tocopherol in CSF of subjects taking high-dose vitamin E in the DATATOP study. *Neurology*. 1998. Vol. 50, n° 6, pp. 1900-1902.

- VATASSERY, Govind T., LAM, Cornelius, SMITH, W. Ed et QUACH, Hung T., 2006. Apolipoprotein E exerts selective and differential control over vitamin E concentrations in different areas of mammalian brain. *Journal of Neuroscience Research*. 1 novembre 2006. Vol. 84, n° 6, pp. 1335-1342. DOI 10.1002/jnr.21037.
- VATASSERY, Govind T., QUACH, Hung T., SMITH, W. Ed, SANTACRUZ, Karen S. et ROY, Sabita, 2007. Apolipoprotein e deficiency leads to altered brain uptake of alpha tocopherol injected into lateral cerebral ventricles. *Biochimica Et Biophysica Acta*. juillet 2007. Vol. 1772, n° 7, pp. 797-803. DOI 10.1016/j.bbadis.2007.04.006.
- VIDAILHET, M., RIEU, D., FEILLET, F., BOCQUET, A., CHOURAQUI, J.-P., DARMAUN, D., DUPONT, C., FRELUT, M.-L., GIRARDET, J.-P., HANKARD, R., ROZÉ, J.-C., SIMÉONI, U., TURCK, D. et BRIEND, A., 2017. Vitamin A in pediatrics: An update from the Nutrition Committee of the French Society of Pediatrics. *Archives De Pédiatrie: Organe Officiel De La Societe Francaise De Pédiatrie*. mars 2017. Vol. 24, n° 3, pp. 288-297. DOI 10.1016/j.arcped.2016.11.021.
- VINCENT, Marine, MÉNARD, Olivia, ETIENNE, Julie, OSSEMOND, Jordane, DURAND, Annie, BUFFIN, Rachel, LOIZON, Emmanuelle, MEUGNIER, Emmanuelle, DEGLAIRE, Amélie et DUPONT, Didier, 2020. Human milk pasteurisation reduces pre-lipolysis but not digestive lipolysis and moderately decreases intestinal lipid uptake in a combination of preterm infant in vitro models. *Food Chemistry*. 2020. Vol. 329, pp. 126927.
- VLASSCHAERT, Caitlyn, MCINTYRE, Adam D., THOMSON, Lauren A., KENNEDY, Brooke A., RATKO, Suzanne, PRASAD, Chitra et HEGELE, Robert A., 2021. Abetalipoproteinemia Due to a Novel Splicing Variant in MTTP in 3 Siblings. *Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports*. décembre 2021. Vol. 9, pp. 23247096211022484. DOI 10.1177/23247096211022484.
- VON SALLMANN, Ludwig, GELDERMAN, Albert H. et LASTER, Leonard, 1969. Ocular histopathologic changes in a case of a-beta-lipoproteinemia (Bassen-Kornzweig syndrome). *Documenta Ophthalmologica*. 1969. Vol. 26, n° 1, pp. 451-460.
- VON LINTIG, Johannes et SIES, Helmut, 2013. Carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 15 novembre 2013. Vol. 539, n° 2, pp. 99-101. DOI 10.1016/j.abb.2013.09.014.
- VU, Hien TV, ROBMAN, Luba, HODGE, Allison, MCCARTY, Catherine A. et TAYLOR, Hugh R., 2006. Lutein and zeaxanthin and the risk of cataract: the Melbourne visual impairment project. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006. Vol. 47, n° 9, pp. 3783-3786.
- WALD, George, 1945. Human vision and the spectrum. *Science*. 1945. Vol. 101, n° 2635, pp. 653-658.
- WALSH, Meghan T., DI LEO, Enza, OKUR, Ilyas, TARUGI, Patrizia et HUSSAIN, M. Mahmood, 2016. Structure-function analyses of microsomal triglyceride transfer protein missense mutations in abetalipoproteinemia and hypobetalipoproteinemia subjects. *Biochimica Et Biophysica Acta*. novembre 2016. Vol. 1861, n° 11, pp. 1623-1633. DOI 10.1016/j.bbali.2016.07.015.
- WALSH, Meghan T. et HUSSAIN, M. Mahmood, 2017. Targeting microsomal triglyceride transfer protein and lipoprotein assembly to treat homozygous familial hypercholesterolemia. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. janvier 2017. Vol. 54, n° 1, pp. 26-48. DOI 10.1080/10408363.2016.1221883.
- WALSH, Meghan T., IQBAL, Jahangir, JOSEKUTTY, Joby, SOH, James, DI LEO, Enza, ÖZAYDIN, Eda, GÜNDÜZ, Mehmet, TARUGI, Patrizia et HUSSAIN, M. Mahmood, 2015. Novel Abetalipoproteinemia Missense Mutation Highlights the Importance of the N-Terminal  $\beta$ -Barrel in Microsomal Triglyceride Transfer Protein Function. *Circulation. Cardiovascular Genetics*. octobre 2015. Vol. 8, n° 5, pp. 677-687. DOI 10.1161/CIRCGENETICS.115.001106.
- WANG, Y., TRAN, K. et YAO, Z., 1999. The activity of microsomal triglyceride transfer protein is essential for accumulation of triglyceride within microsomes in McA-RH7777 cells. A unified model for the assembly of very low density lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 24 septembre 1999. Vol. 274, n° 39, pp. 27793-27800. DOI 10.1074/jbc.274.39.27793.
- WASSERMAN, R H et TAYLOR, A N, 1972. Metabolic Roles of Fat-Soluble Vitamins D, E, and K. *Annual Review of Biochemistry*. 1972. Vol. 41, n° 1, pp. 179-202. DOI 10.1146/annurev.bi.41.070172.001143.
- WAYS, P. O., PARMENTIER, C. M., KAYDEN, H. J., JONES, J. W., SAUNDERS, D. R. et RUBIN, C. E., 1967. Studies on the absorptive defect for triglyceride in abetalipoproteinemia. *The Journal of Clinical Investigation*. janvier 1967. Vol. 46, n° 1, pp. 35-46. DOI 10.1172/JCI105509.
- WAYS, P., REED, C. F. et HANAHAN, D. J., 1963. Red-cell and plasma lipids in Acanthocytosis. *The Journal of Clinical Investigation*. août 1963. Vol. 42, pp. 1248-1260. DOI 10.1172/JCI104810.

- WEIGERT, Günther, KAYA, Semira, PEMP, Berthold, SACU, Stefan, LASTA, Michael, WERKMEISTER, René Marcel, DRAGOSTINOFF, Nikolaus, SIMADER, Christian, GARHÖFER, Gerhard, SCHMIDT-ERFURTH, Ursula et SCHMETTERER, Leopold, 2011. Effects of lutein supplementation on macular pigment optical density and visual acuity in patients with age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 17 octobre 2011. Vol. 52, n° 11, pp. 8174-8178. DOI 10.1167/iovs.11-7522.
- WEINGLASS, Adam B., KOHLER, Martin, SCHULTE, Uwe, LIU, Jessica, NKETIAH, Emmanuel O., THOMAS, Anu, SCHMALHOFER, William, WILLIAMS, Brande, BILDL, Wolfgang, MCMASTERS, Daniel R., DAI, Kevin, BEERS, Lindsey, MCCANN, Margaret E., KACZOROWSKI, Gregory J. et GARCIA, Maria L., 2008. Extracellular loop C of NPC1L1 is important for binding to ezetimibe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 12 août 2008. Vol. 105, n° 32, pp. 11140-11145. DOI 10.1073/pnas.0800936105.
- WEISSMAN, J. T., PLUTNER, H. et BALCH, W. E., 2001. The mammalian guanine nucleotide exchange factor mSec12 is essential for activation of the Sar1 GTPase directing endoplasmic reticulum export. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. juillet 2001. Vol. 2, n° 7, pp. 465-475. DOI 10.1034/j.1600-0854.2001.20704.x.
- WERTZ, Karin, SEIFERT, Nicole, HUNZIKER, Petra Buchwald, RISS, Georges, WYSS, Adrian, LANKIN, Christopher et GORALCZYK, Regina, 2004. Beta-carotene inhibits UVA-induced matrix metalloprotease 1 and 10 expression in keratinocytes by a singlet oxygen-dependent mechanism. *Free Radical Biology & Medicine*. 1 septembre 2004. Vol. 37, n° 5, pp. 654-670. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2004.05.018.
- WEST, Clive E., EILANDER, Ans et VAN LIESHOUT, Machteld, 2002. Consequences of revised estimates of carotenoid bioefficacy for dietary control of vitamin A deficiency in developing countries. *The Journal of Nutrition*. septembre 2002. Vol. 132, n° 9 Suppl, pp. 2920S-2926S. DOI 10.1093/jn/132.9.2920S.
- WETTERAU, J. R., AGGERBECK, L. P., BOUMA, M. E., EISENBERG, C., MUNCK, A., HERMIER, M., SCHMITZ, J., GAY, G., RADER, D. J. et GREGG, R. E., 1992. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science (New York, N.Y.)*. 6 novembre 1992. Vol. 258, n° 5084, pp. 999-1001. DOI 10.1126/science.1439810.
- WETTERAU, J. R., COMBS, K. A., MCLEAN, L. R., SPINNER, S. N. et AGGERBECK, L. P., 1991. Protein disulfide isomerase appears necessary to maintain the catalytically active structure of the microsomal triglyceride transfer protein. *Biochemistry*. 8 octobre 1991. Vol. 30, n° 40, pp. 9728-9735. DOI 10.1021/bi00104a023.
- WETTERAU, J. R., COMBS, K. A., SPINNER, S. N. et JOINER, B. J., 1990. Protein disulfide isomerase is a component of the microsomal triglyceride transfer protein complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 15 juin 1990. Vol. 265, n° 17, pp. 9800-9807.
- WETTERAU, J. R., LIN, M. C. et JAMIL, H., 1997. Microsomal triglyceride transfer protein. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1 avril 1997. Vol. 1345, n° 2, pp. 136-150. DOI 10.1016/s0005-2760(96)00168-3.
- WETTERAU, J. R. et ZILVERSMIT, D. B., 1984. A triglyceride and cholesteryl ester transfer protein associated with liver microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*. 10 septembre 1984. Vol. 259, n° 17, pp. 10863-10866.
- WHITE, Wendy S., ZHOU, Yang, CRANE, Agatha, DIXON, Philip, QUADT, Frits et FLENDRIG, Leonard M., 2017. Modeling the dose effects of soybean oil in salad dressing on carotenoid and fat-soluble vitamin bioavailability in salad vegetables. *The American Journal of Clinical Nutrition*. octobre 2017. Vol. 106, n° 4, pp. 1041-1051. DOI 10.3945/ajcn.117.153635.
- WIDOMSKA, Justyna et SUBCZYNSKI, Witold K., 2014. Why has Nature Chosen Lutein and Zeaxanthin to Protect the Retina? *Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology*. 21 février 2014. Vol. 5, n° 1, pp. 326. DOI 10.4172/2155-9570.1000326.
- WIDOMSKA, Justyna et SUBCZYNSKI, Witold K., 2019. Mechanisms enhancing the protective functions of macular xanthophylls in the retina during oxidative stress. *Experimental eye research*. 2019. Vol. 178, pp. 238-246.
- WOLF-SCHNURRBUSCH, Ute E. K., ZINKERNAGEL, Martin S., MUNK, Marion R., EBNETER, Andreas et WOLF, Sebastian, 2015. Oral Lutein Supplementation Enhances Macular Pigment Density and Contrast Sensitivity but Not in Combination With Polyunsaturated Fatty Acids. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. décembre 2015. Vol. 56, n° 13, pp. 8069-8074. DOI 10.1167/iovs.15-17586.
- WOODSIDE, J. V., YOUNG, I. S., GILCHRIST, S. E. C. M., VIOQUE, J., CHAKRAVARTHY, U., DE JONG, P. T. V. M., RAHU, M., SELAND, J., SOUBRANE, G., TOMAZZOLI, L., TOPOUZIS, F., VINGERLING, J. R. et FLETCHER, A. E., 2013. Factors associated with serum/plasma concentrations of

- vitamins A, C, E and carotenoids in older people throughout Europe: the EUREYE study. *European Journal of Nutrition*. août 2013. Vol. 52, n° 5, pp. 1493-1501. DOI 10.1007/s00394-012-0456-8.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004. *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*. World Health Organization.
- WU, Huiyun, DWYER, Kathleen M., FAN, Zhihong, SHIRCORE, Anne, FAN, Jing et DWYER, James H., 2003. Dietary fiber and progression of atherosclerosis: the Los Angeles Atherosclerosis Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. décembre 2003. Vol. 78, n° 6, pp. 1085-1091. DOI 10.1093/ajcn/78.6.1085.
- WU, X., ZHOU, M., HUANG, L. S., WETTERAU, J. et GINSBERG, H. N., 1996. Demonstration of a physical interaction between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B during the assembly of ApoB-containing lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 26 avril 1996. Vol. 271, n° 17, pp. 10277-10281. DOI 10.1074/jbc.271.17.10277.
- XIE, Yan, MATSUMOTO, Hitoshi, NALBANTOGLU, Ilke, KERR, Thomas A., LUO, Jianyang, RUBIN, Deborah C., KENNEDY, Susan et DAVIDSON, Nicholas O., 2013. 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. Vol. 8, n° 6, pp. e67819. DOI 10.1371/journal.pone.0067819.
- XU, Xian-Rong, ZOU, Zhi-Yong, HUANG, Yang-Mu, XIAO, Xin, MA, Le et LIN, Xiao-Ming, 2012. Serum carotenoids in relation to risk factors for development of atherosclerosis. *Clinical Biochemistry*. novembre 2012. Vol. 45, n° 16-17, pp. 1357-1361. DOI 10.1016/j.clinbiochem.2012.07.101.
- YABUZAKI, Junko, 2017. Carotenoids Database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms. *Database 2017*. 2017.
- YAM, Jason C. S. et KWOK, Alvin K. H., 2014. Ultraviolet light and ocular diseases. *International Ophthalmology*. avril 2014. Vol. 34, n° 2, pp. 383-400. DOI 10.1007/s10792-013-9791-x.
- YANG, Song, ZHOU, Jun et LI, Dengwen, 2021. Functions and Diseases of the Retinal Pigment Epithelium. *Frontiers in Pharmacology*. 2021. Vol. 12, pp. 727870. DOI 10.3389/fphar.2021.727870.
- YAO, Z. M., BLACKHART, B. D., LINTON, M. F., TAYLOR, S. M., YOUNG, S. G. et MCCARTHY, B. J., 1991. Expression of carboxyl-terminally truncated forms of human apolipoprotein B in rat hepatoma cells. Evidence that the length of apolipoprotein B has a major effect on the buoyant density of the secreted lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 15 février 1991. Vol. 266, n° 5, pp. 3300-3308.
- YAO, Zemin, ZHOU, Hu, FIGEYS, Daniel, WANG, Yuwei et SUNDARAM, Meenakshi, 2013. Microsome-associated luminal lipid droplets in the regulation of lipoprotein secretion. *Current Opinion in Lipidology*. avril 2013. Vol. 24, n° 2, pp. 160-170. DOI 10.1097/MOL.0b013e32835aeb7.
- YEE, S., 1997. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. *Pharmaceutical Research*. juin 1997. Vol. 14, n° 6, pp. 763-766. DOI 10.1023/a:1012102522787.
- YEN, Chi-Liang Eric et FARESE, Robert V., 2003. MGAT2, a monoacylglycerol acyltransferase expressed in the small intestine. *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278, n° 20, pp. 18532-18537.
- YOKOTA, T., IGARASHI, K., UCHIHARA, T., JISHAGE, K., TOMITA, H., INABA, A., LI, Y., ARITA, M., SUZUKI, H., MIZUSAWA, H. et ARAI, H., 2001. Delayed-onset ataxia in mice lacking alpha-tocopherol transfer protein: model for neuronal degeneration caused by chronic oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 18 décembre 2001. Vol. 98, n° 26, pp. 15185-15190. DOI 10.1073/pnas.261456098.
- YOKOTA, T., UCHIHARA, T., KUMAGAI, J., SHIOJIRI, T., PANG, J. J., ARITA, M., ARAI, H., HAYASHI, M., KIYOSAWA, M., OKEDA, R. et MIZUSAWA, H., 2000. Postmortem study of ataxia with retinitis pigmentosa by mutation of the alpha-tocopherol transfer protein gene. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. avril 2000. Vol. 68, n° 4, pp. 521-525. DOI 10.1136/jnnp.68.4.521.
- YONEKURA, Lina et NAGAO, Akihiko, 2007. Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Molecular Nutrition & Food Research*. janvier 2007. Vol. 51, n° 1, pp. 107-115. DOI 10.1002/mnfr.200600145.
- YOUNG, Andrew John, 1991. The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum*. 1 décembre 1991. Vol. 83, n° 4, pp. 702-708. DOI 10.1111/j.1399-3054.1991.tb02490.x.
- YU, Chia-Chia, NANDROT, Emeline F., DUN, Ying et FINNEMANN, Silvia C., 2012. Dietary antioxidants prevent age-related retinal pigment epithelium actin damage and blindness in mice lacking  $\alpha\beta 5$  integrin. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012. Vol. 52, n° 3, pp. 660-670.

- YU, Liqing, BHARADWAJ, Shantaram, BROWN, J. Mark, MA, Yinyan, DU, Wei, DAVIS, Matthew A., MICHAELY, Peter, LIU, Pingsheng, WILLINGHAM, Mark C. et RUDEL, Lawrence L., 2006. Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake. *The Journal of Biological Chemistry*. 10 mars 2006. Vol. 281, n° 10, pp. 6616-6624. DOI 10.1074/jbc.M511123200.
- YUILL, G. M., SCHOLZ, C. et LASCELLES, R. G., 1976. Abetalipoproteinaemia. A case report with pathological studies. *Postgraduate Medical Journal*. novembre 1976. Vol. 52, n° 613, pp. 713-720. DOI 10.1136/pgmj.52.613.713.
- ZAMEL, Rola, KHAN, Razi, POLLEX, Rebecca L. et HEGELE, Robert A., 2008. Abetalipoproteinemia: two case reports and literature review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 8 juillet 2008. Vol. 3, pp. 19. DOI 10.1186/1750-1172-3-19.
- ZEB, Alam et MEHMOOD, Sultan, 2004. Carotenoids contents from various sources and their potential health applications. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2004. Vol. 3, n° 3, pp. 199-204.
- ZHANG, Ping-Chuan, WU, Chang-Rui, WANG, Zhi-Lun, WANG, Li-Yuan, HAN, Yue, SUN, Shu-Liu, LI, Qing-Shan et MA, Le, 2017. Effect of lutein supplementation on visual function in nonproliferative diabetic retinopathy. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. mai 2017. Vol. 26, n° 3, pp. 406-411. DOI 10.6133/apjcn.032016.13.
- ZINO, S., SKEAFF, M., WILLIAMS, S. et MANN, J., 1997. Randomised controlled trial of effect of fruit and vegetable consumption on plasma concentrations of lipids and antioxidants. *BMJ (Clinical research ed.)*. 21 juin 1997. Vol. 314, n° 7097, pp. 1787-1791. DOI 10.1136/bmj.314.7097.1787.
- ZOU, X., GAO, J., ZHENG, Y., WANG, X., CHEN, C., CAO, K., XU, J., LI, Y., LU, W., LIU, J. et FENG, Z., 2014. Zeaxanthin induces Nrf2-mediated phase II enzymes in protection of cell death. *Cell Death & Disease*. 8 mai 2014. Vol. 5, pp. e1218. DOI 10.1038/cddis.2014.190.
- ZUCCO, Flavia, BATTO, Anne-Françoise, BISES, Giovanna, CHAMBAZ, Jean, CHIUSOLO, Arianna, CONSALVO, Rosa, CROSS, Heide, DAL NEGRO, Gianni, DE ANGELIS, Isabella, FABRE, Gérard, GUILLOU, François, HOFFMAN, Sebastian, LAPLANCHE, Loïc, MOREL, Etienne, PINÇON-RAYMOND, Martine, PRIETO, Pilar, TURCO, Laura, RANALDI, Giulia, ROUSSET, Monique, SAMBUY, Yula, SCARINO, Maria Laura, TORREILLES, François et STAMMATI, Annalaura, 2005. An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of Caco-2 cell lines. *Alternatives to laboratory animals: ATLA*. décembre 2005. Vol. 33, n° 6, pp. 603-618. DOI 10.1177/026119290503300618.



# ANNEXES

1. **Annexe 1. Tableau des principales mutations de *MTTP* identifiées dans la FHBL-SD1 et leurs conséquences sur la protéine MTP, d'après (Rodriguez Gutierrez et al. 2021).**

Exon/Intron	Mutation	Nom du variant	Conséquences sur la protéine (si elle a été décrite)
E1	c.1A > G	p.0?	
E1	c.59_75del	p.K20Tfs*5	
I1	c.61 + 1G>C	p.G21Dfs*7	
I1	c.61 + 2T>C	p.G21Dfs*7	
I1	c.148-2A > G <sup>‡</sup>		
E2	c.103_127del	p.K35Ffs*37	
E2	c.136C > G	p.R46G	
E2	c.154C > T	p.Q52X	
E2	c.215del	p.P72Lfs*8	
E3	c.307A > T	p.K103X	Apparition codon stop. Protéine tronquée donc perte d'activité
I3	c.394-2A > C	p.V132_E167del	
I3	c.393 + 3A>T <sup>†</sup>	p.V132_E167del	
E4	c.398_399del	p.V132Nfs*140	
E4	c.419insA	p.N139_E140insX	
E5	c.506A > T	p.D169V	Faible capacité de transfert des TAG (13%) et des phospholipides (9%)
E5	c.582C > A	p.C194X	Apparition codon stop. Protéine tronquée donc perte d'activité
I5	c.619-5_619-2del	p.V207Afs*28	Délétion de l'exon 6, protéine résiduelle de 233 AA avec une quasi-absence d'activité
I5	c.619-3T > G	p.V207Afs*28	
E6	c.619G > T	p.V207Afs*28	
E6	c.708_709del	p.H236Qfs*11	
E7	c.790G > C	p.G264R	Mutation faux-sens



<b>I7</b>	c.910-1G > T		p.L304Tfs*28	
<b>E8</b>	c.923G > A		p.W308X	Apparition codon stop. Protéine tronquée donc perte d'activité
<b>I9 – E9</b>	c.1067 1217_1141del	+	p.P357Ffs*4	
<b>E9</b>	c.1081G > T		p.D361Y	Sécrétion d'apoB-48 réduite à 22%
<b>E9</b>	c.1147del		p.S383Vfs*26	
<b>E9</b>	c.1151A > C		p.D384A	Favorise la sécrétion d'apoB-48
<b>E9</b>	c.1229_1231delinsT		p.A410_L411delinsV	
<b>I9</b>	c.1236 + 2T>G		p.P357Vfs*17	Protéine de 372 AA
<b>I9</b>	c.1237-1G > A		p.S413_K448del	
<b>E10</b>	c.1237_1344del		p.S413_K448del	Protéine de 858 AA quasi non fonctionnelle
<b>E10</b>	c.1304T > A		p.L435H++++	Faible activité de transfert des TAG (1,9% /30 µg de protéines/h)
<b>E10</b>	c.1342A > T		p.K448X	Apparition codon stop. Protéine tronquée donc perte d'activité
<b>I10</b>	c.1344 5_1344+11del	+	p.S413_K448del	
<b>E11</b>	c.1389del		p.A462Qfs14	
<b>E11</b>	c.1392del		p.E465Rfs*13	
<b>E11</b>	c.1401insA		p.E467_D468insR	
<b>E11</b>	c.1448_1461del		p.Pro483Glnfs*25	
<b>E11</b>	c.1508_1515del		p.Leu503Hisfs*7	
<b>E12</b>	c.1582T > C		p.Y528H	Activité résiduelle de 10%
<b>E12</b>	c.1586A > G		p.H529R	Mutation faux-sens
<b>E12</b>	c.1618C > T		p.R540C	Activité résiduelle de 12%
<b>E12</b>	c.1619G > A		p.R540H	Quasi-absence de sécrétion de l'apoB
<b>E12</b>	c.1655C > T		p.P552L	Mutation faux-sens
<b>E12</b>	c.1691C > T		p.I564T	Mutation faux-sens

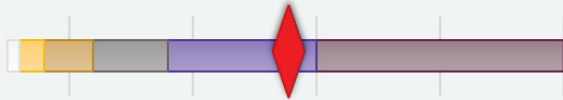
<b>I12</b>	c.1769G > T	p.S590I	Mutation faux-sens
<b>E13</b>	c.1770-1G > A†	p.S590Rfs*2	
<b>E13</b>	c.1783C > T	p.R595X	Apparition codon stop. Protéine tronquée donc perte d'activité
<b>E13</b>	c.1820del	p.R607Lfs*15	
<b>I13</b>	c.1834G > C	p.G612R	Mutation faux-sens
<b>I13</b>	c.1867 + 1G>A	p.S624Gfs*3	
<b>I13</b>	c.1867 + 5G>A	p.S624lfs*31	Deux isoformes : intégration de l'intron 13, produisant une protéine de 653 AA ou délétion de l'exon 13, produisant une protéine de 590 AA
<b>E14</b>	c.1867 + 6T>A	p.S624Gfs*3	
<b>E14</b>	c.1868G > T	p.R623L	Activité résiduelle de 60 %-65 % Deux isoformes : inclusion de l'intron 13 et production d'une protéine de 653 AA ou délétion de l'exon 14 produisant une protéine de 623 AA
<b>E14</b>	c.1946A > G	p.N649S	Activité résiduelle de 57%
<b>E14</b>	c.1982G > C	p.G661A	Mutation faux-sens
<b>E14</b>	c.1989G > A	p.S624Gfs*3	
<b>E15</b>	c.2211del	p.H737fs*9	
<b>E15</b>	c.2212del	p.S738Lfs*10	
<b>E15 – E16</b>	c.2076-39_2303 + 52del‡		
<b>I15</b>	c.2218-2A > G	p.E740Gfs*8	
<b>E16</b>	c.2237G > A	p.G746E	Mutation faux-sens
<b>E16</b>	c.2313T > A	p.Y771X	Apparition codon stop. Protéine tronquée donc perte d'activité
<b>E16</b>	c.2338A > T	p.N780Y	Activité résiduelle négligeable
<b>I16</b>	c.2342 + 1G>A	p.V782Xfs*1	Introduction de l'intron 16 produisant une protéine de 781 AA
<b>I16</b>	c.2342 + 2dup	p.V782_R838del	

<b>E17</b>	c.2346_2347insACTG	p.V784Dfs*7	
<b>E18</b>	c.2445del	p.T816Qfs*10	
<b>E18</b>	c.2524A > T	p.K842X	Apparition codon stop. Protéine tronquée donc perte d'activité
<b>E18</b>	c.2593G > T	p.G865X	Perte des 30 derniers AA et absence d'activité
<b>E18</b>	c.2611del	p.H871I fs*29	

2. Annexe 2. Tableau présentant les principaux symptômes de la FHBL-SD1 et leurs fréquences d'après une revue de la littérature

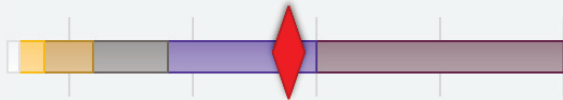
Fréquence des symptômes	Description
<p><b>Stéatorrhée : Très fréquent (80-99%)</b></p> <p>A horizontal bar divided into five segments: white, yellow, grey, purple, and dark red. A red diamond marker is positioned at the far right end of the bar, indicating a frequency of 80-99%.</p>	<p>Quantité élevée de graisse dans les selles, résultat d'une mauvaise absorption des lipides dans l'intestin.</p>
<p><b>Vomissements : Très fréquent (80-99%)</b></p> <p>A horizontal bar divided into five segments: white, yellow, grey, purple, and dark red. A red diamond marker is positioned at the far right end of the bar, indicating a frequency of 80-99%.</p>	
<p><b>Malabsorption intestinale des graisses : Très fréquent (80-99%)</b></p> <p>A horizontal bar divided into five segments: white, yellow, grey, purple, and dark red. A red diamond marker is positioned at the far right end of the bar, indicating a frequency of 80-99%.</p>	<p>Anomalie de l'absorption des graisses au niveau du tractus gastro-intestinal.</p>
<p><b>Acanthocytose : Très fréquent (80-99%)</b></p> <p>A horizontal bar divided into five segments: white, yellow, grey, purple, and dark red. A red diamond marker is positioned at the far right end of the bar, indicating a frequency of 80-99%.</p>	<p>L'acanthocytose est un type de poïkilocytose (présence dans le sang de globules rouges déformés) caractérisé par des érythrocytes rigides en forme d'étoile hérissés d'épines à la surface des cellules.</p>
<p><b>Atteintes du système nerveux : Très fréquent (80-99%)</b></p> <p>A horizontal bar divided into five segments: white, yellow, grey, purple, and dark red. A red diamond marker is positioned at the far right end of the bar, indicating a frequency of 80-99%.</p>	
<p><b>Retard de croissance et du développement : Fréquent (30-79%)</b></p> <p>A horizontal bar divided into five segments: white, yellow, grey, purple, and dark red. A red diamond marker is positioned in the purple segment, indicating a frequency of 30-79%.</p>	<p>Retard pré- et post-natal avec poids et tailles inférieurs à la normale.</p>
<p><b>Anomalie de la pigmentation rétinienne : Fréquent (30-79%)</b></p> <p>A horizontal bar divided into five segments: white, yellow, grey, purple, and dark red. A red diamond marker is positioned in the purple segment, indicating a frequency of 30-79%.</p>	<p>Altération de l'épithélium pigmentaire de la rétine</p>

**Perte de la vision : Fréquent (30-79%)**



Déficiences visuelles pouvant entraîner une limitation importante du champ visuel et de la capacité visuelle.

**Nyctalopie : Fréquent (30-79%)**



Perte de la vision de nuit

**Diarrhée chronique : Fréquent (30-79%)**



**Myalgie : Fréquent (30-79%)**



Douleurs musculaires

**Aréflexie : Fréquent (30-79%)**



Absence de réflexes neurologiques (tel que le réflexe du genou).

**Anémie : Fréquent (30-79%)**



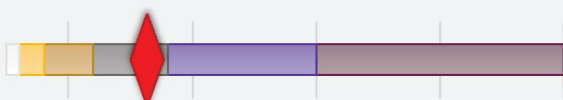
Réduction du volume des érythrocytes ou de la concentration en hémoglobine.

**Réticulocytose : Fréquent (30-79%)**



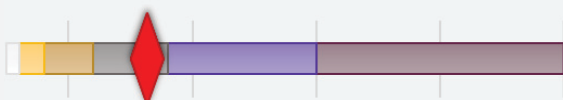
Une augmentation du nombre de réticulocytes (érythrocytes immatures) dans la circulation sanguine périphérique.

**Elévation des transaminases hépatiques : Occasionnel (5-29%)**



Élévation des taux sériques d'alanine aminotransférase (ALAT) et d'aspartate aminotransférase (ASAT), témoins des lésions hépatiques.

**Stéatose hépatique : Occasionnel (5-29%)**



Résultat de l'accumulation de lipides dans les hépatocytes.

**Hépatomégalie : Occasionnel (5-29%)**



Augmentation de la taille du foie

**Hypopigmentation du fond d'œil : Occasionnel (5-29%)**



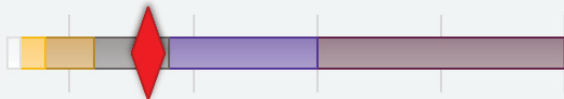
Perte de pigmentation du fond d'œil, notamment dans l'épithélium pigmentaire et la choroïde.

**Perte de la vision des couleurs : Occasionnel (5-29%)**



Perte de la capacité à distinguer ou reconnaître les couleurs.

**Scotome : Occasionnel (5-29%)**



Tache aveugle dans le champ visuel

**Cyphoscoliose : Occasionnel (5-29%)**



Courbure anormale de la colonne vertébrale dans les plans antéropostérieure et latéral.

**Ataxie : Occasionnel (5-29%)**



Dysfonctionnement du cervelet entraînant divers déficits neurologiques tels que l'asynergie (manque de coordination entre les muscles, les membres et les articulations), la dysmétrie (incapacité à évaluer les distances, ce qui peut entraîner une sous-estimation ou une surestimation des mouvements de préhension) et la dysdiadochokinésie (incapacité à effectuer des mouvements rapides nécessitant la contraction répétée de groupes musculaires antagonistes).

**Faiblesse musculaire des membres inférieurs : Occasionnel (5-29%)**

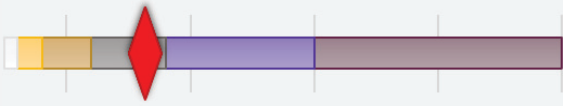
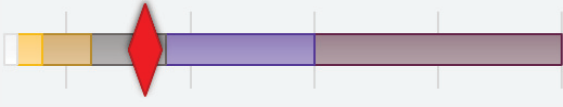
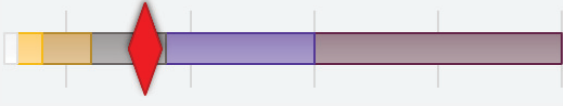
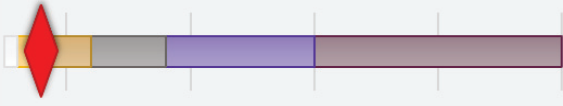
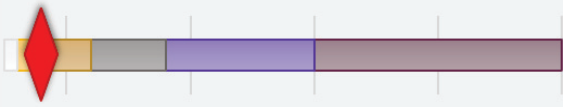
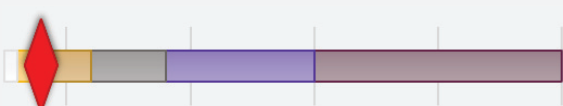
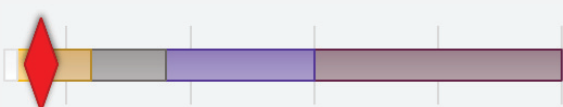
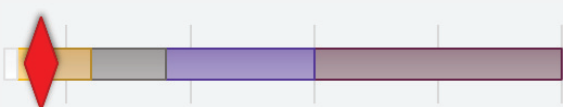
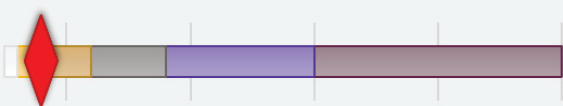


Réduction de la force de la musculature des jambes.

**Dysfonctionnement des motoneurone supérieurs : Occasionnel (5-29%)**

Les motoneurones supérieurs sont des neurones du cortex moteur qui se projettent vers le tronc cérébral et la moelle épinière. Ils sont impliqués dans le contrôle des mouvements volontaires.

<p><b>Altération de la proprioception : Occasionnel (5-29%)</b></p>	<p>Perte ou altération de la perception de la position relative des différentes parties du corps et des articulations.</p>
<p><b>Altération de la sensibilité vibratoire : Occasionnel (5-29%)</b></p>	<p>Diminution de la capacité à percevoir les vibrations (testé à l'aide d'un diapason qui vibre à 128 Hz et qui est appliqué sur des proéminences osseuses telles que les malléoles des chevilles ou les articulations métacarpo-phalangiennes).</p>
<p><b>Dysarthrie : Occasionnel (5-29%)</b></p>	<p>Trouble neurologique affectant la parole caractérisée par une mauvaise articulation, d'origine centrale et périphérique (nerfs crâniens)</p>
<p><b>Signe de Babinsky : Occasionnel (5-29%)</b></p>	<p>Extension dorsale du gros orteil en réponse à une stimulation de la plante du pied. Si le signe de Babinski est présent, il peut indiquer une atteinte du tractus corticospinal.</p>
<p><b>Signe de Romberg : Occasionnel (5-29%)</b></p>	<p>Le patient se tient debout les yeux fermés. Une perte d'équilibre est un signe de Romberg positif et est interprété comme indiquant un déficit de proprioception.</p>
<p><b>Pes cavus : Occasionnel (5-29%)</b></p>	<p>Voûte plantaire archée</p>
<p><b>Augmentation du polygone de sustentation : Occasionnel (5-29%)</b></p>	<p>Démarche anormale avec les pieds très écartés. Il s'agit souvent d'une composante de l'ataxie cérébelleuse.</p>
<p><b>Myopathie : Occasionnel (5-29%)</b></p>	<p>Fragilité musculaire non liée à une atteinte de l'innervation ou de la jonction neuromusculaire.</p>

	
<b>Temps de prothrombine prolongé : Occasionnel (5-29%)</b>	Perte de l'activité de la prothrombine
	
<b>Ostéopénie : Occasionnel (5-29%)</b>	Diminution de la densité osseuse
	
<b>Cécité : Rare (&lt; 1-4%)</b>	Perception visuelle en deçà d'une acuité de 1/20 pour le meilleur œil malgré le port d'une correction visuelle et/ou un champ visuel dont le rayon ne dépasse pas 10 degrés autour de la fixation centrale.
	
<b>Ulcère cornéen : Rare (&lt; 1-4%)</b>	Lésion en creux de la couche épithéliale de la cornée avec atteinte du stroma sous-jacent.
	
<b>Kérato-conjonctivite sèche (ou xérophtalmie) : Rare (&lt; 1-4%)</b>	Dessèchement chronique bilatéral de la conjonctive et de la cornée due à une altération qualitative ou quantitative du film lacrymal.
	
<b>Ophtalmoplégie : Rare (&lt; 1-4%)</b>	Paralyse d'un ou plusieurs muscles extra-oculaires
	
<b>Fibrose hépatique : Rare (&lt; 1-4%)</b>	Accumulation de tissus cicatriciels (constituants de la matrice extracellulaire) dans le parenchyme hépatique pouvant aboutir à la cirrhose.
	
<b>Cirrhose : Rare (&lt; 1-4%)</b>	Inflammation chronique du foie qui entraîne la destruction des cellules hépatiques et leur régénération anarchique, sous forme de nodules, et une perte de fonction de l'organe.
	



**Cardiomégalie : Rare (< 1-4%)**



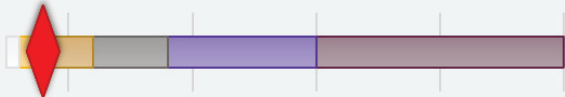
Augmentation du diamètre transversal cardiaque au-delà de 50 % du diamètre transversal du thorax (index cardiothoracique supérieur à 0,5 ou 0,55).

**Insuffisance cardiaque congestive : Rare (< 1-4%)**



Anomalie de la fonction cardiaque souvent liée à un défaut de contraction du myocarde.

**Troubles de la coagulation : Rare (< 1-4%)**



Présence de saignements anormaux

**Insuffisance respiratoire : Rare (< 1-4%)**



**Hypothyroïdisme : Rare (< 1-4%)**

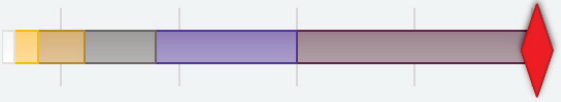

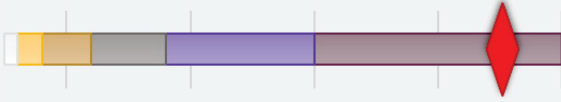
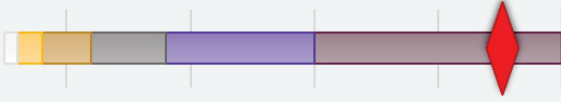
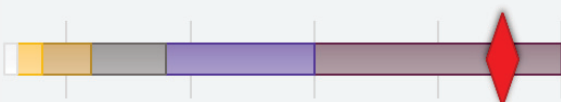
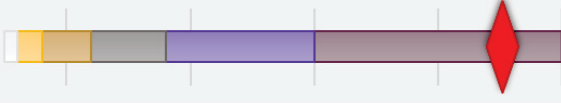



Déficit en hormones thyroïdiennes.

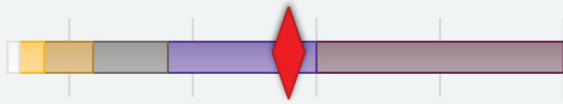
**3. Annexe 3. Principales mutations de *SAR1B* publiées et leurs conséquences sur la protéine Sar1b-GTPase d'après une revue de la littérature.**

<b>Exon/Intron</b>	<b>Mutation</b>	<b>Nom variant</b>	<b>du</b>	<b>Conséquences sur la protéine (si elle a été décrite)</b>
<b>E1</b>	c.32G>A	p.11D		Mutation dans le domaine N- terminal d'interaction avec Sec12
<b>E2</b>	c.83_84delTG	p.L28RfsX34		Décalage du cadre de lecture. Protéine de 34 AA
<b>E2</b>	c.92T>C	p.L31P		Mutation faux-sens
<b>E2</b>	c.109G>A	p.G37R		Pas d'affinité pour GDP/GTP
<b>E2</b>	c.142delG	p.D48TfsX17		Décalage du cadre de lecture. Protéine tronquée de 64 AA
<b>E2</b>	c.184G>A	p.E62K		Effet délétère sur la fonction de la protéine
<b>E3</b>	c.349-1G>C	p.S117K160del		Modification de la structure secondaire
<b>E3</b>	c.364G>C	p.E122X		Protéine tronquée de 76 AA
<b>E3</b>	c.409G>A	p.D137N		Mutation faux-sens. Affinité réduite pour GDP/GTP
<b>E4</b>	c.499G>T	p.E167X		Protéine tronquée de 166 AA
<b>E4</b>	c.536G>T	p.S179I		Pas d'affinité pour GDP/GTP
<b>E4</b>	c.537T>A	p.S179R		Pas d'affinité pour GDP/GTP
<b>E4</b>	c.542T>C	p.L181P		Pas d'affinité pour GDP/GTP
<b>E4</b>	c.554G>T	p.G185V		Affinité réduite pour la membrane du RE
<b>E4</b>	c.555-558dupTTAC	p.G187fsX199		Affinité réduite pour la membrane du RE
<b>E4</b>	c.555-558dupTTAC	p.G187fsX199		Affinité réduite pour la membrane du RE
<b>E14</b>	c.224A>G	p.D75G		Mutation dans le site d'hydrolyse du GTP
	c.1-4482_581406del5946ins15pb	+	p.M1_H43del	Protéine à laquelle il manque le site actif d'hydrolyse du GTP

4. Annexe 4. Tableau présentant les principaux symptômes de la FHBL-SD3 et leurs fréquences d'après une revue de la littérature.

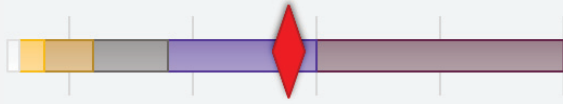
Fréquence des symptômes	Description
<p><b>Diarrhée : Caractéristique (100%)</b></p> 	
<p><b>Malabsorption intestinale des graisses : Caractéristique (100%)</b></p> 	<p>Anomalie de l'absorption des graisses au niveau du tractus gastro-intestinal.</p>
<p><b>Stéatorrhée : Très fréquent (80-99%)</b></p> 	<p>Quantité élevée de graisse dans les selles, résultat d'une mauvaise absorption des lipides dans l'intestin.</p>
<p><b>Vomissements : Très fréquent (80-99%)</b></p> 	
<p><b>Élévation des transaminases hépatiques : Très fréquent (80-99%)</b></p> 	<p>Élévation des taux sériques d'alanine aminotransférase (ALAT) et d'aspartate aminotransférase (ASAT), témoins des lésions hépatiques.</p>
<p><b>Rétinopathie : Très fréquent (80-99%)</b></p> 	<p>Atteinte non inflammatoire de la rétine sous forme de dégénérescence de l'épithélium pigmentaire.</p>
<p><b>Augmentation des gouttelettes lipidiques hépatocellulaires : Fréquent (30-79%)</b></p> 	<p>Augmentation anormale de la quantité de gouttelettes lipidiques intracellulaires dans les hépatocytes.</p>

**Retard de croissance et du développement : Fréquent (30-79%)**

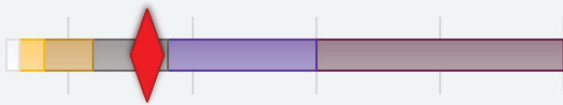


Retard pré- et post-natal avec poids et tailles inférieurs à la normale.

**Distension abdominale : Fréquent (30-79%)**

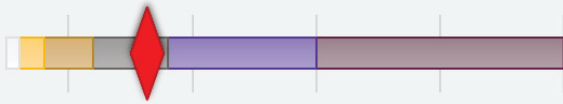


**Perte de la vision : Occasionnel (5-29%)**



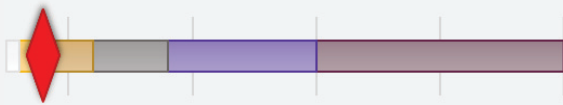
Déficiência visuelle pouvant entraîner une limitation importante du champ visuel et de la capacité visuelle.

**Stéatose hépatique : Occasionnel (5-29%)**



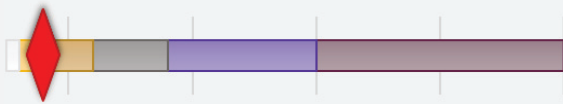
Résultat de l'accumulation de lipides dans les hépatocytes.

**Myopathie : Rare (< 1-4%)**



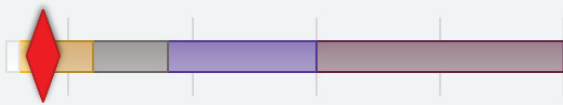
Fragilité musculaire non liée à une atteinte de l'innervation ou de la jonction neuromusculaire.

**Acanthocytose : Rare (< 1-4%)**



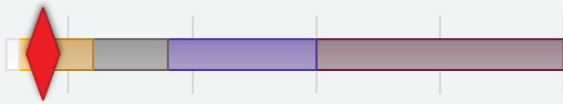
L'acanthocytose est un type de poïkilocytose (présence dans le sang de globules rouges déformés) caractérisé par des érythrocytes rigides en forme d'étoile hérissés d'épines à la surface des cellules.

**Aréflexie : Rare (< 1-4%)**



Absence de réflexes neurologiques (tel que le réflexe du genou).

**Altération de la proprioception : Rare (< 1-4%)**



Perte ou altération de la perception de la position relative des différentes parties du corps et des articulations.

## 5. Annexe 5. Bilans vitaminiques plasmatiques des cas de FHBL recensés dans la littérature.

Référence	Pathologie	Vitamine A	Vitamine E	Vitamine D	Carotènes
(Kayden et al. 1965)	FHBL-SD1	/	Indéetectable	/	10 µg/100 ml [N : 20 – 100]
(Yuill et al. 1976)	FHBL-SD1	/	130 µg/100ml [N : 520 – 1140]	/	/
(Delpre et al. 1978)	FHBL-SD1	/	0,16 mg/100 ml [N : 0,83 – 1,54]	/	11 µg/100 ml [N : 50 – 200]
(Illingworth et al. 1980)	FHBL-SD1	Cas 1 : 175 UI Cas 2 : 40 UI [N : 65 – 275]	Cas 1 : 1 – 2 µg/ml Cas 2 : 1,1 µg/ml [N : 5 – 30]	/	Cas 1 : 5 – 8 µg/dl Cas 2 : 4 µg/dl [N : 50 – 300]
(Akamatsu et al. 1983)	FHBL-SD1	135 UI [N : Non indiqué]	4,2 µg/ml [N : Non indiqué]	37 ng/ml [N : Non indiqué]	/
(Hegele, Angel 1985)	FHBL-SD1	/	0,14 µmol/L [N : 11,6 – 46,4]	/	/
(MacGilchrist et al. 1988) (2 patients)	FHBL-SD1	Cas 1 : 0,21 µmol/L Cas 2 : 1 µmol/L [N : Non indiqué]	Cas 1 : 0,9 µmol/L Cas 2 : indéetectable [N : Non indiqué]	/	/
(Keidar et al. 1990)	FHBL-SD1	/	0,1 mol/L [N : 1,2 – 3,8]	/	/
	FHBL-SD1	55 UI/dl [N : 65 – 275]	0,7 µg/ml [N : 5 – 20]	/	/
(Gorin et al. 1994)		< 10 µg/ml [N : 30 – 95]	2 µg/ml [N : 5 – 20]		19 µg/ml [N : 5 – 20]
(Ohashi et al. 2000)	FHBL-SD1	< 2,4 µmol/L [N : 11 – 35]	/	/	/
(Chowers et al. 2001) (13 patients)	FHBL-SD1 et FHBL-SD2	/	Entre 0,03 et 0,35 mg/100ml [N : 0,5 – 1] <i>Malgré une supplémentation instaurée</i>	/	β-carotène : entre 15 et 151 mg/100ml [N : 20 – 500]

<b>(Sakamoto et al. 2006)</b>	FHBL-SD1	/		0,43 mg/dl [N : 0,75 – 1,41]	/	/
<b>(Zamel et al. 2008)</b>	FHBL-SD1	/		< 5 µmol/L [N : 18 – 29]	/	/
<b>(Chardon et al. 2009)</b>	FHBL-SD1	/		Cas 1 : < 2,30 µmol/L Cas 2 : < 2,30 µmol/L Cas 3 : < 2,30 µmol/L Cas 4 : < 2,30 µmol/L [N : 18 – 28]	/	/
<b>(Najah et al. 2009)</b>	FHBL-SD1		Cas 1 : / Cas 2 : 0,31 µmol/ml [N : Non indiqué]	Cas 1 : < 1 µmol/ml Cas 2 : < 1 µmol/ml [N : Non indiqué]		
<b>(Pons et al. 2011)</b>	FHBL-SD1	/		Cas 1 : 0.41 mg/L Cas 2 : 0.16 mg/L [N : 6 – 15]	/	/
<b>(Di Filippo et al. 2012)</b>	FHBL-SD1	/		9,9 µmol/L [N : 11 – 35]	/	/
<b>(Papadogeorgou et al. 2012)</b> <i>(2 patients)</i>	FHBL-SD3		Cas 1 : 0,94 µmol/L Cas 2 : 0,35 µmol/L [N : 0,7 – 1,4]	Cas 1 : 2,6 µmol/L Cas 2 : 3,7 µmol/L [N : 4,6 – 14]	Cas 1 : 42,5 nmol/L Cas 2 : / [N : > 50]	/
<b>(Mammis et al. 2012)</b>	FHBL-SD1	/		1,8 µmol/L [N : 5,5 – 18]	/	/
<b>(Desaldeleer et al. 2013)</b>	FHBL-SD1	/		2,5 µmol/L [N : Non indiqué]	/	/
<b>(Najah et al. 2013)</b>	FHBL-SD1		430 µg/l [N : 444 – 945]	< 1 µmol/l [N : 16 – 35]	/	/
<b>(Hammer et al. 2014)</b>	FHBL-SD1		Cas 1 : 10 µg/dl Cas 2 : 19 µg/dl Cas 3 : 20 µg/dl Cas 4 : 17 µg/dl [N : 30 – 70]	Cas 1 : < 50 µg/dl Cas 2 : 152 µg/dl Cas 3 : < 50 µg/dl Cas 4 : 130 µg/dl [N : 700 – 1500]	/	/

<b>(Mouzaki et al. 2014)</b>	FHBL-SD1	/	2,5 mmol/L [N : 5 – 14]	49 nmol/L [N : 70 – 250]	/
<b>(Nagappa et al. 2014)</b>	FHBL-SD1	< 0,3 mg/l [N : 5 – 18]	5,24 ng/ml [N : > 10]	/	/
<b>(Desomer et al. 2015)</b>	FHBL-SD1	< 12 µg/dl [N : 30 – 80]	< 0,30 mg/dl [N : 0,5 – 1,8]	Normal	
<b>(Walsh et al. 2015)</b>	FHBL-SD1	/	< 0,1 µg/ml [N : 3 – 9]	8,3 ng/ml [N : 30 – 70]	< 20 ng/ml [N : 200 – 700]
<b>(Paquette et al. 2016)</b>	FHBL-SD1	2,97 mmol/L [N : 1,05 – 2,97]	8,9 mmol/L [N : 13,9 – 47]	389 nmol/L [N : 35 – 150]	/
<b>(Gündüz et al. 2016)</b> <i>(3 patients)</i>	FHBL-SD1	Cas 1 : / Cas 2 : / Cas 3 : 55 ng/dL [N : Non indiqué]	Cas 1 : 0,37 µg/ml Cas 2 : 1,8 µg/ml Cas 3 : < 1 µg/ml [N : Non indiqué]	Cas 1 : 0,37 µg/ml Cas 2 : normal Cas 3 : < 1 µg/ml [N : Non indiqué]	Cas 1 : < 20 ng/ml Cas 2 : normal Cas 3 : < 20 ng/ml [N : 150 – 1250]
<b>(Walsh et al. 2016)</b>	FHBL-SD1	Cas 1 : 11,6 µg/dl Cas 2 : / [N : 30 – 65]	Cas 1 : 0,7 mg/dl Cas 2 : :6,7 mg/dl [N : 3 – 9]	Cas 1 : 7,2 ng/dl Cas 2 : / [N : 30 – 70]	Cas 1 : 20,5 ng/ml Cas 2 : 110 ng/ml [N : 200 – 700]
<b>(Acar 2020)</b>	FHBL-SD1	71 µg/L [N : 316 – 820]	0,87 mg/L [N : 6,6 – 14,3]	11,6 mg/L [N : > 30]	/
<b>(Scott et al. 1979)</b>	FHBL-SD2	0,6 mmol/L [N : > 1,05]	6 µmol/L (N : > 12,2) <i>Patient supplémenté</i>	4,6 ng/ml [N : 3,5 – 30]	0,076 mmol/L [N : > 0 74]
<b>(Scoazec et al. 1992)</b>	FHBL-SD2	550 mg/l [N : 800 – 3000]	0,5 mg/L [N : 9 – 15]	/	/
<b>(Treepongkaruna et al. 2009)</b>	FHBL-SD3	15,7 µg/dl [N : 20 – 50]	/	89,8 µg/dl [N : 650 – 1200]	/
<b>(Cefalù et al. 2010)</b>	FHBL-SD3	/	0,5 µg/ml [N : 5 – 16]	/	5,1 pg/ml [N : 19,9 – 67]
<b>(Okada et al. 2011)</b>	FHBL-SD3	/	6,6 mg/L [N : 7,5 – 14,1]	/	/
<b>(Gangloff et al. 2011)</b> <i>(3 patients)</i>	FHBL-SD2	6 mg/dl ; 21 mg/dL ; 26 mg/dL [N : 20 – 98]	0,4 mg/L ; 0,9 mg/L ; 0,4 mg/L [N : 6 – 18]	42 ng/ml ; 34 ng/mL ; 27 ng/mL [N : 32 – 100]	/

<b>(Ouguerram et al. 2012)</b>	FHBL-SD3	/	/	< 1 µmol/L	/
<b>(Papadogeorgou et al. 2012)</b> <i>(2 patients)</i>	FHBL-SD3	Cas 1 : 0,94 µmol/L Cas 2 : 0,35 µmol/L [N : 0,7 – 1,4]	Cas 1 : 2,6 µmol/L Cas 2 : 3,7 µmol/L [N : 4,6 – 14]	Cas 1 : 42,5 nmol/L Cas 2 : / [N : > 50]	/
<b>(Ben Ameur et al. 2016)</b>	FHBL-SD3	/	2 mmol/L [N : 5 – 14]	60 nmol/L [N : 70 – 250]	/
<b>(Ferreira et al. 2018)</b>	FHBL-SD3	1,28 µmol/L [N : Non indiqué]	6,7 µmol/L [N : Non indiqué]	13,9 pmol/L [N : Non indiqué]	/
<b>(Simone et al. 2019)</b> <i>(2 patients)</i>	FHBL-SD3	Cas 1 : 217 µg/L Cas 2 : 288,9 µg/L [N : 316 – 820]	Cas 1 : 0,12 mg/L Cas 2 : 1,73 mg/L [N : 6,6 – 14,3]	Cas 1 : 7,5 mg/L Cas 2 : 4,4 mg/L [N : 30 – 50]	/
<b>(Kumar et al. 2020)</b>	FHBL-SD3	155 µg/L [N : 194 – 421]	1,98 mg/L [N : 3,02 – 9,05]	43,7 nmol/L [N : 52 – 250]	/
<b>(Doya et al. 2021)</b>	FHBL-SD3	0,3 mg/L [N : 0,3 – 0,9]	1,9 mg/L [N : 9 – 21]	11,6 µg/L [N : > 30]	/



## 6. Annexe 6. Etudes interventionnelles évaluant l'effet antioxydant des caroténoïdes d'après une revue de la littérature.

Etudes interventionnelles avec des aliments complets				
Design	Nb de sujets	Caroténoïdes étudié	Résultat principal	Reference
68 g d'avocat en une fois	11 sujets	Non précisé	La consommation d'avocat a diminué la sécrétion plasmatique d'IL-6 et l'activation de NF- $\kappa$ B	(Li et al. 2013)
Fruits et légumes pendant 12 ans	73286 femmes	$\alpha$ - et $\beta$ -carotène, lycopène, lutéine, zéaxanthine et $\beta$ -cryptoxanthine	Relation inverse entre la consommation d'aliments riches en caroténoïdes et la survenue de maladies cardiovasculaires	(Osganian et al. 2003)
Aliments riches en caroténoïdes (essentiellement à base de carotte et de tomate) pendant 15 ans	559 hommes	$\alpha$ - et $\beta$ -carotène, lycopène	Les aliments riches en caroténoïdes ont diminué le risque de maladies cardiovasculaires	(Buijsse et al. 2008)
Aliments riches en caroténoïdes pendant 7 à 16 ans	399 765 sujets	$\alpha$ - et $\beta$ -carotène, lycopène, lutéine, zéaxanthine et $\beta$ -cryptoxanthine	La consommation d'aliments riches en caroténoïdes est inversement associée au risque de cancer du poumon	(Männistö et al. 2004)
Consommation de fruits et légumes	521 468 sujets	Non précisé	Effet protecteur de la consommation de fruits sur le risque de cancer du poumon	(Wu et al. 2003)
Consommation de fruits et légumes	4412 sujets	$\alpha$ - et $\beta$ -carotène, lycopène, lutéine, zéaxanthine et $\beta$ -cryptoxanthine	Diminution du risque d'hypertension artérielle à 20 ans	(Hozawa et al. 2009)
Jus de tomate (330 ml/jr semaines 3 et 4) puis jus de carotte (330 ml/jr semaines 5 et 6) puis smoothie aux épinards (10 g/jr d'épinards	23 hommes	Lycopène	Reduction de l'oxydation de l'ADN dans les lymphocytes	(Pool-Zobel et al. 1997)

### Etudes interventionnelles avec des compléments alimentaires

β-carotène (20 mg/jr) et vitamine E (20 mg/jr) pendant 8 ans	29 133 sujets fumeurs et non- fumeurs	β-carotène	Augmentation du risque de cancer du poumon chez les fumeurs	(Albanes et al. 1996)
β-carotène (30 mg/jr) et rétinyle palmitate (25000 UI/jr) pendant 5 ans	18 314 sujets fumeurs et non- fumeurs	β-carotène	Augmentation du risque de cancer du poumon chez les fumeurs	(Omenn et al. 1996)
β-carotène (20 mg/jr) et vitamine E (50 mg/jr) pendant 6 ans	28 519 hommes	β-carotène	Augmentation du risque d'hémorragie cérébrale chez les fumeurs	(Leppälä et al. 2000)
β-carotène (6 mg/jr), vitamine E (30 mg/jr), vitamine C (120 mg/jr) et sélénium + zinc (100 µg/jr + 20 mg/jr) pendant 7,5 ans	13 017 sujets	β-carotène	Diminution de l'incidence de cancer et de la mortalité toutes causes confondues	(Hercberg et al. 2004)
β-carotène (15 mg/jr), vitamine E (30 mg/jr), et sélénium (100 µg/jr) pendant 5 ans	30 000 sujets	β-carotène	Diminution de la mortalité toutes causes confondues et de la mortalité liée aux cancers	(Blot et al. 1995)
Alimentation riche en caroténoïdes, vitamines et minéraux	4447 sujets	α- et β-carotène, lycopène, lutéine, zéaxanthine et β-cryptoxanthine	Une association inverse entre consommation de caroténoïdes et augmentation du taux d'HbA1c a été observée chez les personnes n'ayant jamais fumé mais pas chez les (anciens) fumeurs.	(Schwab et al. 2015)

7. **Annexe 7. Etudes observationnelles** sur le lien entre les apports en caroténoïdes et la fonction ophtalmique d'après une revue de la littérature.

Étude (année)	Conception de l'étude	Critères de jugement	Résultats
<i>(Jacques et al. 1988)</i>	Observationnelle 112 participants âgés de 40 à 70 ans sans cataracte.	État nutritionnel déterminé par les taux plasmatiques en nutriments. Risque de cataracte.	Diminution du risque de cataracte chez les sujets présentant des taux de caroténoïdes modérés et élevés.
<i>The National Health and Nutritional Examination Survey (NHANES)</i> <i>(Goldberg et al. 1988)</i>	3 082 personnes âgées ≥ 45 ans.	État nutritionnel. Prévalence de DMLA.	Association négative entre la prévalence de la DMLA et la fréquence de consommation de fruits et légumes riches en vitamine A.
<i>(Jacques, Chylack Jr 1991)</i>	Observation 112 participants avec (77) ou sans (35) cataracte.	Taux plasmatiques en caroténoïdes. Risque de cataracte.	Le risque de développer une cataracte chez les personnes ayant des taux plasmatiques en caroténoïdes faibles (inférieurs au 20e percentile) et modérés (du 20e au 80e centile) était plus de cinq fois plus élevé que chez les personnes ayant des concentrations plasmatiques en caroténoïdes élevées.
<i>The multicenter Eye Disease Case-Control Study (EDCC)</i> <i>(Seddon et al. 1994)</i>	Étude cas-témoins multicentrique. 876 participants atteints de DMLA avancée (356) ou d'une autre maladie oculaire (520), âgés de 55 à 80 ans.	Apport en caroténoïdes évalué par un questionnaire sur la fréquence des aliments. Prévalence de la DMLA.	Les sujets ayant un apport élevé en caroténoïdes ont un risque de DMLA inférieur de 43% par rapport à ceux ayant un apport inférieur. De plus, l'apport élevé en L et Z, provenant de légumes à feuilles vert foncé, était plus fortement associé à un risque réduit de DMLA.
<i>Beaver Dam Eye Study</i> <i>(VandenLangenberg et al. 1998)</i>	Etude en population. 4 926 participants âgés de ≥ 43 ans.	Consommation de L, Z, lycopène et α et β-carotène. Développement de drusen.	Association inverse significative entre les apports alimentaires en caroténoïdes pro-vitamine A (et vitamine E) et l'incidence de gros drusen, et entre le zinc et l'incidence d'anomalies pigmentaires.

<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i> (Klein et al. 1999)	Etude transversale. 8 222 participants âgés ≥ 40 ans.	Taux plasmatiques en L, Z et autres caroténoïdes. Incidence d'anomalies pigmentaires et de progression de DMLA précoce vers une DMLA tardive.	Association inverse entre les niveaux de L et Z et le risque d'anomalies pigmentaires et de DMLA tardive.
<i>(Snellen et al. 2002)</i>	Etude cas-témoin. 138 participants atteints de DMLA (72) ou d'aucune affection oculaire (66), âgés ≥ 60 ans.	Apports nutritionnels en L, Z et autres antioxydants. Prévalence de DMLA néovasculaire.	La prévalence de DMLA chez les patients ayant un faible apport en antioxydants et un faible apport en L était environ deux fois plus élevé que chez les patients ayant un apport élevé.
<i>(Gale et al. 2003)</i>	Etude transversale. 380 participants âgés de 66 à 75 ans.	Taux sériques en L et Z. Risque de DMLA évalué par le « Wisconsin Age-Related Maculopathy Grading System ».	Le risque de DMLA (précoce ou tardive) était deux fois plus élevé chez les personnes ayant des concentrations plasmatiques plus faibles en Z.
<i>Pathologies Oculaires Liées à l'Age (POLA) Study</i> (Delcourt et al. 2006)	Étude prospective en population. 899 participants âgés de ≥ 60 ans.	Taux plasmatiques en caroténoïdes. Prévalence de DMLA tardive et/ou de drusens associés à des anomalies pigmentaires. Prévalence d'opacités des lentilles.	Un taux plasmatique en Z élevé était significativement associé à un risque réduit de DMLA. La DMLA était également significativement associée à la combinaison de plasma L et Z. La cataracte n'a montré aucune association de ce type.
<i>The Carotenoids in Age-Related Eye Disease Study (CARED)</i> (Moeller et al. 2006)	Etude en population. 1 787 femmes âgées de 50 à 79 ans.	Consommation (questionnaire) et taux plasmatiques en L, Z, β-car, ω-3, et autres antioxydants. Prévalence de DMLA.	Pas de différence significative entre la prévalence de DMLA chez les sujets ayant un apport élevé ou faible en L et Z. Cependant, un risque réduit de DMLA a été observé chez les femmes de moins de 75 ans, avec un apport stable de L et Z (sans antécédents de maladies chroniques).
<i>The Blue Mountains</i>	Étude de cohorte	Apport de L, Z,	Un apport alimentaire plus

---

<i>Eye Study (BMES)</i> <i>(Tan et al. 2008)</i>	prospective. 2 454 participants australiens âgés de ≥ 49 ans, réexaminés après 5 ans, 10 ans ou les deux	lycopène, α et β-car et antioxydants. Incidence de DMLA sur 10 ans.	élevé en L et Z a réduit le risque d'incidence à long terme de DMLA.
---	---	--	--

---

## 8. Annexe 8. Etudes interventionnelles de l'impact d'une supplémentation en caroténoïdes sur la fonction ophtalmique d'après une revue de la littérature

Etude (année)	Conception de l'étude	Intervention et Supplémentation (par jour)	Résultats
(Richer 1999)	Etude cas-témoin 14 hommes âgés de $\geq 60$ ans avec DMLA 2 groupes : G1 (11), G2 (3)	G1 : 0,73 +/- 0,45 portions de légumes vert par jour, avec une portion supplémentaire d'épinards (5 oz) 4 à 7 fois par semaine. G2 : Antioxydant à base de L	Les deux groupes de patients ont démontré des effets positifs à court terme sur la fonction visuelle, avec des améliorations selon la grille d'Amsler (87%), de l'AV selon l'échelle de Snellen (71%), de la SC (92%), de la SE (69%) et une amélioration de la vision au cours des activités quotidiennes (60%). Cependant aucune corrélation évidente entre l'aspect ophtalmoscopique de la rétine et l'amélioration visuelle n'a été rapportée.
(Massacesi 2001)	Essai contrôlé randomisé 50 participants atteints de DMLA précoce	L 15 mg	Après 18 mois, amélioration de l'AV.
(Olmedilla et al. 2001)	Etude cas-témoin 10 participants âgés de $\geq 55$ ans atteints de cataracte (G1, n = 5) ou de DMLA (G2, n = 55)	G1 + G2 : L 15 mg	Après 13 mois, la supplémentation en L a significativement augmenté les taux sériques de L et a été associée à une amélioration de l'AV et de la SE chez les patients atteints de cataracte et de DMLA, indépendamment de la progression de la maladie.
Age-Related Eye Disease Study (AREDS) Cataract report (Age-Related Eye Disease Study Research, 2001a)	Essai contrôlé randomisé 4 629 participants atteints de DMLA ou de cataracte dans au moins un œil ; âgés de 55 à 80 ans. 4 groupes : G1 (853), G2 (869), G3 (1 451), G4 (1 456).	G1 : 15 mg $\beta$ -carotène + autres antioxydants (sans L ou Z). G2 : Zinc + Cuivre. G3 : Antioxydants. G4 : Placebo	Aucun effet statistiquement significatif des antioxydants n'a été observé sur le développement ou la progression de l'opacité du cristallin liées à l'âge. Il n'y avait pas non plus d'effet statistiquement significatif sur la réduction du risque de progression de la cataracte ou pour la chirurgie de la cataracte. La formulation AREDS n'a eu aucun effet apparent sur le risque à 7 ans de développement ou de progression de la cataracte liée à l'âge ou de la perte

			d'acuité visuelle.
<i>Lutein and Antioxidant Supplementation Trial (LAST)</i> (Richer et al. 2004)	Essai contrôlé randomisé 90 participants atteints de DMLA atrophique ; âgés de ≥ 70 ans. 3 groupes : G1 (29), G2 (30), G3 (31).	G1 : L 10 mg. G2 : L 10 mg + antioxydants + vitamines + minéraux. G3 : Placebo.	Après un an, amélioration de l'AV selon Snellen, de la DOPM, de la SC dans les groupes G1 et G2. Aucun changement significatif n'a été observé dans le groupe G3.
<i>(Rosenthal et al. 2006)</i>	Etude interventionnelle 45 participants avec ou sans drusen mineur (15), avec grand drusen (15) ou avec une DMLA avancée (15) ; âgés de ≥ 60 ans. 3 groupes : G1 (15), G2 (15), G3 (15).	G1 : L 2.5 mg G2 : L 5 mg G3 : L 10 mg	Après six mois, augmentation des taux sériques de L dans les 3 groupes, indépendamment de la gravité de la pathologie oculaire, mais aucun changement significatif n'a été détecté dans l'AV.
<i>The Taurine, Omega-3 Fatty Acids, Zinc, Antioxidant, Lutein (TOZAL) study</i> (Cangemi 2007)	Etude interventionnelle 37 participants ayant au moins un œil diagnostiqué avec une DMLA atrophique ; âgés de ≥ 70 ans.	L 8 mg + Z 400 µg + Taurine 400 mg + Vitamine A 10 000 UI + β-carotène 18 640 UI	Après six mois, les patients ont présenté une amélioration significative de l'AV.
<i>Carotenoids and co-antioxidants in age-related maculopathy (CARMA) study</i> (Neelam et al. 2008) (Beatty et al. 2013)	Essai contrôlé randomisé. 433 participants âgés de ≥ 55 ans, atteints de DMLA. 2 groupes : G1 (216), G2 (217).	G1 : Formulation AREDS. G2 : Placebo.	À 24 mois, un écart entre l'augmentation dans les taux sériques en L a été observé entre les deux groupes. Le DOPM a diminué régulièrement au fil du temps dans G2, tandis qu'une augmentation a été observée dans G1. Mais aucun changement dans la SC n'a été observé dans les deux groupes.
<i>Carotenoids and Antioxidants in Age-Related Maculopathy</i>	Essai contrôlé randomisé. 27 participants atteints de DMLA	G1 : L 10 mg + Z 1 mg + astaxanthine 4 mg.	Après 12 mois, une augmentation significative la réponse locale de la rétine interne (évaluée par ERGmf) a été observée dans la rétine centrale de G1, mais pas dans G2. Aucun effet

<i>Italian Study (CARMIS)</i> <i>(Parisi et al. 2008)</i>	non avancée ; âgés de ≥ 60 ans.  2 groupes : G1 (15), G2 (12).	G2 : Placebo.	significatif n'a été observé dans la rétine périphérique dans les deux groupes.
<i>Lutein Intervention Study Austria (LISA)</i> <i>(Weigert et al. 2011)</i>	Essai contrôlé randomisé.  126 participants atteints de DMLA ; âgés de ≥ 60 ans.  2 groupes : G1 (84), G2 (42).	G1 : L 20 mg pendant 3 mois, puis L 10 mg pendant 3 mois.  G2 : Placebo.	Après six mois, la supplémentation en L a considérablement augmenté la DOPM. Aucun effet significatif n'a été observé sur la fonction maculaire (évaluée par micropérimétrie) ou l'AV.
<i>The Zeaxanthin and Visual Function Study (ZVF)</i> <i>(Richer et al. 2011)</i>	Essai contrôlé randomisé  60 participants atteints de DMLA précoce et modérée ; âgés de ≥ 60 ans.  3 groupes : G1 (10), G2 (25), G3 (25).	G1 : L 9 mg ("Faux Placebo").  G2 : Z 8 mg.  G3 : L 9 mg + Z 8 mg.	Après un an, MPOD a augmenté dans les trois groupes. La sensibilité au contraste élevé a augmenté dans les trois groupes, mais était plus élevée dans G2, tandis que la sensibilité à faible contraste s'est améliorée dans G1 et G3, mais pas dans G2.
<i>(Sasamoto et al. 2011)</i>	Essai d'intervention.  43 participants japonais atteints de DMLA (33), de chorioretinopathie séreuse centrale (5), ou sans affection oculaire (5) ; âgés de ≥ 40 ans.	L 6 mg	Après un an, aucun effet sur la DOPM n'a été observé, mais les sujets ont présenté une amélioration significative de la SC et de la sensibilité rétinienne.
<i>(Ma et al. 2012)</i>	Essai contrôlé randomisé.  108 participants atteints de DMLA précoce ; âgés de 50 à 79 ans.  4 groupes : G1 (27), G2 (27), G3 (27), G4 (27) + Groupe de témoins sains (36).	G1 : Placebo  G2 : L10 mg  G3 : L20 mg  G4 : L10 mg + Z 10 mg	Après 48 semaines, la DOPM a augmenté dans G2, G3 et G4. À la semaine 48, des augmentations significatives de la SC ont été observées pour tous les groupes de traitement actif, et il y avait une différence significative entre le groupe G3 et le groupe placebo.



<i>Combination of L Effects in the Aging Retina (CLEAR) study (Murray et al. 2013)</i>	Essai contrôlé randomisé. 72 participants atteints de DMLA précoce ; âgés de ≥ 60 ans. 2 groupes : G1 (36), G2 (36).	G1 : L 10 mg G2 : Placebo	Après 12 mois, une augmentation significative de la DOPM a été observée chez G1. Aucune amélioration de l'AV n'a été observée chez G1, mais l'AV a diminué chez G2.
<i>Long Term Effects of L/Z and ω-3 Supplementation on Optical Density of AMD Patients (LUTEGA) (Dawczynski et al. 2013)</i>	Essai contrôlé randomisé. 145 participants atteints de DMLA non exsudative. 3 groupes : G1 (50), G2 (55), G3 (40).	G1 : L 10 mg + Z 1 mg + DHA 100 mg + EPA 30 mg. G2 : L 20 mg + Z 2 mg + DHA 200 mg + EPA 60 mg. G3 : Placebo.	Après 12 mois, amélioration de la DOPM et de la MAVC dans G1 et G2.
<i>Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS 2) (Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) Research 2013)</i>	Essai contrôlé randomisé. 4 203 participants atteints de DMLA intermédiaire dans les deux yeux ou de DMLA intermédiaire dans un œil et de DMLA avancée dans l'autre œil. 4 groupes : G1 (1 007), G2 (1 038), G3 (1 062), G4 (1 069).	G1 : AREDS formulation. G2 : AREDS + L 10 mg + Z 2 mg. G3 : AREDS + DHA 350 mg + EPA 650 mg. G4 : AREDS + L 10 mg + Z 2 mg + DHA 350 mg + EPA 650 mg.	L'ajout d'AG ω3 ou de lutéine + zéaxanthine à la formule AREDS n'a eu aucun effet global supplémentaire sur le risque de DMLA avancée. Cependant, les participants AREDS2 ayant remplacé le β-carotène par L+Z (formule AREDS 2) ont eu une augmentation du bénéfice, par rapport à ceux qui ont pris la formule AREDS.
<i>(Berrow et al. 2013)</i>	Essai contrôlé randomisé. 14 participants atteints de DMLA. 2 groupes : G1 (8), G2 (6).	G1 : L 12 mg G2 : Placebo	Après 40 semaines, aucun effet clinique ; seulement une amélioration minime des résultats de la mfEGR.
<i>(Sabour-Pickett et al. 2014)</i>	Etude interventionnelle 52 participants atteints de DMLA. 3 groupes : G1 (17), G2 (21), G3	G1 : L 20 mg + Z 2 mg. G2 : L 10 mg + Z 2 mg + MZ 10 mg. G3 : L 3 mg + Z 2	Après un an, la DOPM a augmenté dans tous les groupes ; l'amélioration significative de la SC a été beaucoup plus efficace dans G3.

	(14).	mg + MZ 17 mg.	
(Akuffo et al. 2015)	Etude interventionnelle 67 participants atteints de DMLA. 3 groupes.	G1 : L 20 mg + Z 2 mg. G2 : L 10 mg + Z 2 mg + MZ 10 mg. G3 : L 3 mg + Z 2 mg + MZ 17 mg.	Après trois ans, tous les groupes ont montré une augmentation significative de la DOPM, mais aucun effet sur l'AV et la progression de la DMLA.
(Wolf-Schnurrbusch et al. 2015)	Etude interventionnelle 79 participants atteints de DMLA. 2 groupes : G1 (40), G2 (39).	G1 : L 10 mg + Z 1 mg. G2 : L 10 mg + Z 1 mg + DHA / EPA 130 mg.	Après six mois et un an, la DOPM et la SC ont considérablement augmenté chez G1, mais pas l'AV. Pas d'effet significatif chez G2.
(Huang, Dou, Huang, Xu, Zou, Lu, et al. 2015)	Essai contrôlé randomisé. 108 participants atteints de DMLA précoce. 4 groupes : G1 (28), G2 (26), G3 (27), G4 (27).	G1 : Placebo G2 : L 10 mg G3 : L 20 mg G4 : L 10 mg + Z 10 mg	Après 2 ans, augmentation significative de la DOPM et de la SC, mais aucun effet sur l'AV et le temps de récupération à l'éblouissement, dans tous les groupes.
(Fujimura et al. 2016)	Etude interventionnelle. 20 participants avec au moins un œil avec une DMLA humide ou une DMLA précoce.	L 20 mg + Z 1 mg + DHA 200 mg	Après six mois, augmentation significative de la DPOM et de la SC. Corrélation linéaire entre la DOPM et les concentrations sériques de L.
(Korobelnik, Rougier, Delyfer, Bron, Bénédicte MJ Merle, et al. 2017)	Etude interventionnelle. 120 participants sans pathologie oculaire. 2 groupes : G1 (60), G2 (60).	G1 : Placebo G2 : L 5 mg lutéine + Z 1 mg	Après 3 mois et 6 mois, augmentation significative de L et Z plasmatiques dans G2 par rapport à G1. Pas de différence entre les groupes dans l'évolution de la MPOD.

Légende : AV : acuité visuelle, DHA : Acide Docosahexaénoïque, EPA : Acide Eicosapentaénoïque, DOPM : Densité Optique du Pigment Maculaire, L : Lutéine, MAVC : Meilleure Acuité Visuelle Corrigée, SC : Sensibilité aux Contrastes, SE : Sensibilité à L'éblouissement, ERGmf : Electrorétinogramme Multifocal, Z : Zéaxanthine.



**9. Annexe 9. Protocole et dossier CPP étude clinique « Caractérisation de la densité du pigment maculaire chez les patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales en lien avec leur statut en caroténoïdes et anti-oxydant : Etude CaCo (CArotenoid in hypoChOlesterolemia) ».**

**Recherche impliquant la personne humaine mentionnée au 3 de l'article L.1121-1 du Code de la Santé Publique**

Promoteur : Hospices Civils de Lyon  
BP 2251  
3 quai des Célestins,  
69229 LYON cedex 02

Investigateur principal : Pr Noël PERETTI – PU-PH (GHE-HFME)

UF nutrition pédiatrique, Service hépatologie, gastroentérologie et nutrition pédiatrique

Hôpital Femme Mère Enfant de Lyon (GHE-HFME)

59, Bd Pinel 69677 BRON cedex

Tél : 04.72.35.70.50 / Fax : 04.27.85.67.66

E-mail : noel.peretti@chu-lyon.fr

Code promoteur : **69HCL21\_0720**

Numéro d'enregistrement clinicaltrials.gov : **NCT05208879**

**Avis favorable du CPP Ile de France I le : 13/01/2022**

**N°ID-RCB : 2021-A01785-36**

## LISTE DES ABREVIATIONS

ABL	Abêtalipoprotéinémie
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM	Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et des produits de santé
ARC	Attaché de Recherche Clinique
CCTIRS	Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche
CEREES	Comité d'Expertise pour les Recherches, les Etudes et les Evaluations dans le
CNIL	Commission Nationale Informatique et Liberté
CPP	Comité de Protection des Personnes
CRF	Case Report Form (cahier observation)
DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DO	Densité Optique
EI	Evénement Indésirable
EIG	Evénement Indésirable Grave
HBL	Hypobêtalipoprotéinémies
HCL	Hospices Civils de Lyon
MR	Méthodologie de Référence
TEC	Technicien d'Etude Clinique

# 1. Informations générales

## 1.1. Titre

**Caractérisation de la densité du pigment maculaire chez les patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales en lien avec leur statut en caroténoïdes et anti-oxydant.**

## 1.2. Identifiants du projet et historique des mises à jour

Code promoteur : 69HCL21\_0720

Numéro d'enregistrement clinicaltrials.gov : NCTXXXXX

Avis favorable du CPP Ile-de-France le : 13/01/2022

## 1.3. Historique des versions

Version	Date	Motif de la mise à jour
0.1	01/04/2021	Rédaction initiale
1	25/06/2021	Corrections
2	23/11/2021	Précision au CPP qu'il s'agit bien d'une RIPH3

## 1.4. Promoteur

### - Identité :

Hospices Civils de Lyon  
BP 2251  
3 Quai des Célestins  
69229 LYON Cedex 02

### - Signature du protocole au nom du Promoteur :

Dr Alexandre Pachot, Directeur de la Recherche en Santé  
Hospices Civils de Lyon, Direction de la Recherche en Santé,  
Siège Administratif, BP 2251, 3 Quai des Célestins, 69229 LYON Cedex 02  
Tél : 04 72 40 68 52, Fax : 04 72 40 68 69

- **Responsable de la recherche au niveau du Promoteur :**

**Valérie Plattner, médecin référent**

Hospices Civils de Lyon, Direction de la Recherche en Santé,  
Siège Administratif, BP 2251, 3 Quai des Célestins, 69229 LYON Cedex 02  
Tél : 04 72 40 68 40, Fax : 04 72 11 51 90

## 1.5. Investigateurs

### Investigateur principal

**Pr. Noël Peretti – PU-PH (GHE-HFME)**

Hôpital Femme Mère Enfant de Lyon (GHE-HFME)  
59, Bd Pinel 69677 BRON cedex  
Tél : 04.72.35.70.50 / Fax : 04.27.85.67.66  
E-mail : [noel.peretti@chu-lyon.fr](mailto:noel.peretti@chu-lyon.fr)

### Investigateurs associés

**Pr. Philippe Moulin – PU-PH (GHE)**

Fédération d'endocrinologie, maladies métaboliques, diabète et nutrition  
Hôpital cardiovasculaire et pneumologique Louis Pradel  
28, av Doyen Lépine 69677 BRON Cedex  
Tél : 04.72.68.13.04 / Fax : 04.72.68.13.07  
Email : [philippe.moulin@chu-lyon.fr](mailto:philippe.moulin@chu-lyon.fr)

**Dr Sybil Charriere**

Fédération d'endocrinologie, maladies métaboliques, diabète et nutrition  
Hôpital cardiovasculaire et pneumologique Louis Pradel  
28, av Doyen Lépine 69677 BRON Cedex  
Tél : 04.72.68.13.04 / Fax : 04.72.68.13.07  
Email : [sybil.charriere@chu-lyon.fr](mailto:sybil.charriere@chu-lyon.fr)

**Pr Laurent Kodjikian**

Service d'Ophtalmologie  
Hôpital de la Croix-Rousse – HCL  
103 Grande rue de la Croix Rousse 69004 Lyon  
Tél : 04.26.10.91.28  
Email : [laurent.kodjikian@chu-lyon.fr](mailto:laurent.kodjikian@chu-lyon.fr)

**Dr Sarah Verrachia**

Service d'Ophtalmologie  
Hôpital Edouard Herriot – HCL  
Pavillon C, 5 Place d'Arsonval 69003 Lyon

Tél : 04.72.11.95.13  
Email : sarah.verrecchia@chu-lyon.fr

## Scientifiques associés

### **Claire Bordat**

Équipe "LiPo"  
Laboratoire Cardiovasculaire, Métabolisme et Nutrition (CarMEN)  
INSERM U1060, INRA U1397, Université Lyon 1, INSA de Lyon  
Groupement Hospitalier Est  
59 bd. Pinel 69500 Bron  
claire.bordat@univ-lyon1.fr Email : claire.bordat@univ-lyon1.fr

### **Dr Charlotte Cuerq**

Laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites du CHU de Lyon  
Service de Biochimie et Biologie Moléculaire  
Unité Médicale Nutrition, Métabolisme  
Centre de Biologie et Pathologie Sud  
165, chemin du Grand Revoyet – Bâtiment 3D 69495 Pierre Bénite  
Tél : 04.78.86.18.01  
Email : charlotte.cuerq@chu-lyon.fr

### **Emilie Blond**

Laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites du CHU de Lyon  
Service de Biochimie et Biologie Moléculaire  
Unité Médicale Nutrition, Métabolisme  
Centre de Biologie et Pathologie Sud  
165, chemin du Grand Revoyet – Bâtiment 3D 69495 Pierre Bénite  
Tél : 04.78.86.29.72  
Email : emilie.blond@chu-lyon.fr

### **Dr Emmanuelle Reboul**

Équipe "Micronutrition Humaine"  
Centre Cardiovasculaire et Nutrition  
Faculté des Sciences Médicales et Paramédicales  
27, boulevard Jean Moulin 13385 Marseille cedex 05  
Tél : 04.91.32.42.78  
Email : [Emmanuelle.Reboul@univ-amu.fr](mailto:Emmanuelle.Reboul@univ-amu.fr)

## Méthodologiste – Biostatisticien

### **Pr Berouz Kassai / Dr Aurélie Portefaix**

Centre d'Investigation Clinique



Hospices Civils de Lyon  
3 Quai des Célestins  
69002 Lyon  
Tel : 04 72 35 72 31 / 04 72 35 71 70  
Fax : 04 72 12 94 19

## Comités scientifiques ou autre

Comité scientifique : Il est composé du Professeur Noël Peretti, du Professeur Philippe Moulin, du Docteur Sarah Verrachia, du Docteur Aurélie Portefaix, du Docteur Emmanuelle Reboul. Il est responsable de la supervision globale du projet. Il s'assure de l'avancée de l'étude, de sa bonne conduite et de sa crédibilité scientifique.

Concernant les examens ophtalmologiques, le Professeur Laurent Kodjikian et un membre de son équipe reliront l'ensemble des examens effectués, en insu du statut des patients (malades ou témoins).

## 2. Justification scientifique

### 2.1. Etat actuel des connaissances – Rationnel

Les vitamines liposolubles sont au nombre de quatre (A, D, E et K), elles constituent un groupe de molécules indispensables en raison de leurs rôles physiologiques multiples, nécessairement apportées par l'alimentation car non synthétisées par l'organisme. Leur métabolisme est comparable à celui des lipides (Borel et al., 2001). Une fois libérées de leur matrice alimentaire dans l'estomac, elles sont absorbées au niveau de la bordure en brosse des entérocytes de l'intestin proximal au cours du processus de digestion. Une fois dans l'entérocyte, les lipides et les vitamines liposolubles sont transportés jusqu'à la membrane du réticulum endoplasmique où l'on assiste à leur réestérification (Sauvant et al., 2003). Afin d'être libérés dans la circulation, les lipides non polaires ayant été resynthétisés doivent être incorporés dans les lipoprotéines, des particules de transport pouvant interagir avec le milieu aqueux. L'intestin grêle possède la capacité de sécréter l'ensemble des lipoprotéines, cependant les chylomicrons constituent les principaux transporteurs des graisses alimentaires et des vitamines liposolubles. Ces derniers sont structurés grâce à une protéine essentielle : l'apolipoprotéine B-48 (apoB-48), indispensable à leur assemblage et leur exocytose cellulaire. Ainsi, au sein du réticulum endoplasmique, on observe la synthèse de l'apoB-48 et l'assemblage de la particule lipoprotéique grâce à l'intervention de la protéine microsomale de transfert des triglycérides (MTP) (Hussain, 2014). Une fois formés, les chylomicrons sont dirigés vers l'appareil de Golgi lors d'une étape de transfert impliquant la protéine Sar1 GTPase (Saito et al., 2017).

La fonction cruciale de ces 3 protéines (apoB-48, MTP, Sar1GTPase) dans l'absorption intestinale des graisses par l'entérocyte a été mise en évidence par l'existence de trois maladies génétiques regroupées sous le terme générique d'hypocholestérolémies primaires intestinales : l'hypobêtalipoprotéïnémie homozygote due à des aberrations moléculaires du gène de l'apoB (Cottrill et al., 1974), l'abêtalipoprotéïnémie qui résulte d'une mutation du gène de la MTP (Wetterau et al., 1992) (Burnett et al., 1993) et la maladie de rétention des chylomicrons liée à des mutations du gène codant pour la protéine Sar1 GTPase, empêchant alors le transport des lipides vers l'appareil de Golgi et la synthèse de la forme mature des lipoprotéines intestinales contenant l'Apo B-48 (Roy et al., 1987).

Ces pathologies sous forme homozygote sont rares, cependant les conséquences de la malabsorption intestinale provoquée par ces anomalies génétiques peuvent être graves : retard de croissance staturo-pondérale sévère, anomalies neurologiques avec dégénérescence cérébrospinale, dysarthrie, anomalies de la vision par rétinite pigmentaire et neuropathies périphériques associées à une situation de stéatose hépatique et présence de troubles de la coagulation par déficit en vitamine K (Lee and Hegele, 2014).

La prise en charge des hypocholestérolémies familiales intestinales repose essentiellement sur un régime pauvre en lipides à chaînes longues, associé à une supplémentation en vitamines liposolubles à forte dose et en acides gras essentiels par voie orale ou éventuellement par voie parentérale pour les formes les plus sévères (Peretti et al., 2010). La grande rareté de ces maladies, ainsi que le caractère peu spécifique des symptômes entraînent un retard au diagnostic préjudiciable pour les patients. En effet, la prise en charge se doit d'être précoce afin de prévenir les complications neuro-ophtalmiques invalidantes majoritairement associées aux carences en vitamine A et E (Chowers et al., 2001).

Pourtant, malgré une supplémentation précoce et adaptée, une dégradation de la fonction ophtalmique survenant à l'âge adulte est régulièrement observée (Alshareef et al., 2015) (Illingworth et al., 1980). Cette dégradation se fait généralement sous la forme d'une rétinite pigmentaire (dite secondaire) caractérisée par une perte progressive des photorécepteurs et un dysfonctionnement de l'épithélium pigmentaire se traduisant par une perte progressive et graduelle de la vision évoluant généralement vers la cécité (Alshareef et al., 2015) (Levy et al., 2019). Or, les rétinites pigmentaires primaires (c'est-à-dire d'origine génétique) sont caractérisées par atrophies de la macula lutea (Pagon, 1988) composée de deux molécules lipophiles de la famille des caroténoïdes xanthophylles que sont la lutéine et la zéaxanthine, aussi appelées pigments maculaires (Hartridge, 1951). De plus, des études menées par des équipes travaillant spécifiquement sur ces maladies dégénératives rétiniennes ont montré l'association entre atteinte rétinienne et stress oxydant (Campochiaro et al., 2015) (Campochiaro and Mir, 2018) (Kruk et al., 2015).

Or, des données préliminaires montrent que les patients atteints d'hypocholestérolémie primaire intestinale sont carencés en molécules de la famille des caroténoïdes (dont la supplémentation n'est pas envisagée actuellement dans la prise en charge) et souffrent d'un état de stress oxydant chronique potentiellement délétère (Burnett and Hooper, 2015) (Clarke et al., 2006).

## 2.2. Hypothèse de la recherche

Au regard de toutes les données bibliographiques, plusieurs hypothèses peuvent alors être émises concernant la dégradation de la fonction ophtalmique observée chez ces patients :

- Il existerait une corrélation entre carence en caroténoïdes et densité en pigments maculaires. Ainsi, une carence chronique en caroténoïdes, pourrait être à l'origine d'une diminution progressive de la densité en pigments maculaires conduisant à une dégradation de la fonction ophtalmique, malgré une supplémentation en vitamine A.
- Les nombreuses carences en vitamines et en éléments nutritifs liposolubles entraîneraient, d'une part l'accumulation de conditions pro-oxydantes et d'autres part un déficit en molécules antioxydantes (vitamine E, vitamine A, caroténoïdes, polyphénols, lycopène) conduisant à un état de stress oxydant pathologique. Ce stress oxydant pourrait être en cause dans la dégénérescence rétinienne observée et pourrait justifier d'ajuster la prise en charge des patients avec des suppléments complémentaires en caroténoïdes (prioritairement lutéine et zéaxanthine) et éventuellement en vitamine C (acide ascorbique).

### 2.3. Justification des choix méthodologiques

Nous avons choisi de réaliser une étude monocentrique, prospective, cas-témoins.

Un critère de jugement intermédiaire a été choisi (densité optique). Celui-ci est bien corrélé à la diminution clinique de l'acuité visuelle liée à une dégénérescence rétinienne. Le lien entre baisse de la densité optique du pigment maculaire et baisse de l'acuité visuelle a notamment été démontrée dans de nombreuses études menées sur la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou sur la maladie de Stargardt (Aleman et al., 2007) (Koh et al., 2004) (Rougier et al., 2011).

La mesure de la densité optique ne nécessite pas un examen supplémentaire mais elle est déterminée lors de l'examen de suivi habituel qu'est le fond d'œil à l'aide de clichés spécifiques obtenus à l'aide d'une rétinographie en autofluorescence. En effet en autofluorescence, les chromophores de la lipofuscine sont excités avec deux longueurs d'onde : une première qui se situe dans la région spectrale bleue où la bande d'absorption de la lipofuscine chevauche celle des pigments maculaires, et une deuxième qui se situe toujours dans la région d'absorption de la lipofuscine mais en dehors de la plage d'absorption des pigments maculaires. Ainsi, l'excitation par la première lumière (verte) entraîne une fluorescence de la lipofuscine dans la région maculaire ainsi que dans toutes les régions périphériques de la rétine. A l'inverse, l'excitation par la lumière bleue entraîne une fluorescence de la lipofuscine uniquement dans les régions périphériques ; dans la région maculaire, l'intensité de la fluorescence est atténuée en raison de l'absorption de la lumière bleue par les pigments maculaires. En comparant les intensités de fluorescence de la lipofuscine obtenues avec les deux longueurs d'onde d'excitation dans les régions fovéales et périphériques de la rétine, l'absorption de la lumière par la macula lutea peut être estimée sous forme de densité optique (DO).

Les patients malades et les patients témoins seront appariés sur l'âge car on s'attend à une variation physiologique des résultats avec l'âge (densité optique).

Nous avons choisi d'inclure des enfants à partir de 6 ans car une coopération est nécessaire durant l'autofluorescence et cet examen est réalisable à partir de cet âge-là.

### 2.4. Population cible

Etant donnée qu'il s'agit d'une pathologie très rare (seulement 40 cas décrits en France pour les hypocholestérolémies familiales par rétention de chylomicrons et une prévalence < 1/1.000.000 pour les deux autres formes de hypocholestérolémie familiale – réf. «<http://www.orpha.net> »), il a été décidé d'inclure dans cette étude tous les patients (enfant de plus de 6 ans ou adultes) qui acceptent de participer à cette étude et qui depuis 1990 ont été pris en charge pour cette pathologie dans le service de Gastroentérologie et Nutrition Pédiatrique (Pr Peretti) et qui poursuivent leur suivi à l'âge adulte sur le site du GHE (Groupement Hospitalier Est) à Lyon dans le service d'endocrinologie-nutrition (Pr Moulin). La liste active de patients est actuellement de 25 sujets, nous pensons donc pouvoir inclure 20 patients.

Le groupe de patients aura une mesure de la densité optique durant leur examen d'ophtalmologie programmé dans le cadre du suivi des complications de l'hypocholestérolémie (fond d'œil, vision des couleurs, potentiel évoqué visuel, électrorétinogramme...) (Peretti et al., 2010). En effet, la mesure de la densité optique consiste en une analyse supplémentaire post-examen de clichés supplémentaires de la rétine obtenus lors du fond d'œil réalisé pour le suivi ophtalmologique des patients.

Le groupe témoin sera constitué de patients mineurs ou adultes, suivis en routine au service d'ophtalmologie de l'Hôpital Edouard Herriot, Lyon (Pr Kodjikian) et nécessitant un examen du fond d'œil dans le cadre de leur suivi habituel, une mesure supplémentaire de la densité du pigment maculaire sera effectuée lors de cet examen. Le groupe de patients témoins n'est nécessaire que pour l'analyse du pigment maculaire. Aucun groupe témoin n'est envisagé pour la caractérisation du déficit

plasmatique en lutéine et en zéaxanthine et pour l'analyse du stress oxydant, il n'y aura donc pas de prise de sang supplémentaire pour les patients témoins.

## 2.5. Retombées attendues

Une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques associés est indispensable à l'amélioration de la prise en charge de ces patients qui continuent de présenter des complications neuro-ophtalmiques malgré la prise en charge actuellement préconisée.

Si la carence en caroténoïde est confirmée, et une corrélation trouvée avec la densité de pigment maculaire et/ou un niveau de stress oxydant élevé, ceci ouvrirait alors une nouvelle piste thérapeutique par supplémentation en caroténoïdes à forte dose et/ou tentative de contrôle du stress oxydant par ajout de molécules anti-oxydantes afin de ralentir ou d'améliorer la dégénérescence maculaire.

Enfin, les résultats de cette étude permettront de mettre en place un protocole clinique d'essai randomisé en double aveugle afin de comparer l'efficacité d'une prise en charge avec ajout d'une supplémentation en caroténoïdes et contrôle du stress oxydant par rapport à la prise actuelle sur le développement de complications ophtalmiques.

## 3. Objectifs de la recherche

### 3.1. Objectif principal

Cette étude consiste à caractériser et évaluer la densité du pigment maculaire chez les patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales majeurs ou mineurs de plus de 6 ans. La densité du pigment maculaire des patients malades sera mesurée par la méthode de l'imagerie par auto-fluorescence et sera comparée à celle de patients témoins. Cet examen nécessite un fond d'œil avec dilatation pupillaire qui est réalisé normalement durant le bilan de suivi des patients avec hypocholestérolémie génétique.

### 3.2. Objectifs secondaires

Cette étude comporte quatre objectifs secondaires :

- 1) Caractériser le statut en caroténoïdes des patients.
- 2) Caractériser les niveaux des marqueurs de stress oxydant des patients.
- 3) Etudier la corrélation entre la densité optique du pigment maculaire avec d'une part le statut en caroténoïdes, et d'autre part le niveau de stress oxydant.
- 4) Recherche d'une éventuelle évolution à un an de la densité optique, des statuts vitaminiques et du stress oxydant

L'analyse des données se fera à la fin de l'étude, une fois la dernière visite de chaque patient effectué

## 4. Conception de la recherche

## 4.1. Type d'étude

Il s'agit d'une étude portant sur des patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales régulièrement suivis et comportant un ou plusieurs actes ou procédures dénués de risques.

Cette étude n'engendre pas de modification dans la prise en charge des patients mais nécessite le recueil supplémentaire d'éléments (photographies du fond d'oeil) ou produits du corps (volume sanguin supplémentaire) dans le cadre du soin : volume sanguin supplémentaire sur la prise de sang habituelle et mesure de la densité du pigment maculaire au moyen de méthodes d'imagerie durant le fond d'oeil dans le service d'ophtalmologie pour leur suivi ophtalmologique habituel mais habituellement sans cette mesure spécifique du pigment maculaire (photographie supplémentaire).

Dans ces conditions, cette étude entre dans le cadre du 3° de l'article L. 1121-1 du Code de la Santé Publique.

## 4.2. Critères de jugement

### Critère de jugement principal

Le premier critère d'évaluation est la densité optique (DO) déterminée par une photographie supplémentaire au cours du fond d'oeil habituellement réalisée pour le suivi : imagerie en autofluorescence à deux longueurs d'onde. Cette méthode d'imagerie permet d'obtenir un profil de distribution de l'autofluorescence calculé en utilisant une échelle d'intensité de gris au centre de la macula et le long des méridiens horizontal et vertical. La densité optique du pigment maculaire est alors exprimée en logarithme du rapport des spectres d'excitation péri-ovale / fovéal symbolisé par le sigle « DU » (« Density Unit »). En effet en autofluorescence, les chromophores de la lipofuscine sont généralement excités avec deux longueurs d'onde : une première qui se situe dans la région spectrale bleue où la bande d'absorption de la lipofuscine chevauche celle des pigments maculaires, et une deuxième qui se situe toujours dans la région d'absorption de la lipofuscine mais en dehors de la plage d'absorption des pigments maculaires. Ainsi, l'excitation par la première lumière (verte) entraîne une fluorescence de la lipofuscine dans la région maculaire ainsi que dans toutes les régions périphériques de la rétine. A l'inverse, l'excitation par la lumière bleue entraîne une fluorescence de la lipofuscine uniquement dans les régions périphériques ; dans la région maculaire, l'intensité de la fluorescence est atténuée en raison de l'absorption de la lumière bleue par les pigments maculaires. En comparant les intensités de fluorescence de la lipofuscine obtenues avec les deux longueurs d'onde d'excitation dans les régions fovéales et périphériques de la rétine, l'absorption de la lumière par la macula lutea peut être estimée sous forme de densité optique (DO).

### Critères de jugement secondaires

Les autres critères d'évaluation sont :

- 1) Statut en caroténoïdes : dosage des concentrations plasmatiques et érythrocytaires en lutéine et zéaxanthine. Ces molécules seront analysées par chromatographie liquide de haute performance et le dosage se fera par mesure de l'aire sous la courbe de chaque molécule d'intérêt. Après précipitation par éthanol et extraction avec hexane, le dosage des molécules d'intérêt se feront par HPLC (Chromatographie Liquide de Haute Performance) en phase inversée avec détection spectrophotométrique à 445 nm.

- 2) Marqueurs du stress oxydant : Glutathion réduit érythrocytaire, Superoxyde dismutase (SOD), Glutathion peroxydase (GPx), Malondialdéhyde plasmatique et érythrocytaire, Vitamine C plasmatique, Cholestérol oxydé plasmatique, F2-isoprostanes.
- 3) Corrélation entre la DO et d'une part concentrations plasmatiques et érythrocytaires en lutéine et zéaxanthine, et d'autre part les molécules de stress oxydant précitées (coefficient de Pearson)
- 4) Statut vitaminique et stress oxydant après 1 an de suivi : même critères qu'initialement à V1. Statut en caroténoïdes (dosage des concentrations plasmatiques et érythrocytaires en lutéine et zéaxanthine). Marqueurs du stress oxydant (Glutathion réduit érythrocytaire, Superoxyde dismutase (SOD), Glutathion peroxydase (GPx), Malondialdéhyde plasmatique et érythrocytaire, Vitamine C plasmatique, Cholestérol oxydé plasmatique, F2-isoprostanes).

### 4.3. Critères d'éligibilité

#### Critères d'inclusion

##### Groupe malade :

- Patients atteints d'une hypocholestérolémie familiale génétiquement prouvée,
- Patients suivis de façon systématique dans le service de Gastroentérologie et Nutrition Pédiatrique de l'Hôpital Femme Mère Enfant de Lyon ou dans le service d'endocrinologie adulte du GHE (Hôpital Louis Pradel),
- Fille/femme ou garçon/homme de plus de 6 ans et de plus de 12 kg au moment de l'inclusion (âge nécessaire pour la coopération pour la mesure du pigment maculaire),
- Non-opposition du patient ou de ses parents/tuteurs dans le cas d'un patient mineur,
- Patient bénéficiant d'une prise en charge par la sécurité sociale.

##### Groupe témoin :

- Patients suivis au service d'ophtalmologie de l'Hôpital Edouard Herriot,
- Patient âgé de plus de 6 ans et de moins de 50 ans
- Non-opposition du patient ou de ses parents/tuteurs dans le cas d'un patient mineur,
- Patient bénéficiant d'une couverture par la sécurité sociale.

#### Critères de non-inclusion

##### Groupe malade :

- Allergie aux anesthésiques locaux (notamment à la xylocaïne),
- Allergie aux mydriatiques,
- Personne participant à une autre recherche comprenant une période d'exclusion toujours en cours à la pré-inclusion,

- Personne faisant l'objet d'une mesure de sauvegarde de justice.

### Groupe témoin :

- Patients de moins de 6 ans ou de plus de 50 ans,
- Patients diagnostiqués avec une dégénérescence maculaire liée à l'âge ou présentant des signes de dégénérescence maculaire liée à l'âge dans l'un ou les deux yeux,
- Patients souffrant de pathologies oculaires évolutives susceptibles de compliquer l'évaluation du pigment maculaire (glaucome sévère, myopie forte, autre rétinopathie sévère),
- Patients présentant une opacité de la rétine empêchant une évaluation correcte du pigment maculaire (cataracte, dystrophie cornéenne),
- Patient atteint d'une pathologie induisant une malabsorption intestinale (grêle court, maladie inflammatoire intestinale, insuffisance pancréatique, cholestase hépatique)
- Patients présentant des pathologies chroniques avec niveau de stress oxydant important (diabète, pathologies cardiovasculaires, maladies inflammatoires)
- Allergie aux mydriatiques,
- Personne participant à une autre recherche comprenant une période d'exclusion toujours en cours à la pré-inclusion,
- Personne faisant l'objet d'une mesure de sauvegarde de justice.

## Modalités de recrutement et faisabilité

Les patients malades seront sélectionnés par l'un des investigateurs de l'étude lors des consultations de suivi habituel en Hôpital de Jour du Service de Gastroentérologie et Nutrition Pédiatrique ou du service d'endocrinologie du GHE. Les patients seront définitivement inclus lors de la visite d'inclusion après obtention de leur non-opposition.

Le groupe témoin pour l'analyse du pigment maculaire sera constitué de patients majeurs volontaires recrutés dans le service d'ophtalmologie de l'Hôpital Edouard Herriot. Ces patients seront sélectionnés par le médecin investigateur parmi les patients nécessitant un examen du fond d'œil dans le cadre de leur prise en charge diagnostique habituelle. Ces patients seront définitivement inclus après obtention de leur non-opposition.

## 5. Organisation générale

### 5.1. Calendrier de l'étude

Durée de la période d'inclusion : 12 mois

Durée de la participation pour chaque patient : 12 mois

Durée totale de l'étude : 24 mois

Début des inclusions : dès accord du CPP

Dès la première inclusion, le promoteur doit informer sans délai le CPP de la date effective de démarrage de l'étude (date effective de démarrage = date d'inclusion du premier patient).

La date de fin d'étude sera transmise par le promoteur au CPP dans un délai de 90 jours. La date de fin de la recherche correspond au terme de la participation de la dernière personne qui se prête à la recherche, ou le cas échéant, au terme défini dans le protocole.

## 5.2. Schéma général et tableau récapitulatif

Il s'agit d'une étude comparative portant sur des patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales régulièrement suivis et comportant un ou plusieurs actes ou procédures dénués de risques.

Cette étude consiste en une comparaison de la densité optique du pigment maculaire chez des patients atteints d'hypocholestérolémies génétiques par rapport à des patients témoins, avec suivi sur un an pour le groupe malade. Pour cela, un groupe de patients hypocholestérolémiques et un groupe de patients témoins non atteints d'hypocholestérolémie primaire intestinale seront constitués. L'étude est constituée de deux visites pour le groupe malade afin de permettre une mesure initiale de la densité optique qui sera comparée à une mesure faite chez les patients témoins, et une deuxième visite à un an afin de constater une éventuelle évolution de cette densité optique. Une seule visite est envisagée pour le groupe de patients témoins, partant du postulat qu'aucune modification statistiquement significative du pigment maculaire ne peut être observée chez des patients non affectés d'hypocholestérolémies primaires intestinales de moins de 50 ans (et plus de 6 ans pour les mineurs car coopération requise pour les examens durant le fond d'œil).

Dans le groupe des patients atteints d'hypocholestérolémies génétiques, les données de leur bilan sanguin, lipidique et hépatique, réalisés dans le cadre du suivi habituel annuel, seront récupérées dans le cahier d'observation lors des deux visites. En plus de ces bilans, une analyse des concentrations plasmatiques en caroténoïdes et une analyse du stress oxydant sera effectuée afin d'établir une éventuelle corrélation entre les concentrations sanguines en molécules d'intérêt, le niveau de stress oxydant et la densité optique en pigment maculaire. Ces bilans, en sus du suivi habituel, seront effectués lors des deux visites et nécessitent le prélèvement de volumes sanguins additionnels (14 ml en cinq prélèvements en sus du suivi) lors de la prise de sang effectuée dans le cadre du suivi habituel. Aucune prise de sang spécifique à la recherche n'est donc à prévoir, il s'agit de volumes supplémentaires sur un cathéter déjà mis en place dans le soin courant.

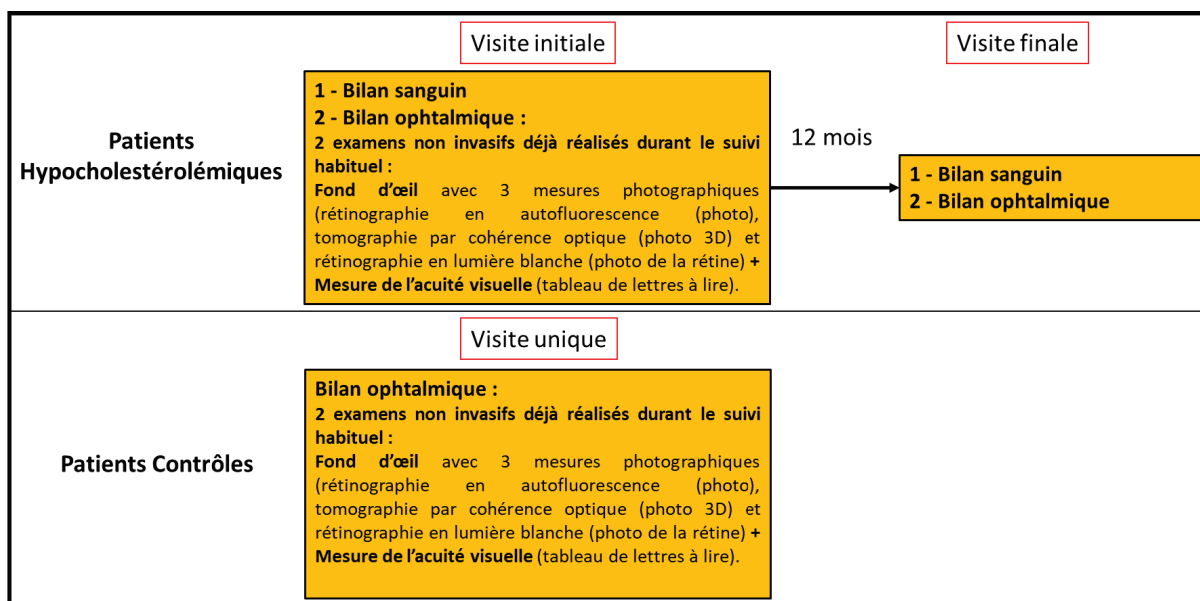
La fonction ophtalmique sera étudiée à l'aide de 2 examens déjà réalisés durant leur suivi habituel : 1) un fond d'œil avec 3 mesures photographiques (rétinographie en autofluorescence (photo), tomographie par cohérence optique (photo 3D) et rétinographie en lumière blanche (photo de la rétine) couplé à 2) une mesure de l'acuité visuelle (tableau de lettres à lire). L'autofluorescence correspond à une simple photo et permet d'analyser plus particulièrement la densité du pigment maculaire (pour plus de détail sur cette mesure, reportez-vous au paragraphe ci-dessous « Traitements / produits / stratégies à l'étude et modalités d'administration / Quel est le traitement / produit / stratégie étudié »). Ces mesures sont considérées par les ophtalmologues comme des examens de routines lors des fonds d'œil mais ne sont pas nécessairement réalisées en systématique. Lors du fond d'œil prévu, la photo de la mesure d'autofluorescence sera ajoutée si non prévue initialement.

- Rétinographie en autofluorescence : L'autofluorescence est une technique d'imagerie non invasive qui permet de mettre en évidence des dysfonctionnements de l'épithélium pigmentaire. Cet examen est une technique récente, basée sur le principe d'émission de lumière fluorescente de la lipofuscine (naturellement présente dans l'œil) lorsqu'elle est illuminée par une source lumineuse externe. L'analyse des clichés en autofluorescence permet d'identifier toute



modification de la répartition habituelle de l'autofluorescence du fond d'œil. En pratique, les anomalies de signal de l'autofluorescence peuvent être liées à une modification de la quantité ou de la composition des fluorophores contenus dans le cytoplasme des cellules de l'épithélium pigmentaire. Ainsi, une diminution de l'opacité de la macula lutea est associée à une diminution de la densité optique du pigment maculaire car liée à une moindre absorption de la lumière bleue par ces pigments. L'appareil utilisé (ophtalmoscope laser à balayage) va ainsi fournir des images de la macula (centre de la rétine). Une image très sombre correspond souvent à la disparition de l'épithélium pigmentaire. Cet examen est non invasif et réalisé en externe (pas d'hospitalisation) mais nécessite une dilatation de pupillaire. C'est cet examen qui va permettre d'évaluer la densité du pigment maculaire.

- Tomographie de cohérence optique (OCT Plex Elite®) : Cet examen consiste à capter une onde lumineuse diffusée par un matériau et afin d'obtenir des images en coupe de la structure de l'œil et notamment de la macula (centre de la rétine) et de reconstituer une image tridimensionnelle. Cet examen est non invasif et réalisé en externe (pas d'hospitalisation). L'examen se fait avec ou sans dilatation pupillaire.
- Photographie de l'œil ou rétino-graphie : La rétino-graphie est un examen de diagnostic qui, sous la forme de photographies, permet d'obtenir une image du fond de l'œil ou de la rétine. Cette procédure permet de détecter certaines maladies qui affectent la rétine, comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge, la rétinopathie diabétique ou la rétinite pigmentaire. L'appareil va émettre des flashes et prendre une photo après chaque éclair lumineux. Cet examen dure environ 10 minutes et ne nécessite pas de dilatation des pupilles.
- Acuité visuelle : Cet examen consiste à utiliser un tableau de lettres pour mesurer la capacité à voir des objets situés à au moins 6 mètres de distance. Cet examen n'est ni invasif ni contraignant



Aucun de ces examens n'est invasif mais l'analyse de la macula par autofluorescence nécessite une dilatation, c'est-à-dire un élargissement, de la pupille. Cette dilatation s'obtient par l'instillation d'un collyre dit mydriatique lors du fond d'œil réalisé dans le cadre du suivi habituel.

Si le patient ne s'oppose pas à participer à l'étude, l'investigateur le notifie dans le dossier médical de celui-ci.

## Tableau récapitulatif :

Récapitulatif des prélèvements à effectuer chez les patients hypocholestérolémies génétiques		
	Visite initiale	Visite finale
Vitamine E	X	X
Vitamine A	X	X
Vitamine C	X	X
Lutéine	X	X
Zéaxanthine	X	X
Glutathion réduit érythrocytaire	X	X
Glutathion peroxydase (GPx)	X	X
Superoxyde dismutase (SOD)	X	X
Malondialdéhyde plasmatique et érythrocytaire	X	X
Cholestérol oxydé plasmatique	X	X
F2-isoprostanes plasmatiques et urinaires	X	X
Bilan hépatique	X	X
Bilan lipidique	X	X
Numération Formule Sanguine	X	X
Examens ophtalmiques	X	X

L'ensemble des analyses nécessite un prélèvement d'un total de 36 ml de sang veineux (22 ml en quatre prélèvements prévus dans le suivi habituel des patients et 14 ml en sus du suivi) ainsi qu'un prélèvement de 7 ml d'urine uniquement chez les patients atteints d'hypocholestérolémies génétiques. Pour le prélèvement urinaire, il sera demandé au patient de récupérer les urines matinales la veille de la visite.

Le détail des prélèvements (volumes, natures, tubes, circuit des échantillons) est détaillé en annexe 1.

<b>Dosages sanguins et examens prévus et pris en charge dans le cadre du suivi habituel des patients</b>	
Dosages sanguins	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitamine A/E (4 ml)</li> <li>- Vitamine E érythrocytaire (4 ml)</li> <li>- Vitamine C (4 ml)</li> <li>- Bilan lipidique (3 ml)</li> <li>- Bilan hépatique (3 ml)</li> <li>- Numération Formule Sanguine (4 ml)</li> </ul>
Examens ophtalmiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tomographie par cohérence optique (OCT Plex Elite®)</li> <li>- Rétinographie par Autofluorescence</li> <li>- Rétinographie en lumière blanche (photographie du fond d'œil)</li> <li>- Acuité visuelle</li> </ul>

<b>Dosages sanguins et examens spécifiques à l'étude</b>	
Dosages sanguins	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Caroténoïdes (pas de volume supplémentaire)</li> <li>- Glutathion peroxydase (GPx) / Superoxyde Dismutase (SOD) (4 ml)</li> <li>- Malondialdéhyde plasmatique et érythrocytaire / Glutathion réduit érythrocytaire (4 ml)</li> <li>- Cholestérol oxydé plasmatique (4 ml)</li> <li>- F2-isoprostanes (2 ml)</li> </ul>
Dosages urinaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>- F2-isoprostanes (7 ml)</li> </ul>

<b>Récapitulatif des prélèvements à effectuer chez les patients témoins</b>		
	Visite initiale	Visite finale
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tomographie par cohérence optique (OCT Plex Elite®)</li> <li>- Rétinographie par Autofluorescence</li> <li>- Rétinographie en lumière blanche (photographie du fond d'œil)</li> <li>- Acuité visuelle</li> </ul>	X	Non

### 5.3. Règles d'arrêt temporaire ou définitif

- Arrêt de participation d'une personne à la recherche :

Les sujets pourront demander à sortir de l'étude à n'importe quel moment, sans avoir à se justifier, et quelle qu'en soit la raison. En cas de sortie prématurée, l'investigateur doit en documenter les raisons de façon aussi complète que possible.

- Arrêt d'une partie ou de la totalité de la recherche :

Les Hospices Civils de Lyon se réservent le droit d'interrompre l'étude à tout moment, s'il s'avère que les objectifs d'inclusion ne sont pas atteints.

En cas d'arrêt prématuré de l'étude pour des raisons de sécurité, l'information sera transmise par le promoteur dans un délai de 15 jours au CPP.

## 6. Evaluation de la sécurité

Un événement indésirable est une réaction nocive et non voulue.

D'après l'article L1123-10, les dispositions relatives aux vigilances de chaque produit ou pratique faisant l'objet de la recherche sont applicables.

L'investigateur devra signaler tout événement indésirable selon les procédures de gestion de la qualité et des soins de son établissement.

D'après l'article L1413-14, tout professionnel ou établissement de santé ayant constaté une infection nosocomiale ou tout autre événement indésirable grave lié à des soins réalisés lors d'investigations, de traitements ou d'actions de prévention doit en faire la déclaration au directeur général de l'agence régionale de santé.

Les événements indésirables sanitaires sont à signaler sur le portail de signalement des événements indésirables sanitaires : [www.signalement-sante.gouv.fr](http://www.signalement-sante.gouv.fr)

L'investigateur notifie au promoteur via le cahier d'observation tous les événements indésirables et les résultats d'examen de biologie médicale anormaux définis dans le protocole comme déterminants pour l'évaluation de la sécurité des personnes.

Se référer aux critères de jugement.

## 7. Aspects statistiques

### 7.1. Nombre de sujets nécessaires

Etude descriptive de cohorte concernant une maladie rare avec une quinzaine de sujets suivis sur Lyon (principale cohorte nationale), le protocole sera proposé à l'ensemble des patients suivis.

L'analyse des concentrations plasmatiques en lutéine et en zéaxanthine ainsi que l'analyse du stress oxydant consiste en une comparaison des valeurs de chaque sujet à une valeur de référence établie pour la population générale. Il n'y a donc pas d'effectif minimal requis.

Concernant l'analyse de la densité du pigment maculaire, les hypocholestérolémies primaires étant des maladies rares avec un nombre limité de patients, tous les patients répondant aux critères d'inclusion seront recrutés. Nous estimons à 20 le nombre de patients dans le groupe dit malades, considérant que la file active actuelle de patients est de 25 et qu'un taux de refus de 10% a été pris en compte. Il est à noter que des essais cliniques antérieurs menés sur des patients atteints d'une maladie rare ou avec un nombre limité de patients ont montré des résultats statistiques significatifs sur le pigment maculaire, comme l'étude menée par Koh et al. sur les patients atteints de maculopathie liée à l'âge, ou par Aleman et al. chez les patients atteints de dystrophie maculaire liée à la mutation du gène ABCA4 (également appelée maladie de Stargardt) (Koh et al., 2004, Aleman et al., 2007).

## 7.2. Description des méthodes statistique

Analyse de la densité du pigment maculaire : Les comparaisons entre les densités optiques du pigment maculaire des patients malades et des témoins seront effectuées en utilisant une ANOVA. Les conditions de faisabilité de ce test seront vérifiées par les tests de Dubin-Watson, Shapiro-Wilk et le test de Barlett. En cas de non-satisfaction aux conditions de l'ANOVA, l'analyse sera faite en utilisant le test de Kruskal-Wallis et le test de Dunn. Le critère de jugement principal est le logarithme du rapport des spectres d'excitation parafovéal / fovéal exprimé en « DU ».

Analyse des concentrations de lutéine et zéaxanthine : Les données seront présentées en valeurs moyennes plus ou moins une erreur standard de la moyenne (SEM). Les comparaisons par rapport à une valeur standard seront effectuées en utilisant le test de Wilcoxon. La variable principale sera l'aire sous la courbe mesurée par HPLC. Le critère principal de jugement de l'étude est l'aire sous la courbe pour les taux de lutéine et zéaxanthine.

Coefficient de corrélation de Pearson entre la densité optique et d'une part la concentration sérique en caroténoïdes ainsi que, dans un deuxième temps, le niveau de stress oxydant.

## 7.3. Méthode de prise en compte des données manquantes

Aucune analyse intermédiaire n'est prévue.

## 7.4. Gestion des modifications apportées au plan d'analyse

Un plan d'analyse statistique détaillé sera rédigé avant le gel de la base des données. Il tiendra compte de toute modification du protocole ou de tout événement inattendu survenu au cours de l'étude et ayant un impact sur les analyses présentées ci-dessus. Les analyses planifiées pourront être complétées en cohérence avec les objectifs de l'étude.

Toute modification apportée par la suite au plan d'analyse statistique devra être justifiée et donnera lieu à une nouvelle version du document. Ces déviations au plan d'analyse seront reportées dans le rapport final de l'étude. L'ensemble des documents sera conservé dans le dossier de l'étude.

## 7.5. Responsable des analyses et logiciel utilisé

### **Claire BORDAT**

Équipe « Micronutrition Humaine » / Equipe « Do-IT »

Centre CardioVasculaire et Nutrition - C2VN (UMR 1263, UMR 1260 ; INRA - INSERM – AMU) / Laboratoire CarMeN Laboratory, INSERM, U1060, INRAE, UMR 1397, Université Claude Bernard Lyon 1,

Email : claire.bordat@univ-lyon1.fr

Logiciel : Prism 9 pour Windows 64-bit (Version 9.0.0), GraphPad Software LLC.

### **Dr Liora RESTIER - Dr Abdelouhaed BELMALIH**

Chefs de projet, Hôpital Femme-Mère-Enfants (GHE-HFME)

59, Bd Pinel 69677 BRON cedex

## 8. Droits d'accès aux données et documents sources

### 8.1. Accès aux données

Le promoteur est chargé d'obtenir l'accord de l'ensemble des parties impliquées dans la recherche afin de garantir l'accès direct à tous les lieux de déroulement de la recherche, aux données sources, aux documents sources et aux rapports dans un but de contrôle de qualité et d'audit par le promoteur ;

Les investigateurs mettront à disposition des personnes chargées du suivi, du contrôle de qualité ou de l'audit de la recherche impliquant la personne humaine, les documents et données individuelles strictement nécessaires à ce contrôle, conformément aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur (articles L.1121-3 et R.5121-13 du code de la santé publique).

### 8.2. Documents sources

Les documents sources sont le dossier médical hospitalier du patient (patient de l'étude et patient-témoins d'ophtalmologie). Celles-ci incluent, les résultats et comptes rendus d'examens, la correspondance médicale, et les dossiers médicaux de chaque patient. Un CRF papier sera disponible, les données seront collectées dans un fichier EXCEL accessible par mot de passe et stockées sur le serveur Y des HCL. Les documents sources seront conservés 25 ans dans le service de gastroentérologie dans une armoire à clé.

### 8.3. Confidentialité des données

Conformément aux dispositions concernant la confidentialité des données auxquelles ont accès les personnes chargées du contrôle de qualité d'une recherche impliquant la personne humaine (article L.1121-3 du code de la santé publique), conformément aux dispositions relatives à la confidentialité des informations concernant notamment les essais, les personnes qui s'y prêtent et les résultats obtenus (article R. 5121-13 du code de la santé publique), les personnes ayant un accès direct aux données prendront toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives aux essais, aux personnes qui s'y prêtent et notamment en ce qui concerne leur identité ainsi qu'aux résultats obtenus.

Ces personnes, au même titre que les investigateurs eux-mêmes, sont soumises au secret professionnel (selon les conditions définies par les articles 226-13 et 226-14 du code pénal).

Pendant la recherche impliquant la personne humaine ou à son issue, les données recueillies sur les personnes qui s'y prêtent et transmises au promoteur par les investigateurs (ou tous autres intervenants spécialisés) seront rendues anonymes.

Elles ne doivent en aucun cas faire apparaître en clair les noms des personnes concernées ni leur adresse.

Dans cette étude, chaque patient participant à l'étude sera identifié par un numéro et un monogramme (3 initiales).

## 9. Contrôle et assurance de la qualité

Les investigateurs s'engagent à accepter les audits d'assurance qualité effectués par des personnes mandatées par le promoteur ainsi que les inspections effectuées par les Autorités Compétentes. Toutes les données, tous les documents et rapports peuvent faire l'objet d'audits et d'inspections réglementaires sans que puisse être opposé le secret médical.

## 10. Considérations éthiques

### 10.1. Autorités compétentes

Le protocole, la notice d'information, le cahier de recueil de données de l'étude et le cas échéant le(s) questionnaire(s) seront soumis pour avis au Comité de Protection des Personnes XX (Préciser le numéro du CPP désigné après avis).

La notification de l'avis favorable du CPP sera transmise à l'ANSM.

Le promoteur s'engage à ce que le démarrage de l'étude ne se fasse qu'après obtention de l'avis favorable du CPP.

### 10.2. Modifications substantielles

En cas de modification substantielle apportée au protocole par l'investigateur, elle sera approuvée par le promoteur. Ce dernier devra obtenir préalablement à sa mise en œuvre un avis favorable du CPP.

### 10.3. Information du patient

Conformément à la loi 2004-806 du 09 août 2004 relative à la politique de santé publique et au décret d'application n° 2006-477 du 26 avril 2006,

- Préalablement à l'inclusion, le patient et ses parents/tuteurs recevront oralement une information complète sur l'étude, ainsi qu'une notice écrite d'information.
- Avant le début de l'étude, la non-opposition orale du patient (adulte ou enfant, s'il est en âge et en mesure de l'exprimer), et/ou des parents/tuteurs seulement pour les patients mineurs, sera recueilli par un des investigateurs de l'étude et sera notifiée dans le dossier médical du patient.

Après vérification des critères d'éligibilité, l'étude sera présentée au patient et à ses parents ou aux représentants de l'autorité parentale (si le patient est mineur) par l'un des investigateurs devant réaliser l'intervention.

L'information donnée aux patients et leurs parents/représentants de l'autorité parentale, sera donnée oralement et résumée dans un document écrit jugé approprié par le CPP. La lettre d'information est rédigée dans un langage compréhensible pour le patient et ses parents. L'investigateur devra donner au patient et aux représentants de l'autorité parentale, l'opportunité de lire le document avant de donner sa décision.

L'investigateur s'engage à faire part au promoteur de la date d'inclusion du 1er patient dans l'étude et de la date effective de fin d'étude.

## 10.4. Déclaration de conformité

Le promoteur et l'investigateur s'engagent à ce que cette recherche soit conduite :

- Conformément au protocole,
- Conformément aux dispositions législatives et réglementaires actuellement en vigueur en France et au niveau international.

## 11. Gestion et conservation des données

### 11.1. Cahier d'observation

Toutes les données seront recueillies de façon pseudo-anonyme. Chaque patient recevra au moment de l'inclusion un identifiant (comportant 4 caractères) constitué des deux initiales et du numéro d'inclusion dans l'étude sur deux chiffres.

Au moment de l'inclusion des patients cas atteints d'hypocholestérolémies, les données suivantes seront recueillies dans les cahiers d'observation :

- Démographiques (âge, sexe)
- Anthropométriques (poids, taille)
- Histoire de la maladie (antécédents familiaux ; circonstances qui ont conduit au dépistage de la maladie, date du diagnostic)
- Données cliniques (pathologies chroniques ; traitement en cours et durée de chaque traitement ; présence ou non d'une supplémentation en vitamines au moment de l'inclusion et la posologie prescrite)
- Données biochimiques : bilan lipidique (TG, LDL-c, HDL-c, cholestérol total, apoB) ; bilan hépatique (ASAT, ALAT, GGT, bilirubine totale et conjuguée) ; numération sanguine : leucocytes (G/l), Polynucléaires neutrophiles (G/l), Hémoglobine (G/l), Plaquettes (G/l) ; Albumine (g/l), Taux Prothrombine (%), Facteur V (%).
- Vitamines A, E, C et caroténoïdes plasmatiques
- Vitamine E érythrocytaire
- Marqueurs de stress oxydant : Malondialdéhyde (MDA), Glutathion, Glutathion Peroxydase, Superoxyde Dismutase plasmatiques, LDL-oxydés sériques et F2-Isoprostanes plasmatiques et urinaires

Au moment de l'inclusion des patients témoins, les données suivantes seront recueillies dans les cahiers d'observation :

- Démographiques (âge, sexe)
- Anthropométriques (poids, taille)
- Données cliniques (pathologies chroniques ; traitement en cours et durée de chaque traitement ; présence ou non d'une supplémentation en vitamines au moment de l'inclusion et la posologie prescrite)

A chaque visite des patients cas atteints d'hypocholestérolémies, seront recueillies les données suivantes :



- Démographiques (âge)
- Anthropométriques (poids, taille)
- Données cliniques (pathologies chroniques ; traitement en cours et durée de chaque traitement ; présence ou non d'une supplémentation en vitamines au moment de l'inclusion et la posologie prescrite)
- Données biochimiques : bilan lipidique (TG, LDL-c, HDL-c, cholestérol total, apoB) ; bilan hépatique (ASAT, ALAT, GGT, bilirubine totale et conjuguée) ; bilan sanguin : leucocytes (G/l), Polynucléaires neutrophiles (G/l), Hémoglobine (G/l), Plaquettes (G/l), Albumine (g/l), Taux Prothrombine (%), Facteur V (%).
- Vitamines A, E, C et caroténoïdes plasmatiques
- Vitamine E érythrocytaire
- Marqueurs de stress oxydant : Malondialdéhyde (MDA), Glutathion, Glutathion Peroxydase, Superoxyde Dismutase plasmatiques, LDL-oxydés sériques et F2-Isoprostanes plasmatiques et urinaires
- Données issues des examens ophtalmiques (Tomographie par Cohérence Optique ou OCT Plex Elite®, Rétinographie par Autofluorescence, Rétinographie en lumière blanche ou photographie du fond d'œil et acuité visuelle)

Lors de la visite unique des patients témoins, les données suivantes seront recueillies :

- Démographiques (âge, sexe)
- Anthropométriques (poids, taille)
- Données cliniques (pathologies chroniques ; traitement en cours et durée de chaque traitement ; présence ou non d'une supplémentation en vitamines au moment de l'inclusion et la posologie prescrite)
- Données issues des examens ophtalmiques (Tomographie par Cohérence Optique ou OCT Plex Elite®, Rétinographie par Autofluorescence, Rétinographie en lumière blanche ou photographie du fond d'œil et acuité visuelle)

Le cahier d'observation ne comportera que les données nécessaires à l'analyse en vue de publication. Les autres données relatives au patient et nécessaires à son suivi en dehors de l'étude, seront colligées dans son dossier médical.

## 11.2. Gestion des données

Les données seront recueillies par les médecins investigateurs ou associés dans les établissements précédemment cités lors des différentes visites (visites d'inclusion et visites propres à l'étude). Les cahiers d'observation sous format papier seront conservés dans une armoire fermée à clé dans le service du Pr Noël Peretti et conservés 10 ans. Les données sont inscrites dans le dossier patient informatisé, gérés par le système Easily, en lecture simple avec relecture. Le transfert des données dans la base de données (EXCEL) se fera par double saisie, le fichier sera accessible par mot de passe. Les données sont stockées sur le serveur Y interne des Hospices Civils de Lyon.

La collecte de données se fera de manière pseudo-anonymisée. Le fichier de correspondance sera gardé par chaque service participant à l'étude.

Les données sont archivées pendant une durée de 25 ans sur le serveur Y des hospices civils de Lyon.

### 11.3.CNIL

Cette étude entre dans le cadre de la « Méthodologie de Référence » (MR-003) en application des dispositions de l'article 54 alinéa 5 de la loi n°78-17 du 6 janvier 1978 modifiée relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés. Ce changement a été homologué par décision du 5 janvier 2006 et modifiée le 21 juillet 2016. Les Hospices Civils de Lyon, promoteur de l'étude, ont signé un engagement de conformité à cette « Méthodologie de Référence ».

### 11.4.Archivage

Pour toutes les recherches sur la personne humaine, la durée de conservation est de 15 ans.

Les documents suivants seront archivés par le(s) centres investigateurs jusqu'à la fin de la période d'utilité pratique.

Ces documents sont :

- Protocole et annexes, amendements éventuels,
- Formulaires d'information
- Données individuelles
- Documents de suivi et courriers relatifs à la recherche

Le promoteur conserve la totalité des documents de l'étude :

- Protocole et annexes, amendements éventuels,
- Formulaires d'information (trames)
- Documents de suivi et courriers relatifs à la recherche
- Analyses statistiques
- Rapport final de l'étude

Le promoteur conservera l'ensemble des données de l'étude pendant 25 ans.

Aucun déplacement ou destruction ne pourra être effectué sans l'accord du promoteur. Au terme des 15 ans, le promoteur sera consulté pour destruction. Toutes les données, tous les documents et rapports pourront faire l'objet d'audit ou d'inspection.

## 12. Règles relatives à la publication

Les communications et rapports scientifiques correspondant à cette étude seront réalisés sous la responsabilité de l'investigateur principal de l'étude avec l'accord des investigateurs associés. Les coauteurs du rapport et des publications seront les investigateurs et les cliniciens impliqués, au prorata de leur contribution à l'étude, ainsi que le biostatisticien et les chercheurs associés.

Les règles de publications suivront les recommandations internationales (N Engl J Med, 1997; 336 :309-315).

L'étude sera enregistrée sur un registre des essais cliniques en libre accès (clinicaltrials.gov) avant l'inclusion du 1er patient.

## 13. Références bibliographiques citées dans le protocole clinique

- Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Windsor, E.A., Schwartz, S.B., Swider, M., Chico, J.D., Sumaroka, A., Pantelyat, A.Y., Duncan, K.G., Gardner, L.M., 2007. Macular pigment and lutein supplementation in ABCA4-associated retinal degenerations. *Investigative ophthalmology & visual science* 48, 1319–1329.
- Alshareef, R.A., Bansal, A.S., Chiang, A., Kaiser, R.S., 2015. Macular atrophy in a case of abetalipoproteinemia as only ocular clinical feature. *Can. J. Ophthalmol.* 50, e43-46. <https://doi.org/10.1016/j.jejo.2014.12.016>
- Borel, P., Pasquier, B., Armand, M., Tyssandier, V., Grolier, P., Alexandre-Gouabau, M.-C., Andre, M., Senft, M., Peyrot, J., Jaussan, V., Lairon, D., Azais-Braesco, V., 2001. Processing of vitamin A and E in the human gastrointestinal tract. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 280, G95–G103. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.1.G95>
- Burnett, J.R., Hooper, A.J., 2015. Vitamin E and oxidative stress in abetalipoproteinemia and familial hypobetalipoproteinemia. *Free Radic. Biol. Med.* 88, 59–62. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.044>
- Burnett, J.R., Hooper, A.J., Hegele, R.A., 1993. Abetalipoproteinemia, in: Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J., Stephens, K., Amemiya, A. (Eds.), *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
- Campochiaro, P.A., Mir, T.A., 2018. The mechanism of cone cell death in Retinitis Pigmentosa. *Prog Retin Eye Res* 62, 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.08.004>
- Campochiaro, P.A., Strauss, R.W., Lu, L., Hafiz, G., Wolfson, Y., Shah, S.M., Sophie, R., Mir, T.A., Scholl, H.P., 2015. Is There Excess Oxidative Stress and Damage in Eyes of Patients with Retinitis Pigmentosa? *Antioxid. Redox Signal.* 23, 643–648. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6327>
- Chowers, I., Banin, E., Merin, S., Cooper, M., Granot, E., 2001. Long-term assessment of combined vitamin A and E treatment for the prevention of retinal degeneration in abetalipoproteinaemia and hypobetalipoproteinaemia patients. *Eye* 15, 525–530. <https://doi.org/10.1038/eye.2001.167>
- Clarke, M.W., Hooper, A.J., Headlam, H.A., Wu, J.H.Y., Croft, K.D., Burnett, J.R., 2006. Assessment of tocopherol metabolism and oxidative stress in familial hypobetalipoproteinemia. *Clin. Chem.* 52, 1339–1345. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.068692>
- Cottrill, C., Glueck, C.J., Leuba, V., Millett, F., Puppione, D., Brown, W.V., 1974. Familial homozygous hypobetalipoproteinemia. *Metab. Clin. Exp.* 23, 779–791. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(74\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0026-0495(74)90010-9)
- Hartridge, H., 1951. Macular pigment. *Nature* 167, 76–77. <https://doi.org/10.1038/167076b0>
- Hussain, M.M., 2014. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr. Opin. Lipidol.* 25, 200–206. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000084>
- Illingworth, D.R., Connor, W.E., Miller, R.G., 1980. Abetalipoproteinemia: Report of two cases and review of therapy. *Arch. Neurol.* 37, 659–662. <https://doi.org/10.1001/archneur.1980.00500590083015>

- Koh, H.-H., Murray, I.J., Nolan, D., Carden, D., Feather, J., Beatty, S., 2004. Plasma and macular responses to lutein supplement in subjects with and without age-related maculopathy: a pilot study. *Experimental eye research* 79, 21–27.
- Kruk, J., Kubasik-Kladna, K., Aboul-Enein, H.Y., 2015. The Role Oxidative Stress in the Pathogenesis of Eye Diseases: Current Status and a Dual Role of Physical Activity. *Mini Rev Med Chem* 16, 241–257. <https://doi.org/10.2174/1389557516666151120114605>
- Lee, J., Hegele, R.A., 2014. Abetalipoproteinemia and homozygous hypobetalipoproteinemia: a framework for diagnosis and management. *Journal of inherited metabolic disease* 37, 333–339.
- Levy, E., Poinot, P., Spahis, S., 2019. Chylomicron retention disease: genetics, biochemistry, and clinical spectrum. *Current Opinion in Lipidology* Publish Ahead of Print. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000578>
- Pagon, R.A., 1988. Retinitis pigmentosa. *Surv Ophthalmol* 33, 137–177. [https://doi.org/10.1016/0039-6257\(88\)90085-9](https://doi.org/10.1016/0039-6257(88)90085-9)
- Peretti, N., Sassolas, A., Roy, C.C., Deslandres, C., Charcosset, M., Castagnetti, J., Pugnet-Chardon, L., Moulin, P., Labarge, S., Bouthillier, L., Lachaux, A., Levy, E., 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 Journal of Rare Diseases* 5, 24. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-24>
- Rougier, M.-B., Delyfer, M.-N., Korobelnik, J.-F., 2011. Macular pigment distribution in Stargardt macular disease. *Journal français d'ophtalmologie* 34, 287–293.
- 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., Marcel, Y., Deckelbaum, R.J., 1987. Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology* 92, 390–399. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(87\)90133-8](https://doi.org/10.1016/0016-5085(87)90133-8)
- Saito, K., Maeda, M., Katada, T., 2017. Regulation of the Sar1 GTPase Cycle Is Necessary for Large Cargo Secretion from the Endoplasmic Reticulum. *Front Cell Dev Biol* 5, 75. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00075>
- Sauvant, P., Mekki, N., Charbonnier, M., Portugal, H., Lairon, D., Borel, P., 2003. Amounts and types of fatty acids in meals affect the pattern of retinoids secreted in human chylomicrons after a high-dose preformed vitamin A intake. *Metab. Clin. Exp.* 52, 514–519. <https://doi.org/10.1053/meta.2003.50082>
- Wetterau, J.R., Aggerbeck, L.P., Bouma, M.E., Eisenberg, C., Munck, A., Hermier, M., Schmitz, J., Gay, G., Rader, D.J., Gregg, R.E., 1992. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 258, 999–1001.

## 14. Liste des annexes du protocole

14.1.ANNEXE 1 : Récapitulatif des prélèvements à effectuer chez les patients hypocholestérolémies génétiques lors des deux visites de suivi

LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE MULTI SITE DU CHU DE LYON - BIOLOGIE SPECIALISEE DU GHS & DU GHN		
ANALYSE BIOLOGIQUE	NATURE DU PRELEVEMENT	VOLUME, REFERENCE ET TYPE DE PRELEVEMENT
Vitamine A Vitamine E Caroténoïdes	Sang veineux (Plasma)	<b>4 ml</b> dans tube héparine Li <b>VERT VIF</b> Réf. BD 368496 / HCL 188
Vitamine E érythrocytaire	Sang veineux (Plasma)	<b>4 ml</b> dans tube héparine Li <b>VERT VIF</b> Réf. BD 368496 / HCL 188
Vitamine C	Sang veineux (Plasma)	<b>4 ml</b> dans tube héparine Li <b>VERT VIF</b> Réf. BD 368496 / HCL 188
Malondialdéhyde (MDA) + Glutathion	Sang veineux (Plasma)	<b>4 ml</b> dans tube héparine Li <b>VERT VIF</b> Réf. BD 368496 / HCL 188
Glutathion Peroxydase + Superoxyde Dismutase	Sang veineux (Plasma)	<b>4 ml</b> dans tube héparine Li <b>VERT VIF</b> Réf. BD 368496 / HCL 188
LDL-oxydés	Sang veineux (Sérum)	<b>4 ml</b> dans tube sec + activ coag <b>ROUGE</b> Réf. BD 365904 / HCL 230627
F2-Isoprostanes	Sang veineux (Sérum)	<b>2 ml</b> dans tube sec + activ coag <b>ROUGE</b> Réf. BD 365904 / HCL 230627
	Urine	<b>7 ml</b> dans un tube à urine <b>BEIGE</b> Réf. BD 368501 / HCL 160368
Bilan Hépatique Complet	Sang veineux (Plasma)	<b>3 ml</b> dans tube héparine Li sans gel PST <b>VERT</b>

		Réf. BD 368497 / HCL
<b>LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE MULTI SITE DU CHU DE LYON GHE – CENTRE DE BIOLOGIE ET PATHOLOGIE EST</b>		
<b>ANALYSE BIOLOGIQUE</b>	<b>NATURE DU PRELEVEMENT</b>	<b>VOLUME, REFERENCE ET TYPE DE PRELEVEMENT</b>
Numération Formule Sanguine	Sang veineux	<b>4 ml</b> dans tube EDTA K2 <b>MAUVE</b> Réf. BD 367862 / HCL 230630
Bilan Lipidique Complet	Sang veineux	<b>3 ml</b> dans tube SST <b>JAUNE</b> (sec avec gel) Réf. BD 368498 / HCL 188224

*Caractérisation de la densité du pigment maculaire chez les patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales en lien avec leur statut en caroténoïdes et anti-oxydant.*

*CaCo (CArotenoid in hypoChOlesterolemia)*

**Pr Noël PERETTI**

*Version 3.0 du 16/12/2021*

**PARTIE 1 : INFORMATIONS SUR LA RECHERCHE**

Madame, Monsieur,

Le Pr. Noël Peretti vous propose de participer à une recherche impliquant la personne humaine\*, de type non interventionnel, qui a pour objectif de caractériser la densité du pigment maculaire chez les patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales.

Vous êtes libre d'y participer ou non. Vous pouvez prendre le temps nécessaire pour lire les informations ci-dessous, discuter avec vos proches et votre médecin traitant et poser toutes vos questions au médecin/professionnel de santé de la recherche, appelé investigateur\*. Après avoir obtenu les réponses satisfaisantes à vos questions et disposé d'un délai suffisant de réflexion, vous pourrez alors décider si vous acceptez de participer à la recherche ou non.

## Contexte et justification de la recherche / Pourquoi cette recherche est-elle mise en place ?

Cette étude a été mise en place afin d'améliorer le suivi et le traitement des patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales (abêtalipoprotéïnémie, hypobêtalipoprotéïnémie, maladie de rétention des chylomicrons). Les hypocholestérolémies primaires intestinales (HBL) constituent un groupe de maladies du métabolisme des lipides caractérisées par une baisse permanente du taux de cholestérol dit LDL-cholestérol. Ces maladies se manifestent dès la petite enfance par un retard de croissance, une diarrhée avec stéatorrhée et une intolérance alimentaire aux graisses. Chez les enfants atteints d'hypocholestérolémies primaires sévère, le tableau est dominé par une hypertrophie du foie, une ataxie spinocérébelleuse (dégénérescence du cervelet se traduisant par des troubles de la marche et de l'équilibre) et des carences sévères en vitamines liposolubles (A, D, E, K).

A ce jour, la prise en charge des patients consiste en un régime très pauvre en graisses pour diminuer les troubles intestinaux et une supplémentation en vitamines A et E à fortes doses pour prévenir les séquelles neurologiques et oculaires. Malheureusement, malgré la mise en place d'un traitement précoce, on observe, chez certains patients une perte progressive de la vision de nuit ou de la vision des couleurs qui peut évoluer rapidement vers une cécité. Cette altération de la fonction ophtalmique est caractérisée par une dégradation progressive de la rétine, de la périphérie vers le centre. Or, le centre de la rétine, responsable de la vision centrale et de la vision fine (permettant notamment de lire et de reconnaître les visages), est appelée « macula » ou « tâche jaune ». Elle est constituée de molécules appelées « caroténoïdes » qui forment le « pigment maculaire ». Ce pigment maculaire doit être dense, c'est-à-dire, contenir une forte quantité de caroténoïdes pour une bonne santé de l'œil. Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles présentes dans de nombreux fruits et légumes (carottes par exemple) qui peuvent être mal absorbés en cas d'hypocholestérolémie intestinale génétique. On peut donc supposer qu'il existe une carence en caroténoïdes qui entraîne une diminution de la densité du pigment maculaire et un important stress oxydant pour la rétine.

## Présentation de la recherche / En quoi la recherche consiste-t-elle ?

Cette étude a donc pour but premier de comparer la densité optique du pigment maculaire des patients atteints d'hypocholestérolémies génétiques à celles de patients témoins volontaires comme vous suivis en ophtalmologie mais non atteints par cette hypocholestérolémie génétique. Cette comparaison permettra de déterminer l'éventuel impact de ces pathologies et des carences associées sur l'intégrité de la rétine et de la vision. La fonction ophtalmique sera étudiée à l'aide de 2 examens : 1) un fond d'œil avec 3 mesures photographiques (rétinographie en autofluorescence (photo), tomographie par cohérence optique (photo 3D) et rétinographie en lumière blanche (photo de la rétine)) couplé à 2) une mesure de l'acuité visuelle (tableau de lettres à lire). L'autofluorescence correspond à une simple photo et permet d'analyser plus particulièrement la densité du pigment maculaire (pour plus de détail sur cette mesure, reportez-vous au paragraphe ci-dessous « Traitements / produits / stratégies à l'étude et modalités d'administration / Quel est le traitement / produit / stratégie étudié »). Ces mesures sont considérées par les ophtalmologues comme des examens de routines lors des fonds d'œil mais ne sont pas nécessairement réalisées en systématique. Lors du fond d'œil prévu pour vous, la photo de la mesure d'autofluorescence sera ajoutée si non prévue initialement.

Durant cette étude seront également mesurés les concentrations sanguines en caroténoïdes et en marqueurs de stress oxydant (Glutathion réduit érythrocytaire, Superoxyde dismutase (SOD), Glutathion peroxydase (GPx), Activité de la catalase plasmatique et érythrocytaire, Malondialdéhyde plasmatique et érythrocytaire, Vitamine C plasmatique, Cholestérol oxydé plasmatique, F2-isoprostanes sanguins et urinaires), **uniquement dans le groupe de patients atteints d'hypocholestérolémie primaire intestinale, vous ne serez donc pas concerné par ces analyses sanguines.**



Ces données permettront dans un premier temps de mettre en évidence une éventuelle différence entre la rétine des patients malades et celle des patients témoins. Dans un deuxième temps, cela permettra d'étudier la corrélation entre densité optique du pigment maculaire, taux de caroténoïdes sanguins et/ou niveau de stress oxydant afin de caractériser le rôle éventuel que peut jouer des carences en caroténoïdes dans la diminution de vision constatée à l'âge adulte chez certains patients. Cette étude inclut également un suivi sur un an des patients afin d'étudier une éventuelle évolution des critères étudiés (densité optique, caroténoïdes sanguins et stress oxydant).

Si la carence en caroténoïde est confirmée, et une corrélation trouvée avec la densité de pigment maculaire et/ou un niveau de stress oxydant élevé, ceci ouvrirait alors une nouvelle piste thérapeutique pour les patients atteints d'hypocholestérolémie primaire intestinale en instaurant une supplémentation en caroténoïdes à forte dose avec tentative de contrôle du stress oxydant par ajout de molécules antioxydantes afin de ralentir ou d'améliorer la dégénérescence maculaire.

Cette étude inclura donc, d'une part, des patients atteints d'abêtalipoprotéïnémie ou de maladie de rétention de chylomicrons régulièrement suivis dans le Service « Hépatologie, Gastroentérologie et Nutrition Pédiatrique » à l'Hôpital Femme Mère Enfant de Lyon (GHE-HFME) et dans le service « Service d'endocrinologie, de diabétologie et des maladies métaboliques » de l'Hôpital Louis Pradel (GHE-Pradel) et d'autre part un groupe de patients témoins non atteints d'hypocholestérolémie génétique, non carencé en caroténoïdes et présentant une macula normale malgré la présence d'une autre pathologie oculaire.

### **Traitements / produits / stratégies à l'étude et modalités d'administration / Quel est le traitement / produit / stratégie étudié ?**

La fonction ophtalmique sera étudiée à l'aide de 2 examens déjà réalisés durant le suivi habituel : 1) un fond d'œil avec 3 mesures photographiques (rétinographie en autofluorescence (photo), tomographie par cohérence optique (photo 3D) et rétinographie en lumière blanche (photo de la rétine) couplé à 2) une mesure de l'acuité visuelle (tableau de lettres à lire).

- Rétinographie en autofluorescence : L'autofluorescence est une technique d'imagerie non invasive qui permet de mettre en évidence des dysfonctionnements de l'épithélium pigmentaire. Cet examen est une technique récente, basée sur le principe d'émission de lumière fluorescente de la lipofuscine (naturellement présente dans votre œil) lorsqu'elle est illuminée par une source lumineuse externe. L'analyse des clichés en autofluorescence permet d'identifier toute modification de la répartition habituelle de l'autofluorescence du fond d'œil. En pratique, les anomalies de signal de l'autofluorescence peuvent être liées à une modification de la quantité ou de la composition des fluorophores contenus dans le cytoplasme des cellules de l'épithélium pigmentaire. Ainsi, une diminution de l'opacité de la macula lutea est associée à une diminution de la densité optique du pigment maculaire car liée à une moindre absorption de la lumière bleue par ces pigments. L'appareil utilisé (ophtalmoscope laser à balayage) va ainsi fournir des images de la macula (centre de la rétine). Une image très sombre correspond souvent à la disparition de l'épithélium pigmentaire. Cet examen est non invasif et réalisé en externe (pas d'hospitalisation) mais nécessite une dilatation de pupillaire. C'est cet examen qui va permettre d'évaluer la densité du pigment maculaire.
- Tomographie par cohérence optique (OCT Plex Elite®) : Cet examen consiste à capter une onde lumineuse diffusée par un matériau et afin d'obtenir des images en coupe de la structure de l'œil et notamment de la macula (centre de la rétine) et de reconstituer une image tridimensionnelle. Le patient doit simplement fixer une mire lumineuse centrale via l'objectif tandis qu'un faisceau proche de l'infrarouge va venir balayer sa rétine. Le praticien pilote l'appareil depuis son écran de contrôle, analyse les images et ajuste les paramètres tout en sélectionnant les zones de la rétine ou de la macula qui l'intéressent. La visualisation de la rétine se matérialise par des vues 3D qui

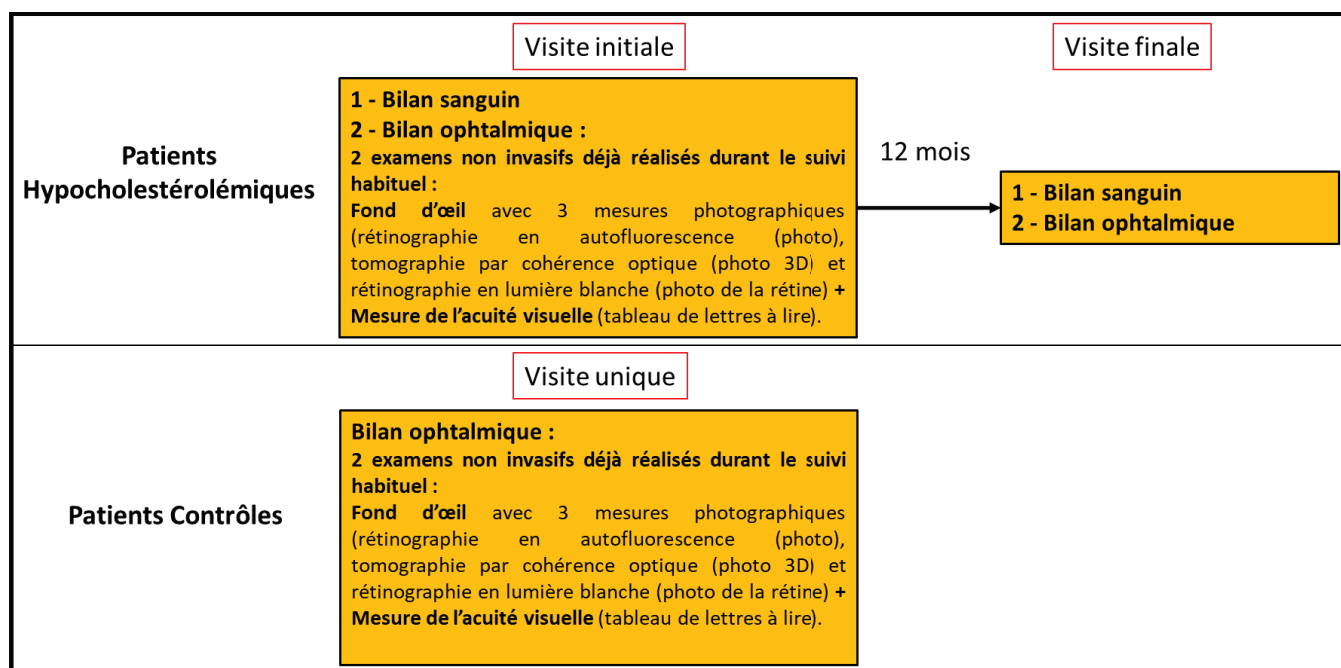
sont en fait des reconstructions informatiques dont l'échelle est fortement modifiée. Cet examen est non invasif et réalisé en externe (pas d'hospitalisation). L'examen se fait avec ou sans dilatation pupillaire. Cet examen permettra de fournir une aide à l'interprétation des clichés obtenus en autofluorescence et par le rétinographe.

- Photographie de l'œil ou rétinographie : La rétinographie est un examen de diagnostic qui, sous la forme de photographies, permet d'obtenir une image du fond de l'œil ou de la rétine. Cette procédure permet de détecter certaines maladies qui affectent la rétine, comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge, la rétinopathie diabétique ou la rétinite pigmentaire. Il s'agit d'un examen de routine effectué systématiquement lors de chaque visite de suivi chez l'ophtalmologue. L'appareil va émettre des flashes et prendre une photo après chaque éclair lumineux. Cet examen dure environ 10 minutes et ne nécessite pas de dilatation des pupilles.
- Acuité visuelle : Cet examen de routine consiste à utiliser un tableau de lettres pour mesurer votre capacité à voir des objets situés à au moins 6 mètres (20 pieds) de distance. Cet examen n'est ni invasif ni contraignant.

Aucun de ces examens n'est invasif mais l'analyse de la macula par autofluorescence nécessite une dilatation, c'est-à-dire un élargissement, de la pupille. Cette dilatation s'obtient par l'instillation d'un collyre dit mydriatique qui est réalisé pour le fond d'œil. A ce titre, veuillez indiquer à l'investigateur (ou le professionnel de santé) tout soupçon d'allergie à ce type de produit.

## Déroulement de la recherche / Comment la recherche se déroule-t-elle ?

Il s'agit d'une étude monocentrique, prospective, cas-témoins portant sur des patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales régulièrement suivis et comportant un ou plusieurs actes ou procédures dénués de risques. Veuillez trouver ci-dessous un schéma de l'étude :



Votre participation à l'étude consistera donc en une visite unique permettant d'effectuer les quatre examens ophtalmiques décrits ci-dessus qui constitueront le bilan ophtalmique. Votre participation à l'étude sera définitivement validée à la condition d'un fond d'œil normal.

Participer à cette étude requiert votre adhésion et l'accord d'effectuer cette visite. Suite à ces examens, si votre fond d'œil apparaît normal, votre participation à l'étude sera validée, en accord avec vous et l'investigateur. Il est donc important que vous en discutiez avec l'investigateur (ou le professionnel de santé) avant de décider de votre participation.

Si vous décidez d'arrêter votre participation à l'étude, vous devrez en informer votre médecin ou le Pr Noël PERETTI.

Celui-ci est également en droit d'arrêter votre participation à l'étude à n'importe quel moment, s'il considère que ceci est dans votre intérêt.

### **Alternatives médicales / Quelles sont les éventuelles alternatives médicales ?**

Non concerné.

### **Bénéfices attendus, contraintes et absence de risque associés aux traitements et procédures spécifiques de la recherche / Quels sont les bénéfices attendus et les contraintes. Justifier l'absence de risque lié à la recherche ?**

Cette étude permettra d'avoir une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la dégradation de la fonction ophtalmique chez les patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales et permettra donc une amélioration de leur prise en charge.

En effet, si la carence en caroténoïde est confirmée, qu'une différence significative a été observée avec la macula des patients témoins et qu'une corrélation a été établie entre densité du pigment maculaire et/ou un niveau de stress oxydant élevé, ceci permettrait alors de proposer des études dans le futur pour envisager une nouvelle piste thérapeutique par supplémentation en caroténoïdes à forte dose et/ou tentative de contrôle du stress oxydant par ajout de molécules antioxydantes afin de ralentir ou d'améliorer la dégénérescence maculaire.

Cette étude ne présente aucun risque pour vous car il s'agit d'une étude non interventionnelle durant laquelle aucun médicament ne vous sera prescrit et aucun acte invasif ne sera pratiqué.

Si vous participez actuellement à un autre protocole de recherche sur la personne humaine, merci d'en informer votre médecin.

### **Remboursement des frais**

La participation à l'étude n'est pas rémunérée mais les frais liés à la recherche sont entièrement pris en charge par le promoteur.

### **Fin de participation / Que se passera-t-il en cas d'arrêt prématuré de la recherche et après la recherche ?**

L'étude s'arrêtera lorsque le dernier patient inclus aura réalisé sa visite de fin de période.

Si vous choisissez de ne pas participer à cette étude vous conserverez tous vos droits garantis par la loi et recevrez les soins nécessaires appropriés.

De même, si vous décidez de participer à cette recherche, mais que vous changiez d'avis au cours de celle-ci, vous pouvez à tout moment demander d'interrompre votre participation à l'étude sans aucun préjudice, sans justification de votre part et sans que votre responsabilité ne soit engagée. Dans ce cas, vos données recueillies jusque-là seront utilisées dans les résultats de l'étude.

Si vous décidez d'arrêter votre participation à l'étude, vous devrez en informer votre médecin ou le Pr Noël PERETTI.

Durant votre participation à l'étude, vous serez informé de toutes découvertes importantes et qui pourrait affecter votre décision de continuer à participer à cette étude.

### **Durée de conservation des données**

Conformément à la réglementation française et européenne, les données de l'étude seront conservées en base active jusqu'à 2 ans après la dernière publication, puis archivées pour une durée de 15 ans.

### **Dispositions législatives et réglementaires**

Conformément à l'article L. 1121-4 du Code de la santé publique, cette recherche a obtenu un avis favorable du Comité de Protection des Personnes de [*nom du CPP*] en date du [*xxx*].

Le traitement de vos données personnelles dans le cadre de la recherche est conforme à une méthodologie de référence (MR) MR-003\* établie par la Commission Nationale Informatique et Libertés (CNIL).

L'assurance de cette recherche non interventionnelle est celle des soins, en cas d'éventuel événement indésirable rapprochez-vous de votre investigateur.

## **PARTIE 2 : INFORMATIONS SUR LES DROITS DU PARTICIPANT ET SUR LA GESTION DES DONNEES RECUEILLIES**

### **Que signifie le principe d'une non-opposition à une recherche impliquant la personne humaine ?**

Votre participation à une recherche impliquant la personne humaine est libre et volontaire : vous êtes libre d'accepter ou de refuser de participer à cette étude recherche et vous pouvez interrompre à tout moment votre participation sans avoir à donner de raison et sans encourir aucune responsabilité ni préjudice de ce fait. Il vous suffit de le signaler à l'investigateur.

Votre décision de participer ou de ne pas participer n'aura aucune conséquence sur votre prise en charge médicale et la qualité de vos soins ou sur votre relation avec l'investigateur.

Pour participer à une recherche non interventionnelle, vous devez exprimer préalablement votre non-opposition après avoir reçu une information claire et compréhensible sur les enjeux et le déroulement de la recherche et sur vos droits en tant que participant.

Vous serez informé(e) par l'investigateur qui vous suit de toute nouvelle information concernant la recherche qui pourrait modifier votre décision d'y participer.

Vous avez le droit d'obtenir communication, au cours ou à l'issue de la recherche, des informations concernant votre santé, détenues par l'investigateur ou, le cas échéant, le médecin ou la personne qualifiée qui le représente.

Si vous le souhaitez, vous pourrez être informé(e) des résultats globaux de cette recherche conformément aux dispositions de l'article L. 1122-1 du code de la santé publique, une fois que celle-ci sera achevée par simple demande auprès du Professeur Noël Peretti.

### **Comment vos données personnelles\* seront-elles traitées dans le cadre de la recherche ?**

Si vous acceptez de participer à la recherche, vos données personnelles, y compris vos données de santé, feront l'objet d'un traitement\* par le promoteur, en qualité de responsable du traitement de ces données.

Les données suivantes seront recueillies :

- Démographiques (âge),
- Anthropométriques (poids, taille),
- Données cliniques (pathologies chroniques ; traitement en cours et durée de chaque traitement ; présence ou non d'une supplémentation en vitamines au moment de l'inclusion et la posologie prescrite)
- Données issues des examens ophtalmiques (Tomographie par Cohérence Optique ou OCT Plex Elite®, Rétinographie par Autofluorescence, Rétinographie en lumière blanche ou photographie du fond d'œil et acuité visuelle).

### **Quelle est la base juridique et la finalité du traitement de vos données personnelles ?**

Le traitement de vos données personnelles est nécessaire à la réalisation de la recherche et est fondé sur la mission d'intérêt public dont est investi le promoteur.

Ce traitement est autorisé car il est nécessaire à des fins de recherche scientifique. Le responsable de traitement doit mettre en œuvre des mesures appropriées permettant de garantir vos droits et libertés, notamment le seul recueil de données strictement nécessaires à la recherche.

Comment la confidentialité de vos données sera-t-elle assurée ?

Vos données personnelles seront traitées de manière confidentielle, conformément à la loi du 6 janvier 1978 modifiée dite « Loi Informatique et Libertés », et conformément au Règlement Général sur la Protection des Données (RGPD\*).

Vos données seront codées\*, c'est-à-dire que vous serez identifié par un numéro de code pour les besoins de la recherche, sans mention de vos noms et prénoms. Seul l'investigateur conservera la liste de correspondance entre le code et votre nom.

## **Qui aura accès à vos données dans le cadre de la recherche ?**

Les informations concernant votre identité (nom, prénom) ne seront connues que par :

- L'équipe médicale vous prenant en charge
- Les personnes réalisant le contrôle de la qualité de la recherche mandatées par le promoteur
- Les autorités sanitaires ou de contrôle,
- Le délégué à la protection des données du promoteur si vous le contactez ([dpo@chu-lyon.fr](mailto:dpo@chu-lyon.fr))

En cas de litige, par le personnel habilité de l'organisme d'assurance du promoteur.

Vos données codées seront accessibles aux personnes suivantes :

- Le promoteur et les personnes agissant pour son compte,
- Les experts indépendants chargés de réanalyser les données pour vérifier les résultats de la recherche, en vue de leur publication, dans des conditions strictes de sécurité.

Ces personnes, soumises au secret professionnel, auront accès à vos données codées dans le cadre de leur fonction et en conformité avec la réglementation.

## **Quels sont vos droits relatifs à vos données personnelles ?**

Vous avez le droit d'accéder à vos données, par l'intermédiaire de l'investigateur, et demander qu'elles soient rectifiées ou complétées.

Vous pouvez également demander la limitation du traitement de vos données (c'est-à-dire demander au promoteur de geler temporairement l'utilisation de vos données).

Même si vous acceptez de participer à la recherche, vous pourrez à tout moment vous opposer au traitement de vos données aux fins de réalisation de la recherche. Dans ce cas, aucune information supplémentaire vous concernant ne sera collectée.

Vous pouvez également exercer votre droit à l'effacement sur les données déjà recueillies mais celles-ci pourront ne pas être effacées si cela rendait impossible ou compromettrait gravement la réalisation des objectifs de la recherche.

De plus, certaines données visant à assurer la qualité et la sécurité de la recherche (par exemple : les effets indésirables des produits testés) doivent obligatoirement être collectées par le promoteur. Vous ne pourrez pas exercer votre droit d'opposition ou d'effacement concernant ces données.

Vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire d'un médecin de votre choix à l'ensemble de vos données médicales en application des dispositions de l'article L. 1111-7 du Code de la Santé Publique.

## **Comment exercer vos droits ?**

Vous pouvez exercer vos droits à tout moment et sans avoir à vous justifier.

Le promoteur n'ayant pas accès à votre identité, il est recommandé de vous adresser, dans un premier temps, à l'investigateur, aux coordonnées disponibles dans la présente note.

Vous pouvez en outre, si vous le souhaitez, exercer vos droits auprès du délégué à la protection des données du promoteur par voie électronique : [dpo@chu-lyon.fr](mailto:dpo@chu-lyon.fr) ou par courrier postal :

Le délégué à la protection des données

162 avenue Lacassagne

Bâtiment A – 3e étage – Bureau 316

69003 LYON.

Qui gèrera cette demande en coordination avec le médecin et les professionnels impliqués dans l'étude. Dans ce cas, votre identité (prénom, nom) sera rendue accessible au délégué à la protection des données du promoteur.

Dans l'hypothèse où vous ne parvenez pas à exercer vos droits, vous disposez également du droit de déposer une réclamation concernant le traitement de vos données personnelles auprès de la Commission nationale de l'informatique et des libertés (CNIL), qui est l'autorité de contrôle compétente en France en matière de protection des données.

## **Vos données codées pourront-elles être réutilisées ?**

Vous pouvez accepter ou refuser le principe de l'utilisation de vos données codées lors de recherches ultérieures, conduites exclusivement à des fins scientifiques dans le domaine de la nutrition humaines et des maladies rares.

Si vous en acceptez le principe, vous serez recontacté(e) pour être informé(e) des caractéristiques du / des nouveaux traitement(s) conformément à l'article 14 du RGPD, et si vous ne vous y opposez pas vos données codées pourront être réutilisées et transmises pour ces autres projets de recherche dans le domaine de la santé.

Cette/ces recherche(s) ultérieure(s) devra(ont) soit être conforme(s) à un référentiel établi par la CNIL si elle(s) entre(nt) dans le cadre d'une procédure simplifiée du fait de ses/leurs caractéristiques, soit faire l'objet d'une autorisation de la CNIL.

Grâce à cette information, vous pourrez choisir d'exercer vos droits d'accès, de rectification, de limitation, d'opposition ou d'effacement de vos données.

Les modalités d'opposition pour chaque projet de recherche seront indiquées sur la note d'information qui vous sera adressée.

Toute l'équipe vous remercie et se tient à votre disposition pour répondre à vos questions.

## Vos contacts

<p><b>Promoteur de la recherche et responsable du traitement</b></p>	<p>Hospices Civils de Lyon          Direction de la Recherche en Santé          BP 2251          3 quai des Célestins,          69229 LYON cedex 02  <a href="http://www.chu-lyon.fr">www.chu-lyon.fr</a></p>
<p><b>Investigateur coordonnateur de la recherche</b></p>	<p>Pr Noël PERETTI – PU-PH (GHE-HFME)          UF nutrition pédiatrique, Service hépatologie, gastroentérologie et nutrition pédiatrique          Hôpital Femme Mère Enfant de Lyon (GHE-HFME)          59, Bd Pinel 69677 BRON cedex          Tél : 04.72.35.70.50 / Fax : 04.27.85.67.66          E-mail : noel.peretti@chu-lyon.fr</p>
<p><b>Investigateur du lieu de recherche</b></p>	<p>Pr Noël PERETTI – PU-PH (GHE-HFME)          UF nutrition pédiatrique, Service hépatologie, gastroentérologie et nutrition pédiatrique          Hôpital/Groupement : Hôpital Femme Mère Enfant de Lyon (GHE-HFME)          Adresse : 59, Bd Pinel 69677 BRON cedex          Tél : 04.72.35.70.50</p>
<p><b>Professionnels de la recherche</b></p>	<p>Claire Bordat          Équipe "LiPo"          Laboratoire Cardiovasculaire, Métabolisme et Nutrition (CarMEN)          Groupement Hospitalier Est          59 bd. Pinel 69500 Bron          claire.bordat@univ-lyon1.fr Email : <a href="mailto:claire.bordat@univ-lyon1.fr">claire.bordat@univ-lyon1.fr</a></p> <p>Emmanuelle Reboul          Équipe "Micronutrition Humaine"          Centre CardioVasculaire et Nutrition          Faculté des Sciences Médicales et Paramédicales          27, boulevard Jean Moulin 13385 Marseille cedex 05</p>




	<p>Tél : 04.91.32.42.78</p> <p>Email : <a href="mailto:Emmanuelle.Reboul@univ-amu.fr">Emmanuelle.Reboul@univ-amu.fr</a></p>
<b>Délégué à la protection des données</b>	<p>Le délégué à la protection des données</p> <p>162 avenue Lacassagne</p> <p>Bâtiment A – 3e étage – Bureau 316</p> <p>69003 LYON</p> <p><a href="mailto:dpo@chu-lyon.fr">dpo@chu-lyon.fr</a></p>
<b>CNIL- Commission nationale de l'Informatique et des libertés</b>	<p>CNIL</p> <p>3 Place de Fontenoy</p> <p>TSA 80715</p> <p>75334 PARIS CEDEX 07</p> <p>La CNIL n'accueille pas le public.</p> <p>Le standard est ouvert tous les jours de 10 h à 12 h et de 14 h à 16 h : 01 53 73 22 22.</p> <p><a href="https://www.cnil.fr/fr/contacter-la-cnil-standard-et-permanences-telephoniques">https://www.cnil.fr/fr/contacter-la-cnil-standard-et-permanences-telephoniques</a></p> <p><a href="https://www.cnil.fr/fr/webform/adresser-une-plainte">https://www.cnil.fr/fr/webform/adresser-une-plainte</a></p>

### **PARTIE 3 : GLOSSAIRE**

<b>Recherche impliquant la personne humaine</b>	Les recherches organisées et pratiquées sur l'être humain en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales sont désignées par le terme « recherche impliquant la personne humaine » (article L. 1121-1 du Code de la santé publique)
<b>Promoteur</b>	Personne physique ou morale responsable de la recherche, qui en assure la gestion et qui vérifie que son financement est prévu.
<b>Investigateur</b>	Personne physique chargée de surveiller et de diriger la recherche sur un lieu de recherche.
<b>RGPD</b>	Règlement Général sur la Protection des Données. Règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016 relatif à la protection des personnes physiques à l'égard du traitement des données à caractère personnel et à la libre circulation de ces données
<b>Résultats globaux</b>	Résultats de la recherche issus de l'analyse de toutes les données de celle-ci.

<b>Données personnelles</b>	Donnée se rapportant à une personne physique identifiée ou identifiable. Les données de santé sont des données à caractère personnel particulières car sensibles.
<b>Données codées Ou pseudo-anonymisées</b>	Le codage ou la pseudo anonymisation consiste à remplacer les données directement identifiantes (nom, prénom, etc.) d'un jeu de données par des données indirectement identifiantes (alias, numéro, etc.).
<b>Méthodologie de référence (MR)</b>	Procédure simplifiée encadrant l'accès aux données de santé pour les promoteurs de recherche
<b>Traitement des données</b>	Un traitement de données personnelles est une opération, ou ensemble d'opérations, portant sur des données personnelles, quel que soit le procédé utilisé (collecte, enregistrement, organisation, conservation, adaptation, modification, extraction, consultation, utilisation, communication par transmission ou diffusion ou toute autre forme de mise à disposition, rapprochement).

	<b>Formulaire de non-opposition étude</b>	DRS DRCI-FOR-0153- v004
---	---	-------------------------------

*Caractérisation de la densité du pigment maculaire chez les patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales en lien avec leur statut en caroténoïdes et anti-oxydant.*

*CaCo (CArotenoid in hypoChOlesterolemia)*

*Pr. Noël PERETTI*

*Version 3.0 du 16/12/2021*

- Je soussigné, Pr. Noël Peretti certifie avoir informé de façon éclairée sur les modalités de cette recherche Madame/Monsieur.....

- Je certifie qu'elle (il) ne s'oppose pas à la recherche   
S'oppose à la recherche

Un exemplaire du document d'information lui a été remis, un exemplaire est conservé dans son dossier. La non-opposition (opposition) est tracée dans le dossier médical.

---

Signature de l'investigateur ou du médecin / professionnel de santé qui le représente ayant informé le/la participant(e)      Date de signature

---

*Caractérisation de la densité du pigment maculaire chez les patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales en lien avec leur statut en caroténoïdes et anti-oxydant.*

*CaCo (CArotenoid in hypoChOlesterolemia)*

**Pr Noël PERETTI**

*Version 3.0 du 16/12/2021*

**PARTIE 1 : INFORMATIONS SUR LA RECHERCHE**

Madame, Monsieur,

Le Pr. Noël Peretti vous propose de participer à une recherche impliquant la personne humaine\*, de type non interventionnel, qui a pour objectif de caractériser la densité du pigment maculaire chez les patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales.

Vous êtes libre d'y participer ou non. Vous pouvez prendre le temps nécessaire pour lire les informations ci-dessous, discuter avec vos proches et votre médecin traitant et poser toutes vos questions au médecin/professionnel de santé de la recherche, appelé investigateur\*. Après avoir obtenu les réponses satisfaisantes à vos questions et disposé d'un délai suffisant de réflexion, vous pourrez alors décider si vous acceptez de participer à la recherche ou non.

## **Contexte et justification de la recherche / Pourquoi cette recherche est-elle mise en place ?**

Cette étude a été mise en place afin d'améliorer le suivi et le traitement de votre pathologie. En effet, avec la prise en charge actuelle, on observe, chez certains patients une perte progressive de la vision de nuit ou de la vision des couleurs qui peut évoluer rapidement vers une cécité. Cette altération de la fonction ophtalmique est caractérisée par une dégradation progressive de la rétine, de la périphérie vers le centre. Or, le centre de la rétine, responsable de la vision centrale et de la vision fine (permettant notamment de lire et de reconnaître les visages), est appelée « macula » ou « tâche jaune ». Elle est constituée de molécules appelées « caroténoïdes » qui forment le « pigment maculaire ». Ce pigment maculaire doit être dense, c'est-à-dire, contenir une forte quantité de caroténoïdes pour une bonne santé de l'œil. Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles présentes dans de nombreux fruits et légumes (carottes par exemple) qui peuvent être mal absorbés en cas d'hypocholestérolémie intestinale génétique. On peut donc supposer qu'il existe une carence en caroténoïdes qui entraîne une diminution de la densité du pigment maculaire et un important stress oxydant pour la rétine.

## **Présentation de la recherche / En quoi la recherche consiste-t-elle ?**

Cette étude a donc pour but premier de comparer la densité optique du pigment maculaire des patients atteints d'hypocholestérolémies génétiques à celles de patients témoins volontaires suivis en ophtalmologie mais non atteints par cette hypocholestérolémie génétique. Cette comparaison permettra de déterminer l'éventuel impact de ces pathologies et des carences associées sur l'intégrité de la rétine et de la vision. La fonction ophtalmique sera étudiée à l'aide de 2 examens : 1) un fond d'œil avec 3 mesures photographiques (rétinographie en autofluorescence (photo), tomographie par cohérence optique (photo 3D) et rétinographie en lumière blanche (photo de la rétine)) couplé à 2) une mesure de l'acuité visuelle (tableau de lettres à lire). L'autofluorescence correspond à une simple photo et permet d'analyser plus particulièrement la densité du pigment maculaire (pour plus de détail sur cette mesure, reportez-vous au paragraphe ci-dessous « Traitements / produits / stratégies à l'étude et modalités d'administration / Quel est le traitement / produit / stratégie étudié »). Ces mesures sont considérées par les ophtalmologues comme des examens de routines lors des fonds d'œil mais ne sont pas nécessairement réalisées en systématique. Lors du fond d'œil prévu pour vous, la photo de la mesure d'autofluorescence sera ajoutée si non prévue initialement.

Durant cette étude seront également mesurés les concentrations sanguines en caroténoïdes et en marqueurs de stress oxydant (Glutathion réduit érythrocytaire, Superoxyde dismutase (SOD), Glutathion peroxydase (GPx), Activité de la catalase plasmatique et érythrocytaire, Malondialdéhyde plasmatique et érythrocytaire, Vitamine C plasmatique, Cholestérol oxydé plasmatique, F2-isoprostanes sanguins et urinaires). Ces analyses complémentaires seront effectuées grâce à un volume de sang supplémentaire de 14 mL prélevé lors de votre prise de sang habituelle dans le cadre de votre suivi. Au total vous serez prélevé de 36 mL de sang (soin + recherche).

Ces données permettront dans un premier temps de mettre en évidence une éventuelle différence entre la rétine des patients atteints d'hypocholestérolémie primaire intestinale et celle des témoins. Dans un deuxième temps, cela permettra d'étudier la corrélation entre densité optique du pigment maculaire, taux de caroténoïdes sanguins et/ou niveau de stress oxydant afin de caractériser le rôle éventuel que peut jouer des carences en caroténoïdes dans la diminution de vision constatée à l'âge adulte chez certains patients. Cette étude inclut également un suivi sur un an des patients afin d'étudier une éventuelle évolution des critères étudiés (densité optique, caroténoïdes sanguins et stress oxydant).

Si la carence en caroténoïde est confirmée, et une corrélation trouvée avec la densité de pigment maculaire et/ou un niveau de stress oxydant élevé, ceci ouvrirait alors une nouvelle piste thérapeutique par supplémentation en caroténoïdes à forte dose et/ou tentative de contrôle du stress

oxydant par ajout de molécules antioxydantes afin de ralentir ou d'améliorer la dégénérescence maculaire.

Cette étude inclura donc, d'une part, des patients atteints d'abêtalipoprotéinémie ou de maladie de rétention de chylomicrons régulièrement suivis dans le Service « Hépatologie, Gastroentérologie et Nutrition Pédiatrique » à l'Hôpital Femme Mère Enfant de Lyon (GHE-HFME) et dans le service « Service d'endocrinologie, de diabétologie et des maladies métaboliques » de l'Hôpital Louis Pradel (GHE-Pradel) et d'autre part un groupe de patients témoins non atteints d'hypocholestérolémie génétique, non carencé en caroténoïdes et présentant une macula normale malgré la présence d'une autre pathologie oculaire.

### **Traitements / produits / stratégies à l'étude et modalités d'administration / Quel est le traitement / produit / stratégie étudié ?**

Votre participation à l'étude ne présente aucun risque. Les traitements, produits, stratégies et modalités d'administration sont autorisés et utilisés conformément à la pratique habituelle. Les seules procédures supplémentaires en lien avec l'étude sont un prélèvement d'un volume de sang supplémentaire lors de la prise de sang effectuée annuellement dans le cadre du suivi de votre pathologie ainsi qu'une collecte des urines matinales. Ces actes ne sont pas de nature à perturber vos soins.

La fonction ophtalmique sera étudiée à l'aide de 2 examens déjà réalisés durant votre suivi habituel : 1) un fond d'œil avec 3 mesures photographiques (rétinographie en autofluorescence (photo), tomographie par cohérence optique (photo 3D) et rétinographie en lumière blanche (photo de la rétine) couplé à 2) une mesure de l'acuité visuelle (tableau de lettres à lire).

- Rétinographie en autofluorescence : L'autofluorescence est une technique d'imagerie non invasive qui permet de mettre en évidence des dysfonctionnements de l'épithélium pigmentaire. Cet examen est une technique récente, basée sur le principe d'émission de lumière fluorescente de la lipofuscine (naturellement présente dans votre œil) lorsqu'elle est illuminée par une source lumineuse externe. L'analyse des clichés en autofluorescence permet d'identifier toute modification de la répartition habituelle de l'autofluorescence du fond d'œil. En pratique, les anomalies de signal de l'autofluorescence peuvent être liées à une modification de la quantité ou de la composition des fluorophores contenus dans le cytoplasme des cellules de l'épithélium pigmentaire. Ainsi, une diminution de l'opacité de la macula lutea est associée à une diminution de la densité optique du pigment maculaire car liée à une moindre absorption de la lumière bleue par ces pigments. L'appareil utilisé (ophtalmoscope laser à balayage) va ainsi fournir des images de la macula (centre de la rétine). Une image très sombre correspond souvent à la disparition de l'épithélium pigmentaire. Cet examen est non invasif et réalisé en externe (pas d'hospitalisation) mais nécessite une dilatation de pupillaire. C'est cet examen qui va permettre d'évaluer la densité du pigment maculaire.
- Tomographie par cohérence optique (OCT Plex Elite®) : Cet examen consiste à capter une onde lumineuse diffusée par un matériau et afin d'obtenir des images en coupe de la structure de l'œil et notamment de la macula (centre de la rétine) et de reconstituer une image tridimensionnelle. Le patient doit simplement fixer une mire lumineuse centrale via l'objectif tandis qu'un faisceau proche de l'infrarouge va venir balayer sa rétine. Le praticien pilote l'appareil depuis son écran de contrôle, analyse les images et ajuste les paramètres tout en sélectionnant les zones de la rétine ou de la macula qui l'intéressent. La visualisation de la rétine se matérialise par des vues 3D qui sont en fait des reconstructions informatiques dont l'échelle est fortement modifiée. Cet examen est non invasif et réalisé en externe (pas d'hospitalisation). L'examen se fait avec ou sans

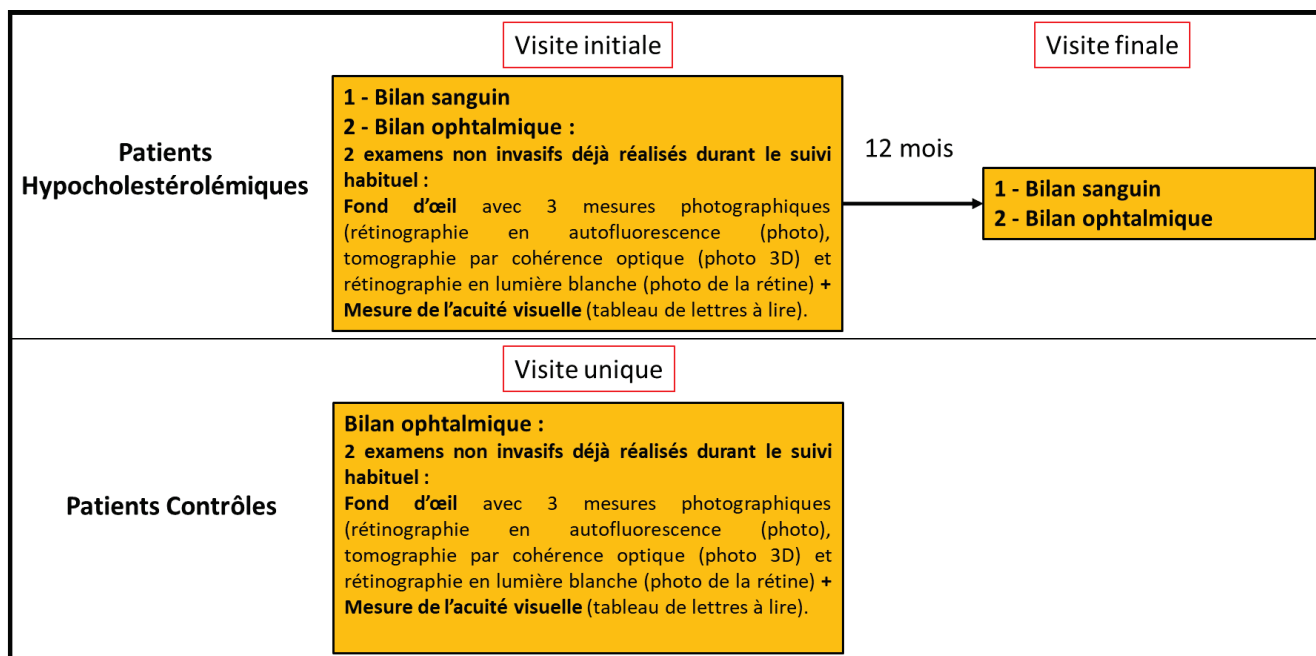
dilatation pupillaire. Cet examen permettra de fournir une aide à l'interprétation des clichés obtenus en autofluorescence et par le rétinographe.

- Photographie de l'œil ou rétinographie : La rétinographie est un examen de diagnostic qui, sous la forme de photographies, permet d'obtenir une image du fond de l'œil ou de la rétine. Cette procédure permet de détecter certaines maladies qui affectent la rétine, comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge, la rétinopathie diabétique ou la rétinite pigmentaire. Il s'agit d'un examen de routine effectué systématiquement lors de chaque visite de suivi chez l'ophtalmologue. L'appareil va émettre des flashes et prendre une photo après chaque éclair lumineux. Cet examen dure environ 10 minutes et ne nécessite pas de dilatation des pupilles.
- Acuité visuelle : Cet examen de routine consiste à utiliser un tableau de lettres pour mesurer votre capacité à voir des objets situés à au moins 6 mètres (20 pieds) de distance. Cet examen n'est ni invasif ni contraignant.

Aucun de ces examens n'est invasif mais l'analyse de la macula par autofluorescence nécessite une dilatation, c'est-à-dire un élargissement, de la pupille. Cette dilatation s'obtient par l'instillation d'un collyre dit mydriatique. A ce titre, veuillez indiquer à l'investigateur (ou le professionnel de santé) tout soupçon d'allergie à ce type de produit.

### Déroulement de la recherche / Comment la recherche se déroule-t-elle ?

Il s'agit d'une étude monocentrique, prospective, cas-témoins portant sur des patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales régulièrement suivis et comportant un ou plusieurs actes ou procédures dénués de risques. Veuillez trouver ci-dessous un schéma de l'étude :



Cette étude ne comprend aucune procédure particulière mais nécessite le prélèvement d'un volume de sang supplémentaire lors de la prise de sang effectuée durant les deux visites. Au total, 36 ml de sang (22 ml pour le soin et 14 ml dans le cadre de la recherche) seront prélevés dans 10 tubes

différents pour permettre les analyses. Un tableau détaillant les analyses est joint ci-dessous. De plus, un prélèvement des urines matinales vous sera demandé la veille de la visite afin que vous puissiez confier ce prélèvement à votre médecin le jour de la visite. Les échantillons seront conservés 1 an à partir de la fin de l'étude.

Dosages sanguins et examens prévus et pris en charge dans le cadre de votre suivi	
Dosages sanguins	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitamine A/E (4 ml)</li> <li>- Vitamine E érythrocytaire (4 ml)</li> <li>- Vitamine C (4 ml)</li> <li>- Bilan lipidique (3 ml)</li> <li>- Bilan hépatique (3 ml)</li> <li>- Numération Formule Sanguine (4 ml)</li> </ul>
Examens ophtalmiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tomographie par cohérence optique (OCT Plex Elite®)</li> <li>- Rétinographie par Autofluorescence</li> <li>- Rétinographie en lumière blanche (photographie du fond d'œil)</li> <li>- Acuité visuelle</li> </ul>

Dosages sanguins et examens spécifiques à l'étude	
Dosages sanguins	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Caroténoïdes (pas de volume supplémentaire)</li> <li>- Glutathion peroxydase (GPx) / Superoxyde Dismutase (SOD) (4 ml)</li> <li>- Malondialdéhyde plasmatique et érythrocytaire / Glutathion réduit érythrocytaire (4 ml)</li> <li>- Cholestérol oxydé plasmatique (4 ml)</li> <li>- F2-isoprostanes (2 ml)</li> </ul>
Dosages urinaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>- F2-isoprostanes (7 ml)</li> </ul>



Participer à cette étude requiert votre adhésion et le respect du calendrier. Il est important que vous en discutiez avec l'investigateur (ou le professionnel de santé) avant de décider de votre participation.

Si vous décidez d'arrêter votre participation à l'étude, vous devrez en informer votre médecin ou le Pr Noël PERETTI.

Celui-ci est également en droit d'arrêter votre participation à l'étude à n'importe quel moment, s'il considère que ceci est dans votre intérêt.

### **Alternatives médicales / Quelles sont les éventuelles alternatives médicales ?**

Non concerné. La participation à cette étude ne modifiant en aucun cas votre prise en charge, aucune alternative n'est nécessaire en cas de non-participation.

### **Bénéfices attendus, contraintes et absence de risque associés aux traitements et procédures spécifiques de la recherche / Quels sont les bénéfices attendus et les contraintes. Justifier l'absence de risque lié à la recherche ?**

Cette étude permettra d'avoir une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la dégradation de la fonction ophtalmique et permettra donc une amélioration de votre prise en charge et de celle de tous les patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales.

En effet, si la carence en caroténoïde est confirmée, qu'une différence significative a été observée avec la macula des patients témoins et qu'une corrélation a été établie entre densité du pigment maculaire et/ou un niveau de stress oxydant élevé, ceci permettrait alors de proposer des études dans le futur pour envisager une nouvelle piste thérapeutique par supplémentation en caroténoïdes à forte dose et/ou tentative de contrôle du stress oxydant par ajout de molécules antioxydantes afin de ralentir ou d'améliorer la dégénérescence maculaire.

Cette étude ne présente aucun risque pour vous car il s'agit d'une étude non interventionnelle durant laquelle aucun médicament ne vous sera prescrit et aucun acte supplémentaire à votre prise en charge ne sera effectué.

Si vous participez actuellement à un autre protocole de recherche sur la personne humaine, merci d'en informer votre médecin.

### **Remboursement des frais**

La participation à l'étude n'est pas rémunérée mais les frais liés à la recherche sont entièrement pris en charge par le promoteur.

### **Fin de participation / Que se passera-t-il en cas d'arrêt prématuré de la recherche et après la recherche ?**

L'étude s'arrêtera lorsque le dernier patient inclus aura réalisé sa visite de fin de période.

Si vous choisissez de ne pas participer à cette étude vous conserverez tous vos droits garantis par la loi et recevrez les soins nécessaires appropriés.

De même, si vous décidez de participer à cette recherche, mais que vous changiez d'avis au cours de celle-ci, vous pouvez à tout moment demander d'interrompre votre participation à l'étude sans aucun préjudice, sans justification de votre part et sans que votre responsabilité ne soit engagée. Dans ce cas, vos données recueillies jusque-là seront utilisées dans les résultats de l'étude.

Si vous décidez d'arrêter votre participation à l'étude, vous devrez en informer votre médecin ou le Pr Noël PERETTI.

Durant votre participation à l'étude, vous serez informé de toutes découvertes importantes et qui pourrait affecter votre décision de continuer à participer à cette étude.

### **Durée de conservation des données**

Conformément à la réglementation française et européenne, les données de l'étude seront conservées en base active jusqu'à 2 ans après la dernière publication, puis archivées pour une durée de 15 ans.

### **Dispositions législatives et réglementaires**

Conformément à l'article L. 1121-4 du Code de la santé publique, cette recherche a obtenu un avis favorable du Comité de Protection des Personnes de [*nom du CPP*] en date du [*xxx*].

Le traitement de vos données personnelles dans le cadre de la recherche est conforme à une méthodologie de référence (MR) MR-003\* établie par la Commission Nationale Informatique et Libertés (CNIL).

L'assurance de cette recherche non interventionnelle est celle des soins, en cas d'éventuel événement indésirable rapprochez-vous de votre investigateur.

## **PARTIE 2 : INFORMATIONS SUR LES DROITS DU PARTICIPANT ET SUR LA GESTION DES DONNEES RECUEILLIES**

### **Que signifie le principe d'une non-opposition à une recherche impliquant la personne humaine ?**

Votre participation à une recherche impliquant la personne humaine est libre et volontaire : vous êtes libre d'accepter ou de refuser de participer à cette étude recherche et vous pouvez interrompre à tout moment votre participation sans avoir à donner de raison et sans encourir aucune responsabilité ni préjudice de ce fait. Il vous suffit de le signaler à l'investigateur.

Votre décision de participer ou de ne pas participer n'aura aucune conséquence sur votre prise en charge médicale et la qualité de vos soins ou sur votre relation avec l'investigateur.

Pour participer à une recherche non interventionnelle, vous devez exprimer préalablement votre non-opposition après avoir reçu une information claire et compréhensible sur les enjeux et le déroulement de la recherche et sur vos droits en tant que participant.

Vous serez informé(e) par l'investigateur qui vous suit de toute nouvelle information concernant la recherche qui pourrait modifier votre décision d'y participer.

Vous avez le droit d'obtenir communication, au cours ou à l'issue de la recherche, des informations concernant votre santé, détenues par l'investigateur ou, le cas échéant, le médecin ou la personne qualifiée qui le représente.

Si vous le souhaitez, vous pourrez être informé(e) des résultats globaux de cette recherche conformément aux dispositions de l'article L. 1122-1 du code de la santé publique, une fois que celle-ci sera achevée, selon les modalités suivantes par simple demande auprès du Professeur Noël Peretti.

### **Comment vos données personnelles\* seront-elles traitées dans le cadre de la recherche ?**

Si vous acceptez de participer à la recherche, vos données personnelles, y compris vos données de santé, feront l'objet d'un traitement\* par le promoteur, en qualité de responsable du traitement de ces données.

Les données suivantes seront recueillies :

- Démographiques (âge),
  - Anthropométriques (poids, taille),
  - Données cliniques (pathologies chroniques ; traitement en cours et durée de chaque traitement ; présence ou non d'une supplémentation en vitamines au moment de l'inclusion et la posologie prescrite),
  - Données biochimiques : bilan lipidique (TG, LDL-c, HDL-c, cholestérol total, apoB) ; bilan hépatique (ASAT, ALAT, GGT, bilirubine totale et conjuguée) ; bilan sanguin : leucocytes (G/l), Polynucléaires neutrophiles (G/l), Hémoglobine (G/l), Plaquettes (G/l), Albumine (g/l), Taux Prothrombine (%), Facteur V (%).
  - Vitamines A, E, C et caroténoïdes plasmatiques
  - Vitamine E érythrocytaire
- Marqueurs de stress oxydant : Malondialdéhyde (MDA), Glutathion, Glutathion Peroxydase, Superoxyde Dismutase plasmatiques, LDL-oxydés sériques et F2-Isoprostanes plasmatiques et urinaires

- Données issues des examens ophtalmiques (Tomographie par Cohérence Optique ou OCT Plex Elite®, Rétinographie par Autofluorescence, Rétinographie en lumière blanche ou photographie du fond d'œil et acuité visuelle).

## **Quelle est la base juridique et la finalité du traitement de vos données personnelles ?**

Le traitement de vos données personnelles est nécessaire à la réalisation de la recherche et est fondé sur la mission d'intérêt public dont est investi le promoteur.

Ce traitement est autorisé car il est nécessaire à des fins de recherche scientifique. Le responsable de traitement doit mettre en œuvre des mesures appropriées permettant de garantir vos droits et libertés, notamment le seul recueil de données strictement nécessaires à la recherche.

## **Comment la confidentialité de vos données sera-t-elle assurée ?**

Vos données personnelles seront traitées de manière confidentielle, conformément à la loi du 6 janvier 1978 modifiée dite « Loi Informatique et Libertés », et conformément au Règlement Général sur la Protection des Données (RGPD\*).

Vos données seront codées\*, c'est-à-dire que vous serez identifié par un numéro de code pour les besoins de la recherche, sans mention de vos noms et prénoms. Seul l'investigateur conservera la liste de correspondance entre le code et votre nom.

## **Qui aura accès à vos données dans le cadre de la recherche ?**

Les informations concernant votre identité (nom, prénom) ne seront connues que par

- L'équipe médicale vous prenant en charge
- Les personnes réalisant le contrôle de la qualité de la recherche mandatées par le promoteur
- Les autorités sanitaires ou de contrôle,
- Le délégué à la protection des données du promoteur si vous le contactez ([dpo@chu-lyon.fr](mailto:dpo@chu-lyon.fr))

En cas de litige, par le personnel habilité de l'organisme d'assurance du promoteur.

Vos données codées seront accessibles aux personnes suivantes :

- Le promoteur et les personnes agissant pour son compte,
- Les experts indépendants chargés de réanalyser les données pour vérifier les résultats de la recherche, en vue de leur publication, dans des conditions strictes de sécurité.

Ces personnes, soumises au secret professionnel, auront accès à vos données codées dans le cadre de leur fonction et en conformité avec la réglementation.

## **Quels sont vos droits relatifs à vos données personnelles ?**

Vous avez le droit d'accéder à vos données, par l'intermédiaire de l'investigateur, et demander à ce qu'elles soient rectifiées ou complétées.

Vous pouvez également demander la limitation du traitement de vos données (c'est-à-dire demander au promoteur de geler temporairement l'utilisation de vos données).

Même si vous acceptez de participer à la recherche, vous pourrez à tout moment vous opposer au traitement de vos données aux fins de réalisation de la recherche. Dans ce cas, aucune information supplémentaire vous concernant ne sera collectée.

Vous pouvez également exercer votre droit à l'effacement sur les données déjà recueillies mais celles-ci pourront ne pas être effacées si cela rendait impossible ou compromettrait gravement la réalisation des objectifs de la recherche.

De plus, certaines données visant à assurer la qualité et la sécurité de la recherche (par exemple : les effets indésirables des produits testés) doivent obligatoirement être collectées par le promoteur. Vous ne pourrez pas exercer votre droit d'opposition ou d'effacement concernant ces données.

Vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire d'un médecin de votre choix à l'ensemble de vos données médicales en application des dispositions de l'article L. 1111-7 du Code de la Santé Publique.

### **Comment exercer vos droits ?**

Vous pouvez exercer vos droits à tout moment et sans avoir à vous justifier.

Le promoteur n'ayant pas accès à votre identité, il est recommandé de vous adresser, dans un premier temps, à l'investigateur, aux coordonnées disponibles dans la présente note.

Vous pouvez en outre, si vous le souhaitez, exercer vos droits auprès du délégué à la protection des données du promoteur par voie électronique : [dpo@chu-lyon.fr](mailto:dpo@chu-lyon.fr) ou par courrier postal :

Le délégué à la protection des données

162 avenue Lacassagne

Bâtiment A – 3<sup>e</sup> étage – Bureau 316

69003 LYON.

Qui gèrera cette demande en coordination avec le médecin et les professionnels impliqués dans l'étude. Dans ce cas, votre identité (prénom, nom) sera rendue accessible au délégué à la protection des données du promoteur.

Dans l'hypothèse où vous ne parvenez pas à exercer vos droits, vous disposez également du droit de déposer une réclamation concernant le traitement de vos données personnelles auprès de la Commission nationale de l'informatique et des libertés (CNIL), qui est l'autorité de contrôle compétente en France en matière de protection des données.

### **Vos données codées pourront-elles être réutilisées ?**

Vous pouvez accepter ou refuser le principe de l'utilisation de vos données codées lors de recherches ultérieures, conduites exclusivement à des fins scientifiques dans le domaine de la nutrition humaine et des maladies rares.

Si vous en acceptez le principe, vous serez recontacté(e) pour être informé(e) des caractéristiques du / des nouveaux traitement(s) conformément à l'article 14 du RGPD, et si vous ne vous y opposez pas vos données codées pourront être réutilisées et transmises pour ces autres projets de recherche dans le domaine de la santé.

Cette/ces recherche(s) ultérieure(s) devra(ont) soit être conforme(s) à un référentiel établi par la CNIL si elle(s) entre(nt) dans le cadre d'une procédure simplifiée du fait de ses/leurs caractéristiques, soit faire l'objet d'une autorisation de la CNIL.

Grâce à cette information, vous pourrez choisir d'exercer vos droits d'accès, de rectification, de limitation, d'opposition ou d'effacement de vos données.

Les modalités d'opposition pour chaque projet de recherche seront indiquées sur la note d'information qui vous sera adressée.

Toute l'équipe vous remercie et se tient à votre disposition pour répondre à vos questions.

## Vos contacts

<p><b>Promoteur de la recherche et responsable du traitement</b></p>	<p>Hospices Civils de Lyon          Direction de la Recherche en Santé          BP 2251          3 quai des Célestins,          69229 LYON cedex 02  <a href="http://www.chu-lyon.fr">www.chu-lyon.fr</a></p>
<p><b>Investigateur coordonnateur de la recherche</b></p>	<p>Pr Noël PERETTI – PU-PH (GHE-HFME)          UF nutrition pédiatrique, Service hépatologie, gastroentérologie et nutrition pédiatrique          Hôpital Femme Mère Enfant de Lyon (GHE-HFME)          59, Bd Pinel 69677 BRON cedex          Tél : 04.72.35.70.50 / Fax : 04.27.85.67.66          E-mail : noel.peretti@chu-lyon.fr</p>
<p><b>Investigateur du lieu de recherche</b></p>	<p>Pr Noël PERETTI – PU-PH (GHE-HFME)          UF nutrition pédiatrique, Service hépatologie, gastroentérologie et nutrition pédiatrique          Hôpital/Groupement : Hôpital Femme Mère Enfant de Lyon (GHE-HFME)          Adresse : 59, Bd Pinel 69677 BRON cedex          Tél : 04.72.35.70.50</p>
<p><b>Professionnels de la recherche</b></p>	<p>Claire Bordat          Équipe "LiPo"          Laboratoire Cardiovasculaire, Métabolisme et Nutrition (CarMEN)          Groupement Hospitalier Est          59 bd. Pinel 69500 Bron          claire.bordat@univ-lyon1.fr Email :  <a href="mailto:claire.bordat@univ-lyon1.fr">claire.bordat@univ-lyon1.fr</a></p> <p>Emmanuelle Reboul          Équipe "Micronutrition Humaine"          Centre CardioVasculaire et Nutrition          Faculté des Sciences Médicales et Paramédicales          27, boulevard Jean Moulin 13385 Marseille cedex 05</p>


	<p>Tél : 04.91.32.42.78</p> <p>Email : <a href="mailto:Emmanuelle.Reboul@univ-amu.fr">Emmanuelle.Reboul@univ-amu.fr</a></p>
<b>Délégué à la protection des données</b>	<p>Le délégué à la protection des données</p> <p>162 avenue Lacassagne</p> <p>Bâtiment A – 3e étage – Bureau 316</p> <p>69003 LYON</p> <p><a href="mailto:dpo@chu-lyon.fr">dpo@chu-lyon.fr</a></p>
<b>CNIL- Commission nationale de l'Informatique et des libertés</b>	<p>CNIL</p> <p>3 Place de Fontenoy</p> <p>TSA 80715</p> <p>75334 PARIS CEDEX 07</p> <p>La CNIL n'accueille pas le public.</p> <p>Le standard est ouvert tous les jours de 10 h à 12 h et de 14 h à 16 h : 01 53 73 22 22.</p> <p><a href="https://www.cnil.fr/fr/contacter-la-cnil-standard-et-permanences-telephoniques">https://www.cnil.fr/fr/contacter-la-cnil-standard-et-permanences-telephoniques</a></p> <p><a href="https://www.cnil.fr/fr/webform/adresser-une-plainte">https://www.cnil.fr/fr/webform/adresser-une-plainte</a></p>

### **PARTIE 3 : GLOSSAIRE**

<b>Recherche Impliquant la personne humaine</b>	<p>Les recherches organisées et pratiquées sur l'être humain en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales sont désignées par le terme « recherche impliquant la personne humaine » (article L. 1121-1 du Code de la santé publique)</p>
<b>Promoteur</b>	<p>Personne physique ou morale responsable de la recherche, qui en assure la gestion et qui vérifie que son financement est prévu.</p>
<b>Investigateur</b>	<p>Personne physique chargée de surveiller et de diriger la recherche sur un lieu de recherche.</p>
<b>RGPD</b>	<p>Règlement Général sur la Protection des Données.</p> <p>Règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016 relatif à la protection des personnes physiques à l'égard du traitement des données à caractère personnel et à la libre circulation de ces données</p>
<b>Résultats globaux</b>	<p>Résultats de la recherche issus de l'analyse de toutes les données de celle-ci.</p>



<b>Données personnelles</b>	Donnée se rapportant à une personne physique identifiée ou identifiable. Les données de santé sont des données à caractère personnel particulières car sensibles.
<b>Données codées Ou pseudo-anonymisées</b>	Le codage ou la pseudo-anonymisation consiste à remplacer les données directement identifiantes (nom, prénom, etc.) d'un jeu de données par des données indirectement identifiantes (alias, numéro, etc.).
<b>Méthodologie de référence (MR)</b>	Procédure simplifiée encadrant l'accès aux données de santé pour les promoteurs de recherche
<b>Traitement des données</b>	Un traitement de données personnelles est une opération, ou ensemble d'opérations, portant sur des données personnelles, quel que soit le procédé utilisé (collecte, enregistrement, organisation, conservation, adaptation, modification, extraction, consultation, utilisation, communication par transmission ou diffusion ou toute autre forme de mise à disposition, rapprochement).

	<b>Formulaire de non-opposition étude</b>	DRS  DRCI-FOR-0153- v004
---	---	-----------------------------------

*Caractérisation de la densité du pigment maculaire chez les patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales en lien avec leur statut en caroténoïdes et anti-oxydant.*

*CaCo (CArotenoid in hypoChOlesterolemia)*

*Pr Noël PERETTI*

*Version 3.0 du 16/12/2021*

- Je soussigné, Pr. Noël Peretti certifie avoir informé de façon éclairée sur les modalités de cette recherche Madame/Monsieur .....

- Je certifie qu'elle (il) ne s'oppose pas à la recherche   
 s'oppose à la recherche

Un exemplaire du document d'information lui a été remis, un exemplaire est conservé dans son dossier. La non opposition (opposition) est tracée dans le dossier médical.

---

Signature de l'investigateur ou du médecin / professionnel de santé qui le représente ayant informé le/la participant(e) \_\_\_\_\_ Date de signature \_\_\_\_\_

---

## Avis final du Comité de protection des personnes Comité de protection des personnes Ile de France I sur Demande Initiale

Paris, le 13 janvier 2022

**Réf. CPP : CPPIDF1-2021-ND99-cat.3**

**Numéro SI : 21.04365.000059**

### Informations CPP

**Nom du CPP :** Comité de protection des personnes Ile de France I  
**Adresse :** Hôpital Hôtel Dieu - 1, place du Parvis Notre dame 75004 PARIS France  
**Courriel :** cppidf1.htd@aphp.fr  
**Numéro de téléphone :** 0142348052

### Informations promoteur

**Organisme :** Hospices Civils de Lyon  
**Nom et prénom :** PACHOT Alexandre  
**Courriel :** drci\_promo@chu-lyon.fr  
**Copie à :** aec-essaiscliniques@ansm.sante.fr

1

### Investigateur

**Investigateur :** Pr Noel PERETTI

### Informations dossier

**Numéro national :** 2021-A01785-36  
**Référence interne :** 69HCL21\_0720  
**Règlementation :** Loi Jardé  
**Qualification de recherche :** Catégorie 3  
**Produit ou acte :** Hors produits de santé (produits non mentionnés à l'article L.5311-11 du code de la santé publique)  
**Titre :** " Caractérisation de la densité du pigment maculaire chez les patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales en lien avec leur statut en caroténoïdes et anti-oxydant : CaCo"

### Personnes ayant délibéré

Collège	Catégorie	Nom et prénom
Collège I	Spécialiste de médecine générale	Pérignon Jean-Louis
Collège I	Qualification RIPH - Autre	Traiffort Elisabeth
Collège I	Qualification RIPH - Autre	Frija Elisabeth
Collège II	Représentant d'association agréée	Bouffier Emmanuelle

Collège II	Compétence juridique	Deng Charlotte
Collège II	Représentant d'association agréée	Labroquère Claudine
Collège II	Représentant d'association agréée	Barrière Marianne
		de Crécy Hélène

#### Documents analysés par le CPP

Catégorisation	Intitulé	Date de dépôt
ATT - Attestation	2021-A01785-36_ATTSTATION_engagement_CPP_V1_du_20211203_CaCo.docx.pdf	03/12/2021
COU - Courrier	2021-A01785-36_COURRIER_CPP_V1_du_20211203_CaCo.docx.pdf	03/12/2021
CVI - CV investigateurs	2021-A01785-36_CV S.CHARRIERE 2021_CaCo.pdf	03/12/2021
CVI - CV investigateurs	2021-A01785-36_CV L.KODJIKIAN 2021_CaCo.pdf	03/12/2021
CVI - CV investigateurs	2021-A01785-36_CV Sarah Verrecchia 2021_CaCo.pdf	03/12/2021
CVI - CV investigateurs	2021-A01785-36_CV P.MOULIN 2021_CaCo.pdf	03/12/2021
CVI - CV investigateurs	2021-A01785-36_CV N.PERETTI 2021_CaCo.pdf	03/12/2021
DEM - Demande autorisation	2021-A01785-36_DEMANDE_CPP_V1_du_20211203_CaCo.docx.pdf	03/12/2021
DOC - Autres documents	2021-A01785-36_Document Réponse aux remarques et demandes CPP_V1 du 20211217_CaCo-V1.pdf	17/12/2021
DON - Données : preuve de conformité du traitement des données	2021-A01785-36_DONNEES_CPP_V1_du_20211203_CaCo.docx.pdf	03/12/2021
DON - Données : preuve de conformité du traitement des données	Recepisse_MR003_2016.pdf	03/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_13-17 ans_Patient_V2 du 20211123_CaCo.pdf	03/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_13-17 ans_TEMOINS_V2 du 20211123_CaCo.pdf	03/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Adulte_V2 du 20211123_CaCo.pdf	03/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Adulte_TEMOINS_V2 du 20211123_CaCo.pdf	03/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Enfants de 6 à 12 ans_V2 du 20211123_CaCo.pdf	03/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Enfants TEMOINS de 6 à 12 ans_V2 du 20211123_CaCo.pdf	03/12/2021

INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Parents_Enfants TEMOINS_V2 du 20211123_CaCo.pdf	03/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Parents_V2 du 20211123_CaCo.pdf	03/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_13-17 ans_TEMOINS_sma_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_13-17 ans_Patient_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_13-17 ans_Patient_sma_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_13-17 ans_TEMOINS_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Adulte_sma_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Adulte_TEMOINS_sma_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Adulte_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Adulte_TEMOINS_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Enfants de 6 à 12 ans_sma_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Enfants TEMOINS de 6 à 12 ans_sma_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Enfants de 6 à 12 ans_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Enfants TEMOINS de 6 à 12 ans_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Parents_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Parents_Enfants TEMOINS_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Parents_sma_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
INF - Doc Information	2021-A01785-36_NFIC_Parents_Enfants TEMOINS_sma_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
LIS - Liste investigateurs	2021-A01785-36_Liste - des investigateurs_V1 du 20211027_CaCo.pdf	03/12/2021
PRO - Protocole	2021-A01785-36_PROTOCOLE_V2 du 20211123_CaCo.pdf	03/12/2021
PRO - Protocole	2021-A01785-36_PROTOCOLE_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
PRO - Protocole	2021-A01785-36_PROTOCOLE_sma_V3 du 20211216_CaCo.pdf	17/12/2021
QUE - Echelles/questionnaires	Non applicable .pdf	03/12/2021
REP - Courrier de réponse	2021-A01785-36_COURRIER_Réponse_aux_remarques_et_demandes_CPP_V1 du 20211201_CaCo.pdf	03/12/2021
REP - Courrier de réponse	2021-A01785-36_Courrier réponse demandes CPP_V1 du 20211217_CaCo.docx.pdf	17/12/2021

RES - Résumé	2021-A01785-36_RESUME_auto-éval_V2 du 20211123_CaCo.pdf	03/12/2021
--------------	---	------------

Ce dossier a été étudié en séance le **11/01/2022**. C'est la date de la notification de l'avis sur le SI qui fait foi.

### Avis favorable

*Cet avis est valable deux ans. Si vous n'avez pas été en mesure d'inclure des participants dans ce délai, vous pouvez demander au CPP une prorogation de cet avis avant la fin de validité de ce dernier (voir en ce sens l'article R.1123-26 du code de la santé publique).*

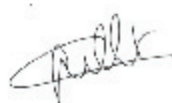
#### Personnes ayant délibéré

Collège	Catégorie	Nom et prénom
Collège I	Qualification RIPH - Biostatistique ou épidémiologie	Couffignal Camille
Collège I	Qualification RIPH - Autre	Traiffort Elisabeth
Collège I	Qualification RIPH - Autre	Frija Elisabeth
Collège I	Spécialiste de médecine générale	Pérignon Jean-Louis
Collège I	Qualification RIPH - Autre	Golinelli Danielle
Collège I	Spécialiste de médecine générale	Grillot-Courvalin Catherine
Collège I	Qualification RIPH - Autre	Sagnes Sandrine
Collège I	Qualification RIPH - Biostatistique ou épidémiologie	Bardin Christophe
Collège II	Représentant d'association agréée	Barrière Marianne
Collège II	Compétence éthique	Zucker Jean-Michel
Collège II	Compétence éthique	de Rochegonde Thierry
Collège II	Représentant d'association agréée	Labroquère Claudine
Collège II	Compétence juridique	Vernerey Marie-Fleur
Collège II	Compétence juridique	Deng Charlotte
Collège II	Compétence en sciences humaines et sociales ou action sociale	Mazin Catherine

4

Catherine Grillot-Courvalin

Présidente du CPP IDF1



## Caractérisation du déficit en vitamine E et caroténoïdes chez les patients atteints d'hypobétalipoprotéïnémies familiales

Les hypobétalipoprotéïnémies familiales sont un groupe de pathologies héréditaires caractérisées par une hypocholestérolémie sévère, dues à un défaut d'assemblage et de sécrétion des lipoprotéines et un syndrome de malabsorption des lipides. Ces maladies nécessitent une prise en charge précoce associant un régime hypolipidique, et une vitaminothérapie substitutive à fortes doses, pour prévenir l'apparition des complications neuro-ophtalmiques. Or, deux problématiques subsistent : les taux sériques de vitamine E ne sont jamais restaurés et la supplémentation en vitamine A ne permet pas de prévenir l'apparition d'une rétinite pigmentaire. La compréhension des mécanismes d'absorption des nutriments liposolubles dans ces pathologies est essentielle afin de justifier un ajustement de la prise en charge des patients avec des formes galéniques plus efficaces et/ou des suppléments complémentaires en caroténoïdes. Pour cela l'étude de la biodisponibilité des formes galéniques de vitamine E selon la pathologie est un élément important. De plus l'absence de modèle cellulaire d'entérocyte mimant la maladie est un obstacle majeur à cette meilleure compréhension de l'absorption de ces composés liposolubles. Pour ces raisons, notre première étude fondamentale avait pour but de comparer la biodisponibilité des différentes formes de vitamine E dans un modèle entérocytaire classiques (Caco-2). Dans un deuxième temps, nous avons développé un nouveau modèle cellulaire par invalidation des gènes responsables des FHBL, afin de tester in vitro l'absorption de ces formes galéniques ainsi que l'absorption des caroténoïdes. Cette étude fondamentale est complétée par une étude clinique de corrélation entre le statut des patients en caroténoïdes et leur fonction ophtalmique. Nos travaux montrent que l'absorption-sécrétion de vitamine E dans un modèle entérocytaire classiques (Caco-2) est plus importante avec le tocophérol sous forme libre, intermédiaire avec la forme acétate de tocophérol (TAC) et significativement plus faible sous la forme pégylée (TPGS) ( $p < 0,0001$ ). De plus, nous avons démontré pour la première fois que les cellules Caco-2 sécrètent au pôle basolatéral plusieurs formes de vitamine E lorsque le traitement est donné sous forme estérifiée (Cuerq et al. 2021). Deuxièmement, nous avons créé de nouveaux modèles cellulaires d'entérocytes par invalidation CRISPR-Cas9 des gènes responsables de la FHBL-SD1 (MTTP) et de la FHBL-SD2 (SAR1B). Ces clones invalidés présentent une sécrétion réduite de cholestérol et de triglycérides, ainsi que de vitamine E sous ses différentes formes galéniques (article en révision). L'étude sur l'absorption des caroténoïdes dans ces clones montre une sécrétion basolatérale fortement altérée pour les quatre caroténoïdes étudiés (article en préparation). Enfin l'étude clinique est en cours et les résultats préliminaires confirment le statut déficitaire en caroténoïdes des patients FHBL. En conclusion, notre travail apporte de nouvelles données fondamentales et cliniques permettant de mieux comprendre la physiopathologie de ces maladies génétiques rares, de développer de nouvelles hypothèses physiopathologiques et d'envisager de nouvelles perspectives thérapeutiques, et notamment des suppléments en caroténoïdes.

Mots clés : Caroténoïdes, Carotène, Lutéine, Zéaxanthine, Vitamines Liposolubles, A-Tocophérol, Chylomicron, Hypocholestérolémie Génétique, Hypobétalipoprotéïnémie Familiale, Maladie De Rétention Des Chylomicrons, Abétalipoprotéïnémie, Nutrition

## Characterization of vitamin E and carotenoid deficiency in patients with familial hypobetalipoproteinemia

Familial hypocholesterolemia, namely abetalipoproteinemia, hypobetalipoproteinemia and chylomicron retention disease, are rare genetic disorders characterized by defect in lipoprotein assembly and secretion and lipid malabsorption syndrome causing severe hypocholesterolemia. These diseases require early management with a low-fat diet and high dose vitamin replacement therapy to prevent the onset of neuro-ophthalmic complications. However, two main issues remain: serum levels of vitamin E are never restored, and vitamin A supplementation does not prevent the development of retinitis pigmentosa. Understanding the mechanisms underlying fat-soluble nutrients absorption in these diseases is essential to justify adjusting patient management with more effective galenic forms and/or complementary carotenoid supplements. Consequently, studying vitamin E galenic forms bioavailability in the pathologic context is a crucial aspect. Furthermore, the lack of an enterocyte cell model mimicking the disease is a major obstacle to a better understanding liposoluble nutrients absorption and thus to therapeutic adaptation. In this regard, our first fundamental study aimed to comparing different forms of vitamin E bioavailability in a common enterocyte model (Caco-2). In a second phase, we developed a new cellular model by invalidating the genes responsible for FHBL, to study the absorption of these different galenic forms and the hypothesis of a role of carotenoid deficiency in these diseases. This fundamental study is completed by a clinical study of the correlation between the patients' plasma carotenoid levels and their eye health. Our work shows that absorption-secretion of vitamin E in a classic model of enterocytes (Caco-2) is higher with free tocopherol, intermediate with tocopherol acetate (TAC) and significantly lower with pegylated form (TPGS) ( $p < 0.0001$ ). In addition, we demonstrated for the first time that Caco-2 cells secrete multiple forms of vitamin E at the basolateral pole when given the pegylated form (Cuerq et al. 2021). Secondly, we have created a novel enterocyte cell model of FHBL-SD1 (MTTP) and FHBL-SD2 (SAR1B) by CRISPR-Cas9 genes invalidation. These cells displayed a reduced cholesterol and triglycerides secretion as well as vitamin E in its different galenic forms (submitted paper). The study on the carotenoids' absorption in these original models also indicates an altered basolateral secretion regarding the four carotenoids studied (article in preparation). Finally, the clinical study, still in progress, preliminary confirms the carotenoid deficiency status of FHBL patients. In conclusion, our work brings new fundamental and clinical data to better understand the pathophysiology of these rare genetic diseases, to develop new pathophysiological hypotheses and to consider new therapeutic perspectives by considering the hypothesis of a carotenoid deficiency.

Keywords: Carotenoids, Carotene, Lutein, Zeaxanthin, Fat-soluble vitamins, A-Tocopherol, Chylomicron, Genetic hypocholesterolemia, Familial Hypobetalipoproteinemia, Chylomicron Retention Disease, Abetalipoproteinemia, Nutrition

Laboratoire CarMeN,  
INSERM U1060, INRAE, Université Claude Bernard Lyon-1,  
Hôpital Lyon Sud Secteur 2 Bâtiment CENS ELI-2D  
165, chemin du grand Revoyet - 69310 Pierre Bénite

C2VN (Centre de recherche en Cardiovasculaire et Nutrition)  
INRAE, INSERM, Aix-Marseille Université  
Faculté des Sciences Médicales et Paramédicales  
27, boulevard Jean Moulin - 13005 Marseille