



Impact du microbiome intestinal sur la cholestérolémie : concepts et applications

Mélanie Bourgin

► To cite this version:

Mélanie Bourgin. Impact du microbiome intestinal sur la cholestérolémie : concepts et applications. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Saclay, 2021. Français. ⟨NNT : 2021UPASB022⟩. ⟨tel-03543111⟩

HAL Id: tel-03543111

<https://pastel.hal.science/tel-03543111v1>

Submitted on 25 Jan 2022

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.



HAL Authorization

Impact du microbiome intestinal sur la
cholestérolémie : Concepts et applications

*Impact of the gut microbiome on
Cholesterolemia : concepts and applications*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 581 : agriculture, alimentation, biologie, environnement et
santé (ABIES)

Spécialité de doctorat : Microbiologie

Unités de recherche : Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350,
Jouy-en-Josas, France &
UPSP NP3 (2017.B146), Oniris, 44037, Nantes, France
Réfèrent : AgroParisTech

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,

Le 28/05/2021, par

Mélanie BOURGIN

Composition du Jury

Dalila AZZOUT-MARNICHE

Professeur, AgroParisTech

Présidente

Leila AMMAR

Professeur, Faculté de Médecine de SFAX

Rapporteur & Examinatrice

Michaël THERON

Maître de Conférences, HDR, Université de Bretagne Occidentale

Rapporteur & Examineur

François GUERRERO

Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Examineur

Direction de la thèse

Moez RHIMI

Chargé de Recherche, INRAE, centre IDF-Jouy-en-Josas-Antony

Directeur de thèse

Jean-Claude DESFONTIS

Professeur, ONIRIS

Co-Directeur & Examineur

**« Il n'y a que la liberté d'agir, de penser qui soit capable de
produire de grandes choses. »**

Jean le Rond d'Alembert, Encyclopédie ou Dictionnaire raisonnée
des sciences, des arts et des métiers (1751-1772)

Remerciements

Tout d'abord, je remercie l'INRAE, et l'unité MICALIS et son directeur Philippe Noirot pour m'avoir accueillie. Et en particulier aux départements MICA et AlimH qui ont co-financé cette thèse. Je remercie ONIRIS, et sa directrice Laurence Deflesselle pour m'avoir accueillie.

Je voudrais remercier ensuite mes co-directeurs, Moez Rhimi et Jean-Claude Desfontis, pour m'avoir confié ce projet de thèse et pour m'avoir accompagnée durant ces trois années. Merci pour votre disponibilité, et votre investissement tout au long de mes travaux. Merci pour vos conseils, vos connaissances et pour toutes nos discussions scientifiques.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse pour évaluer ce travail. Je remercie chaleureusement Dr. Leila Ammar et Dr. Michaël Theron pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie également chaleureusement, merci à Pr. Dalila Azzout-Marniche et Pr. François Guerrero, pour leur présence en tant que membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, de leur bienveillance et leurs précieux conseils : merci à Pr. Valérie Nivet-Antoine, Dr. Gaétan Mayer et Dr. Emmanuelle Maguin d'avoir accepté de donner votre point de vue à ce projet de recherche.

Je tiens à remercier également Alexandre Pery, responsable de la scolarité à l'ABIES pour son écoute et ses conseils. Je remercie également l'école doctorale ABIES et l'ensemble de l'équipe pédagogique pour leur accompagnement.

Je souhaite remercier toutes les plateformes avec lesquelles nous avons travaillé sur ce projet. L'animalerie axénique Anaxem, de l'unité Micalis ; la plateforme CRIP à ONIRIS ; la plateforme de spectrométrie de Nantes ; la plateforme @Bridge pour la mise à disposition du matériel permettant les analyses de qualité de l'ARNs ; ainsi que la plateforme d'histologie de l'UMR 1313 GABI. Merci à toutes ces personnes, avec qui j'ai partagé des moments agréables.

Aux directeurs des deux équipes de recherche, au sein de l'institut MICALIS, l'équipe *Microbiota Interaction with Human & Animal* (MIHA), Dr. Emmanuelle Maguin, et au sein de l'école ONIRIS, l'équipe Nutrition, physiopathologie et pharmacologie (NP3), Pr. Jean-Claude Desfontis pour m'avoir accueilli au sein de leur groupe de recherches. Sincères remerciements, pour m'avoir permis de mener à bien ce magnifique projet.

Mes remerciements vont également à tous les membres l'équipe MIHA, passé et présent, pour leurs disponibilités, leurs aides votre bonne humeur. Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez appris tant scientifiquement qu'humainement. Je profite également à remercier tous les membres de l'équipe Nutrition, physiopathologie et pharmacologie (NP3) ayant de près ou de loin contribué à la réalisation de cette thèse. Merci à tous du temps que vous m'avez accordé, de votre implication dans cette thèse, de votre travail, de vos conseils et de vos connaissances et votre disponibilité. Je remercie également tous les membres de MICALIS et ONIRIS pour avoir contribué au bon déroulement de ces travaux de recherche par la qualité de leur relation. Merci pour ces beaux moments de partage.

Je souhaiterai également remercier l'unité MaAIGE, le Dr Simon Labarthe et le Dr. Béatrice Laroche, qui m'ont beaucoup appris et m'ont partagé leur connaissance de la modélisation mathématique et leur potentiel application à la biologie. Un grand merci pour cette aventure scientifique.

Je remercie également tous mes amis de Bretagne, Alex, Jay, Claire, Thomas, Guillaume, Nolwenn, Benoît et Pierre, pour leur soutien amical à toute épreuve pendant ces dernières années. Merci également à mes amis, la team des microbiologistes de Paris-Saclay, Emilie, Manhaz, Xavier, Yohann et Margaux, Emilie, Maher et Antoine pour ces moments passés à parler de sciences et de bactéries sans modération. Merci également à Amal et Oussouss pour ces bons moments passés ensemble, ces week-ends d'évasions et ces beaux voyages, qui m'ont permis d'enrichir cette belle aventure.

Enfin, je remercie également toute ma famille, mes grands-parents, la *Bien-famille*, tous mes oncles et tantes, mes cousins et cousines pour m'avoir toujours encouragée et soutenue, et pour tout ce que vous m'avez transmis. Je tiens particulièrement à remercier mes grand-mères, pour m'avoir toujours montré cette volonté et cette force pour faire valoir la raison.

Je tiens également à remercier mon mari, Ilias. Ilias, tu m'as tellement soutenu pendant ces dernières et intenses années de doctorat. Tu as toujours été là pour écouter, suggérer, aider psychologiquement et ce soutien est devenu essentiel pour que je puisse accomplir ces travaux de thèse de doctorat. Je tiens également à remercier ma Belle-famille pour tous leurs encouragements tout au long de ce doctorat.

Dernière dédicace, je tiens à remercier mes parents, Bruno et Laurence pour m'avoir aidé, poussé, conseillé et soutenu à 2000 % en permanence pendant toutes mes études : les travaux présentés dans cette thèse sont également le résultat de leur implication dans mes études et un résultat indirect de leurs efforts en tant que parents. Je remercie également mes deux magnifiques sœurs, Maelys et Morgane, Merci du fond du cœur de m'avoir tellement apporté.

Table des matières

REMERCIEMENTS	A
TABLE DES MATIERES.....	B
ABREVIATIONS.....	C
LISTES DES FIGURES PAR CHAPITRE.....	D
LISTES DES TABLEAUX PAR CHAPITRE	E
AVANT-PROPOS.....	1
CHAPITRE 1 – LE CHOLESTEROL	6
1. Les fonctions biologiques du cholestérol.....	6
2. Le métabolisme du cholestérol.....	8
2.1. Les voies d'entrées du cholestérol dans l'organisme.....	8
2.2. L'absorption de cholestérol dans l'intestin	10
2.3. Le transport de cholestérol dans l'organisme, les lipoprotéines	12
2.4. Les voies de dégradation du cholestérol dans l'organisme	15
2.4.1 La voie de stockage au niveau des tissus périphériques.....	15
2.4.2. La voie des sels biliaires	18
2.4.3. Les voies d'élimination vers les selles	19
3. L'hypercholestérolémie et ses troubles associés.....	20
3.1. Les maladies cardiovasculaires	21
3.2. Les stéatopathies hépatiques non-alcooliques	21
3.3. L'athérosclérose.....	25
3.3.1. L'Etablissement de l'athérosclérose	25
3.3.2. De l'atteinte des cellules de la zone lésée jusqu'aux fonctions physiologiques	25
3.3.3. Les manifestations cliniques de la maladie et les challenges de la recherche scientifique	27
4. La diminution du cholestérol en excès dans l'organisme : d'une approche expérimentale vers une application thérapeutique	27
4.1. Les modèles expérimentaux ciblés.....	27
4.1.1. Les paramètres généraux des modèles expérimentaux.....	28

4.1.2. Les modèles expérimentaux liés au métabolisme du cholestérol : le cas de la souris et du lapin	29
4.2. Les méthodes d'étude globale et prédictive	31
4.3. Les stratégies hypocholestérolémiantes : des approches conventionnelles jusqu'aux alternatives thérapeutiques	32
4.3.1. Les lignes directrices conventionnelles pour diminuer l'hypercholestérolémie.....	32
4.3.2. Les alternatives thérapeutiques modernes pour diminuer l'hypercholestérolémie : un zoom sur les aliments fonctionnels.....	35

CHAPITRE 2- INTERACTION DU MICROBIOME INTESTINAL ET DU METABOLISME DU CHOLESTEROL CHEZ L'HOMME..... 37

1. Les généralités sur le microbiote intestinal.....	37
1. 1. Le microbiome intestinal humain en bonne santé.....	37
1. 2. Le microbiome intestinal, composant intégré au développement et à la santé de l'homme.....	40
2. Etudier le microbiote intestinal chez l'homme.....	43
2.2. Etude de l'interaction du microbiote intestinal et de l'hôte.....	45
2.2.1. Les approches expérimentales causales dans la recherche sur le microbiome	46
2.2.1. Les approches expérimentales prospectives basées sur les mécanismes d'actions du microbiome	48
2.3. Les challenges de la recherche sur le microbiome intestinal	49
3. L'impact du microbiote sur le métabolisme du cholestérol et ses dérivés biliaires : Généralités..	50
3.1. Contexte.....	50
3.2. Résumé de la revue scientifique « Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism : current status and future prospects »	51
3.3. Revue scientifique “Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism: current status and future prospects”	53
4. Les voies métaboliques microbiennes du métabolisme du cholestérol	82
4.1. La voie de piégeage du cholestérol	82
4.1.1. Contexte	82
4.1.2. Synthèse bibliographique : « Démystifier le mécanisme de piégeage du cholestérol par les bactéries du microbiome intestinal »	82
4.2. La voie de conversion du cholestérol en coprostanol	89
4.2.1. Contexte	89
4.2.2. Résumé de la revue scientifique “Microbial Reduction of Cholesterol to Coprostanol : An Old Concept and New Insights“	90
4.2.3. Revue scientifique “Microbial Reduction of Cholesterol to Coprostanol : An Old Concept and New Insights ”	92
4.3. La voie des hydrolases des sels biliaires	110
4.3.1. Contexte	110

4.3.2. Résumé de la revue scientifique “Bile Salt Hydrolases : At the Crossroads of Microbiota and Human Health ”	110
4.3.3. Revue scientifique “Bile Salt hydrolases: At the Crossroads of Microbiota and Human Health”	112

CHAPITRE 3 – LES OBJECTIFS SCIENTIFIQUES DU PROJET DE THESE..... 132

CHAPITRE 4 – LES STRATEGIES EXPERIMENTALES..... 135

1. Design expérimental du projet de thèse 135

2. Impact du microbiote intestinal sur le métabolisme : validation mathématique 136

2.1. Le modèle mathématique du métabolisme du cholestérol	136
2.2. La modélisation des activités du microbiote intestinal influençant la cholestérolémie.....	136
2.2.1. Les bactéries et les tests d'activités BSH et de production de coprostanol	137
2.2.2. La modélisation mathématique des souches bactériennes, <i>Bacteroides xylanisolvens</i> XB1A et <i>Bacteroides</i> sp. D8.....	138
2.2.3. Distribution du cholestérol au sein de l'organisme	138
2.2.3.1. Animaux et design expérimental.....	138

3. Démarche expérimentale Article 2 140

3.1. Sélection des bactéries commensales représentatives des 3 voies métaboliques du cholestérol	140
3.2. Sélection du microbiote intestinal humain d'un donneur sain présentant un profil métabolique neutre vis-à-vis des stérols	142
3.3. Détermination de la voie du microbiote qui challenge la cholestérolémie.....	142
3.3.1. Préparation de la solution fécale pour la FMT	142
3.3.2. Préparation des bactéries commensales	143
3.3.3. Les animaux	143
3.3.4. La procédure d'expérimentation animale	144
3.3.5. Les mesures in vivo de la procédure expérimentale.....	146
3.3.6. Le prélèvement des tissus biologiques	146
3.3.7. Les analyses biochimiques.....	147
3.3.8. Les analyses statistiques.....	147
3.4. Évaluation du potentiel préventif de notre bactérie candidate sur un modèle lapin plus proche de l'homme	147
3.4.1. Préparation de la bactérie candidate.....	148
3.4.2. Les animaux	148
3.4.3. La procédure expérimentale	148
3.4.4. Les mesures in vivo de la procédure expérimentale.....	151
3.4.5. Le prélèvement des tissus biologiques	151
3.4.6. Les analyses biochimiques.....	151
3.4.7. Les analyses histologiques des tissus et des lésions hépatiques et athérosclérotiques.....	151
3.4.8. Les analyses statistiques.....	153

CHAPITRE 5 : ACTUALISATION CONCEPTUELLE DU METABOLISME DU CHOLESTEROL CHEZ L'HOMME 154

1. Présentation..... 154

2. Résumé de l'article 1 " <i>Exploring the Bacterial Impact on Cholesterol Cycle: A Numerical Study</i> "	154
--	-----

3. Article 1 " <i>Exploring the Bacterial Impact on Cholesterol Cycle: A Numerical Study</i> "	157
--	-----

CHAPITRE 6 : L'IMPACT DU MICROBIOTE INTESTINAL SUR LA CHOLESTEROLEMIE

176

1. Présentation.....	176
----------------------	-----

2. Résumé de l'article 2.....	176
-------------------------------	-----

3. Article 2 « <i>Towards a better understanding of the microbial metabolism of cholesterol</i> »	179
---	-----

CHAPITRE 7 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....

207

CHAPITRE 8 : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

223

Abréviations

Cette liste d'abréviation comprend les abréviations les plus couramment utilisées dans ce manuscrit. Certaines des abréviations sont utilisées uniquement en *langue anglaise*. Ces dernières seront traduites uniquement lorsqu'elles sont employées en langue française.

A α - et β M : l'acide α - et β -muricholique

AB : les acides biliaires

AC : l'acide cholique

ACAT-2: l'acetyl-CoA cholesterol acyltransferase 2

ACh : l'acétylcholine

ACDC : l'acide chenodeoxycholique

ADC : l'acide deoxycholique

ADN : l'acide DésoxyriboNucléique

AGC : l'acide glycocholique

AGCDC : l'acide glycochenodeoxycholique

ALC : l'acide lithocholique

APO A/B/C/E : l'apoprotéines de type A, B, C, E

ARN : l'acide ribonucléique

ATC : l'acide taurocholique

ATCDC : l'acide taurochenodeoxycholique

AUDC : l'acide ursodeoxicholique

AVC : l'accident vasculaire cérébral

BSH (*Bile Salt Hydrolase*) : l'hydrolase des sels biliaires

Abréviations

CAZymes (*Carbohydrate active enzymes*) : les enzymes actives vis-à-vis des glucides

CCC (*Cholesterol-to-coprostanol conversion*) : la population bactérienne responsable de la conversion de cholestérol en coprostanol

Chol-T (*Total-cholesterol*) : le cholestérol total

Chol-L (*Free-cholesterol*) : le cholestérol sous sa forme libre

CE : les cellules endothéliales

Chylomicron-Chol : les chylomicrons

CYP7A1 : Le cholestérol 7 α -hydroxylase

e.g (*exempli grātia*) : par exemple

EFSA (*European Food Safety Authority*) : l'autorité européenne de sécurité des aliments

FDA (*Food and Drug Administration*) : l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux

FMT (*Fecal Microbiota Transplantation*) : la transplantation de microbiote fécal

FXR (*Farnesoid X receptor*)

GC-MS : la chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

Germ-Free : l'organisme exempt de micro-organismes

GRAS (*Generally Recognized As Safe*) : généralement reconnu comme étant sans danger

H&E : la coloration à l'hématoxyline et de l'éosine

HDL-Chol (*High Density Lipoprotein*) : les lipoprotéines de haute densité

HMGC : l'3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A

HMGCS : l'3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase

ICAN : l'institut de cardiométabolisme et de nutrition

LDL-Chol (*Low Density Lipoprotein*) : les lipoprotéines de basse densité

Abréviations

MCVs : Les maladies cardio-vasculaires

NAS (*NAFLD activity score*) : Le score d'activité de la stéatopathie non-alcoolique

NAFLD (*Non-alcoholic fatty liver disease*) : la stéatopathie non-alcoolique

NASH (*Non-alcoholic fatty steatosis hepatic*) : la stéatose hépatique non-alcoolique

NO : le monoxyde d'azote

NZW (*New Zealand White*) : les lapins Néo-Zélandais blancs

ODE : l'équations différentielles ordinaires

OTU (*Operational Taxonomic Unit*) : une unité taxonomique opérationnelle

PBS (*Phosphate Buffered Saline*) : une solution de tampon phosphate saline

PBSD (*Primary-bile-salts deconjugation*) : la population bactérienne dotée d'activité BSH

PCSK9 : la protéine convertase de la famille subtilisine des protéases à sérine

PE : Phényléphrine

SEM (*Standard Error of Mean*) : une erreur type à la moyenne

SCFAs (*Short-Chain Fatty Acids*) : les acides gras à chaîne courte

SR-BI (*Scavenger receptor class B type I*)

TG : les triglycérides

TGI : le tractus gastro-intestinal

TGR5 (*Membrane G protein-coupled receptors*) : le récepteur membranaire couplé à une protéine G

TICE (*Trans-intestinal cholesterol excretion*) : l'excrétion trans-intestinale de cholestérol

VLDL-Chol (*Very-Low Density Lipoprotein*) : les lipoprotéines de très basse densité

VSMC (*Vascular Smooth Muscle Cell*) : les cellules musculaires lisses des vaisseaux

Listes des figures par chapitre

Chapitre 1 : Le cholestérol

Figure 1 : La structure chimique du cholestérol.	7
Figure 2 : L'absorption de cholestérol intestinal.	11
Figure 3 : La distribution du cholestérol endogène et exogène à travers les compartiments physiologiques majeurs chez l'homme.....	13
Figure 4 : Le cycle entéro-hépatique.	17
Figure 5 : Les profils hépatiques des NAFLD.....	22
Figure 6 : De l'initiation vers une progression de l'athérosclérose.....	24
Figure 7: Les propriétés hémodynamiques de l'artère dans un contexte physiologique donné....	26
Figure 8 : Les approches thérapeutiques hypocholestérolémiantes existantes	34

Chapitre 2- Interaction du microbiome intestinal et du métabolisme du cholestérol chez l'homme

Figure 9 : La représentation de la niche écologique du microbiote intestinal dans le tractus digestif humain.....	38
Figure 10 : Les méthodes expérimentales pour démontrer les rôles causaux du microbiote dans la physiologie et la maladie de l'hôte.....	44
Figure 11 : Les mécanismes de piégeage de cholestérol des micro-organismes	85

Chapitre 3 – Les objectifs scientifiques du projet de thèse

Figure 12 : Déterminer la contribution des activités du microbiote intestinal à la cholestérolémie	133
--	-----

Chapitre 4 – Les stratégies expérimentales

Figure 13 : Une vue globale de la démarche expérimentale de ce projet de thèse.	135
Figure 14 : La procédure expérimentale 1 pour établir la distribution de cholestérol dans l'organisme	139
Figure 15 : La procédure expérimentale pour sélectionner la voie métabolique du microbiote intestinal la plus efficace pour challenger la cholestérolémie.	145

Listes des figures par chapitre

Figure 16 : La procédure expérimentale pour évaluer le potentiel préventif de la voie BSH sur le métabolisme du cholestérol et ces troubles associés..... 149

Chapitre 7 : Discussion générale et perspectives

Figure 17: Profil d'activité BSH d'AS99..... 215

Listes des tableaux par chapitre

Chapitre 1 : Le cholestérol

Tableau 1 : La comparaison des régimes alimentaires hypercholestérolémiques chez la souris.. 30

Tableau 2 : La comparaison des caractéristiques du métabolisme du cholestérol, des lipoprotéines et des sels biliaires 30

Chapitre 2- Interaction du microbiome intestinal et du métabolisme du cholestérol chez l'homme

Tableau 3 : Les différents niveaux d'analyse méta-omique représentés, de la phylogénie à la métabolomique..... 42

Chapitre 4 : Les stratégies expérimentales

Tableau 4 : Les bactéries représentatives des voies métaboliques du microbiote intestinal vis-à-vis des stérols..... 141

Avant-propos

“I then most always saw, with great wonder, that in the said matter there were many very little living animalcules, very prettily a-moving.” —Antonie van Leeuwenhoek, Septembre, 1683.

Voici les premières évidences d’une interaction hôte-microbiote humain initiée par Antonie van Leeuwenhoek, à l’origine de la découverte de ces microbes originaires de l’homme, nommés « *animacules* ». Identifiées dès la fin du XVII^{ème} siècle grâce au tout premier microscope, cette approche expérimentale démontre l’existence d’une relation entre les bactéries et l’homme. En effet, les bactéries sont présentes dans certains sites de l’organisme humain, la bouche et les selles (**Pariente, 2019**). Puis, dès la fin du XIX^{ème} siècle, la relation hôte-microbiote s’est ensuite précisée comme conflictuelle grâce à Koch, Pasteur : un micro-organisme donné est responsable d’une maladie : c’est l’exemple du « *bacille de Koch* », agent étiologique de la tuberculose chez l’homme (**Wheelis, 2008**). L’évolution des méthodes de culture bactérienne favorise l’isolement de bactéries non pathogènes, comme *Escherichia coli* issue des bactéries de l’intestin, identifie cette relation hôte-micro-organismes comme saine (**Hacker et Blum-Oehler, 2007**). De façon intéressante, Metchnikoff renforce cette vision, en la qualifiant d’essentielle pour le maintien de la santé de l’homme, pour son bonheur et sa longévité. Son hypothèse est soutenue à travers ces observations sur la dissémination des toxines à travers l’hôte, émises par les bactéries du côlon perturbées, responsables *in fine* de cancers colorectaux. Face à cela, il suggère un remplacement de la flore native colonique via l’utilisation des « *friendly microorganisms* » tels des bactéries lactiques, pour traiter ces troubles gastro-intestinaux et favoriser la relation amicale hôte-micro-organismes « *en condition normale* ». C’est alors que le terme « *orthobiose*, définit par un corps mis à l’abri de l’atteinte par les maladies infectieuses et les intoxications », est suggéré par le scientifique pour qualifier cette relation déséquilibrée par nos modes de vie (**Podolsky, 2012**). Jusqu’à la fin du XX^{ème} siècle, la thématique s’est focalisée sur ce lien « dominant / dominé » des micro-organismes pathogènes sur la santé de l’hôte. Un nombre incroyable d’articles de ces agents pathogènes ont été publiés durant cette période, et ceux grâce à la translation des notions microbiologiques au domaine de la médecine clinique (**Finegold, 1993**). Ce premier cycle de recherches sur l’interaction biologique entre l’hôte et ses micro-organismes a permis de déterminer

un échange unilatéral qualifié de parasitisme, des micro-organismes pathogènes au détriment de la santé humaine.

De façon plus réservé, les recherches sur cette « *microflore indigène*, microflore normale » se sont enrichies grâce à la découverte de nouvelles bactéries, localisées à des sites spécifiques de l'organisme humain telles que *Helicobacter hepaticus* dans l'estomac ou de *Bacteroides thetaiotaomicron* dans l'intestin (Finegold, 1993 ; Schauer, 1997). Ce n'est qu'avec la conception de nouveaux modèles expérimentaux, des animaux stériles et colonisées par une seule bactérie *Bacteroides thetaiotaomicron*, timidement évolue vers de nouvelles directions : cette relation peut donc s'avérer bénéfique pour la santé de l'hôte, avec l'évidence d'une communication présente entre ses micro-organismes et leur l'hôte (Bry *et al.*, 1996). Cette interaction commence alors à prendre cette dimension hôte et micro-organismes, qui composent un écosystème bactérien, alors qualifié par les auteurs de ces précédents travaux de "Mammalian Ecosystem". L'avancement des techniques modernes au début au XXI^{ème}, en particulier du séquençage de l'ADN, de son amplification et son traitement informatique, nous a apporté un avancement gigantesque dans le domaine. Ces micro-organismes qui constituent le microbiote humain sont alors identifiés, leur composition, leur diversité, leur abondance sont grandement étudiées. Les premières définitions du microbiote sont alors proposées comme un ensemble de micro-organismes vivants dans un environnement spécifique (appelé microbiome) chez un hôte. Les recherches scientifiques révolutionnent le domaine en démontrant l'importance de ces fonctionnalités dans le développement et la santé de l'homme, en particulier au niveau de l'écosystème intestinal (Cho et Blaser, 2012). Un grand nombre d'études redéfinit ce lien, comme fraternel entre l'hôte et « *ces autres qui sont en nous* » grâce à des fonctions biologiques attribuées : digestives, métaboliques, protectrices, structurales et de maturation (Fujimura *et al.*, 2010). Ces travaux ont pleinement fait connaître un dialogue symbiotique, réciproque, profitable aux microbiotes qui arborent l'hôte et à l'hôte lui-même. Enfin, la mise en place d'une méthodologie expérimentale via l'expérience de transfert de microbiote de souris à souris ou d'homme à souris, a démontré de façon spectaculaire, la transférabilité du phénotype via le microbiote, qui joue un rôle causal dans un symptôme physiopathologique (gain de masse grasseuse), dans une maladie (l'obésité, maladies cardiovasculaires) et dans l'expression d'un comportement (lié à l'alimentation) (Turnbaugh *et al.*, 2006). Cette évidence a suscité un intérêt considérable des chercheurs, sur cette interaction qui est associée à une maladie. Le rôle pivot d'une communauté bactérienne donnée est exprimé en

fonction de son abondance, d'un type de microbiote à l'interface du phénotype pathologique de l'organisme : l'exemple le plus emblématique étant avec *Faecalibacterium prausnitzii* et *Akkermansia muciniphila* dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (**de Vos et de Vos, 2012**). La notion de « *dysbiose* » est employée lorsque des conditions défavorables engendrent un déséquilibre d'un écosystème bactérien de l'organisme humain. Cet état est associé à de multiples facteurs environnementaux (alimentation, traitement antibiotique), génétique, et au mode de vie. De manière générale, ce dialogue est décrit via un « *axe intestin-organe* », qui connecte les micro-organismes et ses dérivés métaboliques du tractus gastro-intestinal à un organe cible. C'est le cas de « l'axe intestin-foie », qui est grandement étudié dans la progression de différents stades de pathologies liées au foie, allant d'une simple stéatose hépatique jusqu'à l'hépatocarcinome (**Tripathi et al., 2018**). Le développement de modèles expérimentaux « *germ-free*, organisme dépourvu de micro-organismes », contribue à déterminer cette communication complexe entre le microbiote et l'organisme humain et surtout à révéler l'aspect causal de cette association.

Néanmoins, l'affiliation de l'abondance d'un phylotype bactérien à une pathologie complexe représente une limite. Ces approches conventionnelles, nous amènent vers une image incomplète de cette interaction, souvent mal interprétée car elle extériorise le côté fonctionnel : ces molécules bactériennes produites par le microbiote, les métabolites, se disséminent dans l'ensemble de l'organisme humain et interagissent directement avec le métabolisme de l'hôte. Les méthodes de décryptage de haute-performance, les « *meta-omics* » ont enrichi cette configuration mécanistique et ce à plusieurs niveaux d'organisation du vivant du génome, transcriptome, protéome et métabolome. Ces technologies ont porté la thématique vers une première vision globale d'un système biologique complexe, identifiant de nouveaux paramètres soit du microbiote ou soit de l'hôte dans un contexte physiologique donné (**Shaffer et al., 2017**). Leur champ d'application s'est étendu à l'identification de nouveaux marqueurs ou de cibles thérapeutiques pour d'optimiser les stratégies thérapeutiques dans la prévention, le diagnostic et le traitement de maladies. Les chercheurs d'approche fondamentale ont vivement collaboré avec des chercheurs en médecine clinique et ainsi, favoriser le développement des compétences translationnelles dans l'étude de la thématique interaction hôte-microbiote. C'est l'exemple de l'efficacité d'un médicament, l'acarbose, qui a été étudié chez les patients atteints de diabète de type 2. Les auteurs

ont démontré que les patients qui présentent un niveau important de *Bacteroides* dans leur microbiote, possèdent une efficacité thérapeutique plus importante en réponse au traitement par rapport aux patients moins répondeurs, qui eux présentent plutôt un haut niveau de *Prevotella* prédominant (Gu *et al.*, 2017). Les études « *meta-omics* » ont apporté des approches prometteuses dans la compréhension de la thématique hôte-microbiote, caractérisant majoritairement la composition, les fonctions et les activités métaboliques du microbiote, au dépend de l'hôte.

Récemment, les recherches se sont orientées vers une nouvelle dimension systémique, qui combine l'ensemble de ces données « *meta-omics* », quantitatives et massives issues de différents niveaux d'organisation de l'organisme vivant, en un seul et même système biologique. L'introduction de l'approche dite « *holo-omic*, regroupant un organisme humain et les micro-organismes qu'il héberge » retrace une vision globale et bidirectionnelle de cette interaction entre l'hôte et son microbiote associé qui est alors désormais plus évidente. La mise en place de modèle de prédiction visant à mimer un phénotype complexe dans une situation physiologique donnée permet d'étudier l'influence des fonctions de systèmes biologiques, via l'utilisation des outils mathématiques et des bases de données (Shaffer *et al.*, 2017). Zeeki et son équipe se sont appliqués à la mise en place d'un modèle mathématique qui intègre les paramètres biologiques sanguins, anthropométriques, liés à l'activité physique, à la consommation alimentaire et au microbiote intestinal d'une cohorte d'individus sains. Ils ont rigoureusement prédit une réponse glycémique post-prandiale spécifique pour un aliment donné. Réciproquement, ces prédictions de cette réponse glycémique ont été validées avec une cohorte d'individus indépendants, confirmant ainsi la causalité de ces paramètres biologiques dans la réponse de l'hôte (Zeevi *et al.*, 2015). L'ensemble de ces propos, explique la situation de la sphère scientifique actuelle dans le domaine interaction hôte-microbiome, qui a fortement abouti à une science pluridisciplinaire. L'ensemble des méthodes globales et prédictives (mathématiques et informatiques) et des méthodes expérimentales et descriptives (biologie, médecine, animal) permettent d'étudier et de modéliser les phénomènes et processus biologiques complexes, non élucidés.

Cette nouvelle perspective « *intestin-système* » reste largement inexplorée, notamment dans l'étude de l'homéostasie de constante physiologique de l'organisme humain. C'est l'exemple du cholestérol circulant dans notre sang, paramètre déterminant dans la progression des maladies

cardio-vasculaires telles que l'athérosclérose. Certaines évidences scientifiques ont démontré une relation liée des bactéries avec le cholestérol de l'hôte chez l'homme. Des bactéries isolées à partir de fèces humaines, dégradent le cholestérol (**Sadzikowski *et al.*, 1977**). Ces bactéries de microbiote intestinal produisent des mécanismes responsables de la dégradation du cholestérol, présents dans l'organisme. Cette thématique a suscité de nombreux intérêts de la communauté scientifique et spécifiquement dans leur large application clinique de bactéries probiotiques. La consommation de souches probiotiques essentiellement lactiques apporte un effet bénéfique sur la cholestérolémie de l'hôte et stabilise cette constante biologique dérégulée dans certaines pathologies (**Jones *et al.*, 2012 ; Hassan *et al.*, 2019**). Ainsi, cette interaction complexe entre « cholestérol-bactéries-hôte » contribue au métabolisme du cholestérol de l'hôte et intervient dans le maintien de la santé de l'hôte. Et pourtant, nos connaissances sur ces bactéries « *cholestérololytiques* » de l'intestin dans l'organisme humain et de leur impact dans l'homéostasie du cholestérol de l'hôte restent encore limitées.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'impact du microbiote intestinal sur le métabolisme du cholestérol chez l'homme. Dans une première partie, nous présenterons le contexte scientifique actuel concernant le métabolisme du cholestérol (**Chapitre 1**), le microbiote intestinal et leur interaction au sein de l'hôte sous un format original (**Chapitre 2**). Les objectifs scientifiques (**Chapitre 3**) et la stratégie expérimentale du projet seront brièvement exprimés (**Chapitre 4**). Dans un deuxième temps, les travaux menés sur l'impact du microbiote intestinal sur le métabolisme du cholestérol à partir d'un modèle mathématique sera décrit (**Chapitre 5**). Les mécanismes sous-jacents du microbiote intestinal sur la cholestérolémie de l'hôte seront exposés, et leur application thérapeutique potentielle dans les maladies associées à l'hypercholestérolémie sera démontrée (**Chapitre 6**). Enfin, dans un dernier chapitre, nous discuterons des résultats obtenus afin de les mettre en perspective de travaux ultérieurs (**Chapitre 7**).

Ce travail collaboratif établit un premier focus sur cette interaction « *cholestérol-microbiote intestinal – hôte* » par des approches basiques, translationnelles qui regroupent des méthodes prédictives et des modèles expérimentaux descriptifs. Ce résultat permet de distinguer la voie du microbiote intestinal qui peut être considérée comme cible thérapeutique, et contribue à restaurer l'homéostasie métabolique de l'organisme humain.

Chapitre 1 – Le cholestérol

Le cholestérol joue un rôle crucial dans l'organisme humain. Il est indispensable au bon fonctionnement de l'organisme vivant. Depuis sa découverte au XVIII^{ème} siècle dans l'étude des calculs biliaires¹, le cholestérol a suscité un vif intérêt de la communauté scientifique : un total de 13 prix Nobel sont dévoués à sa caractérisation chimique, biochimique, et son rôle physiologique et clinique. Le métabolisme du cholestérol est un ensemble de processus de régulation complexe (Adam, 2011). A l'état de déséquilibre, celui-ci peut s'avérer néfaste pour l'organisme, impliqué dans le développement de maladies cardiovasculaires, notamment identifiées dans des modèles expérimentaux animaux et chez l'homme (Min *et al.*, 2012). Dans cette partie, nous envisageons de comprendre le métabolisme du cholestérol dans son ensemble, afin de mieux appréhender et suivre sa régulation, l'influence des facteurs majoritaires qui préservent l'équilibre du cholestérol circulant, et ceux essentiellement lié au fonctionnement des autres systèmes physiologiques qui composent l'être humain.

1. Les fonctions biologiques du cholestérol

Un nombre considérable d'évidences démontre que le cholestérol présente des fonctions essentielles, nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme humain. Le cholestérol est classifié parmi les lipides et est retrouvé essentiellement chez les animaux et l'homme. Son omniprésence à différents niveaux d'organisation structurale souligne le rôle primordial du cholestérol. Par définition, il existe une seule et même molécule du cholestérol, qui contient 27 atomes de carbone (Figure 1). Sa structure chimique lui donne un caractère amphiphile, avec une partie polaire caractérisée par un noyau stéroïde et d'une chaîne aliphatique apolaire (Figure 1 ; Bukiya et Dopico, 2017). L'estérification de la molécule est à l'origine de son insolubilité et constitue sa forme de stockage. A l'échelle des cellules, le cholestérol est un constituant architectural, et fait

¹ Les **calculs biliaires** correspondent à une formation de dépôts solides essentiellement composé de cholestérol, qui bloque le fonctionnement des voies biliaires.

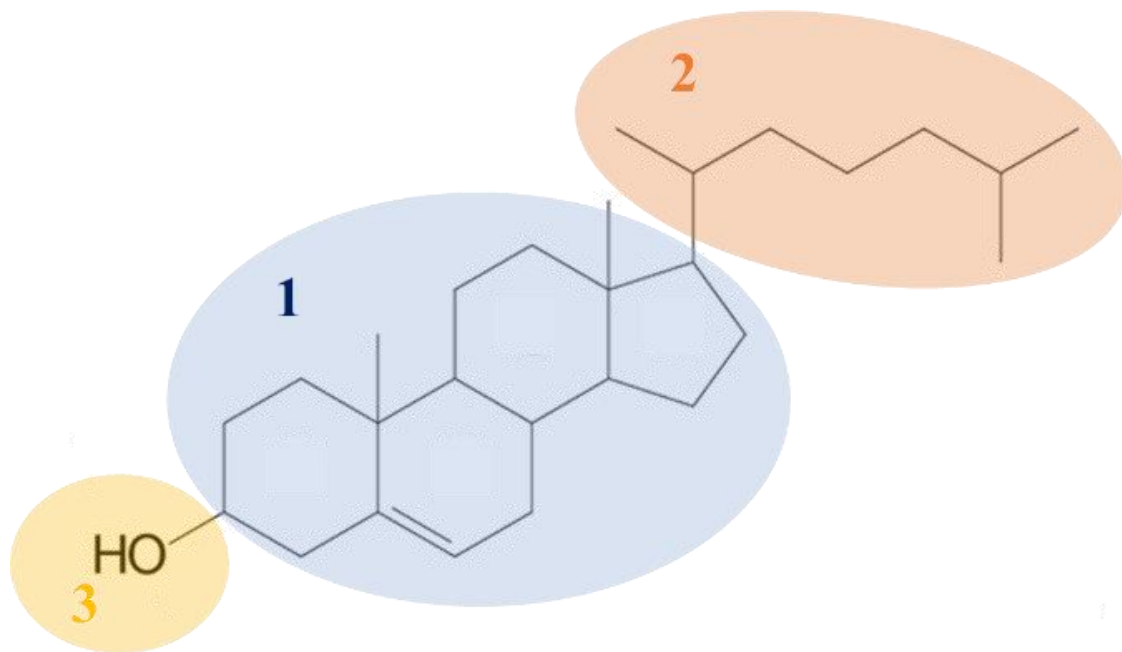


Figure 1 : La structure chimique du cholestérol.

Le cholestérol est composé d'un noyau stéroïde (**1**) et d'une chaîne hydrocarbonée (**2**). Un groupement hydroxyle ($-\text{OH}$) (**3**), confère à la molécule une tête polaire et hydrophile et constitue le site d'estérification donnant la forme de stockage du cholestérol.

partie intégrante des constituants, participant à la fluidité et la perméabilité de la membrane biologique des eucaryotes (**Maxfield et Tabas, 2005**). Il participe à la dynamique et à la signalisation cellulaire via la formation de raft lipidique (**Jacobson *et al.*, 2007 ; Ikonen, 2008**). Au niveau de l'organisme, le cholestérol intervient étroitement dans le système digestif *via* son rôle précurseur dans la synthèse des acides biliaires, qui facilitent l'absorption de lipides alimentaires (cholestérol, graisses, vitamines). De façon spécifique, le cholestérol est retrouvé dans le système endocrinien via son rôle précurseur dans la synthèse d'hormones sexuelles stéroïdiennes et de vitamine D (**Moon *et al.*, 2016**). Dans le système immunitaire, le cholestérol est utilisé comme précurseur de molécules de communication, notamment le 25-hydroxy-cholestérol, un métabolite produit par les macrophages lors de l'activation de mécanismes de l'immunité innée (**Ikonen *et al.*, 2008**). Dans le système circulatoire, le cholestérol est transporté puis distribué vers les organes et les tissus de ces systèmes pour exercer ces fonctions.

2. Le métabolisme du cholestérol

Le niveau de cholestérol circulant est maintenu par un équilibre entre les apports endogènes et exogènes de cholestérol et les différents processus d'absorption et de dégradation du cholestérol de l'organisme. Le prochain sous-chapitre décrit les principaux paramètres complexes qui sous-tendent la stabilité du métabolisme du cholestérol chez l'homme.

2.1. Les voies d'entrées du cholestérol dans l'organisme

La biosynthèse de cholestérol est une des principales sources primaires de cholestérol pour l'organisme. Sa synthèse *de novo* est une voie biochimique, composée d'une succession de plusieurs étapes avec l'intervention d'une trentaine d'enzymes. De façon succincte, une combinaison de deux molécules d'acétyl coenzyme A aboutit à la formation de 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMGCoA) puis à la formation de mévalonate. L'enzyme clef de cette étape est l'HMGCoA-synthase A (HMGCS). Son activité régulatrice a été grandement étudiée en tant que cible thérapeutique pour contrôler la synthèse du cholestérol circulant de l'organisme (**Brown et Goldstein, 1980**). Le mévalonate subit une double phosphorylation, suivie d'une décarboxylation du mévalonate pyrophosphate pour aboutir à la formation de molécules d'isoprénoïdes (Isopentenyl pyrophosphate, Diméthylallyl pyrophosphate). Une succession de condensation des isoprénoïdes conduit à la production de squalène. A partir de ce précurseur

biochimique, la synthèse des stérols s'achève par la synthèse de cholestérol (**Cerqueira et al., 2016**). On estime qu'entre 800 et 1000 mg de cholestérol sont synthétisés chaque jour par l'organisme (**Mok et al., 1979**). Les sites de synthèse *de novo* sont principalement localisés dans le foie (40–50 %), l'intestin (10–20 %) et dans l'hypoderme incluant le tissu adipeux (20%) (**Spady et Dietschy, 1983**). Cependant, l'extrapolation de ces résultats à l'homme reste à approfondir du fait que les auteurs de ces études ont sélectionnés plusieurs modèles expérimentaux (rat, lapin, souris, chimpanzé) et écarté l'apport de cholestérol contenu dans leur régime (**Dietschy et al., 1993 ; Stellaard et Lütjohann, 2017**).

La seconde source de cholestérol est apportée par notre alimentation et se retrouve dans notre intestin. Une étude pionnière a démontré que l'apport de cholestérol alimentaire entraîne une augmentation de la cholestérolémie. Ainsi, le cholestérol alimentaire favorise l'augmentation de la cholestérolémie et est considéré comme un facteur de risques des MCVs (**Dietschy et Siperstein, 1967**). Ce contexte oblige un questionnement du grand public sur cette question pour limiter la consommation, avec un apport nutritionnel journalier de 200 à 300 mg de cholestérol recommandé (**Committee on Nutrition American Heart Association, 1968 ; Dietary guidelines for Americans, 2015-2020**). Jusqu'à aujourd'hui, de nombreuses recherches ont été entreprises, en particulier sur l'aliment vedette du cholestérol alimentaire, l'œuf : la consommation d'œufs influence le niveau de cholestérol circulant chez l'homme (**NHANES, 2006**). Cependant, une multitude d'études conduisent à des résultats contradictoires suivant le type d'individu étudié (populations, normo- ou dyslipidémiques), la cause de la pathologie (génétique ou non), la variabilité de réponses au sein d'une même population (hypo-répondeur, hyper-répondeurs) (**Ginsberg et al., 1994 ; Fernandez, 2006 ; Qureshi et al., 2007 ; Qin et al., 2018 ; Xia et al., 2020**). Toujours dans l'attente d'hypothèses concluantes, les prérogatives de la « *Food and Drug Administration* (FDA), l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux », dirigent la population vers une éducation nutritionnelle éclairée, avec une prise de conscience sur la consommation de produits alimentaires enrichis en cholestérol: les produits carnés à l'état brut ou transformé (d'origine bovine, porcine ou la volaille), les produits laitiers (lait, yaourt, fromage), les œufs, les produits de la mer (**FDA, 2020**). Aujourd'hui, cette stratégie a permis de sensibiliser et favoriser les habitudes alimentaires saines de la population, qui reste la première approche préventive et efficace non-médicamenteuse pour limiter le risque des MCVs (**NCD Risk Factor**

Collaboration, 2020). Enfin, la dernière source de cholestérol de l'organisme est la desquamation cellulaire, est définie par un renouvellement des entérocytes dans l'intestin. Ce processus naturel correspond au décollement et la perte de la couche superficielle de l'épithélium lors de la mort cellulaire. Croft, *et al.*, soutiennent que ce phénomène contribue activement à un apport de lipides membranaires entre 12 à 30 grammes par jour au niveau de la lumière intestinale (**Croft et Cotton, 1973**). Cependant, l'absence de résultats récents semble négliger cet apport de cholestérol de l'organisme. Pour résumer, l'ensemble de ces voies d'entrées du cholestérol forme un pool de cholestérol et participe au maintien de l'homéostasie du cholestérol de notre organisme. Sur la totalité de cholestérol contenu dans notre organisme, 70 % est issu de la synthèse *de novo* de cholestérol dans le foie et les autres tissus comme l'intestin, contre 30 % en provenance du cholestérol alimentaire (**Grundy et al., 1983**).

2.2. L'absorption de cholestérol dans l'intestin

Dérivé de ces sources endogènes et exogènes, le cholestérol contribue à l'établissement d'un pool de cholestérol présent au niveau de la lumière de l'intestin. Cette quantité de cholestérol est estimée entre 1 400 à 1 700 mg par jour (**Wang, 2007**). Une partie de ce pool est absorbée dans l'intestin (**Figure 2**). Altmann et ses collègues de l'institut de recherche de Schering-Plough (New Jersey, USA) ont clairement établi le rôle de la protéine *Niemann-Pick C1 Like 1* (NPC1L1) dans l'absorption du cholestérol (**Altmann et al., 2004**). Chez l'homme, l'inhibition de NPC1L1 révèle que sa contribution majoritaire est d'environ 54 % dans ce processus (**Sudhop et al., 2002**). D'autres transporteurs, *scavenger receptor class B type I* (SR-BI) a également un rôle essentiel dans l'absorption de cholestérol. Cependant, sa fonction dans cet organe n'est pas établie et les avis restent divergents sur sa régulation : sa sur-expression provoquerait une augmentation de l'absorption de cholestérol, à l'inverse, son absence n'induirait pas de modification de l'absorption (**Mardones et al., 2001**). D'autres évidences scientifiques sur SR-BI, évoque le rôle non spécifique et accessoire. En effet, il est établi que SR-BI dans l'intestin présente de nombreux ligands : les triglycérides, les lipoprotéines dans le transport de cholestérol inverse (**Bietrix et al., 2006**). D'autres acteurs de l'efflux de cholestérol intestinal ont été identifiés, les transporteurs *ATP-binding cassette* (ABC) de type G5 et G8 (**Berge et al., 2000 ; Figure 2**).

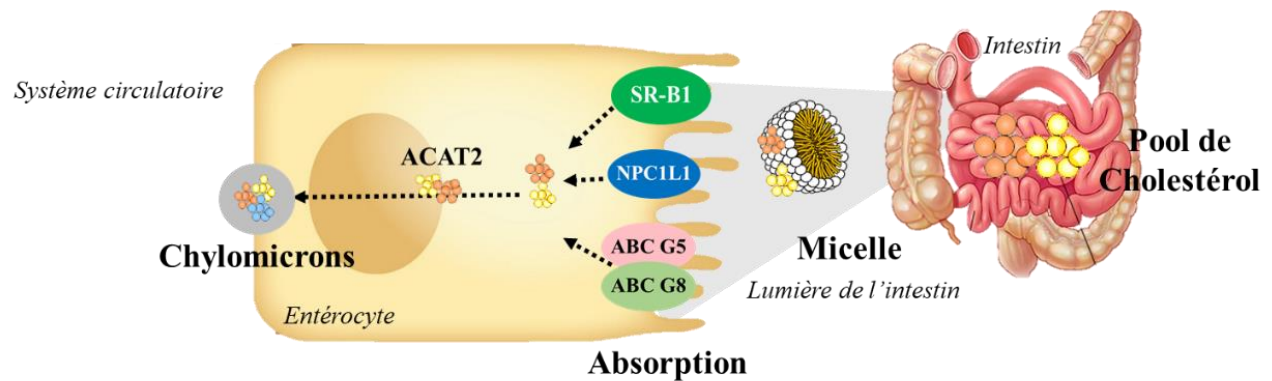


Figure 2 : L'absorption de cholestérol intestinal.

Dans l'intestin, le pool de cholestérol s'associe aux sels biliaires pour être solubilisée sous forme de micelles dans le milieu intestinal. Ce cholestérol, lié au complexe micellaire, est absorbé par les entérocytes au niveau de l'iléon. Etant donné la nature hydrophobe du cholestérol, la molécule passe à travers la membrane par diffusion passive dans les cellules intestinales (Turley et Dietschy, 2003). La majorité du cholestérol est convertie en ester de cholestérol par l'acétyl- A cholesterol acyltransferase 2 (ACAT-2) pour favoriser sa sécrétion dans la circulation et rejoindre le foie via les chylomicrons (D'après Jia *et al.*, 2011).

En plus de ces transporteurs, la solubilisation du cholestérol est un facteur indispensable à son absorption. Pour cela, les sels biliaires sécrétés dans l'intestin jouent un rôle central pour agir en tant que détergent biologique. En leur absence, l'absorption de cholestérol est seulement de 20 % (**Woollett et al., 2004**). L'ensemble de ces facteurs participent à l'absorption de cholestérol dans l'intestin (**Figure 2**). En général, cette fraction de cholestérol absorbée est estimée entre 28 % à 80 % du pool de cholestérol initial pour un individu sain (**Sudhop et al., 2002**). Cette variabilité interindividuelle s'explique par des facteurs liés à la physiologie de l'individu comme l'âge ou le polymorphisme génétique² (**Ros et al., 2000 ; Levy et al., 2007**). La composition du régime alimentaire et sa teneur en cholestérol installe un effet dose du cholestérol dans l'intestin et *in fine* réduit cette efficacité d'absorption (**Ros et al., 2000**). De façon intéressante, Kern *et al.*, rapporte le cas d'un patient qui a consommé 25 œufs par jour et présente un taux de cholestérol normal. Ceci s'explique par un processus compensatoire qui allie une réduction de 18 % d'absorption de cholestérol et une augmentation de la conversion de cholestérol en sels biliaires (**Kern et al., 1991**). Ce cholestérol absorbé rejoint la circulation lymphatique via des protéines spécifiques de transport pour être distribué au sein de l'organisme.

2.3. Le transport de cholestérol dans l'organisme, les lipoprotéines

Le cholestérol est une molécule insoluble dans un environnement hydrophile du système circulatoire et doit être véhiculé par des transporteurs, les lipoprotéines. Ce sont des complexes macromoléculaires sphériques qui présentent un cœur lipidique, entouré d'une monocouche externe. Les phospholipides et le cholestérol non estérifié, les apoprotéines se retrouvent à la surface alors que le noyau présente des triglycérides (TG) et le cholestérol sous sa forme libre ou estérifié. Les apoprotéines (APO) de type A, B, C, E constituent la structure des lipoprotéines et agissent comme ligands pour les récepteurs des lipoprotéines, situés dans l'ensemble de l'organisme (**Gagné et Gaudet, 2007 ; Feingold et al., 2021**). Les lipoprotéines sont classifiées suivant leur composition, leur densité et leur rôle dans le transport de cholestérol dans l'organisme. Ces lipoprotéines ont été découvertes à travers le travail de nombreux laboratoires de recherche, notamment ceux des professeurs pionniers de la lipidologie, Pr. Oncley, Pr. Gofman et le Pr. Fried-

² Le **polymorphisme génétique** fait référence à une variance dans la séquence d'un gène entre les individus. Ces variations sont responsables d'une diversité des caractères phénotypiques d'un individu au sein d'une population.

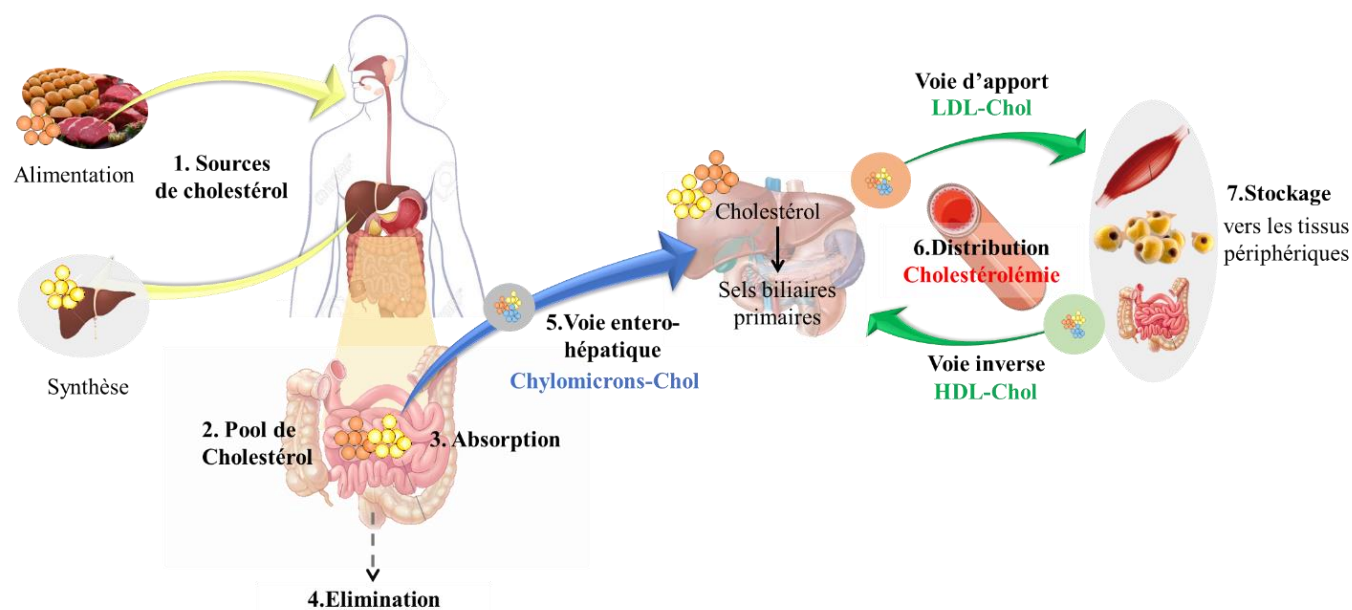


Figure 3 : La distribution du cholestérol endogène et exogène à travers les compartiments physiologiques majeurs chez l'homme

(1) A partir du cholestérol issu de l'alimentation et de la synthèse de novo, (2) ce pool se retrouve dans la lumière de la partie haute de l'intestin. (3) Une part de cholestérol est absorbée avec les lipides alimentaires par les cellules intestinales pour former les chylomicrons-Chol. (4) Le restant est entraîné dans le reste du tractus intestinal et est en partie éliminé. (5) Ces chylomicrons suivent la voie entéro-hépatique via le système circulatoire pour rejoindre le foie où ils sont dégradés. (6) Le cholestérol hépatique endogène et exogène est transporté par les LDL-Chol dans la circulation plasmatique vers les tissus périphériques (squelettiques, adipeux et intestinaux). Le transport inverse de cholestérol dans les tissus périphériques vers le foie (6), est assuré par les HDL-Chol.

-ewald (**Lindgren *et al.*, 1951 ; Oncley et Harvie, 1969 ; Friedewald *et al.*, 1972**). Leurs travaux ont permis de révéler que le transport de cholestérol est lié aux chylomicrons (chylomicron-chol), aux lipoprotéines de très basse densité (VLDL-Chol), aux lipoprotéines de basse densité (LDL-Chol), aux lipoprotéines de haute densité (HDL-Chol) (**Figure 3**). Ainsi, les lipoprotéines coordonnent des mécanismes de régulation dense et flexible, autour de 3 voies majoritaires.

La voie entéro-hépatique est la voie d'origine des lipoprotéines via la genèse des chylomicrons dans l'intestin. Leur formation débute lors de l'assemblage de lipides alimentaires, à savoir du cholestérol, des phospholipides et des APO B. Ce complexe lipidique forme des gouttelettes, s'étend pour former des chylomicrons. Ces chylomicrons rejoignent la circulation lymphatique puis plasmatique pour être ensuite internalisés et dégradés par le foie (**Figure 3 ; Castro *et al.*, 2012**). Le foie est l'organe central du métabolisme des lipoprotéines plasmatiques. Il fournit les besoins nécessaires en lipides et en cholestérol aux tissus périphériques. Précisément, des gouttelettes lipidiques excrétées par le foie, exportent le cholestérol, pour former les VLDL-Chol. Ces VLDL-Chol naissants sécrétés vers le plasma, combinent un assemblage d'APO B, d'APO E, de cholestérol, de triglycérides, et de phospholipides. Puis, ces VLDL-Chol sont ensuite transformés dans le sang en LDL-Chol, lorsque leur teneur en cholestérol devient plus importante que celle des triglycérides (**Havel, 1975**). Cet apport de cholestérol est médié par des récepteurs aux LDL-Chol qui favorisent leur incorporation et leur dégradation dans les tissus périphériques (**Brown et Goldstein, 1976 ; Marinetti, 1990**).

La voie de transport inverse de cholestérol, menée par les HDL-Chol, transfère le cholestérol des tissus ou organes périphériques vers le foie. Ces HDL-Chol sont habilités à transporter le cholestérol (**Choy *et al.*, 2004**). Ces trois voies de transports participent au maintien d'un taux de cholestérol limité dans le système circulatoire (**Figure 3**). Lors d'un excès de cholestérol, il s'accumule dans les LDL-Chol, ce qui entraîne une circulation prolongée de ces LDL-Chol au sein des parois vasculaires. C'est pourquoi, la distribution des HDL-Chol et des LDL-Chol est essentielle pour maintenir une teneur en cholestérol constant et assurer une distribution fonctionnelle dans l'organisme via le système circulatoire.

D'un point de vue clinique, la distribution du cholestérol dans l'organisme d'une personne saine est suivie à partir du dosage sanguin du cholestérol total (1,5 et 2,5 g/L soit 3,8 à 6,5 mmol/L), de LDL-Chol (1,1 à 1,6 g/L) et par celui associé aux HDL-Chol (0,4 à 0,6 g/L), des triglycérides

(inférieur à 1,5 g/L). Cet examen lipidique de base définit la cholestérolémie d'un individu, et est souvent préconisé pour diagnostiquer des troubles associés à un dysfonctionnement des lipides et prévenir à long terme des MCVs. De façon intéressante, les données épidémiologiques démontrent que la teneur moyenne de cholestérol total de la population mondiale, équivaut entre 4,64 mmol/L - 4,76 mmol/L (**Farzadfar et al., 2011**). La régulation de la cholestérolémie résulte, i) des voies d'entrée du cholestérol (biosynthèse, alimentation, desquamation des cellules, bile), ii) de l'efficacité d'absorption du cholestérol vers le plasma, iii) des voies de sorties du cholestérol. Ces dernières que nous allons voir dans les prochains chapitres.

2.4. Les voies de dégradation du cholestérol dans l'organisme

Les voies de dégradation du cholestérol englobent 3 processus majoritaires, incluant le stockage de cholestérol, la synthèse de sels biliaires et l'élimination de cholestérol vers les selles.

2.4.1 La voie de stockage au niveau des tissus périphériques

Le stockage de cholestérol est un processus dynamique qui participe à l'équilibre de la cholestérolémie. Généralement sous forme estérifié, le cholestérol est entreposé dans les tissus périphériques, réservés à cet effet. Le foie, les tissus intestinaux et adipeux, les muscles squelettiques sont des réserves de cholestérol abondantes dans l'organisme. Ces cellules ne sont pas capables de métaboliser extensivement le cholestérol. Ce stockage sert plutôt de lieu de dépôt à long terme, et permet d'exercer dans certaines conditions des fonctions physiologiques dites secondaires (**Farkas et al., 1973**). C'est le cas du cholestérol stocké dans les muscles squelettiques. Il peut intervenir lors de phénomène de contraction-excitation musculaire³ et lors du rétablissement d'une dysfonction musculaire via la stimulation d'insuline⁴ par l'intermédiaire de transporteurs situés à la surface des cellules musculaires (**Barrientos et al., 2017**). A ce jour, peu d'études s'attachent à cette quantité de cholestérol de ce tissu. Cependant, certaines évidences tendent à soutenir l'importance capitale du maintien constant de cette distribution de cholestérol du muscle squelettique sur la teneur en LDL-chol (**Vella et al., 2020**). Parmi les autres cellules

³ La **contraction- excitation musculaire** est un mécanisme qui regroupe l'excitation des fibres musculaires qui amène *in fine* au glissement des filaments fins et épais les uns contre les autres, c'est-à-dire la contraction des muscles.

⁴ L'**insuline** est une hormone sécrétée par les cellules du pancréas qui permet l'absorption de glucose par les cellules du tissu adipeux, du foie et du muscle squelettique. Elle est nécessaire à son fonctionnement énergétique.

périphériques, celles du tissu adipeux présentent un rôle de stockage principal de cholestérol, contenant 0,6 – 1,6 mg de cholestérol par gramme de tissu (**Farkas *et al.*, 1973 ; Krause et Hartman, 1984**).

Une attention particulière a été portée autour de la composition des adipocytes. L'analyse de ces cellules a démontré que ce tissu présente une teneur en cholestérol importante, avec une accumulation au niveau de sa membrane de cholestérol libre et à l'intérieur du cytoplasme des gouttelettes de triglycérides (**Kovanen *et al.*, 1975 ; Chung *et al.*, 2014**). Cet enrichissement actif de cholestérol de ces cellules, a été rapporté dans l'implication de l'obésité, mais les mécanismes sous-jacents qui contribuent à ce phénomène sont peu étudiés (**Chui *et al.*, 2005**). Le foie sert également d'organe de stockage et forme au niveau des hépatocytes des gouttelettes lipidiques (**Matsuzawa *et al.*, 2007**). Plusieurs études ont identifié le foie comme organe majoritaire de stockage de l'excès de cholestérol dans l'organisme. C'est d'ailleurs un des processus qui serait impliqué dans l'apparition de stéatohépatite non-alcoolique (**Iannou *et al.*, 2019**).

Enfin, de nombreuses publications ont décrit l'intestin comme organe de stockage. Il est intéressant de savoir qu'à l'échelle de la cellule, peu de cholestérol est réellement déposé dans les entérocytes : c'est un lieu de stockage transitoire qui dépend uniquement de la nature de la molécule (**Nguyen *et al.*, 2012**). En effet, le cholestérol libre est incorporé aux membranes des entérocytes pour faire partie intégrante de la structure de la membrane cellulaire. Le cholestérol estérifié est pris en charge par l'activité d'ACAT2, et sera incorporé dans des gouttelettes lipidiques pour être acheminé vers le système circulatoire (**Buhman *et al.*, 2000**). Lorsque l'on se met à l'échelle de l'organe du système digestif, une quantité de cholestérol est disponible au niveau de la lumière intestinale. Cependant, il est difficile d'établir la quantité du cholestérol réellement présente du fait de l'influence de la cholestérolémie, en considérant la régulation des voies de biosynthèse et de catabolisme du cholestérol, en partie décrites dans les précédentes sections.

La voie finale d'élimination du cholestérol réside autour d'une de ses fonctions physiologiques principales, assurée par les sels biliaires (**Russel, 2003**). Environ 50 % du pool de cholestérol est converti en acide biliaire et fait partie intégrante du renouvellement quotidien du cholestérol chez l'homme. Le foie est le seul organe qui présente cette capacité à éliminer directement le cholestérol à travers la sécrétion de produits biliaires, qualifiés communément de *bile* (**Chiang, 2004**). Les sels biliaires sont les principaux composants de la bile, liquide biologique

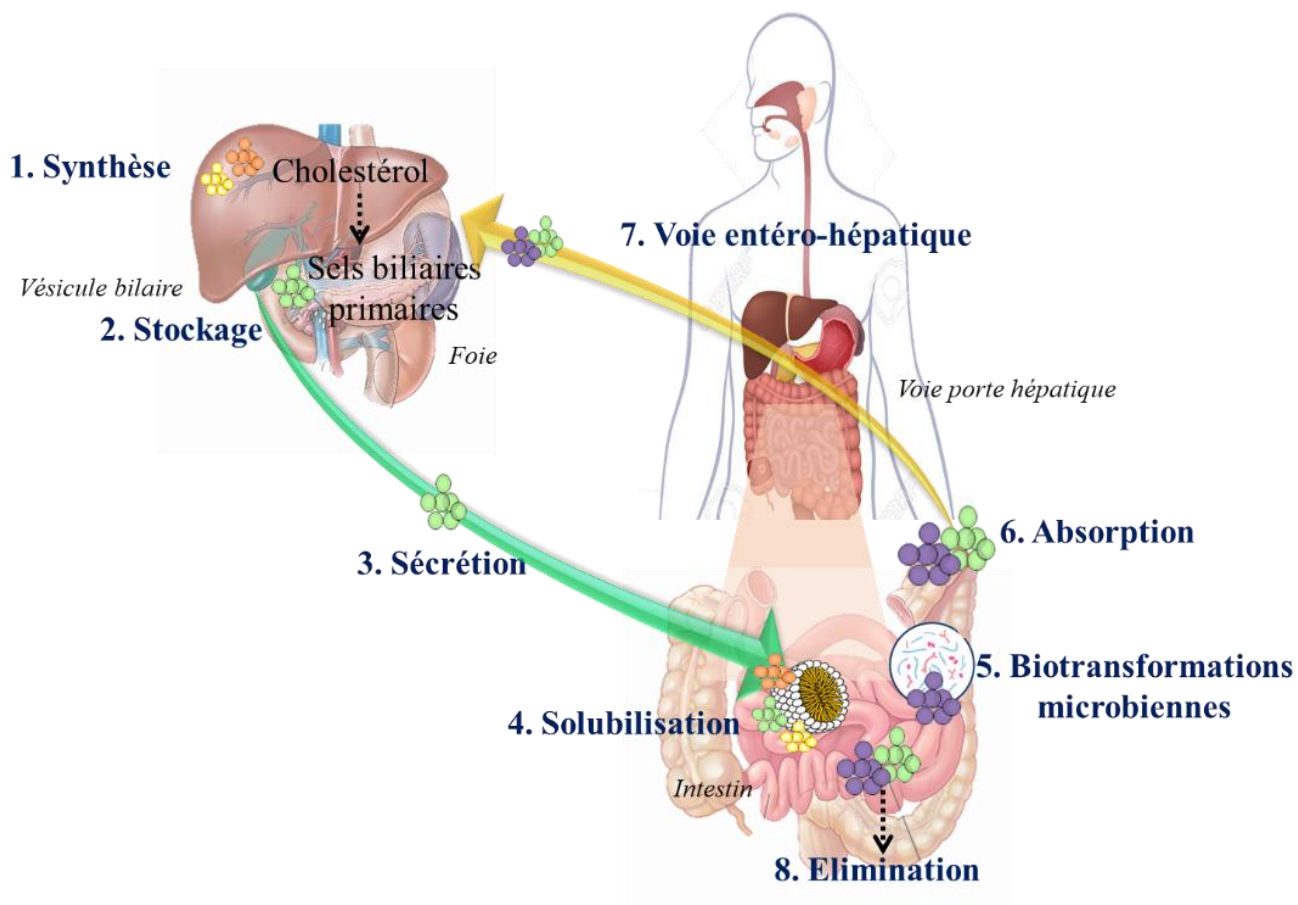


Figure 4 : Le cycle entéro-hépatique.

1) Les sels biliaires sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol puis 2) sont excrétés à travers le canalicule et transportés dans la vésicule biliaire où ils sont stockés en même temps que les phospholipides et autres composants de la bile (phospholipides, cholestérol, bilirubine⁵). 3) Suite aux repas, la bile majoritairement constituée des sels biliaires, est sécrétée dans l'intestin au niveau du duodénum. 4) La plupart des sels biliaires sont ensuite solubilisés avec les lipides alimentaires, incluant le cholestérol. 5) Une partie des sels biliaires sont biotransformés par le microbiote intestinal, pour former les sels biliaires secondaires. 6) La majorité des sels biliaires primaires et secondaires sont réabsorbés avec le cholestérol par les cellules intestinales au niveau de l'iléon. Après un transport intracellulaire dans les entérocytes, 7) les sels biliaires rejoignent la circulation via la voie porte hépatique pour rejoindre le foie et y être pris en charge par les hépatocytes. 8) Une partie des sels biliaires échappent au recyclage et sera excrétée dans les selles.

⁵ **Bilirubine** est un produit de dégradation issue de l'hème des globules rouges au niveau de la rate. Essentiellement associée comme colorant principalement jaune de la bile, la bile permet d'excréter les déchets métaboliques du foie incluant l'excès de cholestérol ou la bilirubine.

stocké au niveau de la vésicule biliaire. Lorsqu'ils sont sécrétés en amont de l'intestin, ils exercent un rôle fondamental dans notre système digestif en solubilisant nos lipides alimentaires, notamment le cholestérol et les vitamines liposolubles. Ce processus est réalisé via la formation de micelles, qui facilitent leur absorption au niveau des entérocytes, et *in fine* leur recyclage vers le foie. C'est le cycle entéro-hépatique (**Figure 4**). C'est un processus qui est important dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol. De façon plus approfondie, l'acide cholique (AC) et l'acide chenodeoxycholique (ACDC) sont deux acides biliaires synthétisés à partir du cholestérol dans le foie (**Chiang, 2013**). Cette voie de biosynthèse est initiée par l'enzyme cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1). Ces deux acides biliaires sont ensuite conjugués soit à la glycine donnant l'acide glycocholique (AGC) et l'acide glycochenodeoxycholique (AGCDC), soit conjugué à la taurine conduisant à l'acide taurocholique (ATC) et l'acide taurochenodeoxycholique (ATCDC) (**Hardison et al., 1978**). Ces acides biliaires conjugués sont communément qualifiés de « sels biliaires primaires » grâce à la formation de sels de sodium. Les sels biliaires primaires sont transportés vers la vésicule biliaire.

2.4.2. La voie des sels biliaires

Après un repas, les sels biliaires primaires sont sécrétés à haute concentration et se répartissent au niveau du duodénum, du jéjunum et de l'iléon pour exercer leur fonction physiologique (**Figure 4 : Chiang et al., 2013**). Une partie de ces sels biliaires est biotransformée par le microbiote intestinal. Ce métabolisme microbien donne lieu à la production d'une myriade de métabolites secondaires, incluant majoritairement l'acide deoxycholique (ADC), l'acide lithocholique (ALC), l'acide ursodeoxycholique (AUDC) (**Ridlon et al., 2006**). Une partie des sels biliaires primaires et secondaires est réabsorbée activement via des transporteurs situés au niveau de l'iléon. Ils sont recyclés vers le foie et restockés vers la vésicule biliaire pour être remobilisés lors d'une prochaine stimulation du cycle entéro-hépatique. Propre à celui de l'homme, un pool de sels biliaires divers et variés est présent dans notre compartiment digestif. Sa composition reste difficile à déterminer du fait d'influence de nombreux facteurs sur le métabolisme des sels biliaires qui restent encore à approfondir. C'est le cas de la biotransformation microbienne, la composition du régime alimentaire et la variabilité inter-individuelle qui présentent une importance dans la composition du pool biliaire. Seuls les ATC, AGC, et AGCDC ont été identifiés comme

majoritaires (**Fuchs et Dressman, 2014**). Perez de la Cruz Moreno *et coll* ont pu également estimer la concentration au niveau du duodénum, entre 570 à 5137 μmol et de 829 à 5470 μmol dans le jéjunum (**Perez de la Cruz Moreno et al., 2006**). Outre ses fonctions digestives, un nombre important d'études a permis de renforcer le rôle fondamental des sels biliaires dans le maintien de ces fonctions métaboliques (**De Aguiar Vallim et al., 2013 ; Shapiro et al., 2018**). Les sels biliaires agissent comme molécules « signal » dans les fonctions métaboliques de l'homme à travers de nombreux récepteurs distribués dans les différents tissus tels que *nuclear receptor farnesoid X receptor* (FXR) dans le foie, ou des récepteurs *membrane G protein-coupled receptors* (TGR5). De nombreuses investigations doivent être apportées sur ces récepteurs métaboliques et leur implication dans le métabolisme des stérols dans leur tissu respectif.

2.4.3. Les voies d'élimination vers les selles

Le rôle de l'intestin dans la régulation du métabolisme du cholestérol a largement été sous-estimé, en partie lors des processus d'élimination du cholestérol dans l'organisme. Environ 4,5 % de stérols, comprenant le cholestérol et les sels biliaires, échappent au cycle entéro-hépatique (**Voronova et al., 2020**). De la partie terminale de l'iléon jusqu'au côlon, les sels biliaires et le cholestérol restants traversent ce dernier segment du tube digestif pour être *in fine* excrétés vers les selles. Dans la littérature, certaines valeurs seuils sont disponibles, environ 0,8 grammes de sels biliaires par jour et de 0,4 - 0,6 gramme de cholestérol par jour chez l'homme (**Forman, 1972**). Cependant, ces données doivent être mises à jour au regard de nouveaux déterminants récemment identifiés. Un nouvel entrant présent dans l'intestin, le microbiote intestinal dégrade le cholestérol et les sels biliaires primaires au cours du cycle entéro-hépatique (**Wahlström et al., 2016 ; Gérard et al., 2004**).

Indépendamment, une autre voie d'élimination secondaire de cholestérol par les selles est grandement étudiée pour son impact clinique sur la diminution de cholestérol circulant dans l'organisme : l'excrétion de cholestérol trans-intestinal (TICE, *trans-intestinal cholesterol excretion*) (**Vrins, 2010 ; Jakulj et al., 2013 ; Reeskamp et al., 2018**). Le cholestérol circulant qui est présent dans les LDL-Chol, intègre les entérocytes au niveau des récepteurs présents au niveau de leur membrane basolatérale, trans-intestinale, puis apicale pour être sécrété dans la lumière intestinale (**Van der Velde et al., 2007**). La contribution des entérocytes à participer à l'enrichissement de cholestérol éliminé au niveau de l'intestin est estimée entre 10– 15 % (**Férézou**

et al., 1981). L'ensemble de ces propos redéfinissent l'élimination du cholestérol vers les fèces comme un ensemble de ces stérols, incluant le cholestérol et les sels biliaires d'origine alimentaire, hépato-biliaires, ceux dérivés des stérols transformés par le microbiote intestinal et ceux issus du transport inverse de cholestérol à partir du système circulatoire (Temel *et al.*, 2010). Des données proposent une estimation de ce pool de cholestérol intestinal. En moyenne, 20 % de ce cholestérol provient du cholestérol alimentaire non-absorbé, 13 % de cholestérol apporté par les entérocytes et 67 % de cholestérol est excrété vers les selles (Férézou *et al.*, 1981 ; Jakulj *et al.*, 2016). Mais ces dernières données sont incomplètes, excluant la contribution du microbiote intestinal. Cet ensemble complexe est souvent assimilé à une voie d'élimination non comptabilisée et souvent mal-interprétée. Des nombreuses investigations doivent être approfondies pour déterminer la quantité de cholestérol et de sels biliaires intestinaux totaux éliminés.

En résumé, l'homéostasie du cholestérol intègre ces différents processus. À l'équilibre, les apports, les voies de dégradation et d'absorption de cholestérol sont des déterminants critiques de la concentration de cholestérol circulant, marqué par un taux de LDL-Chol stable dans l'organisme. En revanche, ce LDL-Chol est qualifié communément de “mauvais cholestérol” lorsque sa concentration en excès contribue activement à l'hypercholestérolémie.

3. L'hypercholestérolémie et ses troubles associés

L'hypercholestérolémie est définie par un excès de cholestérol total circulant dans l'organisme, majoritairement porté par les LDL-Chol. Le cholestérol circulant en excès entraîne des dysfonctions au niveau des systèmes biologiques impliqués dans le métabolisme du cholestérol, décrit précédemment. L'hypercholestérolémie est une dyslipidémie⁶ qui est rapportée dans de nombreuses maladies et entraîne une atteinte au niveau hépatique (*e.g.* stéatohépatite non-alcoolique), dans la majorité des systèmes, les maladies métaboliques⁷ (*e.g.* l'obésité) et au niveau du système circulatoire (*e.g.* athérosclérose) (Lusis, 2000 ; Chatrath *et al.*, 2012 ; Klop *et al.*,

⁶ Une **dyslipidémie** est une anomalie d'un ou de plusieurs lipides plasmatiques incluant le cholestérol total et le LDL-Chol et les triglycérides (TG). L'hypercholestérolémie est une des dyslipidémies les plus fréquentes.

⁷Les **maladies métaboliques** sont associées à une généralisation de dysfonction du métabolisme énergétique de l'organisme, marquées par une hyperglycémie, une insuline élevée, une hypercholestérolémie, une hypertension et un excès de masse adipeuse.

2013). En particulier, l'athérosclérose et la stéatose hépatique non-alcoolique favorisent la survenue de MCVs (Tana *et al.*, 2019 ; Klop *et al.*, 2013).

3.1. Les maladies cardiovasculaires

Les MCVs englobent une multitude de troubles physiologiques, visibles au niveau du cœur et des vaisseaux du système circulatoire. Elles représentent la première cause de mortalité dans le monde, affectant 31 % de la mortalité mondiale totale (WHO, 2020). L'apparition des MCVs est favorisée généralement par des facteurs de risques d'ordre génétique (predisposition génétique), lié aux comportements (tabagisme, alimentation mauvaise et sédentarité), ou à des troubles physiologiques (hypercholestérolémie, hypertension, hyperglycémie), associée à des maladies métaboliques (*e.g.* obésité, athérosclérose) (Flora et Nayak, 2019). Parmi les MCVs, les maladies coronariennes⁸ sont les plus communes, telles que l'athérosclérose. Les MCVs s'installent majoritairement de façon asymptomatique jusqu'au stade ultime, pour donner lieu à des événements critiques pour le bien-être et la santé de l'homme : insuffisances cardiaques, infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux (AVC) (Libby *et al.*, 2019). Il est donc primordial d'accentuer auprès du grand public la prévention pour favoriser la prise en charge des MCVs (Karunathilake et Ganegoda, 2018). Pour mieux appréhender l'hypercholestérolémie et limiter l'influence de multiples facteurs de risques, nous avons choisi de cibler un premier spectre de lésions pathologiques réversibles, finement liées à ce paramètre métabolique. Le cholestérol, en excès dans l'organisme, engendre des premières lésions locales, initiées au niveau des parois du système circulatoire pour l'athérosclérose et du foie pour les stéatopathies hépatiques non-alcooliques.

3.2. Les stéatopathies hépatiques non-alcooliques

Les stéatopathies hépatiques non-alcooliques (NAFLD, *non-alcoholic fatty liver disease*) désignent un groupe de maladies, communément associées aux pathologies du « foie gras » (Sheka *et al.*, 2020). Elles surviennent à la suite d'une accumulation excessive de lipides et des lésions majeures au niveau du foie (Marchesini et Marzocchi, 2007). C'est le cas de la stéatohépatite non-alcoolique (NASH, *non-alcoholic steatohepatitis*), qui reste la manifestation clinique la plus

⁸ Les **maladies coronariennes** affectent les artères coronaires du système circulatoire qui alimente le cœur.

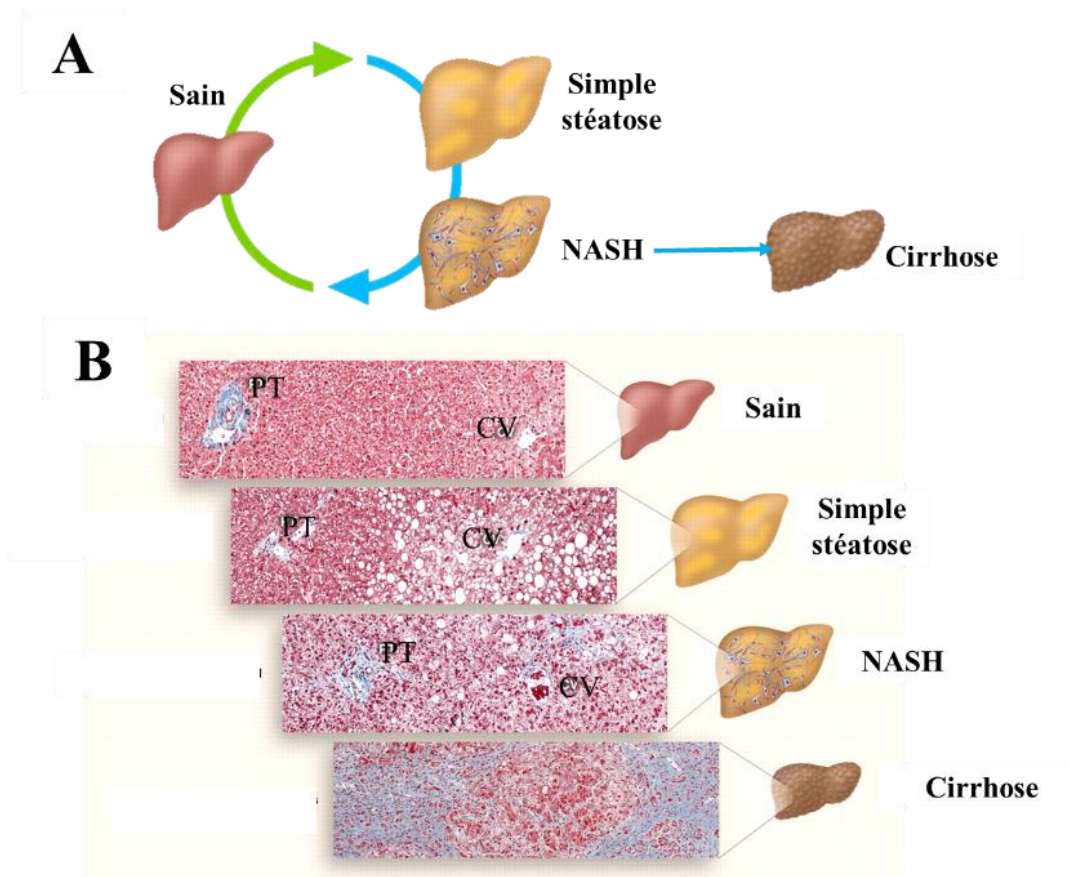


Figure 5 : Les profils hépatiques des NAFLD (D'après Cohen *et al.*, 2011 ; Sheka *et al.*, 2020)

(A) Anatomopathologie du foie diagnostiqué NAFLD. A partir d'un foie sain, l'accumulation des triglycérides et de cholestérol dans les hépatocytes cause une simple stéatose. L'inflammation et un début de fibrose hépatique⁹, caractérisent les NASH. Les NASH évoluent dans certains cas vers un état complexe et irréversible, la cirrhose.

(B) Evaluation histologique des NAFLD à partir d'un foie sain, stéatosé, atteint de NASH et de cirrhose. Brièvement, une simple stéatose se distingue par un agrégat de macrovésicules lipidiques situées au niveau des hépatocytes, composés de triglycérides et cholestérol, qui débute typiquement autour des veines centrales (CV). La stéatose se complexifie avec un grossissement de la taille des hépatocytes, qui s'accompagne d'une composante inflammatoire : une majorité des neutrophiles s'agglomère au niveau des lobules hépatocytaires. Cette dimension inflammatoire caractérise la progression du stade NASH. Jusqu'alors cette atteinte hépatique peut être rétablie. Dans certaines conditions, les NASHs progressent vers un stade ultime et irréversible, la cirrhose marquée par une fibrose hépatique avec la coloration en bleu de Masson's trichrome par des fibres de collagène prédominantes. Ces lésions sont majoritairement situées au niveau de la zone de la triade portale (PT, l'artère, la veine porte hépatique et le conduit biliaire), et sont souvent réparties au niveau des veines centrales (CV).

⁹ La **fibrose hépatique** est une atteinte du foie, qui survient suite à un dommage ou une inflammation du tissu biologique. Cette fibrose donne lieu à une non-régénération du tissu atteint.

fréquente des NAFLD. C'est également le point critique final des NAFLD, avant l'établissement d'un stade plus complexe et irréversible. Les NAFLD sont classifiées en fonction du degré de sévérité des anomalies histopathologiques (**Figure 5 ; Neuschwander-Tetri et Caldwell, 2003**). L'étendue de la stéatose (supérieure à 5 %, d'une inflammation lobulaire hépatique, un ballonnement des hépatocytes) et celle de la fibrose déterminent le score d'activité cette pathologie cliniquement hétérogène (**Kleiner et al., 2005**). Cependant, la majorité des patients atteints de NAFLD sont asymptomatiques. Dans la majorité des cas, les individus atteints sont confrontés à un schéma de diagnostic médical conventionnel, avec un bilan sanguin et des questionnaires d'informations cliniques. Des anomalies du bilan sérique (e.g., hypercholestérolémie, hypertriglycémie, albumine¹⁰, transaminases¹¹), des indicateurs de dysfonctions métaboliques macroscopiques peuvent être considérés comme des critères d'inclusions non-viables et non-spécifiques des NAFLD (**Sourianarayanan et al., 2013**). La nécessité d'une intervention clinique via un examen histologique à partir d'une biopsie de foie, reste la seule approche de diagnostic des NAFLD (**Takahashi et Fukusato, 2014**). Ces éléments illustrent notre compréhension actuelle assez limitée sur l'évolution de ces *NAFLD* chez l'homme.

L'approche avec des modèles expérimentaux reste la meilleure alternative pour évaluer les mécanismes sous-jacents de ces nouvelles maladies chroniques (**Farrell et al., 2019**). De nombreuses évidences ont souligné l'importance de notre alimentation, en tant que facteur contributif des NAFLD (**Van Rooyen et al., 2011**). C'est le cas de souris nourries avec un régime riche en matière grasse¹² supplémenté en cholestérol, qui développent une NASH. A l'inverse, des souris ayant reçu le même régime sans cholestérol, sont atteintes d'une simple stéatose (**Liang et al., 2018**). Une forte dérégulation du métabolisme du cholestérol a été également démontrée uniquement à l'échelle des paramètres physiologiques. Bien que ces maladies soient complexes et multifactorielles, le rôle accélérateur du cholestérol dans la progression des pathologies associées aux NASH a été bien établi (**Van Rooyen et al., 2011 ; Buzzetti et al., 2016**).

¹⁰ L'**albumine** est une protéine la plus abondante dans le sang. Elle est produite par les hépatocytes. Leur dosage est prescrit pour dépister une dysfonction hépatique

¹¹ Les **transaminases** sont des enzymes présentes dans plusieurs tissus reflétant ainsi l'activité et la destruction des cellules de ces organes. Les principales causes d'augmentation de leur taux dans le sang, sont liées majoritairement à des anomalies hépatiques.

¹² La **matière grasse** est un terme communément utilisé pour catégoriser les lipides alimentaires comme composant majoritaire des aliments qui contribuent à l'apport énergétique.

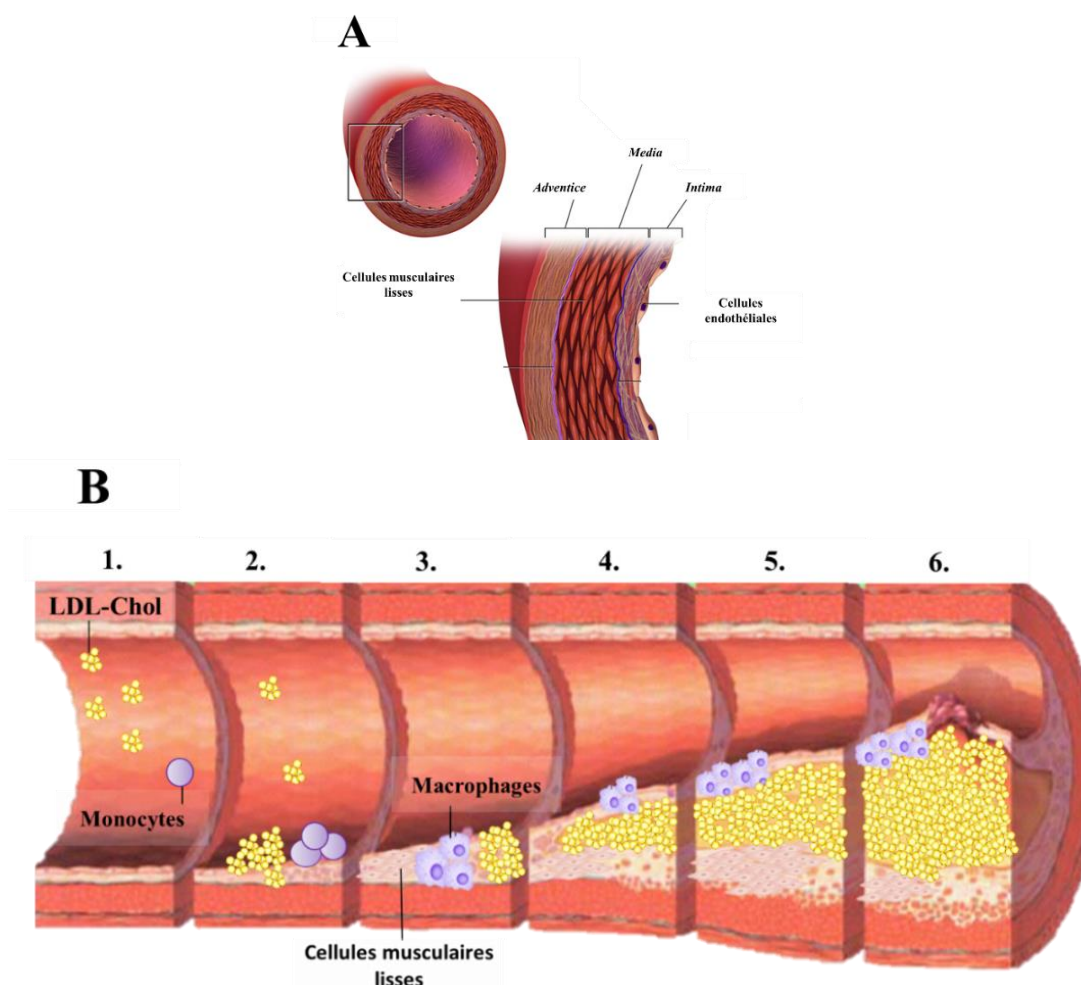


Figure 6 : De l'initiation vers une progression de l'athérosclérose.

(A) La paroi d'une artère est constituée d'une couche interne, l'Intima, (au contact du sang et de son contenu), composée de collagène et d'une couche de cellules endothéliales (CE). D'une couche intermédiaire, la Media, (lumière de l'artère), constituée de cellules musculaires lisses du vaisseau (VSMC), entourée par une matrice extracellulaire composée de fibres d'élastine et de collagène et d'une couche externe, l'Adventice constituée de collagène et de l'endothélium. Les lésions athérosclérotiques se forment entre la couche interne de la Média et l'Intima (**d'après Lapointe, 2016**). (B) (1) A partir d'une artère normalement constituée, le cholestérol et le LDL-Chol circulent en excès dans l'Intima (2) L'accumulation importante de ces lipides, génère un stress oxydatif au niveau de l'Intima. Un changement de profil inflammatoire est induit par un recrutement accru de monocytes circulants, qui adhèrent à l'Intima. Cette étape révèle la formation de stries lipidiques. (3,4) Les LDL-Chol et les monocytes s'infiltrent à l'intérieur de l'Intima et forment une plaque d'athérome. Un processus de maturation convertit les monocytes en macrophages pro-athérogéniques. Ces macrophages intègrent les particules LDL-Chol, pour devenir des cellules remplies de gouttelettes lipidiques. Les cellules endothéliales et musculaires lisses sont atteintes : leurs proliférations sont activées. (5) La progression de la pathologie évolue avec la formation de lésions fibro-lipidiques, avec le dépôt d'une chape fibreuse, composé de collagène, élastine, et fibrine. Le volume de la plaque d'athérome augmente, la lumière artérielle de la Media se réduit. La néovascularisation et la prolifération des cellules musculaires lisses sont favorisées. L'exacerbation de signaux pro-inflammatoires a lieu localement. Cette métamorphose structurale de l'artère est une étape irréversible (6) A un stade ultérieur, les macrophages remplis de gouttelettes lipidiques, entrent en apoptose et forment des corps nécrotiques. La complication des lésions athérogéniques s'accroît, avec l'apparition de thrombose, c'est-à-dire une forte accumulation de ces plaques, avec une calcification au niveau de l'artère. La plaque fortement vulnérable peut se rompre et bloquer la lumière de l'artère et être à l'origine d'un accident vasculaire cérébral (**d'après Stary et al., 1995 ; Gargiulo et al., 2016 ; Libby et al., 2019**).

Bien que les études cherchent à associer les NASH à d'autres anomalies, il reste encore difficile de trouver un lien causal mais plutôt progressif dans l'établissement de ces pathologies. Considérées comme une des caractéristiques hépatiques des maladies métaboliques, les NASH partagent de nombreux facteurs de risque avec les MCVs (**Gaudio et al., 2012**). Un nombre grandissant d'évidences démontrent que les NAFLD peuvent être considérées comme un biomarqueur subclinique de l'athérosclérose et font partie intégrante de la pathologie (**Zhou et al., 2018**). Remarquablement, les auteurs de cette étude proposent un possible dialogue global entre les systèmes biologiques de l'organisme, le foie et le système circulatoire. Ces recherches doivent être approfondies pour élargir le potentiel global de l'athérosclérose chez l'homme pour mieux appréhender les NAFLD.

3.3. L'athérosclérose

3.3.1. L'Etablissement de l'athérosclérose

Il a été mis en évidence que l'hypercholestérolémie est facteur de risque qui favorise l'athérosclérose (**Lusis, 2000**). En effet, le cholestérol et les LDL-Chol circulants en excès dans l'organisme, se déposent au niveau des parois des artères du système circulatoire. Progressivement, ce dépôt s'accumule pour former de simples plaques d'athéromes. L'évolution de l'athérosclérose est classifiée suivant l'état physiopathologique de ces lésions.

3.3.2. De l'atteinte des cellules de la zone lésée jusqu'aux fonctions physiologiques

L'évolution de l'athérosclérose au sein de l'organisme est intimement liée à une rupture de la communication cellulaire de la paroi vasculaire, les cellules endothéliales (CE) et les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) (**Li et al., 2018**). Les parties intégrantes de l'artère, les VSMC et les CE, interagissent pour déterminer les propriétés vasomotrices de la paroi. Par définition, ce dynamisme paramétrise le flux sanguin du système via le contrôle du diamètre de l'artère pour assurer activement la distribution du sang vers les organes et tissus biologiques dans un contexte physiologique donné. Cette réactivité vasculaire se traduit soit par une vasoconstriction exercée par les VSMC, qui conditionne une diminution du diamètre des vaisseaux, soit par une vasodilatation gérée par les CE pour augmenter le diamètre (**Figure 7 ; Furchgott et Zawadzki, 1980 ; Galley et al., 2004 ; Krüger-Genge et al., 2019**).

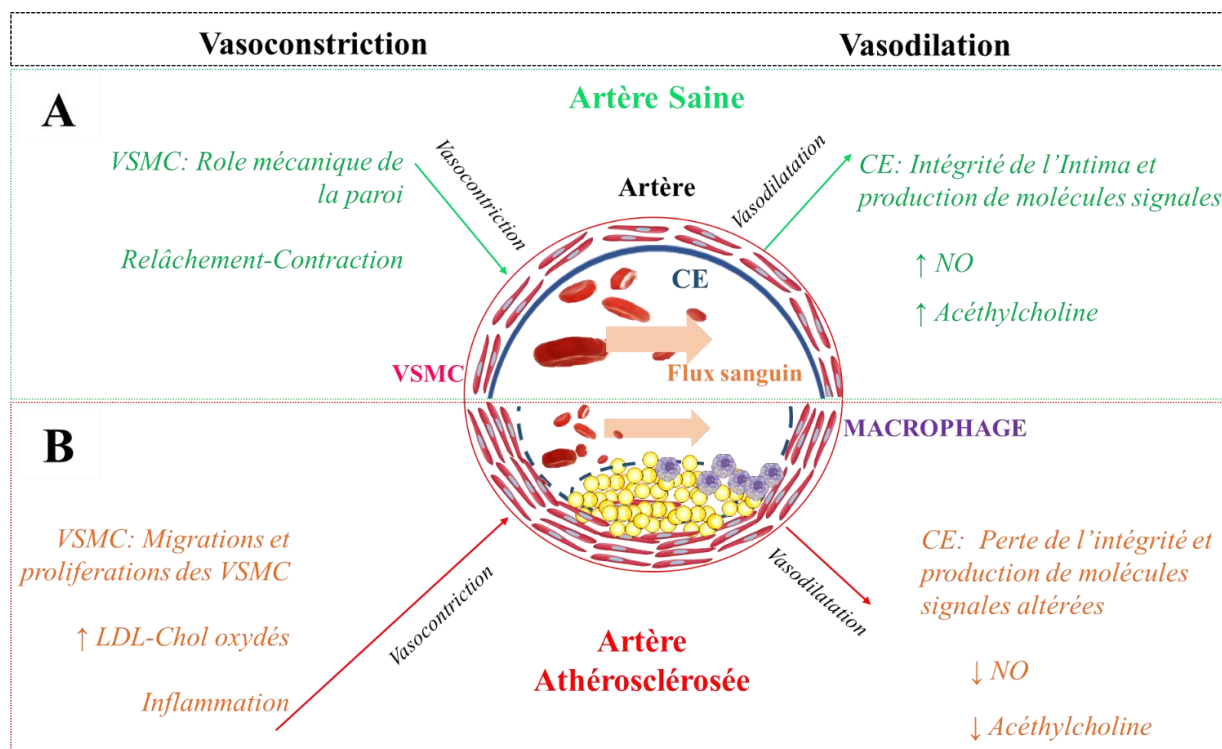


Figure 7: Les propriétés hémodynamiques de l'artère dans un contexte physiologique donné.

(A) Dans un environnement d'une artère saine, les CE maintiennent la balance vasodilatation - vasoconstriction, qui définit le diamètre de l'artère. L'intégrité de cette couche interne permet la sécrétion de molécules « signal », telles que le NO, l'acétylcholine. L'augmentation de leur concentration permet la dilatation du vaisseau, exercée par un relâchement des VSMC. À l'inverse, une diminution de la concentration favorise la contraction des VSMC, activant une vasoconstriction. Cette coordination influence le flux sanguin au niveau de la zone d'intérêt de l'artère.

(B) Dans l'athérosclérose, la balance vasoconstriction-vasodilatation est bouleversée. Le phénotype des VSMC et des EC sont modifiées, en partie par la présence d'un nombre important de LDL-Chol oxydés et de cellules pro-inflammatoires, les macrophages. Brièvement, la couche interne endothéliale est mécaniquement et biochimiquement altérée. La concentration de molécules « signal » diminue, la vasodilatation du vaisseau est partiellement atteinte. De plus, le phénotype des VSMC est grandement modifié, joue un rôle critique dans la progression de la pathologie : la migration des VSMC vers la couche interne et leur prolifération, renforcent le phénomène de vasoconstriction au niveau de la zone lésée. L'ensemble de ces événements participe à la progressivité de l'athérosclérose et la manifestation clinique de la maladie (D'après Krüger-Genge *et al.*, 2019).

L'environnement interne de la zone de l'artère est sous la contrainte de molécules « signal » (e.g. le monoxyde d'azote (NO), de conditions physico-chimiques particulières (e.g. température), de lésions physiques (e.g. coupure, hémorragie), et suivant l'état physiopathologique (e.g. inflammation, athérosclérose). De nombreuses études cliniques ont pu confirmer un changement notable de ces réactivités vasculaires dans l'athérosclérose. Une vasoconstriction importante est rapportée chez des patients ayant une hypercholestérolémie, et plus prononcée chez des individus qui présentent un stade avancé de l'athérosclérose (**Zeiber et al., 1991**).

3.3.3. Les manifestations cliniques de la maladie et les challenges de la recherche scientifique

Ces lésions d'athérosclérose sont rapportées dans l'ensemble des artères carotidiennes, coronaires et périphériques du système circulatoire (**Libby et al., 2019**). Cette instabilité peut être à l'origine d'obstruction de la lumière de l'artère, et aboutir à une privation de la circulation sanguine à l'organe irrigué par cette artère. L'évaluation de la progression de la maladie est une grande difficulté, puisque les premiers stades cliniques sont asymptomatiques (**Saam et al., 2006**). Le second obstacle réside autour d'une manifestation clinique symptomatique, souvent irréversible à un état vital, via la survenue d'ACVs (**Golledge et al., 2000**). Le challenge est donc orienté essentiellement autour de la prévention de la pathologie pour limiter *a minima* les risques critiques pour la santé et le bien-être de l'individu.

4. La diminution du cholestérol en excès dans l'organisme : d'une approche expérimentale vers une application thérapeutique

La plupart de nos connaissances sur les mécanismes biologiques qui soulignent la distribution du cholestérol au sein de l'organisme proviennent de modèles expérimentaux. Nos connaissances sur ce sujet doivent être approfondies pour identifier ces paramètres biologiques complexes qui stabilisent la cholestérolémie et ainsi limiter le risque de pathologies associées. Ceci nécessite la mise en place de modèles adaptés et les plus proche possible de l'homme. Bien que peu de données soient disponibles chez l'homme, un nombre important d'approches méthodologiques expérimentales globales et ciblées ont été développées.

4.1. Les modèles expérimentaux ciblés

4.1.1. Les paramètres généraux des modèles expérimentaux

La complexité du management du métabolisme du cholestérol ne permet pas à l'heure actuelle de disposer de modèles *in vitro* suffisamment élaborés pour espérer reproduire la vraie dynamique du cholestérol chez l'Homme. Communément, le modèle expérimental animal est donc inéluctable pour étudier l'évolution des réponses physiologiques d'une pathologie donnée. La similitude avec le métabolisme de l'homme et de l'espèce choisie doit être prise en considération. Chaque espèce animale présente des variantes qualitatives et quantitatives par rapport à celle de l'homme. La détermination du sexe de l'animal est un critère important dans la régulation du profil du cholestérol plasmatique. L'ensemble des études du domaine favorisent majoritairement des mâles pour s'affranchir *a minima* de l'influence de la fluctuation du métabolisme du cholestérol chez les femelles, qui présentent de façon plus marquée une concentration plus faible de LDL-Chol et de TG (Wang *et al.*, 2011).

La robustesse du modèle s'inscrit également dans la stabilité du métabolisme qui est perturbée avec l'âge de l'individu. Le modèle lapin Watanabe est un modèle très courant dans l'étude des troubles associées à l'hypercholestérolémie et à l'athérosclérose. Ce n'est qu'à partir de l'âge de 12 mois que l'hypercholestérolémie induite de l'animal se stabilise. De plus, les lésions d'athérosclérose au niveau des artères seront largement plus prononcées pour ce phénotype âgé (Kobayashi et Shiomi, 2011). D'autres modèles expérimentaux plus proches de l'homme existent, comme les primates. Mais, la préoccupation éthique du modèle expérimental est une limite sérieuse à leur application au sein de la thématique (Yin *et al.*, 2012).

La mise en place d'une nouvelle approche thérapeutique doit présenter une robustesse solide dans le choix des marqueurs biologiques du métabolisme du cholestérol, révélateur d'une l'efficacité thérapeutique (Yin *et al.*, 2012). La réflexion sur le choix d'un modèle animal doit systématiquement être apportée pour étudier l'efficacité d'un traitement dans le développement de la maladie : d'un stade précoce, asymptomatique jusqu'au développement avancé, prononcé des symptômes. Par exemple, l'évaluation de traitement curatif dans le cas de complications sévères de l'athérosclérose, la rupture de plaques fibrotiques ne pourront être observées, uniquement au niveau des artères d'une lignée de souris génétiquement modifiée, de type *Apoe*^{-/-}, *Fbn1C1039G*^{+/-} (Oppi *et al.*, 2019). Le modèle souris *Apoe*^{-/-} complémenté d'un régime riche en cholestérol ne peut considérablement reproduire avec peine et de façon fastidieuse ces événements

spontanés (Ni *et al.*, 2009). L'ensemble de ces éléments contrôlables sont déterminants pour : *i*) minimiser les facteurs responsables de variabilités extrinsèques à notre objectif scientifique, *ii*) optimiser la visibilité de notre effet physiologique dans un système biologique expérimental, *iii*) favoriser l'obtention de résultats comparables et reproductibles, et *in fine iv*) réduire le nombre d'animaux en expérimentation.

4.1.2. Les modèles expérimentaux liés au métabolisme du cholestérol : le cas de la souris et du lapin

Le modèle conventionnel souris de type C57BL6/J est le modèle idéal pour étudier le métabolisme du cholestérol. Ce modèle correspond aux critères de la physiologie par rapport à l'homme avec certaines nuances situées au niveau du transport de cholestérol circulant majoritairement par les HDL-Chol à l'inverse des LDL-Chol chez l'homme (Barter *et al.*, 2003). Au niveau de la composition des sels biliaires, ces modèles produisent des acides biliaires primaires supplémentaires, l'acide α - et β -muricholique (α - et β MA) et présentent des sels biliaires primaires et secondaires préférentiellement conjugués à la taurine, à l'inverse de la glycine chez l'homme (Takahashi *et al.*, 2016). Dans l'objectif d'étudier les troubles du métabolisme du cholestérol, l'intervention de régimes alimentaires identique à celui de l'homme, de type « *enrichi en lipides* incluant le cholestérol ¹³ » ou de type « *athérogénique*¹⁴ » pour générer un modèle pathologique mais s'accompagne souvent d'effets physiologiques complexes, toxiques et non-désirés (Tableau 1). L'administration de ces régimes enrichis en cholestérol aux souris de type C57BL6/J participe activement à comprendre l'hypercholestérolémie et ses troubles associés. Il y a également des modèles de souris génétiquement modifiées, qui développent spontanément une hypercholestérolémie. C'est le cas des souris de type Apoe^{-/-}, ou LDLr^{-/-} (récepteur au LDL-Chol), étudiées pour l'athérosclérose. Cependant, cette modification génétique induit un phénotype altéré, avec un métabolisme du cholestérol globalement modifié, en particulier au niveau des lipoprotéines (Oppi *et al.*, 2019). D'autres espèces ont vivement suscité un intérêt dans

¹³ Un **régime enrichi en lipide** est un régime alimentaire associé à l'alimentation moderne de l'homme, caractérisé par un apport élevé en lipide, qui est considéré comme un facteur de risque dans l'apparition de maladies métaboliques.

¹⁴ Un **régime athérogénique** est un régime alimentaire développé dans la recherche de modèles expérimentaux, qui reproduisent l'athérosclérose, causée par un enrichissement du régime en lipide (incluant le cholestérol) et en glucides.

Tableau 1 : La comparaison des régimes alimentaires hypercholestérolémiques chez la souris

	Régime athérogénique	Régime de type modern (e.g.mixte de lipides)	Régime standard enrichi en cholestérol
Composition majoritaires	Enrichi en lipides (e.g. cholestérol de 0, 2% à 1,25 %) et glucides (e.g. fructose et glucose)	Enrichi en lipides (e.g. Cholestérol, acide cholique)	Régime standard avec un supplément jusqu'à 2% de cholestérol
Effets recherchés	Faible hypercholestérolémie pour des modèles conventionnel	Hypercholestérolémie et augmentation de absorption des lipides alimentaires	Hypercholestérolémie
Explications et effets physiologiques obtenus	Troubles métaboliques induits (hypertryglycérinémie insuline résistance et augmentation de la pression artérielle)	Hypercholestérolémie Phénotype avec hépatotoxicité et insulin-résistance déclarée	Maintient d'un phénotype normal
Références	(Nakashima <i>et al.</i> , 1994; Tsuchiya <i>et al.</i> , 2012)	(Schuck <i>et al.</i> , 2014)	(Belch <i>et al.</i> , 2013)

Tableau 2 : La comparaison des caractéristiques du métabolisme du cholestérol, des lipoprotéines et des sels biliaires (d'après Fan *et al.*, 2015 ; Vessey, 1978).

	Homme	Lapin	Souris
Transport majoritaire de cholestérol dans le sang	LDL	LDL	HDL
Echanges de cholestérols estérifiés entre les différentes lipoprotéines	Important	Important	Absent
Régulation de l'activité du récepteur LDL-Chol hépatique	Diminution	Diminution	Augmentation
Abondance de la Lipase hépatique qui participe à la formation des LDL-cho	Importante	Faible	Importante
Metabolisme des sels biliaires	2 acides biliaires primaires prédominants (AC et ADC) Conjugaison: essentiellement à la glycine	2 acides biliaires primaires prédominants (AC et ADC) Conjugaison: essentiellement à la glycine	3 acides biliaires primaires prédominants (AC et ADC, A α - et β M) Conjugaison: essentiellement à la taurine

l'étude de ces thématiques. C'est le cas de l'espèce lapin qui présente de multiples correspondances avec le métabolisme du cholestérol de l'homme par rapport à celui de souris (**Tableau 2**). Ce modèle a été favorisé lors du développement de médicament hypocholestérolémiant chez l'homme, avec les lapins conventionnels Néo-Zélandais blancs (NZW) ou ceux génétiquement modifiés, les lapins Watanabe (**Shiomi et al., 2013**). La force de ces modèles est située autour de l'évolution progressive des lésions d'athérosclérose au niveau des artères de l'animal. Les étapes initiatrices et asymptomatiques de l'athérosclérose, visibles par de simples plaques d'athéromes, peuvent être induites avec des lapins NZR nourries avec un régime enrichi en cholestérol (**Schwenke et Carew, 1989 ; Phinikaridou et al., 2010**). La formation d'un stade thrombotique complexe jusqu'à symptomatique, est reproduit notamment avec la souche Watanabe (**Buja et al., 1983**). Ce modèle plutôt appliqué à des fins curatives, développe spontanément des manifestations cliniques et miment les symptômes des patients qui présentent des séquelles cliniques de l'athérosclérose (**Fan et al., 2015**). Cependant ces dernières années, leur disponibilité et certains paramètres techniques et physiologiques ont participé à limiter leur utilisation en recherche clinique (hypercholestérolémie instable, reproduction faible, mortalité et risque cardiaque important, prix) (**Kobayashi et Shiomi, 2011 ; Fan et al., 2015**). Ces deux modèles lapins complémentaires nous permettent d'obtenir une vision globale et intégrale de la pathologie et notamment d'évaluer le potentiel d'agent thérapeutique hypocholestérolémiant jusqu'à leur activité anti- athérosclérose.

4.2. Les méthodes d'étude globale et prédictive

Les méthodes expérimentales conventionnelles *in vitro*, *in vivo* sont essentiellement basées sur une approche ciblée. Il s'agit de rassembler nos connaissances sur les acteurs du métabolisme du cholestérol au sein de l'organisme. Des travaux précédents illustrent cette approche globale dans l'organisme via une analyse dite d'entrées-sorties. Cette méthode consiste à calculer la synthèse de cholestérol hépatique à partir des informations sur les apports de cholestérol (alimentaire, synthétisé), des échanges du foie et des compartiments périphériques via le plasma, des sorties de cholestérol (élimination par les fèces) et la synthèse des sels biliaires (**Stellaard et Lütjohann, 2017**). Cependant, le métabolisme du cholestérol comprend de nombreuses variables physiologiques complexes : leur régulation n'est pas linéaire et certaines interactions existent entre elles (**Goodman et al., 1980**). C'est le cas de la cholestérolémie qui peut être impactée de façon

positive en fonction de la synthèse de cholestérol et de l'absorption intestinale de l'individu. Dans cette optique, l'intégration de ces variables physiologiques par ces méthodes ne sont pas souhaitée. Les modèles mathématiques retraçant le métabolisme du cholestérol sont une bonne alternative. Car il permet d'intégrer à l'échelle de l'organisme, des compartiments physiologiques et des valeurs physiologiques qui définissent la distribution du cholestérol au sein de l'organisme (**Mc Auley et al., 2012**). Les auteurs de cette étude ont pu prédire de nombreuses variantes physiologiques du cholestérol circulant en fonction de l'âge de l'individu, et de l'apport en cholestérol contenu dans l'alimentation. De façon intéressante, ces données ont été validées à partir de données expérimentales conventionnelles ciblées, renforçant l'interprétation du modèle mathématique d'intérêt du sujet.

Ces éléments nous montrent qu'il est important de prendre conscience des avantages et des limites de chacun de ces modèles en termes de correspondance avec la physiologie humaine et de pertinence clinique dans notre objectif scientifique. Puisqu'aujourd'hui aucun modèle ne reproduit parfaitement les troubles complexes associés à l'hypercholestérolémie chez l'homme, il est important de considérer que l'utilisation de plusieurs modèles expérimentaux ou prédictifs ne doit pas être perçue comme un simple substitut de résultats, mais permet de répondre à des questions diverses, d'élucider différents mécanismes, et notamment dans des recherches précliniques translationnelles pour le développement de stratégies thérapeutiques.

4.3. Les stratégies hypocholestérolémiantes : des approches conventionnelles jusqu'aux alternatives thérapeutiques

Un nombre important de stratégies hypocholestérolémiantes diminuent le cholestérol en excès dans l'organisme. La mise en œuvre d'un mode de vie sain et actif, et une intervention pharmacologique contribuent à le réduire et limiter la progression des troubles associés aux MCV. Cependant, dans certaines conditions, l'efficacité, l'accessibilité et la sécurité de ces substances pharmacologiques deviennent alors inadaptées. Identifier de nouvelles stratégies hypocholestérolémiantes reste encore une priorité pour combler l'ensemble des stratégies thérapeutiques non-satisfaisantes.

4.3.1. Les lignes directrices conventionnelles pour diminuer l'hypercholestérolémie

Depuis les années 1980, de multiples approches conventionnelles hypocholestérolémiantes réduisent les facteurs de risques de MCV au sein de la population générale, et notamment à travers

la gestion du cholestérol en excès dans l'organisme (**NCD, 2020**). Les premières recommandations apportées, concernent un mode de vie sain à travers une alimentation saine et équilibrée¹⁵ et une pratique d'exercice physique régulière (**WHO, 2018**). Par la suite, des traitements médicamenteux ont également été suggérés (statines, ézétimibe et inhibiteurs de la protéine convertase de la famille subtilisine des protéases à sérine (PCSK9)). Parmi ces derniers, les statines sont actuellement les agents hypocholestérolémiants les plus prescrites. Elles ciblent directement la synthèse hépatique du cholestérol et réduisent le taux de LDL-chol de 20 % à 60 % (**CTT et coll., 2015 ; Wadhera et al., 2016 ; Wójcik, 2020**). Ces méthodes pharmacologiques ciblent directement le niveau de cholestérol dans l'organisme, à un point donné du métabolisme, au niveau de sa synthèse (Statines), ou indirectement en ciblant son absorption (ézétimibe), son transport (inhibiteur PCSK9) (**Figure 8**). Ces approches restent les voies reconnues approuvées par la FDA et sont les plus efficaces pour prévenir l'installation de ces maladies jusqu'au ralentissement de leurs complications (**Bays et al., 2008**).

De façon intéressante, l'évolution de nos connaissances a permis de nouvelles approches cliniques, rassemblées par un consensus d'experts cliniques américains et européens (**Grundey et al., 2019 ; Mach et al., 2020**). Ces travaux collectifs s'accordent sur des pratiques cliniques communes pour limiter l'apparition de MCVs à travers la restauration de la cholestérolémie. Une approche beaucoup plus approfondie et réfléchie, qui s'adapte au profil physiologique, pathologique du patient et définit *in fine* le type d'intervention médicamenteuse. Ainsi, elle dépend du degré d'hypercholestérolémie, du profil pathologique du patient et de l'efficacité de la réaction à un agent hypocholestérolémiant. C'est le cas pour un jeune patient adulte qui présente de premiers signes sévères d'hypercholestérolémie, ($\text{LDL-Chol} \geq 1.6 \text{ mmol/L}$), une haute dose de statine lui sera d'abord préconisée pendant 8 à 12 semaines. Si cette efficacité n'est pas optimale à long terme, la combinaison de statines et d'un autre agent hypocholestérolémiant, comme l'ézétimibe peut être envisagée pour ce patient. Ces dernières recommandations cliniques sont importantes puisqu'elles définissent l'efficacité thérapeutique propre à chaque individu et ainsi, permettent de repousser la survenue de certaines limites liées à leur utilisation. Malgré l'efficacité thérapeutique reconnue

¹⁵ Une **alimentation saine et équilibrée** respecte les critères suivants : i) Privilégier la consommation de certains aliments (légumes, fruits, céréales, noix et céréales complètes non-transformées), ii) Consommer au moins 400 g de fruits/légumes par jour, iii) Limiter à 10 % notre consommation de sucres raffinés sur notre apport énergétique total, iv) Réduire à 30 % notre consommation de graisses alimentaires, notamment d'origine industrielles, v) Consommer moins de 5 grammes de sels par jour (**WHO, 2018**).

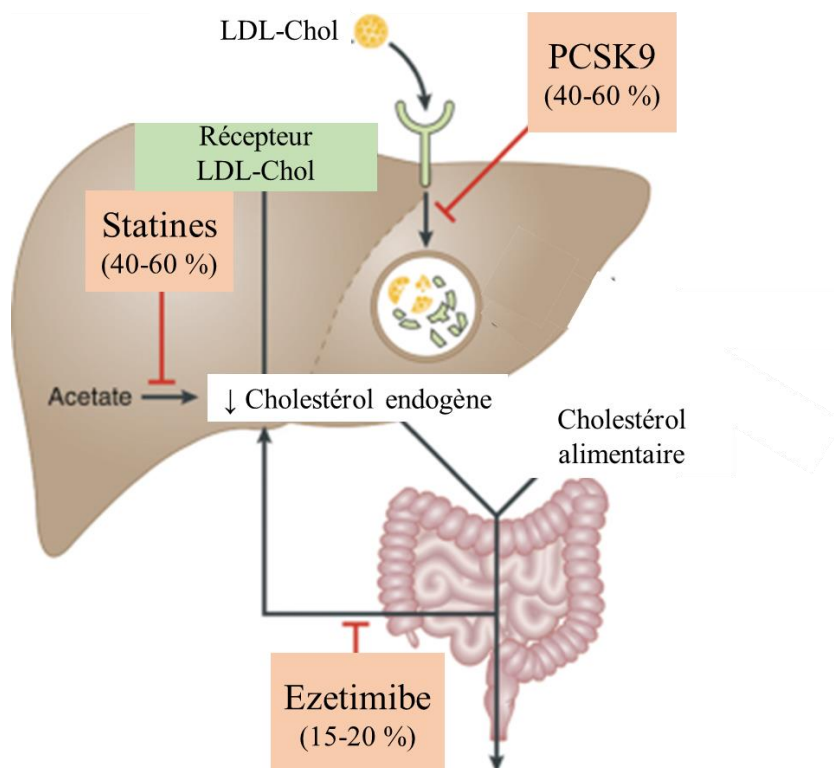


Figure 8 : Les approches thérapeutiques hypocholestérolémiantes existantes

La principale approche thérapeutique médicamenteuse est celle des statines. Le principal site d'action des statines est le foie, organe cible pour abaisser la cholestérolémie (**Pang *et al.*, 2020**). L'intestin est également un organe cible des agents hypocholestérolémiants. C'est le cas de l'ézétimibe qui inhibe de façon sélective l'absorption intestinale du pool de cholestérol (d'origine endogène, alimentaire et biliaire) (**Kosoglou *et al.*, 2005**). Les inhibiteurs de la PCSK9 sont des traitements qui ciblent le foie mais ils sont additionnels et utilisés en second lieu. Ils ont pour effet de diminuer la dégradation du récepteur au LDL-Chol, ce qui augmente la présence des récepteurs situés à la surface des cellules du foie, et in fine, diminue le LDL-Chol circulant. L'ensemble de ces agents aboutissent à une diminution du taux de LDL-Chol dans l'organisme (**d'après Sheridan, 2019**).

des statines, 15 % des patients sont intolérants au traitement et jusqu'à 30 % de patients qualifiés de « non-répondeurs », ne présentent pas l'effet hypolipidémiant attendu (**Trompet et al., 2016**). De plus, de nombreux effets secondaires sont associés aux traitements aux statines, souvent lors de longue durée. Une augmentation des risques de diabète, une dysfonction cognitive et une myotoxicité ont été rapportées (**Lansberg, et al., 2018**). Dans ce contexte, identifier d'autres traitements hypolipidémiants reste encore une priorité pour renforcer le champ thérapeutique préexistant.

4.3.2. Les alternatives thérapeutiques modernes pour diminuer l'hypercholestérolémie : un zoom sur les aliments fonctionnels

Ces dernières années ont vu grandir un intérêt de la communauté scientifique pour des alternatives hypocholestérolémiantes modernes et innovantes (**Bianconi et al., 2018 ; Trautwein et al., 2018 ; Sivamaruthi et al., 2019**). Elles ont démontré leurs efficacités thérapeutiques, et ce dans un même contexte thérapeutique que le traitement de référence, les statines. En effet, ces nouveaux agents sont majoritairement utilisés à l'échelle préventive, en amont de la maladie, et ce jusqu'à une progression vers un stade précoce liés aux dysfonctions du métabolisme du cholestérol (e.g. hypercholestérolémie, plaques d'athérome, simple stéatose hépatique) (**Taylor et al., 2013 ; Athyros et al., 2018 ; Bianconi et al., 2018**). C'est le cas des stratégies nutraceutiques, axées sur une utilisation intelligente d'aliments fonctionnels et de compléments alimentaires¹⁶. Par définition, ces aliments apportent en plus de leur valeur nutritionnelle¹⁷ donnée, des fonctions bénéfiques sur la santé de l'organisme (**Laparra et Sanz, 2010**). Ils ont été proposés à des patients présentant une hypercholestérolémie modérée, qui ne toléraient pas les médicaments conventionnelles (**Ward et al., 2017**). De façon surprenante, en combinant plusieurs substances nutraceutiques, une diminution de 25 % du cholestérol circulant est obtenue, similaire à celle attendue pour des patients traités aux statines (**Trimarco et al., 2015**).

¹⁶ Les **compléments alimentaires** sont définis par une substance ou un type de produit alimentaire dont leur consommation apporte une valeur nutritionnelle additionnelle et un ou plusieurs effets physiologiques supplémentaires (**European Parliament, 2006**).

¹⁷ La **valeur nutritionnelle** d'un aliment correspond à la quantité de nutriments, essentiellement de protéines, de glucides et de lipides, de fibres alimentaires, de vitamines, et de sels minéraux contenus dans l'aliment. Ces aliments vont fournir une quantité d'énergie propre, pour assurer le bon fonctionnement et le maintien d'une bonne santé de l'organisme.

Parmi ces substances nutraceutiques, des produits d'origine biologique comme les probiotiques ont été grandement étudiés pour leur potentiel hypocholestérolémiant (**Joyce et Gahan, 2016 ; Moss *et al.*, 2018 ; Bianconi *et al.*, 2018**). Par définition, un probiotique correspond à un micro-organisme vivant, administré en quantité suffisante pour apporter *in fine* des bénéfices pour la santé de l'individu, en renforçant l'environnement intestinal perturbé et ce, au niveau du microbiote intestinal (**Hiippala *et al.*, 2018 ; Swanson *et al.*, 2020**). De nombreuses améliorations physiologiques ont été attribuées à l'administration de probiotiques, en particulier dans le contrôle la cholestérolémie chez l'homme (**Zendeboodi *et al.*, 2020**). Il a été rapporté que certaines bactéries présentaient la capacité à réduire le niveau de cholestérol chez l'homme. C'est le cas de bactéries probiotiques qui sont répertoriées, avec majoritairement des bactéries lactiques appliquées à l'homme (**PROBIO database, Bioinformatics & Drug Design Group**). Parmi ces bactéries candidates, *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242, commercialisée Cardioviva®, réduit de 11,6 % l'excès de LDL-Chol de patients atteints d'hypercholestérolémie (**Jones *et al.*, 2012**). Les auteurs de cette étude ont assimilé l'effet hypocholestérolémiant à une activité enzymatique de la bactérie, l'hydrolase des sels biliaires (BSH) qui réduit la biodisponibilité de cholestérol de l'organisme. Les auteurs ont assimilé l'efficacité hypocholestérolémiante du probiotique à travers son action directe sur le microbiote intestinal et de son activité métabolique à travers l'activité BSH. L'activité de cette enzyme semble également diminuer le pool de sels biliaires de l'hôte, qui *in fine* favorise la restauration du pool des sels biliaires à travers le catabolisme et l'absorption du cholestérol (**Costabile, 2017**). Pour finir, il est important d'ajouter qu'un lien entre le microbiote intestinal et des statines a récemment été spécifié. L'efficacité des statines dépend d'une configuration du microbiote intestinal à l'état d'équilibre (**Vieira-Silva *et al.*, 2020**).

Toutes ces évidences renforcent l'investissement de la communauté scientifique sur le rôle du microbiote intestinal dans le management du cholestérol chez l'homme. Le développement de nouvelles alternatives attractives autour du potentiel surgissant du microbiote intestinal doit être approfondi, notamment autour des mécanismes sous-jacents du microbiote, de son interaction jusqu'à ses effets physiologiques exercés sur l'hôte. L'ensemble de ces éléments ouvre vers une nouvelle conception de la gestion de la cholestérolémie à travers l'impact du microbiote intestinal via ses activités métaboliques. Ces évidences suggèrent que le microbiote intestinal contribue activement à maintenir le métabolisme du cholestérol et ce jusqu'à prévenir des dysfonctions associées au sein de l'organisme.

Chapitre 2- Interaction du microbiome intestinal et du métabolisme du cholestérol chez l'homme

Ces dernières années, un investissement considérable a été apporté pour étudier le rôle du microbiote intestinal sur la santé de l'homme. Tout autant au niveau académique, qu'à l'échelle des professionnels de la santé humaine, le microbiote intestinal suscite de vives appréciations dans le monde de la recherche scientifique. Notre traditionnelle perception des micro-organismes responsables d'infections, paradigme aujourd'hui notre nouvelle conception : ces micro-organismes résident au sein de notre intestin et sont considérés comme un organe clef, révélateur de notre état physiologique de la santé humaine. Comme nous le montre le précédent chapitre, de nouvelles ressources probiotiques sont prometteuses pour le traitement des troubles associés au métabolisme du cholestérol (**Cordailat-Simmons *et al.*, 2020**). Cependant, il reste nécessaire de clarifier plus précisément le rôle du microbiote intestinal dans le métabolisme du cholestérol, afin de choisir de nouvelles souches probiotiques candidates, plus efficaces pour évaluer leur potentiel hypocholestérolémique jusqu'à leur activité anti-athérosclérotique. Le dernier chapitre de ce contexte scientifique aborde ces points à travers un format varié et original. Premièrement, une simple description scientifique sur les généralités du microbiote intestinal sera introduite. Puis, une évaluation de l'état de l'art plus approfondie, rigoureuse sera portée sur les activités métaboliques du microbiote intestinal vis-à-vis du cholestérol et de ses dérivés, illustrés par des revues scientifiques. L'ensemble de ces éléments permettent d'établir une conceptualisation complète du microbiote intestinal sur le métabolisme du cholestérol afin de mieux appréhender notre stratégie scientifique et expérimentale.

1. Les généralités sur le microbiote intestinal humain

1. 1. Le microbiome intestinal humain en bonne santé

L'intestin humain est un système biologique dynamique, où se déroule l'ingestion, la digestion, l'absorption, la sécrétion et l'élimination de nutriments. Il héberge le microbiote intestinal humain, qui regroupe un ensemble de micro-organismes divers et variés qui incluent en majorité les

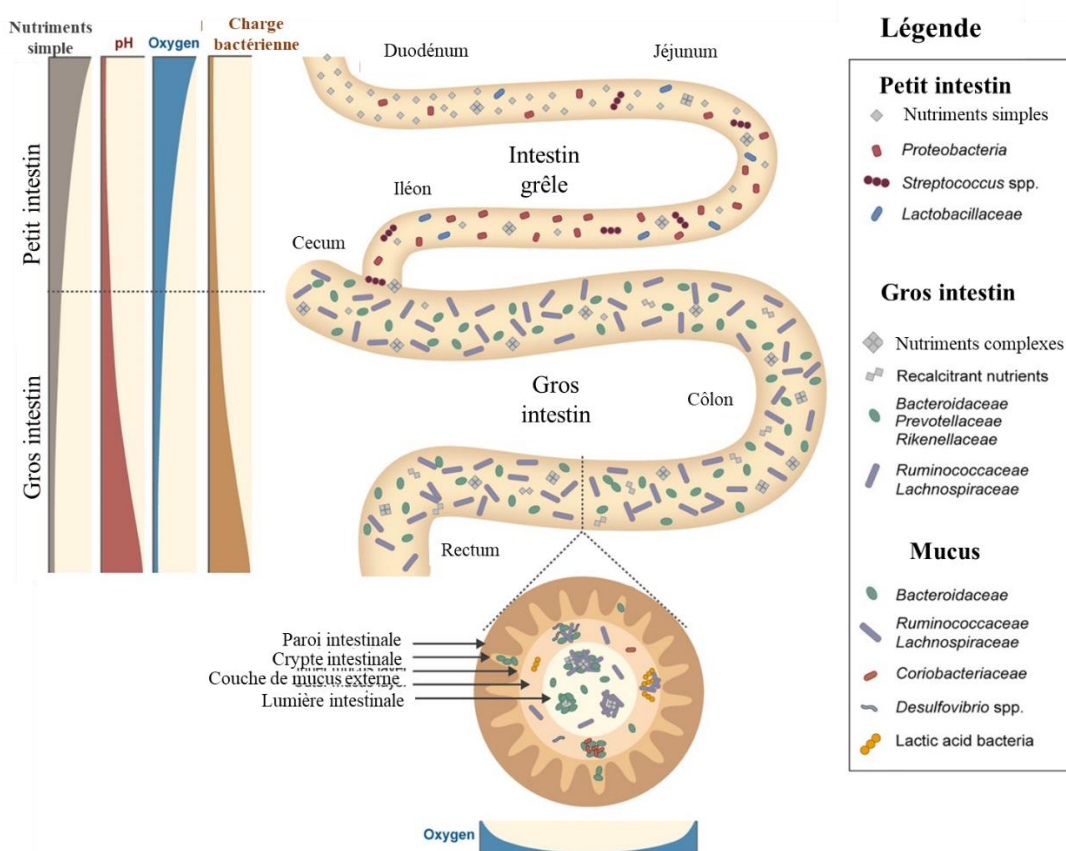


Figure 9 : La représentation de la niche écologique du microbiote intestinal dans le tractus digestif humain.

Les gradients de pH et d'oxygène le long de l'axe longitudinal limitent la charge bactérienne dans les régions proximales de l'intestin grêle, alors que le gros intestin supporte des charges bactériennes élevées. Des nutriments simples abondent dans l'intestin grêle et soutiennent la croissance de taxons capables de piéger efficacement ces composés. En revanche, le gros intestin est peuplé de taxons capables de décomposer les composés récalcitrants. Il existe également une hétérogénéité spatiale le long de l'axe transversal de l'intestin, la couche de mucus et la lumière abritant des communautés microbiennes distinctes qui reflètent les différences de disponibilité des nutriments. Une structuration spatiale à fine échelle est observée à la fois dans le mucus et la lumière, avec une distribution hétérogène des nutriments soutenant différentes communautés bactériennes sur des sites particuliers (d'après Pereira et Berry, 2017).

bactéries, les levures, les virus, les archées, des micro-organismes eucaryotiques. L'ensemble de ces micro-organismes et leur génome¹⁸ compose le microbiome humain. Malgré la diverse contribution génétique des autres micro-organismes, la plupart des recherches s'intéressent aux bactéries de par leur abondance d'environ 10^{14} cellules prédominantes à l'intestin. Cette importance du microbiote intestinal au sein de l'organisme humain est souvent exprimée à travers l'ensemble des gènes de ces bactéries, 100 fois plus étendu que le génome humain (**Gilbert et al., 2018**). On estime qu'entre 500 à 1000 espèces bactériennes résident au sein de notre intestin, mais cette richesse microbienne reste souvent sous-estimée puisque des sous-espèces avec un génotype bactérien défini, en font partie intégrante (**Locey et al., 2016**). Par définition, ce génotype bactérien constitue l'ensemble de déterminants génétiques portés par la cellule bactérienne, et diffère d'un changement d'un ou plusieurs gènes de l'espèce. Ces variations génétiques sont distinguées des variations phénotypiques¹⁹. Les premières affectent le génome bactérien dans sa séquence génétique alors que les secondes modifient le comportement, les activités de la bactérie (**Robinson et al., 2010**). Ce sont ces paramètres qui caractérisent le microbiome à l'échelle de sa structure (du génotype) et de sa fonction (à l'échelle du phénotype et de ses activités associées). Il est donc plus rigoureux de parler de microbiome intestinal, défini comme l'ensemble des génomes d'une communauté bactérienne associée intimement à l'intestin.

La majorité des données rassemblées sur le microbiote intestinal sont issues du microbiote du côlon, et ceci dû à une facilité de prélèvement d'échantillons de selles humaines. Un nombre de paramètres importants permet d'évaluer la composition du microbiome intestinal, composé majoritairement par deux phylums dominants, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* et d'autres phyla minoritaires, les *Actinobacteria*, les *Proteobacteria*, les *Verrucomicrobia* et les *Fusobacteria* (**Qin et al., 2010**). Cependant, il reste difficile d'établir un seul et même profil du microbiome intestinal chez l'homme. En effet, cette composition du microbiote intestinal varie en fonction de paramètres physiologiques (e.g. pH), qui varient tout le long des différents segments de l'intestin. Ces

¹⁸ Un **génom**e constitue l'ensemble de l'information génétique d'un organisme contenu dans chacune de ses gènes portés par une espèce donnée.

¹⁹ Le **phénotype** est l'ensemble des propriétés observables et fonctionnelles d'une cellule.

paramètres biogéographiques et biologiques contribuent vivement à la structure et à la diversité du petit intestin (duodénum, jéjunum et iléon) jusqu'au côlon (**Figure 9 ; Bäckhed et al., 2012**).

Au niveau du petit intestin, des études établies à partir de biopsies ou de liquides biologiques (e.g. fluide jéjunal), ont montré que cette composition se complexifie progressivement. À la surface du duodénum, sont présentes des bactéries appartenant à la famille des *Proteobacteries*, *Lactobacilles*, au niveau du jéjunum, la famille des *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, et au niveau de l'iléon, une composition proche de celle du côlon avec la famille des *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Ruminococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, et *Bacteroidaceae* (**Vasapolli et al., 2019 ; Ruan et al., 2020**). De façon intéressante, l'importance du nombre d'études sur le côlon, a pu aboutir à un core microbien, c'est-à-dire une part significative de populations bactériennes stables et présentes en continu, incluant la famille des *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Alistipes*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Roseburia*, et *Blautia* (**Shetty et al., 2017**). C'est l'ensemble de ces microbiomes, réparties à différents segments de l'intestin qui constitue le microbiome intestinal.

1. 2. Le microbiome intestinal, composant intégré au développement et à la santé de l'homme

Aujourd'hui, il est clairement établi que ces micro-organismes jouent un rôle essentiel dans le maintien de la santé de l'hôte avec lequel il interagit tout au long de sa vie (**Marchesi et al., 2016**). Dès la naissance, des premières bactéries commensales²⁰ colonisent le TGI du nouveau-né par l'intermédiaire de la mère, suivant les conditions environnementales données (e.g. mode d'accouchement, alimentation du nourrisson). Progressivement, le futur microbiote intestinal du nouveau-né, s'enrichit en abondance et en diversité pour devenir *in fine* un écosystème intestinal fonctionnel et complexe jusqu'à l'âge de 3 ans (**Bäckhed et al., 2015 ; Moore et Townsend, 2019**). Jusqu'à l'âge adulte, le microbiote intestinal désormais stabilisé, est capable de résister et de se restaurer lors de perturbations environnementales, on parle alors de sa propriété de

²⁰ Des **bactéries commensales** sont des bactéries qui vivent en commensalisme avec leur hôte, c'est-à-dire en association avec d'autres espèces différentes dans laquelle l'hôte fournit des nutriments aux organismes commensaux. Cette interaction est bénéfique pour le commensal et neutre pour l'hôte, ici l'homme.

résilience²¹ (e.g. le traitement d'antibiotique, un régime alimentaire non-équilibré, administration de probiotique) (**Sommer et al., 2017**). Cette préservation de cette diversité et de cette richesse est tout au long de la vie de l'individu, suggéré comme un indicateur de bonne santé de notre microbiote intestinal (**Fassarella et al., 2020**). Le microbiote intestinal propre à chaque individu, est lié à la particularité physiologique de l'hôte comme son âge ou son régime alimentaire. Ces paramètres physiologiques participent à la variabilité inter-individuelle du microbiote intestinal et rendent périlleux notre résolution d'un seul et même ensemble de micro-organismes, essentiel à notre bonne santé (**Wang et al., 2016**). C'est d'ailleurs cette variabilité interindividuelle du microbiote intestinal qui est intimement associée au type de réponse de l'hôte. C'est ce qui augmente notre difficulté à prédire à savoir si la réponse de l'effet d'un traitement particulier que l'on observe ou bien si c'est cette réponse qui est spécifique à l'individu.

Malgré cette variation parmi les individus, les fonctions du microbiome intestinal sont bien conservées (**Vasapolli et al., 2019**). Cette interaction entre ces micro-organismes avec leur hôte est également un des paramètres qui caractérise le microbiote intestinal en bonne santé et ceci, tout au long de la vie de l'individu adulte sain. Cette association étroite entre les deux partenaires est dite symbiotique, c'est-à-dire qu'elle est bénéfique pour l'hôte et pour l'écosystème microbien. Les micro-organismes bénéficient des substrats énergétiques issus de l'alimentation et de produits du métabolisme humain et l'être humain, lui, tire profit des activités microbiennes (**Sommer et Bäckhed, 2013**). En effet, les bactéries symbiotiques vont participer à la digestion de composés alimentaires (e.g. les fibres alimentaires comme le xylane²² pour certaines espèces du genre *Bacteroides*), renforcer le système immunitaire contre la colonisation de micro-organismes pathogènes²³ (e.g. Inhibition des *Escherichia coli* entérohémorragiques par les bactéries du genre *Bacteroides*), configurer une architecture intestinale (e.g. macrophysiologie des tissus intestinaux) (**Despres et al., 2016 ; Saito et al., 2019 ; Steinway et al., 2020**). Le microbiote intestinal contribue activement à l'homéostasie métabolique de l'hôte à travers le métabolisme des lipides

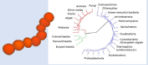




²¹ La **résilience d'un écosystème**, c'est la capacité des micro-organismes de cet écosystème, à retrouver rapidement et dans une même ampleur, sa fonction et sa composition taxonomique initiale lorsque les conditions de perturbations sont contraignantes.

²² Les **xylanes** sont un des composants principaux de la paroi des graines contenu dans les céréales, les noix.

²³ Des **micro-organismes pathogènes** sont capables de causer des lésions et/ou engendrer une maladie.

Chapitre 2- Interaction du microbiome intestinal et du métabolisme du cholestérol chez l'homme

Tableau 3 : Les différents niveaux d'analyse méta-omique représentés, de la phylogénie à la métabolomique (D'après Lepage *et al.*, 2013).

Méthodes méta-omics	Matériels biologiques	Objectifs scientifiques apportés	Limites des méthodes	Applications cliniques
Phylogénie 	ADNr 16S	<ul style="list-style-type: none"> ► Composition et diversité bactérienne 	Pas d'information sur la fonction bactérienne	<ul style="list-style-type: none"> ► Composition d'une dysbiose ► Genre bactérien associé à un état de santé donné
Métagénomique 	ADN génomique	<ul style="list-style-type: none"> ► Haute résolution du profil du microbiote ► Gènes issus des micro-organismes non-cultivables 	Pas d'information sur l'expression de la fonction des gènes d'intérêts	<ul style="list-style-type: none"> ► Gène bactérien associé à une dysbiose ► Etude de cohorte de patients malades vers un diagnostic fonctionnel du microbiote
Métatranscriptomique 	ARNm	<ul style="list-style-type: none"> ► Haute résolution de l'expression du profil du microbiote ► Différence de profils d'expression entre des conditions physiologiques /environnementales 	Faible stabilité de l'ARNm bactérien	<ul style="list-style-type: none"> ► Expression de gène bactérien associé à une dysbiose ► Activités cinétiques du microbiote ► Suivi spécifiquement d'une bactérie active fonctionnellement
Métabolomique 	Protéines/ Peptides	<ul style="list-style-type: none"> ► Haute résolution de du profil protéique du microbiote ► Différence de profils protéiques entre des conditions physiologiques/ environnementales 	Bases de données des protéines à améliorer	<ul style="list-style-type: none"> ► Confirmation des fonctions du microbiote intestinal ► Biomarqueurs
Métabolomique 	Métabolites	<ul style="list-style-type: none"> ► Profils métabolique du microbiote et de l'hôte 	<ul style="list-style-type: none"> ► Bases de données des métabolites à améliorer ► Identification et origine stricte du composé 	<ul style="list-style-type: none"> ► Nouvelles voies biochimiques identifiées ► Criblage de nouveaux biomarqueurs ► Associés aux données cliniques

(e.g. synthèse d'acide gras à chaîne courte (SCFAs), utilisés comme source d'énergie majoritaires pour les cellules du côlon), de celui des glucides (e.g. contrôle des incrétines pour stimuler la sécrétion d'insuline lorsque la glycémie est trop élevée) et délivre des micronutriments essentiels (e.g. la vitamine B9) (Flint *et al.*, 2012 ; Morrison et Preston, 2016 ; Gérard et Vidal, 2019 ; Zhang *et al.*, 2020). Enfin, les bactéries commensales contribuent au développement et à la maturation du système immunitaire (e.g. Le mécanisme de la tolérance par l'interaction de composé membranaire d'une bactérie commensale, *Bacteroides fragilis* avec des lymphocytes de type T, qui contribue de façon indispensable à l'enrichissement d'un répertoire antigénique du système immunitaire de l'hôte) (Mazmanian *et al.*, 2005). Ces capacités fonctionnelles du microbiome intestinal sont médiées grâce à des métabolites bactériens. Ces molécules permettent tout autant la communication entre les bactéries d'un même écosystème, mais visent également les métabolismes de l'hôte afin d'y ajouter un gain ou une perte de fonctions métaboliques.

2. Etudier le microbiote intestinal chez l'homme

Les méthodes d'études du microbiote intestinal ont beaucoup évolué au cours de ces vingt dernières années. Initialement basées sur des approches traditionnelles, les cultures bactériennes nous ont d'abord renseigné à l'échelle d'un micro-organisme donné. Progressivement, les outils moléculaires ont pu expliquer finement sur le phénotype d'un micro-organisme donné et de son interaction avec son hôte. Puis, les méthodes de séquençage ont permis d'avoir une vision globale avec la précision de caractériser tout un écosystème bactérien. La mise en place de modèle *in vivo* complète ces dernières analyses et conforte notre compréhension sur les interactions entre le microbiote et la santé de l'hôte.

2.1. L'étude de la composition du microbiote intestinal

Notre vision du microbiote intestinal a été éclaircie grâce à de nouveaux outils de séquençage de l'information génétique (Shendure et Ji, 2008). De notre capacité à séquencer un seul et unique micro-organisme, l'apparition d'une variété de nouvelles approches basées sur la métagénomique, a abouti à un séquençage de l'ensemble des séquences des génomes de tous les micro-organismes d'un même environnement, qui définit cet écosystème microbien de l'intestin (Tableau 3 ; Qin *et al.*, 2010 ; Human Microbiome Project Consortium, 2012). La composition du microbiote

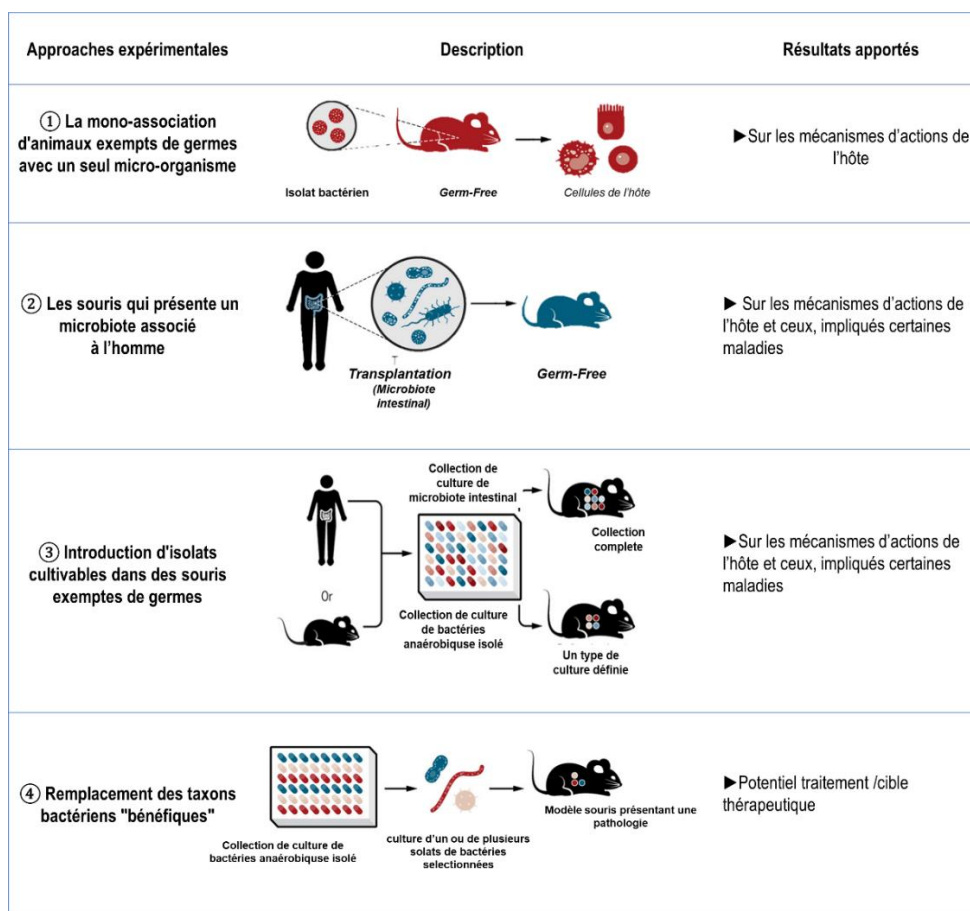


Figure 10 : Les méthodes expérimentales pour démontrer les rôles causaux du microbiote dans la physiologie et la maladie de l'hôte (D'après Round et Palm, 2018)

(1) Les souris exemptées de micro-organismes peuvent être monocolonisées avec des bactéries provenant de nombreuses sources (isolats de communautés microbiennes provenant de l'intestin, mutants bactérien contenant un gène d'intérêt). L'avantage de cette méthode permet d'interroger sur l'activité d'un seul organisme, elle révèle les fonctions d'organismes peu abondants qui sont masquées en présence d'une communauté complexe. Cependant, cette méthode ignore la complexité du microbiote humain et l'importance des interactions microbe-microbe, il est hautement non physiologique, et il est souvent difficile de choisir des témoins appropriés pour la comparaison. (2) Des communautés microbiennes intestinales complètes obtenues à partir d'individus atteints d'une maladie particulière (comme les MICI) et de témoins sains peuvent être utilisées pour coloniser des souris exemptes de germes. L'avantage est sur l'attribution d'un phénotype donné prouvant la causalité microbienne. Les limites se heurtent à la perte d'espèces en raison de la sensibilité à l'oxygène, l'incapacité de certains microbes intestinaux humains ou de certains microbes particuliers à coloniser des rongeurs hôtes, et les mécanismes d'interaction hôte-microbe qui sont spécifiques à l'hôte humain. (3) Des études récentes ont poussé ce modèle un peu plus loin en colonisant des souris exemptes de germes avec des isolats cultivables du microbiote intestinal humain. Il permet de déterminer les effets de groupes spécifiques de microbes sur l'hôte, des sous-ensembles définis du microbiote peuvent être assemblés de manière rationnelle en fonction du profilage et des prévisions phylogénétiques ou fonctionnelles, et les microbes cultivés peuvent être étudiés in vitro et in vivo pour déterminer les mécanismes par lesquels un organisme donné affecte l'hôte. Certains microbes intestinaux sont difficiles ou impossibles à cultiver in vitro, et les expériences sur isolats ont un très faible rendement en raison de l'effort et du temps nécessaires pour constituer des collections de cultures. (4) Les souris conventionnelles ou les souris humanisées présentant une dysbiose ou une maladie due à un microbiote sont des outils idéaux pour tester la capacité des espèces bénéfiques à corriger la dysbiose et à prévenir la maladie. Les avantages et les limites de ces modèles sont similaires à ceux décrits pour les précédents modèles et les isolats cultivables.

intestinal a pu être établie à partir du séquençage de l'ARN ribosomique du gène 16S (ARNr 16S), pour étudier la phylogénie et la taxonomie (Lozupone, et al., 2013). Par définition, ces termes correspondent à l'étude des liens qui existent entre les espèces apparentées et classifie ces micro-organismes selon leur assignation taxonomique, les unités taxonomiques opérationnelles (OTU, *Operational Taxonomic Unit*), respectivement. Cette approche renseigne sur l'architecture de la communauté bactérienne et sa diversité, parfois associée à des caractéristiques de l'individu. C'est l'exemple de l'étude de Koren *et al.*, qui a identifié une différence de composition du microbiote intestinal au cours du premier et du dernier trimestre de grossesse chez des femmes adultes et en bonne santé (Koren *et al.*, 2013).

L'investigation de la structure et de la complexité du microbiote intestinal est réalisée par séquençage shotgun métagénomique, c'est-à-dire l'ensemble des génomes de chaque micro-organisme d'un écosystème. Par définition, le séquençage shotgun est une méthode utilisée pour séquencer l'information génétique. Brièvement, la fragmentation aléatoire de l'ADN génomique est réalisée et la séquence de chaque fragment est définie. Puis, la reconstruction et l'assemblage de ces fragments d'ADN chevauchants en séquence continue, pour constituer le métagénome qui compose l'écosystème (Fraher *et al.*, 2012). Cette technique permet également d'informer sur la fonction d'un gène du microbiote intestinal. Par cette approche, ont été recensés les enzymes du microbiote intestinal agissant sur la dégradation de fibre alimentaire, tels que les polysaccharides et la cellulose (Tasse *et al.*, 2010). Une vingtaine de famille de gènes du métagénome intestinal, nommés les CAZymes ont pu être identifiés pour ces activités catalytiques vis-à-vis des fibres alimentaires, et identifiés au sein d'environ 18 000 bactéries (CAZy database ; Lombard *et al.*, 2014). En revanche, la limite de cette performance reste la quantité massive de données à traiter, associée à l'annotation des gènes et le prix important du séquençage d'un échantillon (Wang *et al.*, 2015). Cependant, la limite de ces études se focalise sur la structure et la fonction du microbiote intestinal et exclut l'interaction de cet écosystème et sa fonctionnalité au sein de son hôte.

2.2. Etude de l'interaction du microbiote intestinal et de l'hôte

Le microbiome et ses interactions avec son hôte humain sont étudiés à l'aide de plusieurs modèles qui reproduisent, les différents aspects du microbiote intestinal humain dans cet environnement (Figure 10). Au sein de ces modèles, l'étude de l'impact des voies métaboliques, des processus

physiologiques ou d'un stimulus effectué par une molécule issue du microbiome intestinal, se révèle informative. Ces données seront ensuite extrapolées à l'homme pour mieux comprendre l'effet du microbiote intestinal sur l'état de santé de l'homme, avec ses limites respectives. Parmi ces modèles, les modèles animaux présentent une importante composante du domaine des sciences liées au microbiome. Parmi ces modèles, les modèles animaux comme les souris ont été grandement investis.

2.2.1. Les approches expérimentales causales dans la recherche sur le microbiome

Plusieurs méthodes ont été développées pour étudier l'effet du microbiote intestinal et établir sa causalité directe sur la physiologie de l'hôte. C'est le cas des modèles de souris « *Germ-free* », c'est-à-dire dépourvus de micro-organismes. Ces souris ont été élevées dans des isolateurs, et ce tout au long de leur développement, dans un environnement stérile à l'abri de toutes expositions de micro-organismes (Grover et Kashyap, 2014). C'est notamment à partir de ces approches que l'impact du microbiote intestinal dans le métabolisme du cholestérol a été suggéré. Rabot *et al.*, ont démontré que ces modèles axéniques présentent un métabolisme de cholestérol altéré, avec concentration de cholestérol plasmatique réduite par rapport à des souris conventionnelles, associée à une augmentation de la synthèse de cholestérol hépatique (Rabot *et al.*, 2010). A partir de ce modèle, la conception de modèle plus élaboré est possible, avec un microbiote humain simplifié par la colonisation d'une seule bactérie commensale ou d'un seul gène microbien fonctionnel porteur d'une activité métabolique au sein de l'intestin. Par cette approche, Yao *et al.*, ont démontré l'influence d'une activité du microbiote intestinal sur le métabolisme du cholestérol, induite par l'activité des hydrolases des sels biliaires portée par une bactérie *Bacteroides thetaiotaomicron*. Les auteurs ont montré que cette activité du microbiote intestinal peut modifier le métabolisme du cholestérol de l'hôte (Yao *et al.*, 2018). Cependant, des ressources importantes sont nécessaires pour assurer l'élevage et le maintien de ces modèles « *Germ-free* ». Ceci doit se faire dans des plateformes spécifiques et compétentes, et peut présenter parfois une contrainte technique, limitant leur accessibilité (Kennedy *et al.*, 2018). De plus, les animaux « *Germ-free* » présentent de nombreuses caractéristiques phénotypiques au niveau de leur anatomie, physiologie et métabolisme et sont souvent moins étudiées par rapport aux animaux conventionnels. Au niveau anatomique, un changement de la longueur de l'intestin jusqu'à l'état de la muqueuse intestinale a été rapporté (Slezak, *et al.*, 2014). A l'échelle du métabolisme,

l'homéostasie de certains métabolismes peut interférer dans l'interprétation de l'effet du microbiote intestinal observé sur l'hôte (**Kennedy *et al.*, 2018**).

Une alternative à ces limites est possible à partir d'animaux conventionnels. Leur microbiote initial dans l'intestin est déplété à l'aide de traitements antibiotiques. Placés dans un environnement stérile, les animaux conventionnels reçoivent l'administration d'antibiotiques par voie orale par un traitement d'antibiotique à large spectre²⁴ pendant quelques semaines (**Hintze *et al.*, 2014**). L'autre intérêt de cette méthode est de combiner cette déplétion de la flore résidente à des modèles présentant un génotypage particulier. C'est le cas de l'étude portée par Le Roy *et al.*, qui à partir de modèle hypercholestérolémique et génétiquement modifié avec la souche de souris C57BL/6J, *Apoe*^{-/-}, gène qui contribue à déterminer la variation du niveau de cholestérol plasmatique d'un organisme (**Davignon *et al.*, 1988 ; Le Roy *et al.*, 2019**). Cette étude démontre que le microbiote intestinal influence le métabolisme du cholestérol à travers la modification au niveau de l'absorption du cholestérol intestinal, la synthèse de cholestérol et de sels biliaires hépatiques. De façon plus approfondie, la mise en place de microbiote identique à celui de l'homme, a également été investie à partir de ce modèle dépourvu de microbiote intestinal. Le transfert de microbiote d'un organisme donneur, tel que l'homme à un autre organisme receveur, tels qu'un modèle animal dépourvu de microbiote intestinal. Ceci permet la mise en place d'un modèle animal humanisé par la technique de transplantation fécale (FMT, *fecal microbiota transplantation*). C'est par cette technique que Roy et coll. ont montré que par le biais de microbiote humain d'individu hyper/normocholestérolémique à des souris dépourvues de micro-organismes, permettait le transfert aux animaux, des phénotypes hyper/normocholestérolémique associés aux donneurs humains (**Roy *et al.*, 2019**). L'ensemble de ces éléments renforcent l'hypothèse que le microbiote intestinal contribue à influencer la cholestérolémie de l'hôte et contribue à la régulation du métabolisme du cholestérol de son hôte.

²⁴ **Des antibiotiques à large spectre** sont des familles d'antibiotiques qui ont plusieurs spectres d'activités, c'est-à-dire qui ciblent l'ensemble des micro-organismes sensibles à une famille d'antibiotiques. Par exemple, la vancomycine inhibe la biosynthèse de la paroi bactérienne. Les bactéries de type entérocoques vont être plus sensibles à la vancomycine.

2.2.1. Les approches expérimentales prospectives basées sur les mécanismes d'actions du microbiome

Élucider les fonctions mais également les mécanismes d'actions du microbiote intestinal est essentiel pour nous informer sur cette interaction hôte-microbiote intestinal. De nombreuses bactéries commensales ont été isolées à partir du microbiote intestinal humain pour comprendre cette interaction complexe entre le microbiote humain et l'homme. Avoir recours à ces méthodes de cultures et de caractérisation du phénotype bactérien de l'isolat²⁵ est une des approches utilisées, pour explorer les activités biologiques bactériennes *in vitro* et évaluer leur effet *in vivo* sur la santé de l'hôte. C'est l'exemple de la bactérie *Parabacteroides distatonis* (*P.distatonis*). Récemment identifiée comme une des populations composantes majeures de microbiote intestinal humain, il a été démontré que cette bactérie présentait des fonctions physiologiques importantes à travers sa capacité *in vitro* à métaboliser les sels biliaires et produire un acide gras à chaîne courte, le succinate (Falony *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2019). De façon intéressante, les travaux de cette étude ont permis d'établir l'effet de l'activité de *P. distatonis* *in vivo* et d'identifier son rôle clef dans des mécanismes du métabolisme du glucose altéré, au sein de modèle murin obèse. Sur une autre étude utilisant cette même combinaison d'approches *in vitro* puis *in vivo*, des isolats de plusieurs souches de *P. distatonis* ont été caractérisés *in vitro* pour leurs propriétés immunomodulatrices et leurs capacités à renforcer la barrière intestinale (Cuffaro *et al.*, 2020). La caractérisation *in vivo* des effets protecteurs de ces dernières souches d'intérêts a été confirmée dans un modèle pathologique murin atteint d'inflammation au niveau de l'intestin. Ces observations, nous suggèrent les méthodes d'études qui identifient la fonctionnalité du microbiote intestinal et de son impact sur l'état de santé de l'hôte. Bien que de plus amples recherches soient nécessaires pour comprendre les mécanismes et les voies signalisation mis en jeu, ces observations renforcent l'idée selon laquelle les bactéries commensales du microbiote intestinal peuvent représenter des pistes prometteuses pour préserver la santé de l'hôte et constituer de nouvelles sources de produits biothérapeutiques.

²⁵ Un **isolat** est une espèce bactérienne complètement isolée de son écosystème initial, ici le microbiote intestinal. Cette méthode est utilisée pour mettre en culture et étudier les propriétés du micro-organisme.

2.3. Les challenges de la recherche sur le microbiome intestinal

Les perspectives d'études sur notre compréhension du microbiome intestinal et de son interaction avec l'hôte humain, nous permet de prendre conscience que cette intense interaction hôte-microbiote contribue au maintien de l'homéostasie. Le microbiote intestinal constitue une cible thérapeutique prometteuse, de choix dans la prise en charge de plusieurs maladies humaines. Fondées sur ces approches, plusieurs stratégies préventives et curatives modulent le microbiote intestinal, pour optimiser l'effet thérapeutique attendu. Ces interventions visent à préserver et favoriser le maintien des interactions hôte-microbiote, d'un point de vue structurale et également fonctionnel. C'est le cas des probiotiques, dans le contrôle la cholestérolémie chez l'homme (**Zendeboodi et al., 2020**). C'est le cas de *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242, précédemment citée, et également d'autres probiotiques, AB-Life®, composées d'un mixte de 3 souches de *Lactobacillus plantarum* KABP™ 011 (CECT 7527), *Lactobacillus plantarum* KABP™ 012 (CECT 7528) et *Lactobacillus plantarum* KABP™ 013 (CECT 7529) (**Fuentes et al., 2013**). Les inventeurs de AB-Life ® ont mis en évidence que ce probiotique cible un large profil de patients : une réduction du niveau de LDL-Chol de 17,6 % est rapportée pour des patients qui présentent une hypercholestérolémie sévère jusqu'à une réduction de 9,4 % pour ceux qui ont une hypercholestérolémie modérée. Récemment, la bactérie *Lactobacillus plantarum* ECGC 13110402, commercialisée LPLDL®, améliore la capacité de réduction de 13,9 % du taux de LDL-Chol chez des individus hypercholestérolémiques (**Costabile et al., 2017**). La majorité de ces espèces probiotiques sont reconnues par la FDA et par l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA, *European Food Safety Authority*) en tant que produits alimentaires généralement considérés sans danger (GRAS, *Generally Recognized As Safe*) pour la santé de l'homme. Récemment, de nouvelles bactéries commensales appartenant au genre *Bacteroides spp.* ont été suggérées comme de nouvelles sources de probiotiques (NGS, *next-generation probiotics*) (**O'Toole et al., 2017**). L'amélioration de nos connaissances sur ces micro-organismes (e.g. séquençage des génomes et la culture bactérienne), leurs interactions avec l'hôte humain, leur capacité d'adaptation et leur affiliation intégrante du core microbiome, rendent attractives les *Bacteroides*. Par ailleurs, de nombreux effets bénéfiques procurés à l'hôte ont été attribués aux *Bacteroides* (**Tan et al., 2019**). C'est le cas de *Bacteroides dorei* D8, responsable de la conversion du cholestérol en coprostanol *in vitro*, potentiel bactérie candidate pour prévenir de risque

d'hypercholestérolémie, associée à la survenue de MCVs (**Gérard et al., 2007**). Récemment, les travaux de Kenny et al., ont abouti à l'identification d'une vingtaine d'espèces métagénomiques²⁶ porteuse du gène *isma* (*intestinal sterol metabolism A*), responsable d'une déplétion de cholestérol intestinal *in vivo* à travers sa biotransformation en coprostanol, résultante d'une cholestérolémie normale (**Kenny et al., 2020**). Une autre étude portée par Gauffin Cano et al., a identifié l'impact de l'administration de *Bacteroides. uniformis* CECT7771 dans un modèle préclinique associé à l'obésité et observe son effet bénéfique sur la diminution de la cholestérolémie de 18 % (**Gauffin Cano et al., 2012**). Enfin, l'administration de *Bacteroides vulgatus* et *Bacteroides dorei* a permis une réduction des risques de la formation de lésions athérosclérotiques dans un modèle murin atteint d'athérosclérose (**Yoshida et al., 2018**). L'ensemble de ces évidences et leur potentiel effet bénéfique sur la santé de l'hôte, nous encourageant à nous diriger vers ces nouveaux outils biothérapeutiques. Cependant, il est indispensable de comprendre les mécanismes bactériens qui aboutissent à un effet biologique hypocholestérolémiant et anti-athérosclérosique. Comprendre fondamentalement ce lien spécifique entre les bactéries candidates et les paramètres physiologiques de l'hôte humain permettra *in fine* d'optimiser l'efficacité thérapeutique attendue et de restaurer ainsi, l'homéostasie liée au microbiote intestinal.

3. L'impact du microbiote sur le métabolisme du cholestérol et ses dérivés biliaires : Généralités

3.1. Contexte

Les précédents éléments cités ont montré que certains micro-organismes peuvent influencer le métabolisme du cholestérol de l'hôte. Peu d'informations sont disponibles sur l'impact du microbiote intestinal sur le métabolisme du cholestérol, à travers les activités métaboliques. Au niveau du côlon, le cholestérol et ses dérivés peuvent être piégés par les bactéries, convertis en autres métabolites (coprostanol, sels biliaires secondaires ou déconjugués)

²⁶ Ici, des **espèces métagénomiques** sont des groupes de gènes du microbiote intestinal, obtenus à partir de la différence d'abondance entre des individus qui présentent un microbiote haut producteur de coprostanol et des individus bas-producteurs. Ces gènes sont regroupés et classifiés taxonomiquement (**Sunagawa et al., 2013**). Ces espèces bactériennes métagénomiques proviennent pour la majorité d'espèces non-cultivées et permettent d'apporter des connaissances essentielles sur les fonctions de ces espèces issues du microbiote intestinal.

par le microbiote. Ces processus de biotransformation favorisent l'élimination du cholestérol dans les selles et pourraient par conséquent diminuer la cholestérolémie et constituer des alternatives ou compléments aux traitements médicamenteux hypolipidémiants actuels. La revue scientifique « *Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism : current status and future prospects* » regroupent l'ensemble de ces éléments scientifiques pour conceptualiser notre compréhension globale de l'impact du microbiote intestinal sur la cholestérolémie. Cette revue a été coécrite avec Aicha Kriaa et publiée dans le journal, *Journal of Lipid Research* lors de ma première année de thèse.

3.2. Résumé de la revue scientifique « *Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism : current status and future prospects* »

Récemment, le microbiote intestinal est apparu comme un facteur crucial d'influence du métabolisme du cholestérol. Depuis lors, un intérêt important a été porté à l'étude de ces interactions hôte-micro-organismes pour découvrir les fonctions microbiennes associées au métabolisme du cholestérol et des acides biliaires (AB). Dans un premier temps, une brève description des origines et du métabolisme du cholestérol est faite. Un ensemble de mécanismes combinés, sont coordonnés et aident à réguler non seulement le taux de cholestérol dans le sang, mais aussi l'équilibre du cholestérol dans tout l'organisme, qui est maintenu par de fines interactions entre l'absorption, l'excrétion et la synthèse du cholestérol.

Nous donnons également un aperçu concis des voies bactériennes du microbiote intestinal sur le métabolisme du cholestérol et des AB. Il a été suggéré que chacune de ces voies, allant de la conversion du cholestérol en coprostanol au métabolisme du BA joue un rôle sur l'homéostasie de l'hôte. Jusqu'à 1 g de cholestérol provenant de la bile, de l'alimentation et des cellules desquamées pénètre quotidiennement dans le côlon et est exposé aux bactéries présentes dans l'intestin. La conversion du cholestérol en coprostanol a été rapportée par des micro-organismes intestinaux. Deux voies principales sont proposées pour la conversion du cholestérol en coprostanol et les principaux taxons bactériens porteurs d'une telle réaction sont nommés. Cependant, les enzymes bactériennes responsables de ces voies métaboliques, sont encore inconnues. Un autre mécanisme du microbiote intestinal est exposé, celui du piégeage du

cholestérol au niveau des membranes bactériennes. Jusqu'à présent, cette capacité d'assimilation du cholestérol a été démontrée seulement dans des conditions *in vitro*. Le piégeage du cholestérol peut avoir un effet protecteur pour les bactéries, mais ce mécanisme est encore inconnu. Les enzymes microbiennes des bactéries du microbiote intestinal, métabolisent les AB primaires en AB secondaires dans la TGI de l'hôte. Environ 5 % de l'ensemble des AB servent de substrat au métabolisme bactérien dans la TIG et constituent la principale voie d'excrétion du cholestérol par l'organisme. Les principales biotransformations de AB par les bactéries intestinales humaines débutent par la conversion de l'AC et ACDC glyco-conjugués et tauro-conjugués déconjugués via les BSH, l'épimérisation, puis 7 α -déshydroxylation pour former des AB secondaires. Jusqu'à présent, ces mécanismes de réaction n'ont pas été investis et les enzymes n'ont pas été caractérisées.

La troisième partie de cette revue s'intéresse aux mécanismes physiopathologiques associés au métabolisme microbien du cholestérol jusqu'à présent peu étudiés. En effet, des études ont déjà signalé des modifications de la composition du microbiote intestinal associé à une modification du métabolisme des AB (comme c'est le cas pour la cirrhose hépatique) et de la production de métabolites spécifiques (athérosclérose). Ces métabolites dérivés du microbiote intestinal comme le TMAO, l'oxyde de triméthylamine, sont prédictifs d'un risque accru de la survenue des MCVs. Dans ce contexte, des associations entre un microbiome intestinal perturbé et un métabolisme des stérols altérés ont été mises en évidence. Une vision critique des publications actuelles de la littérature est apportée au niveau du lien causal établi entre une signature microbienne et une pathologie.

La dernière partie de cette revue s'intéresse aux stratégies basées sur le microbiote intestinal pour réduire le cholestérol. Aujourd'hui, les bactéries dotées d'une activité BSH sont des agents hypocholestérolémians, utilisés comme compléments alimentaires ou "*biomédicaments*" en raison de leurs effets sur la cholestérolémie et de leur appartenance au microbiote intestinal. Ces activités BSH perturbent la formation et l'absorption des micelles, entraînant ainsi une baisse significative du taux de cholestérol, mais aussi la prise de poids et les niveaux de cholestérol chez l'hôte. Plusieurs rapports sont consacrés à l'identification de nouvelles bactéries probiotiques présentant une activité du BSH pour les maladies métaboliques. Malheureusement, la plupart des essais *in vivo* réalisés chez l'homme, sont jusqu'à présent basés sur des essais *in vitro* et se concentrent

uniquement sur la vérification des effets hypocholestérolémiques démontrés *in vitro*, plutôt que sur les mécanismes impliqués. Une meilleure compréhension des interactions mutuelles régulant le métabolisme du cholestérol élargirait la voie vers la découverte de nouvelles cibles pour le traitement de la maladie.

En conclusion, cette revue apporte les preuves actuelles sur l'impact du microbiote intestinal sur le métabolisme du cholestérol et à son rôle dans le développement de maladies métaboliques. L'analyse de ces actions bactériennes sur le cholestérol a permis l'identification des voies microbiennes du métabolisme du cholestérol. Cependant, ce domaine de recherche reste peu étudié, car de nombreuses voies biochimiques et les enzymes impliquées doivent encore être identifiées. La détermination de ces mécanismes d'action favorise l'utilisation des bactéries intestinales comme un puissant agent de réduction du cholestérol. Une telle approche peut être combinée avec les stratégies attractives existantes, y compris les phytostérols, pour accroître leur efficacité et le développement de thérapies hypocholestérolémiques spécifiques.

3.3. Revue scientifique “Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism: current status and future prospects”

Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism: current status and future prospects

Aicha Kriaa, Mélanie Bourgin, Aline Potiron, Héra Mkaouar, Amin Jablaoui, Philippe Gérard, Emmanuelle Maguin, and Moez Rhimi¹

UMR 1319 Micalis, INRA, Microbiota Interaction with Human and Animal Team (MIHA), AgroParisTech, Université Paris-Saclay, F-78350 Jouy-en-Josas, France

Journal of Lipid Research ; Volume 60 Issue 2 Pages 323-332 (February 2019)

DOI: 10.1194/jlr.R088989

Abstract

Recently, the gut microbiota has emerged as a crucial factor that influences cholesterol metabolism. Ever since, significant interest has been shown in investigating these host-microbiome interactions to uncover microbiome mediated functions on cholesterol and bile acid (BA) metabolism. Indeed, changes in gut microbiota composition and, hence, its derived metabolites have been previously reported to subsequently impact the metabolic processes and have been linked to several diseases. In this context, associations between a disrupted gut microbiome, impaired BA metabolism, and cholesterol dysregulation have been highlighted. Extensive advances in metagenomic and metabolomic studies in this field have allowed us to further our understanding of the role of intestinal bacteria in metabolic health and disease. However, only a few have provided mechanistic insights into their impact on cholesterol metabolism. Identifying the myriad functions and interactions of these bacteria to maintain cholesterol homeostasis remain an important challenge in such a field of research. In this review, we discuss the impact of gut microbiota on cholesterol metabolism, its association with disease settings, and the potential of modulating gut microbiota as a promising therapeutic target to lower hypercholesterolemia.

Supplementary key words: gut microbiota • cholesterol metabolism • metabolic diseases • hypercholesterolemia.



Over the last few years, we have witnessed a myriad of original studies being dedicated to unraveling the role of gut microbiota in health and disease, such as inflammatory bowel diseases (1), obesity (2–4), type 2 diabetes (5), liver cirrhosis (6), and atherosclerosis (7–9). The human gastrointestinal tract (GIT) hosts a large number of distinct microbial communities, including bacteria, viruses, archaea, parasites, and fungi (10, 11). In a healthy state, interactions between these microorganisms and the host are largely symbiotic (12), as the gut microbiota shapes the development of the intestinal immune system (13) and influences the host metabolism [mainly through the production of bacterial metabolites as bile acids (BAs) and short-chain fatty acids] (14, 15). Conversely, changes in the gut microbiota composition/functions (known as dysbiosis) in combination with the classic genetic and environmental factors were shown to impact host health, thus triggering the development of several metabolic disorders, mainly CVDs (16). Recently, growing appreciation has been seen for a role of the gut microbiota in metabolic health, mainly in cholesterol homeostasis. The complex interplay between intestinal microbiota, their metabolites, and such diseases was also highlighted (17). Still, bacterially mediated pathophysiological mechanisms that impair cholesterol metabolism and other related metabolic traits remained, until now, poorly investigated (18). Surprisingly, most of the contemporary literature linking gut microbiota to host lipid metabolism and metabolic disorders was aimed at drawing causal inferences and defining microbial signatures for the disease. A better understanding of the mutual interactions regulating cholesterol metabolism will broaden the path to discover new targets for disease treatment. In this review, we shed more light on the impact of gut microbiota on cholesterol and BA metabolism in health and disease with a focus on the different microbial pathways involved and their functional basis

OVERVIEW OF CHOLESTEROL METABOLISM

Beyond being an essential molecule for eukaryotic life as a structural building block for all cell membranes (19, 20), cholesterol is believed to serve as a genuine modulator of cell signaling (21) and neuronal conduction (22). It is also an essential precursor of several biomolecules, including steroid hormones, vitamin D, oxysterols, and BAs (23). Only about one-third of the body cholesterol is of dietary or “exogenous” origin (mainly animal products as eggs and red meat), the



other two-thirds are synthesized within body cells and recognized as endogenous cholesterol (Fig. 1) (24). Virtually, all nucleated cells are able to synthesize their full complement of cholesterol; however, only the liver has the capacity to eliminate cholesterol via secretion into bile or conversion into BA (25). Together with the intestine, the liver controls the influx and the efflux of cholesterol in a coordinated manner, maintaining the whole-body cholesterol homeostasis. In the liver, part of free dietary as well as de novo-synthesized cholesterol is esterified to cholesteryl esters and packaged along with triglycerides and ApoB-100 into VLDLs to be secreted into the blood. The latter lipoproteins are further metabolized to form LDLs that are involved in the transport to peripheral tissues, as the case of VLDLs. Such lipoproteins containing ApoA-I mediate the reverse cholesterol transport from peripheral cells into the liver (26, 27). In fact, several reports described the key role of ApoA-I in the different steps of reverse cholesterol transport starting from the nascent HDL formation and their remodeling, via LCAT, to the HDL cholesterol delivery into the liver through scavenger receptor class B type 1 (SR-B1) (28, 29). Returning to the liver by HDL, cholesterol is further converted into BAs. Previously seen as simple fat emulsifiers, BAs are now known as critical modulators influencing a plethora of host processes, including lipid, glucose, and energy metabolism, through the activation of several nuclear receptors, namely, FXR, pregnane X receptor, vitamin D receptor, and one G protein-coupled receptor (TGR5) (30, 31, 32, 33). Following a coordinated series of steps involving at least 17 different enzymes (34, 35), two primary BAs, chenodeoxycholic acid (CDCA) and cholic acid (CA), are synthesized from cholesterol in the liver. Prior to secretion, BAs are subsequently conjugated to either glycine or taurine, with a ratio of glycine to taurine of 3:1 in humans, and then stored in the gallbladder as mixed micelles along with cholesterol and phospholipids. Conjugation reduces BA pKa, making BAs more water soluble and much more able to fulfill their function as typical detergent molecules in the acid environment of the duodenum (36).

On consumption of a meal, the gallbladder contracts and releases BA micelles into the intestinal lumen to help solubilize cholesterol and fat-soluble vitamins. BAs are afterward extensively reclaimed by the distal ileum via the apical Na⁺-dependent transporter (ASBT), present on the enterocyte brush border. Intracellularly, intestinal bile-acid-binding protein (IBABP, FABP6)

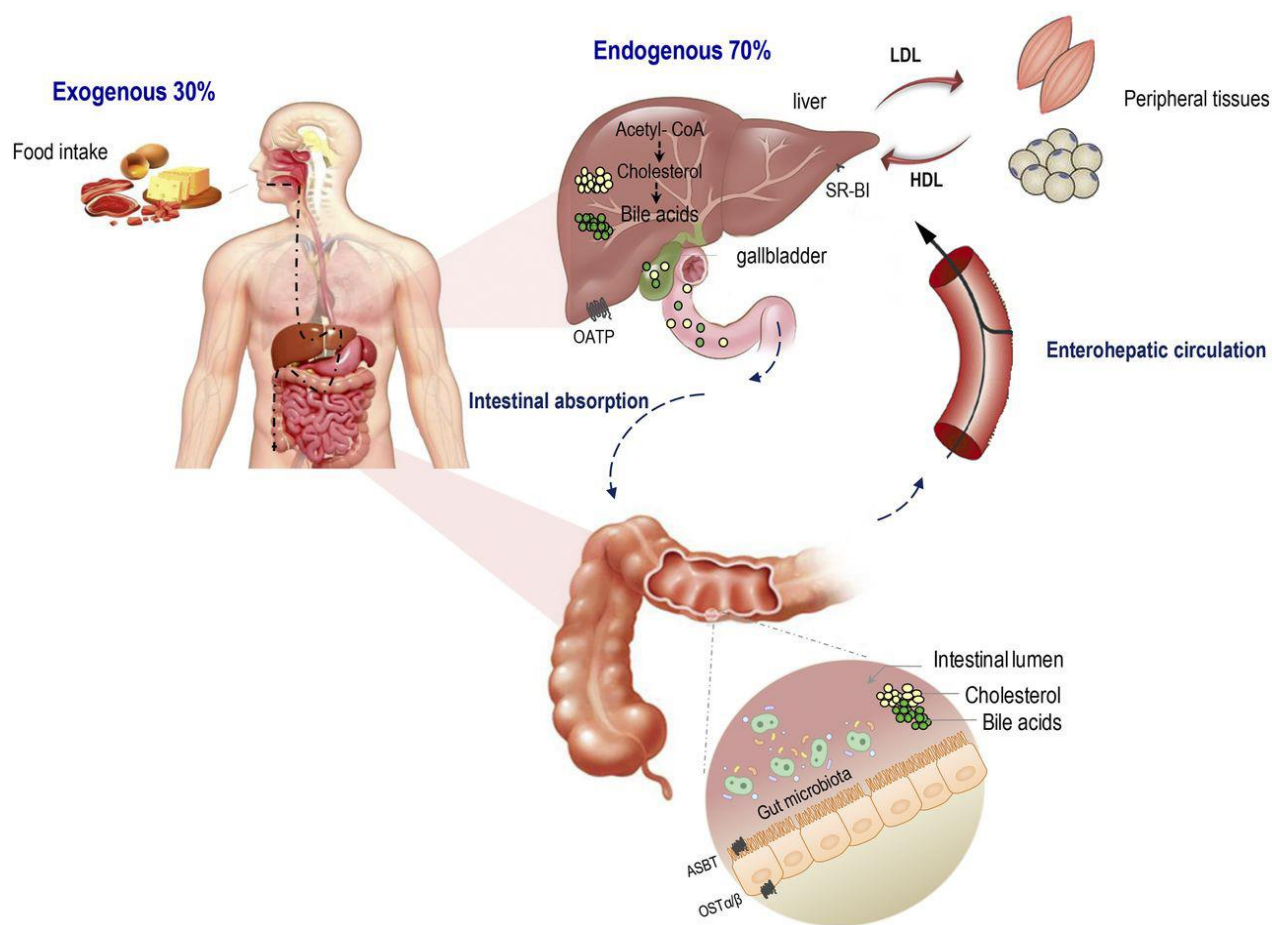


Fig. 1 Cholesterol origins and metabolism. Dietary cholesterol or “exogenous” cholesterol accounts for approximately one-third of pool body cholesterol, the remaining 70% is synthesized exclusively in the liver through a series of multiple biochemical steps. Cholesterol is first converted into BAs, which are absorbed by the apical sodium-dependent BA transporter (ASBT) into enterocytes and secreted into the portal circulation via the basolateral BA transporter, organic solute transporter subunit α (OST α). In the liver, cholesterol is converted into lipoproteins. Hepatic cholesterol enters the circulation as VLDLs, which are further metabolized to LDLs. LDL supplies cholesterol to peripheral tissues for metabolic purposes. HDL, on the other hand, transports cholesterol back to the liver either directly by interacting with hepatic SR-B1 or indirectly by transferring the cholesterol to VLDL or LDL.



promotes BA transport to the basolateral membrane where BAs are effluxed by OST- α/β into the blood. Returning to the liver, BAs are taken up avidly by the Na⁺-taurocholate cotransporting *polypeptide (NTCP) and, to a lesser extent, by organic anion transporters (OATPs) to be reconstituted and resecreted during the next course of digestion, thus completing a portal enterohepatic circulation (34) (Fig. 1). The combined effects of these coordinated steps mentioned above help to regulate not only the serum cholesterol level but also the whole-body cholesterol balance, which is maintained by fine interactions between cholesterol absorption, excretion, and synthesis (37).

IMPACT OF GUT MICROBIOTA ON CHOLESTEROL METABOLISM

In addition to diet and the host's genetic and environmental factors, bacteria present in the gut have recently been suggested to impact on cholesterol metabolism and play a key role in each pathway, ranging from cholesterol conversion into coprostanol to BA metabolism. Below, we give a concise overview of these bacterial pathways.

Microbial conversion of cholesterol into coprostanol

As much as 1 g of cholesterol originating from bile, diet, and desquamated cells enters the colon daily and is exposed to approximately 2×10^{11} to 5×10^{11} bacteria per gram wet weight of human feces (18). Cholesterol conversion to coprostanol by intestinal microorganisms was first reported in the 1930s (38) and shown to be established early in the first year of life in humans (39). The efficiency of microbial cholesterol-to-coprostanol conversion in human populations is bimodal with a majority of high converters (almost complete cholesterol conversion) and a minority of low or inefficient converters (coprostanol content representing less than one-third of the fecal neutral sterol content) (40, 41). Two major pathways have been proposed for this biotransformation (42). The first one is a direct stereospecific reduction of the 5,6-double bond of cholesterol, while the second one is an indirect transformation with at least three steps forming cholestenone and coprostanone as intermediates (Fig. 2A). Early attempts to isolate bacteria responsible for this conversion were unsuccessful (43), and only a few cholesterol-reducing microorganisms from rat cecum (44), hog sewage lagoon (45), and human feces were defined (43, 46). Most of the



cholesterol-reducing bacteria isolated and characterized are members of the genus *Eubacterium*, except for *Bacteroides* sp. strain D8 (46) (Fig. 2A). Strains of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, and *Peptostreptococcus* were also reported to reduce cholesterol to coprostanol (47, 48); unfortunately, they were not explored in vivo. Notably, cholesterol absorption takes place mainly in the upper small intestine, which harbors lactic acid bacteria (mostly *Lactobacillus*) able to significantly

convert cholesterol into coprostanol (48). Lately, new bacterial phylotypes belonging to the *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* families have been associated with high coprostanol levels in healthy humans (49). Coprostanol production from the available cholesterol appears to be most efficient in the colon (50). Interestingly, Sekimoto et al. (50) described the existence of an inverse relationship between the blood cholesterol level and the coprostanol/cholesterol ratio in human feces, suggesting that produced coprostanol can modulate cholesterolemia. Moreover, several studies have reported that the rate of microbial cholesterol-to-coprostanol conversion in human populations is variable, as noted before, and is correlated with gut microbiota composition (41). In line with these observations, some bacteria are also linked to blood lipid levels (51). The poor absorption of coprostanol in the intestine is associated to its structure, which explains its very low uptake through the intestinal mucosa and its limited esterification in mucosal cells (52). Notably lacking Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) treated with an LXR agonist, it was suggested that lipid level decrease was essentially linked to low cholesterol absorption and that production of coprostanol can protect the GIT against accumulated cholesterol (54). Moreover, it was demonstrated that mice lacking NPC1L1 display a different gut microbiota composition when compared with their wild-type littermates (55). Unfortunately, the function, distribution, and abundance of bacteria carrying this conversion in the gut community are still unknown. Coprostanoligenic bacteria were suggested to use cholesterol as a terminal electron acceptor for energy, as originally proposed by Eyssen et al. (44), but the significance of such a conversion to the bacteria remains to be elucidated.

Given the inverse relationship between serum cholesterol levels and fecal coprostanol/cholesterol ratio (50) and the recent report highlighting a role for the gut microbiome in blood lipid levels (51), functional analysis of coprostanoligenic strains will be of great interest.

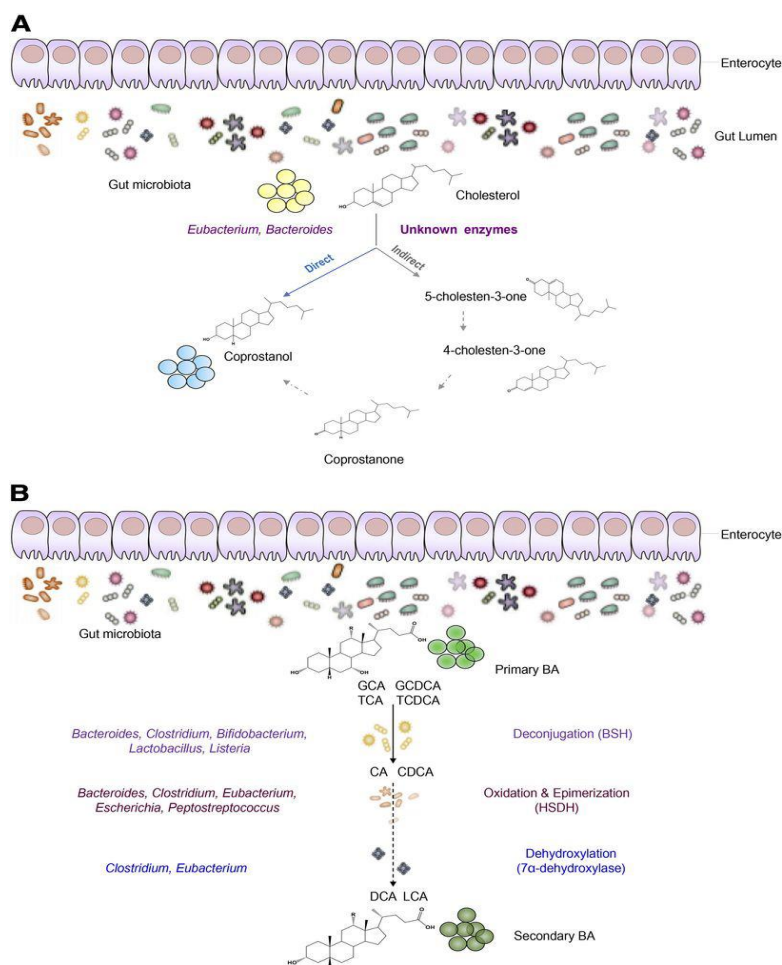


Fig. 2A: Bacterial conversion of cholesterol into coprostanol. Two major pathways are proposed for the conversion of cholesterol to coprostanol. The first pathway involves direct reduction of the 5,6-double bond. The second pathway starts with the oxidation of the 3 β -hydroxy group and isomerization of the double bond to yield 4-cholesten-3-one, which undergoes two reductions to form coprostanone and then coprostanol. The main bacterial taxa carrying such a reaction involve Eubacterium and Bacteroides. However, bacterial enzymes are still unknown. **B: Bacterial BA modifications in the host GIT.** In the intestine, microbial enzymes from gut bacteria metabolize primary BAs into secondary BAs. Glyco-conjugated and tauro-conjugated CA and CDCA are first deconjugated via BSHs, epimerized, and then 7 α -dehydroxylated to form secondary BAs (DCA and LCA). The main bacterial genera involved in BA metabolism include *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, and *Listeria* in BA deconjugation; *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, and *Peptostreptococcus* in the oxidation and epimerization of hydroxyl groups at C3, C7 and C12; *Clostridium* and *Eubacterium* in 7-dehydroxylation; cholesterol to coprostanol metabolism was suggested to reduce the risk of CVDs (40, 53). Using mice and *Clostridium* and *Fusobacterium* in desulfation. GCA, glycocholic acid; TCA, taurocholic acid; GCDCA, glycochenodeoxycholic acid; TCDCA, taurochenodeoxycholic acid.

Microbial entrapment of cholesterol

Cholesterol entrapment and incorporation into bacterial membranes was first noted in the early 1970s, as most of the mycoplasmas and strains tested were shown to require exogenous cholesterol for growth and incorporate large quantities of it into their cell membranes (56, 57). So far, the ability of bacterial uptake of cholesterol has been shown *in vitro* in several strains of *Lactobacillus* genera, including *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. casei*, and *L. gasseri* (58, 59, 60, 61). Only distinct strains of both *Lactobacilli* and *Bifidobacterium* were suggested to perform such activity *in vitro* (62). Numerous studies were focused on the investigation of mechanisms of cholesterol entrapment by bacteria. In frame with this topic, it was proposed that cholesterol removal from the culture media is mainly associated to: i) binding to bacterial cell walls or its assimilation during growth; and ii) cholesterol precipitation (63, 64) (Fig. 2A). In addition to that, authors reported that most of the cholesterol taken up from the medium may have been incorporated into the bacterial cell membrane, as it remained intact inside the cells rather than being further metabolically degraded (64). Fascinating per se is the observation that even nongrowing and dead cells could remove cholesterol *in vitro* via binding of cholesterol to the cellular surface (62, 65, 66). Moreover, earlier studies have reported that some bacteria could produce exopolysaccharides that adhered to the cell surface and could absorb cholesterol (67). Kimoto-Nira et al. (66) previously suggested that the ability of cholesterol-binding is strain specific (65) and highly dependent on the chemical and structural properties of cell membranes (66). The incorporation of cholesterol into bacterial cell membranes increased the concentration of saturated and unsaturated fatty acids, leading to increased membrane strength and, subsequently, higher cellular resistance toward lysis (67).

Whether cholesterol entrapment may offer a protective effect to bacteria in the intestinal environment remains unclear, as the mechanism is still unknown. Additional studies are needed to define the influence of these strains on the intestinal microflora and the overall metabolic activity of the gut.



Microbial metabolism of BAs

Bacterial metabolism of BAs represents one of the most intriguing relationships linking gut microbiota to the host. While most BAs are efficiently absorbed and recycled back to the liver, around 5% of the total BA pool serve as a substrate for bacterial metabolism in the GIT and constitute the major route for cholesterol excretion from the body (18). Below, we outline the main BA biotransformations by human intestinal bacteria.

Deconjugation

On their side chain, BAs undergo deconjugation to form unconjugated BAs as well as free glycine or taurine residues (68). The enzymatic hydrolysis of the C-24 N-acyl amide bond, referred to as deconjugation, is catalyzed by bile salt hydrolase (BSH) enzymes in the small intestine, a process that continues to near completion in the large bowel (Fig. 2B) (69, 70). BSH activity has been widely detected in several bacterial genera, including *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Enterococcus* (71, 72), and possibly many others. Deconjugation of bile salts increases their pKa to ~5, making them less soluble and less efficiently reabsorbed. This results in higher excretion of free BA into the feces, an amount that must be replenished by de novo synthesis from cholesterol (69). Although several hypotheses have been proposed (as follows), the precise benefits of this transformation to the bacterium are still a subject of controversy and appear to vary between bacterial isolates. Proposed benefits include the use of glycine from glycocholic acid as an energy, carbon, and/or nitrogen source and of taurine from taurodeoxycholate as a sulfur source (69). A role of taurine as a nitrogen source was also noted as the transcription of the *Bifidobacterium longum bsh* gene was coupled to the glutamine synthase adenylyltransferase gene (*glnE*), which is part of the nitrogen regulation cascade (73). Deconjugation has also been proposed to play a role in bile detoxification, as it yields free BAs that may help to negate the pH-drop by recapturing and exporting the cotransported proton (74). It may also enhance gastrointestinal persistence in which the combined roles of BSH-positive bacteria and those entrapping cholesterol into their membranes may facilitate their survival in the GIT (67, 70).



Oxidation and epimerization of 3-, 7-, and 12-hydroxyl groups

The oxidation and epimerization of the 3-, 7-, or 12-hydroxyl groups of BAs are carried out by the hydroxysteroid dehydrogenases (HSDHs) of intestinal bacteria. Epimerization of BA hydroxyl groups is a reversible change in stereochemistry from the α to the β configuration (or vice versa), involving the generation of stable oxo-BA intermediates (75, 76). This process can be performed by a single species of bacteria containing both α - and β -HSDHs (intraspecies) or by proto-cooperation between two species, one having an α -HSDH and the second containing the β -HSDH (interspecies). So far, HSDH activity has been confirmed in a diverse variety of bacteria, including *Bacteroides* (77), *Eubacterium* (78), *Clostridium* (79, 80), *Bifidobacterium* (81, 82), *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, and *Escherichia* (80, 83). Notably, epimerization of BA hydroxyl groups was proposed to confer a protective effect for some bacterial species, as it reduces BA toxicity. Generated ursocholic acid (7 β -hydroxy), for instance, is less hydrophobic than chenocholic acid (7 α -hydroxy) and presumably less deleterious to cell membranes (84). Whether intestinal bacteria benefit from such reactions is still a matter of speculation.

7 α -Dehydroxylation

In the colon, bacterial 7 α -dehydroxylases convert primary BAs, CA (with hydroxy groups at C-3, C-7, C-12), and CDCA into deoxycholic acid (DCA) and lithocholic acid (LCA), respectively (69). Both are absorbed to some extent and returned to the liver (61). DCA is reconstituted and reabsorbed in the ileum, similarly to primary BA. In the form of its glycine and taurine conjugates, DCA was shown to account for more than 20% of the total biliary BAs in humans (68). LCA, on the other hand, never constituted more than 5%, as it is largely excreted in the feces once conjugated to sulfite in the liver (69). Quantitatively, 7 α -dehydroxylation is the most important bacterial biotransformation, seeing that secondary BAs predominate in human feces (69, 85). Surprisingly, only distinct members of the *Eubacterium* and *Clostridium* XIVa cluster were shown to undergo this reaction (69, 71, 86, 87). Given the lack of redundancy in this ecosystem, any perturbations to these bacterial groups were suggested to likely influence host metabolism (88). Because 7 α -dehydroxylation is a net reductive process, it was suggested to serve as a key electron-accepting reaction in the energy metabolism of dehydroxylating bacteria (69).



Esterification and desulfation of BA in the gut

BA esters or saponifiable derivatives of BAs have been reported to account for 10–30% of the total fecal BA content in humans (89). However, little is known about the role of gut bacteria in carrying such a reaction. Bacterial genera responsible for BA desulfation include *Clostridium* (90, 91), *Peptococcus* (92), and *Fusobacterium* (93). To date, this reaction mechanism has not been unleashed, and the enzymes have not been characterized.

DYSBIOSIS, CHOLESTEROL DYSREGULATION, AND METABOLIC DISEASES

Growing evidence suggests that gut microbiota may affect lipid metabolism and function as an environmental factor to influence the development of many metabolic diseases (6, 7, 8, 9, 94, 95). Several mediators were hypothesized to link changes in gut bacteria to such diseases, including alterations in gut microbiota and subsequent changes in BA metabolism (as is the case for hepatic cirrhosis) and production of specific metabolites (atherosclerosis).

Hepatic cirrhosis

Recent reports have shown potential mechanisms explaining how dysbiosis may affect BA metabolism and impact upon disease state (96, 97, 98). With advancing liver disease and cirrhosis, several taxonomic groups, including *Lachnospiraceae*, *Roseburia*, *Ruminococcaceae*, and *Blautia*, were reported to decrease in addition to the reduction in primary BA concentrations in the intestine due to the liver problems. As these taxa include members with BA 7 α -dehydroxylation activity, secondary BA rates were also significantly lower in cirrhotic patients relative to healthy controls (98). Surprisingly, this decrease in the BA pool entering the intestine appears to promote the overgrowth of distinct pathogenic and pro-inflammatory members of Enterobacteriaceae and Porphyromonadaceae (97). Of note, a direct relationship was previously reported between such bacteria and cognitive impairment in cirrhotic patients (97). A recent comparison of gut microbial genome content between cirrhotic and healthy individuals suggests the enrichment for genes involved in ammonia production and manganese transport systems, each of which is suggested to play a mechanistic role in the cognitive problems associated with liver cirrhosis (6).



Atherosclerosis

Several significant associations between distinct microbial taxa and atherosclerosis have been highlighted recently (17, 99, 100), thus strengthening the evidence for atherosclerosis as a microbiota-associated disease. Although pathogenic bacteria have been previously associated with such disease (9, 99, 100), the composition and functional alteration of commensal microbiota in relation to atherosclerosis were recently examined (17). Different pathways by which microbiota might affect atherogenesis were reported previously (9). These include local or distant infection of the host, alterations in cholesterol metabolism by gut microbiota, and the production of microbial metabolites. Microbial processing of specific dietary components (choline/carnitine) to trimethylamine (TMA), which is further metabolized to TMAO in the liver, has been previously associated with atherosclerosis in several studies (101, 102, 103, 104, 105) and is suggested to play a crucial role in the disease. In fact, TMAO upregulated several macrophage scavenger receptors (CD36 and SR-A1) associated with atherosclerosis. Furthermore, the use of germ-free (GF) mice proved the effect of diet and gut microbiota in the TMAO production linked to macrophage cholesterol accumulation and foam cell formation (101, 102). Dietary supplementation with the TMA-containing precursor (choline or carnitine) and dietary TMAO directly were each shown to enhance aortic root atherosclerotic plaque in mice (101). In humans, elevated plasma levels of TMAO were strongly associated with an increased risk of CVD (106, 107, 108, 109, 110, 111, 112). Indeed, numerous TMAO-associated proteins were identified as involved in the process of platelet aggregation (104, 110). Although not entirely clear, TMAO was suggested to modulate cholesterol and sterol metabolism at multiple sites in vivo (101, 102). In the liver, TMAO reduced the expression of key enzymes and multiple BA transporters (Cyp7a1, Oatp1, Oatp4, and Ntcp) and reduced the BA pool size (101).

Prior studies have suggested that multiple bacterial strains can metabolize carnitine and choline in vitro (113, 114), but specific commensal species that contribute to TMAO formation remain largely unknown. Recently, species of several bacterial taxa (*Prevotella* and *Bacteroides*) were shown to be associated with both plasma TMAO and dietary status (100, 102). A genus within the

Coriobacteriaceae family (*Colinsella*) was also reported to be enriched in patients with symptomatic atherosclerosis (100). Of note, patients with atherosclerotic heart disease have higher cholesterol absorption and reduced fecal neutral steroid (115, 116), which according to the findings of Martinez et al. (117) was suggested to be linked to the increase of such genus.

Three main TMA-synthesis pathways have been described involving each distinct enzyme complex (CutC/D, CntA/B, and YeaW/X) (118, 119, 120). Recently, additional human bacterial taxa that exhibit choline TMA-lyase (CutC) and carnitine oxygenase (CntA) were further uncovered (121). Furthermore, microbial choline processing was proposed to confer certain advantages for bacteria in a complex environment (122, 123). Of interest, an association between atherosclerosis and gene abundance related to the TMA-synthesis metabolic pathway (mainly those encoding TMA lyases as YeaW/X) was lately described but further studies are certainly needed (17).

Probiotic Strain	Animals/Subjects	Dose and Time of Intervention	Effects	Other Parameters	Possible Mechanisms	References
<i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IS-10285	Rats	2.7×10^8 CFU/ml daily for 12 days	Decreased TC and LDL-c	Increased excretion of BA in feces	BA deconjugation	(133)
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3928	Mice	10^9 CFU/ml for 4 weeks	Decreased LDL cholesterol level	Increased fecal BA excretion	BA deconjugation	(134)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4962, manitol, FOS, inulin	Pigs	1 g/day for 8 weeks	Decreased plasma total cholesterol	—	Cholesterol binding to cell walls	(62)
<i>Eubacterium coprostanoligenes</i>	Rabbits	2×10^7 CFU/ml	Decreased plasma total cholesterol	—	Conversion of cholesterol into coprostanol	(135)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> SKG34 and FBB42	Rats	10^8 CFU/ml for 4 weeks	Decreased TC, HDL-c and TG	—	NR	(136)
<i>Lactobacillus reuteri</i> NCIMB 30242	114 subjects	5×10^9 CFU taken twice per d over 6 weeks	Reduced TC, LDL-c and nonHDL-c	—	BA deconjugation	(130)
VSL#3	60 subjects	112.5×10^9 CFU/capsule for 6 weeks	Reduced TC, TG, LDL and VLDL	Increased fecal excretion	BA deconjugation	(128)
<i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 and <i>Lactobacillus helveticus</i> 416	49 subjects	10^8 and 10^9 CFU/ml for 42 days	Decreased TC, LDL-c, nonHDL-c and CT/HDL-c ratio	—	NR	(137)

TC, total cholesterol; LDL-c, LDL cholesterol; HDL-c, HDL cholesterol; TG, triglycerides; NR, not reported.

TABLE 1 Summary of the major studies investigating the relationship between probiotics and hypercholesterolemia



Whether via direct pharmacological inhibition of microbial enzymes involved in TMA production, dietary intervention, or modification of the microbial community with pro- or prebiotics, targeting the gut microbial TMAO pathway as a treatment strategy has the potential to decrease the risk of atherosclerosis. Further studies in animal models will thus be of importance to ensure causality, define precise mechanisms of action, and identify culprit bacteria in such disease.

MICROBE-BASED STRATEGIES FOR CHOLESTEROL-LOWERING EFFECTS

BSH-active bacteria as a cholesterol-lowering agent

Partly owing to their cholesterol-lowering effects and also being part of gut microbiota, BSH-active bacteria are now largely used as food supplements or “drugs” in this day and age. A growing number of people with hypercholesterolemia or CVDs have used these products containing so-called “friendly” bacteria. Lately, increased BSH activity was shown to disrupt micelle formation and absorption, thus resulting in a significant decrease of cholesterol level. Such a single widely distributed function of gut microbiota could not only significantly influence lipid metabolism but also weight gain and cholesterol levels in the host (70, 124, 125). As mentioned in Joyce et al. (124), high-level expression of cloned BSH enzymes in the GIT of conventionally raised mice resulted in a significant decrease in the host's weight gain, plasma cholesterol, and liver triglycerides, demonstrating the overall impact of BSH activity on host physiology. In line with this data, a combination of probiotic strains, VSL#3 (*Lactobacilli*, *Bifidobacteria*, and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*), was also found to improve lipid profiles in mice (126). This commercially available mixture of bacteria promotes BA deconjugation and fecal excretion, and increases hepatic BA synthesis via downregulation of the FXR/FGF15 axis (126) (Table 1). An extra piece of the puzzle in this captivating cross-talk was also revealed when Li et al. (30) reported that pharmacologically reducing the genus of *Lactobacillus* within the gut was linked to a decrease of the BSH activity, allowing the reduction of obesity induced by high-fat diet in mice. Such an effect was proposed to be mediated by the accumulation of intestinal tauro- β -muricholic acid that has been evidenced as a natural FXR antagonist (30). Recently, the colonization of gnotobiotic mice with *Bacteroides thetaiotaomicron* and its corresponding mutant for BSH activity demonstrated an alteration of BA metabolism, including higher cecal T β MCA



levels and lower liver and plasma lipid levels (127). At a transcriptional level, the observed modifications in the BA pool were reported to modulate the expression of genes involved in both lipid uptake and glucose metabolism, as well as those related to circadian rhythm and immune response (127). Using a double-blinded placebo-controlled randomized study involving 114 subjects with high cholesterol levels, the same author reported a decrease in total cholesterol and LDL-C level by nearly 9% and 5%, respectively, after consumption of yogurt containing BSH-

active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 (128, 129, 130) (Table 1). It is of interest that this strain is the first commercial cholesterol-busting probiotic ready for the US food, beverage, and supplement markets.

Not surprisingly, several reports are nowadays devoted to screening potential probiotic bacteria for BSH activity as potential biotherapeutics for metabolic diseases. However, these studies focusing on the influence of a single factor for strain selection (deconjugation in this case) are insufficient to justify a cholesterol-lowering effect of these strains.

Lactic bacteria as a hypocholesterolemic agent

Cholesterol entrapment has been reported for numerous strains and was suggested to result in decreased availability of cholesterol for absorption, thus leading to reduced serum cholesterol. In fact, consumption of *Bifidobacterium bifidum*, which was shown to assimilate cholesterol *in vitro*, reduced serum cholesterol in hypercholesterolemic human subjects (60) (Table 1). *Lactococcus lactis* KF147 and *Lactobacillus plantarum* Lp81 were also reported to reduce cholesterol level by 12% (131). But, seeing that both bacteria exhibit BSH activity, it was difficult to attribute this effect to bacterial entrapment of cholesterol. Unfortunately, most of the *in vivo* trials done so far are based on *in vitro* trials and focus only on verifying the hypocholesterolemic effects shown *in vitro*, rather than the mechanisms involved. Interestingly, it was reported that inhibition of NPC1L1 by ezetimibe using GF and specific pathogen-free mice allows a decrease of intestinal cholesterol absorption and a decrease of fecal cholesterol excretion in GF mice correlated with a reduction of blood and hepatic cholesterol levels. Therefore, targeting the gut microbiota has been proposed as a promising strategy to lower cholesterolemia, probably in combination with other

hypocholesterolemic drugs (132). Table 1 summarizes the main in vivo trials with the mechanism proposed for each hypocholesterolemic effect.

CONCLUSIONS AND FUTURE PROSPECTS

In conclusion, current evidence has given some credence to the impact of gut microbiota on cholesterol metabolism and its contributory role in the development of metabolic diseases. Actually, microbiome profiling and fecal transplantation have both proved the key role of gut microbiota in cholesterol management, which may be a risk factor for CVDs once dysregulated. The analysis of these bacterial actions on cholesterol has allowed the identification of microbial pathways of cholesterol metabolism. Still, this field of research remains poorly studied, as many pathways still need to be unleashed and the involved enzymes identified. The determination of the molecular basis of these mechanisms of action will promote the use of intestinal bacteria as a powerful cholesterol-lowering agent. Such an approach can be combined with the existing attractive strategies, including phytosterols, to increase their efficiencies. Accumulating data from populations all over the world will certainly promote the opportunity to investigate the role of a functional microbiome on the host's well-being, which constitutes a challenge to develop specific hypocholesterolemic therapies.

Acknowledgments

The authors are grateful to A. Gargouri and R. Gargouri for allowing this collaboration.

REFERENCES

1. Nishida, A., R. Inoue, O. Inatomi, S. Bamba, Y. Naito, and A. Andoh. 2018. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin. J. Gastroenterol.* 11: 1–10.
2. Cani, P. D., R. Bibiloni, C. Knauf, A. Waget, A. M. Neyrinck, N. M. Delzenne, and R. Burcelin. 2008. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes.* 57: 1470–1481.
3. Bäckhed, F., H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich, and J. I. Gordon. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 15718–15723.



4. Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis, and J. I. Gordon. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity of energy harvest. *Nature*. 444: 1027–1031.
5. Qin, J., Y. Li, Z. Cai, S. Li, J. Zhu, F. Zhang, S. Liang, W. Zhang, Y. Guan, D. Shen, et al. 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 490: 55–60.
6. Qin, N., F. Yang, A. Li, E. Prifti, Y. Chen, L. Shao, J. Guo, E. Le Chatelier, J. Yao, L. Wu, et al. 2014. Alteration of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature*. 513: 59–64.
7. Li, D. Y., and W. H. W. Tang. 2017. Gut microbiota and atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 19: 39.
8. Chistiakov, D. A., Y. V. Bobryshev, E. Kozarov, I. A. Sobenin, and A. N. Orekhov. 2015. Role of gut microbiota in the modulation of atherosclerosis-associated immune response. *Front. Microbiol.* 6: 671.
9. Jonsson, A. L., and F. Bäckhed. 2017. Role of gut microbiota in atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* 14: 79–87.
10. Tremaroli, V., and F. Bäckhed. 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 489: 242–249.
11. Hoffmann, C., S. Dollive, S. Grunberg, J. Chen, H. Li, G. D. Wu, J. D. Lewis, and F. D. Bushman. 2013. Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS One*. 8: e66019.
12. Wahlström, A., S. Sayin, H. Marschall, and F. Bäckhed. 2016. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. *Cell Metab.* 24: 41–50.
13. Round, J. L., and S. K. Mazmanian. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 313–323.
14. Postler, T. S., and S. Ghosh. 2017. Understanding the holobiont: how microbial metabolites affect human health and shape the immune system. *Cell Metab.* 26: 110–130.
15. Delzenne, N. M., and L. B. Bindels. 2018. Gut microbiota in 2017: contribution of gut microbiota-host cooperation to drug efficacy. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15: 69–70.
16. Tang, W. H., T. Kitai, and S. L. Hazen. 2017. Gut microbiota in cardiovascular health and disease. *Circ. Res.* 120: 1183–1196.



17. Jie, Z., H. Xia, S-L. Zhong, Q. Feng, S. Li, S. Liang, H. Zhong, Z. Liu, Y. Gao, H. Zhao, et al. 2017. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat. Commun.* 8: 845.
18. Gérard, P. 2013. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota. *Pathogens*. 3: 14–24.
19. Liscum, L., and K. W. Underwood. 1995. Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J. Biol. Chem.* 270: 15443–15446.
20. Simons, K., and E. Ikonene. 2000. How cells handle cholesterol. *Science*. 290: 1721–1726.
21. Sheng, R., Y. Chen, H. Yung Gee, E. Stec, H. R. Melowic, N. R. Blatner, M. P. Tun, Y. Kim, M. Kallberg, T. K. Fujiwara, et al. 2012. Cholesterol modulates cell signaling and protein networking by specifically interacting with PDZ domain-containing scaffold proteins. *Nat. Commun.* 3: 1249.
22. Orth, M., and S. Bellosta. 2012. Cholesterol: its regulation and role in central nervous system disorders. *Cholesterol*. 2012: 292598.
23. Russell, D. W. 2009. Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J. Lipid Res.* 50: S120–S125.
24. Arnold, D. R., and P. O. Kwiterovich. 2003. Cholesterol: absorption, function, and metabolism. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Second edition. 1226–1237.
25. Cohen, D. E. 2008. Balancing cholesterol synthesis and absorption in the gastrointestinal tract. *J. Clin. Lipidol.* 2: S1–S3.
26. Fielding, C. J., and P. E. Fielding. 1995. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* 36: 211–228.
27. Oram, J. F., and J. W. Heinecke. 2005. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol. Rev.* 85: 1343–1372.
28. Saito, H., S. Lund-Katz, and M. C. Phillips. 2004. Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins. *Prog. Lipid Res.* 43: 350–380.
29. Lund-Katz, S., and M. C. Phillips. 2010. High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport. *Subcell. Biochem.* 51: 183–227.



30. Li, F., C. Jiang, K. W. Krausz, Y. Li, I. Albert, H. Hao, K. M. Fabre, J. B. Mitchell, A. D. Patterson, and F. J. Gonzalez. 2013. Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nat. Commun.* 4: 2384.
31. Kuipers, F., V. W. Bloks, and A. K. Groen. 2014. Beyond intestinal soap-bile acids in metabolic control. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10: 488–498.
32. Staley, C., A. R. Weingarden, A. Khoruts, and M. J. Sadowsky. 2017. Interaction of gut microbiota with bile acid metabolism and its influence on disease states. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101: 47–64.
33. Long, S. L., C. G. M. Gahan, and S. A. Joyce. 2017. Interactions between gut bacteria and bile in health and disease. *Mol. Aspects Med.* 56: 54–65.
34. de Aguiar Vallim, T. Q., E. J. Tarling, and P. A. Edwards. 2013. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab.* 17: 657–669.
35. Russell, D. W. 2003. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 137–174.
36. Hofmann, A. F. 1963. The function of bile salts in fat absorption. The solvent properties of dilute micellar solutions of conjugated bile salts. *Biochem. J.* 89: 57–68.
37. Stellaard, F., and D. Lütjohann. 2017. The interpretation of cholesterol balance derived synthesis data and surrogate non cholesterol plasma markers for cholesterol synthesis under lipid lowering therapies. *Cholesterol.* 2017: 5046294.
38. Schoenheimer, R. 1931. New contributions in sterol metabolism. *Science.* 74: 579–584.
39. Midtvedt, A. C., and T. Midtvedt. 1993. Conversion of cholesterol to coprostanol by the intestinal microflora during the first two years of human life. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 17: 161–168.
40. Veiga, P., C. Juste, P. Lepercq, K. Saunier, F. Beguet, and P. Gérard. 2005. Correlation between faecal microbial community structure and cholesterol-to-coprostanol conversion in the human gut. *FEMS Microbiol. Lett.* 242: 81–86.
41. Wilkins, T. D., and A. S. Hackman. 1974. Two patterns of neutral steroid conversion in the feces of normal North Americans. *Cancer Res.* 34: 2250–2254.



42. Macdonald, I. A., V. D. Bokkenheuser, J. Winter, A. M. Mc, and E. H. Lerner. 1983. Degradation of steroids in the human gut. *J. Lipid Res.* 24: 675–700.
43. Dam, H. 1934. The formation of coprosterol in the intestine. The action of intestinal bacteria on cholesterol. *Biochem. J.* 28: 820–825.
44. Eyssen, H. J., G. G. Parmentier, F. C. Compennolle, G. de Pauw, and M. Piessens-Denef. 1973. Biohydrogenation of sterols by *Eubacterium* ATCC 21,408-Nova species. *Eur. J. Biochem.* 36: 411–421.
45. Freier, T. A., D. C. Beit, L. Li, and P. A. Hartman. 1994. Characterization of *Eubacterium coprostanoligenes* sp. nov., a cholesterol-reducing anaerobe. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 137–142.
46. Gérard, P., P. Lepercq, M. Leclerc, F. Gavini, P. Raibaud, and C. Juste. 2007. *Bacteroides* sp. strain D8, the first cholesterolreducing bacterium isolated from human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5742–5749.
47. Crowther, J. S., B. S. Drasar, P. Goddard, M. J. Hill, and K. Johnson. 1973. The effect of a chemically defined diet on the faecal steroid concentration. *Gut.* 14: 790–793.
48. Lye, H. S., G. Rusul, and M. T. Liong. 2010. Removal of cholesterol by *Lactobacilli* via incorporation of and conversion to coprostanol. *J. Dairy Sci.* 93: 1383–1392.
49. Antharam, V. C., D. C. McEwen, T. J. Garrett, A. T. Dossey, E. C. Li, A. N. Kozlov, Z. Mesbah, and G. P. Wang. 2016. An integrated metabolomic and microbiome analysis identified specific gut microbiota associated with fecal cholesterol and coprostanol in *Clostridium difficile* infection. *PLoS One.* 11: e0148824.
50. Sekimoto, H., O. Shimada, M. Mikanishi, T. Nakano, and O. Katayama. 1983. Interrelationship between serum and fecal sterols. *Jpn. J. Med.* 22: 14–20.
51. Fu, J., M. J. Bonder, M. C. Cenit, E. F. Tigchelaar, A. Maatman, J. A. Dekens, E. Brandsma, J. Marczyńska, F. Imhann, R. K. Weersma, et al. 2015. The gut microbiome contributes to a substantial proportion of the variation in blood lipids. *Circ. Res.* 117: 817–824.
52. Bhattacharyya, A. K. 1986. Differences in uptake and esterification of saturated analogues of cholesterol by rat small intestine. *Am. J. Physiol.* 251: G495–500.
53. Beitz, D. C., J. W. Young, L. Li, and K. K. Buhman, inventors. Iowa State University Research Foundation, Inc., assignee. Oral administration of coprostanol producing microorganisms to

humans to decrease plasma cholesterol concentration. United States patent US 5,972,685. October 26, 1999.

54. Tang, W., Y. Ma, L. Jia, Y. A. Ioannou, J. P. Davies, and L. Yu. 2008. Niemann-Pick C1-like 1 is required for an LXR agonist to raise plasma HDL cholesterol in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28: 448–454.

55. Zhong, C. Y., W. W. Sun, Y. Ma, H. Wei, B. H. Zeng, Q. Zhang, Y. Chen, L. Yu, and Z. Y. Song. 2015. Microbiota prevents cholesterol loss from the body by regulating host gene expression in mice. *Sci. Rep.* 5: 10512.

56. Razin, S. 1974. Correlation of cholesterol to phospholipid content in membranes of growing mycoplasmas. *FEBS Lett.* 47: 81–85.

57. Razin, S. 1975. Cholesterol incorporation into bacterial membranes. *J. Bacteriol.* 124: 570–572.

58. Gilliland, S. E., C. R. Nelson, and C. Maxwell. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 377–381.

59. Nielson, J. W., and S. E. Gilliland. 1985. Variations in cholesterol assimilation by individual strains of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* from human intestines. *J. Dairy Sci.* 68 (Suppl. 1): 83.

60. Rasic, J. L., I. F. Vujicic, M. Skringer, and M. Vulic. 1992. Assimilation of cholesterol by some culture of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Biotechnol. Lett.* 14: 39–44.

61. Walker, D. K., and S. E. Gilliland. 1993. Relationship among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 76: 956–961.

62. Liong, M. T., and N. T. Shah. 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *J. Dairy Sci.* 88: 55–66.

63. Tahri, K., J. P. Grill, and F. Schneider. 1996. Bifidobacteria strain behavior toward cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilation. *Curr. Microbiol.* 33: 187–193.

64. Noh, D. O., S. H. Kim, and S. E. Gilliland. 1997. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J. Dairy Sci.* 80: 3107–3113.



65. Kimoto, H., S. Ohmomo, and T. Okamoto. 2002. Cholesterol removal from media by lactococci. *J. Dairy Sci.* 85: 3182–3188.
66. Kimoto-Nira, H., K. Mizumachi, M. Nomura, M. Kobayashi, Y. Fujita, T. Okamoto, I. Suzuki, N. M. Tsuji, J. I. Kurisaki, and S. Ohmomo. 2007. *Lactococcus* sp. as potential probiotic lactic acid bacteria. *Jpn. Agric. Res. Q.* 41: 181–189.
67. Lye, H. S., G. Rusul, and M. T. Liong. 2010. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. *Int. Dairy J.* 20: 169–175.
68. Hofmann, A. F. 1999. Bile acids: the good, the bad, and the ugly. *News Physiol. Sci.* 14: 24–29.
69. Ridlon, J. M., D-J. Kang, and P. B. Hylemon. 2006. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* 47: 241–259.
70. Begley, M., G. M. Gahan, and C. H. Hill. 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 625–651.
71. Ridlon, J. M., D. J. Kang, P. B. Hylemon, and J. S. Bajaj. 2014. Bile acids and the gut microbiome. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 30: 332–338.
72. Tanaka, H., K. Doesburg, T. Iwasaki, I. Mierau. 1999. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *J. Dairy Sci.* 82: 2530–2535.
73. Tanaka, H., H. Hashiba, J. Kok, and I. Mierau. 2000. Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*-biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2502–2512.
74. De Smet, I., L. Van Hoorde, M. Vande Woestyne, H. Christiaens, and W. Verstraete. 1995. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 292–301.
75. Lefebvre, P., B. Cariou, F. Lien, F. Kuipers, and B. Staels. 2009. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol. Rev.* 89: 147–191.
76. Cai, J. S., and J. H. Chen. 2014. The mechanism of enterohepatic circulation in the formation of gallstone disease. *J. Membr. Biol.* 247: 1067–1082.
77. Hylemon, P. B., and J. A. Sherrod. 1975. Multiple forms of 7- α -hydroxysteroid dehydrogenase in selected strains of *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* 122: 418–424.



78. MacDonald, I. A., J. F. Jellett, D. E. Mahony, and L. V. Holdeman. 1979a. Bile salt 3 alpha- and 12 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases from *Eubacterium lentum* and related organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 992–1000.
79. Macdonald, I. A., J. F. Jellett, and D. E. Mahony. 1979b. 12 Alphahydroxysteroid dehydrogenase from *Clostridium* group P strain C48- 50 ATCC No. 29733: partial purification and characterization. *J. Lipid Res.* 20: 234–239.
80. Dickinson, A. B., B. E. Gustafsson, and A. Norman. 1971. Determination of bile acid conversion potencies of intestinal bacteria by screening in vitro and subsequent establishment in germfree rats. *Acta Pathol. Microbiol. Scand B Microbiol. Immunol.* 79: 691–698.
81. Aries, V., and M. J. Hill. 1970. Degradation of steroids by intestinal bacteria. II. Enzymes catalysing the oxidoreduction of the 3 alpha-, 7 alpha- and 12 alpha-hydroxyl groups in cholic acid, and the dehydroxylation of the 7-hydroxyl group. *Biochim. Biophys. Acta.* 202: 535–543.
82. Ferrari, A., N. Pacini, and E. Canzi. 1980. A note on bile acid transformations by strains of *Bifidobacterium*. *J. Appl. Bacteriol.* 49: 193–197.
83. Hirano, S., and N. Masuda. 1981. Epimerization of the 7-hydroxy group of bile acids by the combination of two kinds of microorganisms with 7 alpha- and 7 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity, respectively. *J. Lipid Res.* 22: 1060–1068.
84. Armstrong, M. J., and M. C. Carey. 1982. The hydrophobic/hydrophilic balance of bile salts. Inverse correlation between reverse-phase high performance liquid chromatographic mobilities and micellar cholesterol-solubilizing capacities. *J. Lipid Res.* 23: 70–80.
85. Hylemon, P. B., and J. Harder. 1998. Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 475–488.
86. Kitahara, M., F. Takamine, T. Imamura, and Y. Benno. 2000. Assignment of *Eubacterium* sp. VPI 12708 and related strains with high bile acid 7alpha- dehydroxylating activity to *Clostridium scindens* and proposal of *Clostridium hylemonae* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 971–978.



87. Kitahara, M., F. Takamine, T. Imamura, and Y. Benno. 2001. *Clostridium hiranonis* sp. nov., a human intestinal bacterium with bile acid 7 α -dehydroxylating activity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 39–44.
88. Samuel, P., C. M. Holzman, E. Meilman, and I. Sekowski. 1973. Effect of neomycin and other antibiotics on serum cholesterol levels and 7-dehydroxylation of bile acids by the fecal bacterial flora in man. *Circ. Res.* 33: 393–402.
89. Fiorucci, S., and E. Distrutti. 2015. Bile acid-activated receptors, intestinal microbiota and the treatment for metabolic disorders. *Trends Mol. Med.* 21: 702–714.
90. Borriello, S. P., and R. W. Owen. 1982. The metabolism of lithocholic acid and lithocholic acid-3 β -sulfate by human fecal bacteria. *Lipids.* 17: 477–482.
91. Robben, J., G. Parmentier, and H. Eyssen. 1986. Isolation of a rat intestinal *Clostridium* strain producing 5 α - and 5 β -bile salt 3 α -sulfatase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 32–38.
92. Van Eldere, J., J. Robben, G. De Pauw, R. Merckx, and H. Eyssen. 1988. Isolation and identification of intestinal steroid-desulfating bacteria from rats and humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2112–2117.
93. Robben, J., G. Janssen, R. Merckx, and H. Eyssen. 1989. Formation of delta 2- and delta 3-chenoic acids from bile acid 3-sulfates by a human intestinal *Fusobacterium* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2954–2959.
94. Caesar, R., and F. Bäckhed. 2010. Effects of gut microbiota on obesity and atherosclerosis via modulation of inflammation and lipid metabolism. *J. Intern. Med.* 268: 320–328.
95. Gregory, J. C., J. A. Buffa, E. Org, Z. Wang, B. S. Levison, W. Zhu, M. A. Wagner, B. J. Bennett, L. Li, J. A. DiDonato, et al. 2015. Transmission of atherosclerosis susceptibility with gut microbial transplantation. *J. Biol. Chem.* 290: 5647–5660.
96. Chen, Y., F. Yang, H. Lu, B. Wang, Y. Chen, D. Lei, Y. Wang, B. Zhu, and L. Li. 2011. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology.* 54: 562–572.

97. Bajaj, J. S., D. M. Heuman, P. B. Hylemon, A. J. Sanyal, M. B. White, P. Monteith, N. A. Noble, A. B. Unser, K. Daita, A. R. Fisher, et al. 2014. Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *J. Hepatol.* 60: 940–947.
98. Kakiyama, G., W. M. Pandak, P. M. Gillevet, P. B. Hylemon, D. M. Heuman, K. Daita, H. Takei, A. Muto, H. Nittono, J. M. Ridlon, et al. 2013. Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis. *J. Hepatol.* 58: 949–955.
99. Lindskog Jonsson, A., F. F. Hållénus, R. Akrami, E. Johansson, P. Wester, C. Arnerlöv, F. Bäckhed, and G. Bergström. 2017. Bacterial profile in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*. 263: 177–183.
100. Karlsson, F. H., I. Nookaew, V. Tremaroli, D. Petranovic, F. Backhed, and J. Nielsen. 2012. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat. Commun.* 3: 1245.
101. Wang, Z., E. Klipfell, B. J. Bennett, and R. Koeth. 2011. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 472: 57–63.
102. Koeth, R. A., Z. Wang, B. S. Levison, J. A. Buffa, and E. Org. 2013. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat. Med.* 19: 576–585.
103. Tang, W. H., Z. Wang, B. S. Levison, R. A. Koeth, E. B. Britt, Y. Wu, and S. L. Hazen. 2013. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* 368: 1575–1584.
104. Zhu, W., J. C. Gregory, E. Org, J. A. Buffa, and N. Gupta. 2016. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk. *Cell*. 165: 111–124.
105. Cho, C. E., S. Taesuwan, O. V. Malysheva, E. Bender, N. F. Tulchinsky, J. Yan, J. L. Sutter, and M. A. Caudill. 2017. Trimethylamine-N-oxide (TMAO) response to animal source food varies among healthy young men and is influenced by their gut microbiota composition. *Mol. Nutr. Food Res.* 61: 1–12.
106. Senthong, V., X. S. Li, T. Hudec, J. Coughlin, Y. Wu, B. Levison, Z. Wang, S. L. Hazen, and W. H. Tang. 2016a. Plasma trimethylamine N-oxide, a gut microbe-generated phosphatidylcholine metabolite, is associated with atherosclerotic burden. *J. Am. Coll. Cardiol.* 67: 2620–2628.



107. Senthong, V., Z. Wang, Y. Fan, Y. Wu, S. L. Hazen, and W. H. Tang. 2016b. Trimethylamine N-oxide and mortality risk in patients with peripheral artery disease. *J. Am. Heart Assoc.* 5: e004237.
108. Randrianarisoa, E., A. Lehn-Stefan, X. Wang, M. Hoene, G. Xu, R. Lehmann, and N. Stefan. 2016. Relationship of serum trimethylamine N-oxide (TMAO) levels with early atherosclerosis in humans. *Sci. Rep.* 6: 26745.
109. Stubbs, J. R., J. A. House, A. J. Ocque, S. Zang, C. Johnson, C. Kimber, K. Schmidt, A. Gupta, J. B. Wetmore, T. D. Nolin, et al. 2016. Serum trimethylamine-N-oxide is elevated in CKD and correlates with coronary atherosclerosis burden. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27: 305–313.
110. Manor, O., N. Zubair, M. P. Conomos, X. Xu, J. E. Rohwer, C. E. Krafft, J. C. Lovejoy, and A. T. Magis. 2018. Multi-omic association study of trimethylamine N-oxide. *Cell Reports.* 24: 935–946.
111. Li, X. S., S. Obeid, R. Klingenberg, C. M. Matter, Y. Wu, L. Li, Z. Wang, H. S. Alamri, W. H. Tang, and S. L. Hazen. 2017. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide in acute coronary syndromes: A prognostic marker for incident cardiovascular events beyond traditional risk factors. *Eur. Heart J.* 38: 814–824.
112. Suzuki, T., L. M. Heaney, D. J. Jones, and L. L. Ng. 2017. Trimethylamine N-oxide and risk stratification after acute myocardial infarction. *Clin. Chem.* 63: 420–428.
113. Elssner, T., A. Preusser, U. Wagner, and H. P. Kleber. 1999. Metabolism of L(-)-carnitine by Enterobacteriaceae under aerobic conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 174: 295–301.
114. Romano, K. A., E. I. Vivas, D. Amador-Noguez, and F. E. Rey. 2015. Intestinal microbiota composition modulates choline bioavailability from diet and accumulation of the proatherogenic metabolite trimethylamine-N-oxide. *MBio.* 6: e02481.
115. Matthan, N. R., M. Pencina, J. M. LaRocque, P. F. Jacques, R. B. D'Agostino, E. J. Schaefer, and A. H. Lichtenstein. 2009. Alterations in cholesterol absorption/synthesis markers characterize Framingham offspring study participants with CHD. *J. Lipid Res.* 50: 1927–1935.
116. Rajaratnam, R. A., H. Gylling, and T. A. Miettinen. 2001. Cholesterol absorption, synthesis, and fecal output in postmenopausal women with and without coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 1650–1655.



117. Martínez, I., G. Wallace, C. Zhang, R. Legge, A. K. Benson, T. P. Carr, E. N. Moriyama, and J. Walter. 2009. Diet-induced metabolic improvements in a hamster model of hypercholesterolemia are strongly linked to alterations of the gut microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 4175–4184.
118. Craciun, S., and E. P. Balskus. 2012. Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glycyl radical enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109: 21307–21312.
119. Craciun, S., J. A. Marks, and E. P. Balskus. 2014. Characterization of choline trimethylamine-lyase expands the chemistry of glycyl radical enzymes. *ACS Chem. Biol.* 9: 1408–1413.
120. Koeth, R. A., B. S. Levison, M. K. Culley, J. A. Buffa, Z. Wang, J. C. Gregory, E. Org, Y. Wu, L. Li, J. D. Smith, et al. 2014. -Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO. *Cell Metab.* 20: 799–812.
121. Rath, S., B. Heidrich, D. H. Pieper, and M. Vital. 2017. Uncovering the trimethylamine-producing bacteria of the human gut microbiota. *Microbiome.* 5: 54.
122. Martínez-del Campo, A., S. Bodea, H. A. Hamer, J. A. Marks, H. J. Haiser, P. J. Turnbaugh, and E. P. Balskus. 2015. Characterization and detection of a widely distributed gene cluster that predicts anaerobic choline utilization by human gut bacteria. *MBio.* 6: e00042-15.
123. Falony, G., S. Vieira-Silva, and J. Raes. 2015. Microbiology meets big data: the case of gut microbiota-derived trimethylamine. *Annu. Rev. Microbiol.* 69: 305–321.
124. Joyce, S. A., J. MacSharry, P. G. Casey, M. Kinsella, E. F. Murphy, F. Shanahan, C. Hill, and C. G. Gahan. 2014. Regulation of host weight gain and lipid metabolism by bacterial bile acid modification in the gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111: 7421–7426.
125. Jones, B. V., M. Begley, C. Hill, G. C. Gahan, and J. R. Marchesi. 2008. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 13580–13585.
126. Degirolamo, C., S. Rainaldi, F. Bovenga, S. Murzilli, and A. Moschetta. 2014. Microbiota modification with probiotics induces hepatic bile acid synthesis via downregulation of the Fxr-Fgf15 axis in mice. *Cell Reports.* 7: 12–18.
127. Yao, L., S. C. Seaton, S. Ndousse-Fetter, A. A. Adhikari, N. DiBenedetto, A. I. Mina, A. S. Banks, L. Bry, and A. S. Devlin. 2018. A selective gut bacterial bile salt hydrolase alters host metabolism. *eLife.* 7: e37182.



128. Rajkumar, H., N. Mahmood, M. Kumar, S. R. Varikuti, H. R. Challa, and S. P. Myakala. 2014. Effect of probiotic (VSL#3) and omega-3 on lipid profile, insulin sensitivity, inflammatory markers, and gut colonization in overweight adults: a randomized, controlled trial. *Mediators Inflamm.* 2014: 348959.
129. Jones, M. L., C. J. Martoni, and S. Prakash. 2012. Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* 66: 1234–1241.
130. Jones, M. L., C. J. Martoni, and S. Prakash. 2012. Cholesterol lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. *Br. J. Nutr.* 107: 1505–1513.
131. Hassanein, W. A., N. M. Awany, and S. M. Ibraheim. 2013. Cholesterol reduction by *Lactococcus lactis* KF147. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7: 4338–4349.
132. Mingqian, H., and S. Bingyin. 2017. Gut microbiota as a potential target of metabolic syndrome: the role of probiotics and prebiotics. *Cell Biosci.* 7: 54.
133. Pato, U., I. S. Surono, Koesnandar, and A. Hosono. 2004. Hypocholesterolemic effect of indigenous Dadih lactic acid bacteria by deconjugation of bile salts. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 17: 1741–1745.
134. Jeun, J., S. Kim, S. Y. Cho, H. J. Jun, H. J. Park, J. G. Seo, M. J. Chung, and S. J. Lee. 2010. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. *Nutrition.* 26: 321–330.
135. Li, L., K. K. Buhman, P. A. Hartman, and D. C. Beitz. 1995. Hypocholesterolemic effect of *Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222 in rabbits. *Lett. Appl. Microbiol.* 20: 137–140.
136. Nocianitri, K. A., N. S. Antara, I. M. Sugitha, D. M. Sukrama, Y. Ramona, and I. N. Sujaya. 2017. The effect of two *Lactobacillus rhamnosus* strains on the blood lipid profile of rats fed with high fat containing diet. *Int. Food Res. J.* 24: 795–802.
137. Cavallini, D. C., M. S. Manzoni, R. Bedani, M. N. Roselino, L. S. Celiberto, R. C. Bendramini, G. de Valdez, D. S. Abdalla, R. A. Pinto, D. Rosetto, et al. 2016. Probiotic Soy Product supplemented with isoflavones improves the lipid profile of moderately hypercholesterolemic men: a randomized controlled trial. *Nutrients.* 8: 1–18.

4. Les voies métaboliques microbiennes du métabolisme du cholestérol

4.1. La voie de piégeage du cholestérol

4.1.1. Contexte

La voie de piégeage du cholestérol est le terme général qui conduit à l'élimination directe du cholestérol par le microbiote intestinal. Le cholestérol présent dans l'intestin, est fixé par les microorganismes du microbiote intestinal au niveau de leur membrane cellulaire. A l'instar des cellules eucaryotes, le cholestérol ne rentre pas dans la composition des membranes cellulaires, et par conséquent peu de micro-organismes fixent le cholestérol (**Razin and Tully, 1970 ; Razin, 1975**). Dans un environnement enrichi en cholestérol, les micro-organismes fixateurs de cholestérol utilisent plusieurs mécanismes pour interagir avec cette molécule. De nombreuses évidence scientifiques ont démontré *in vitro* une capacité à piéger le cholestérol, c'est le cas des bactéries probiotiques (**Tsai et al., 2014**). Cette prochaine section synthétise l'ensemble des connaissances scientifiques, associées à cette interaction du cholestérol par sa fixation jusqu'à son incorporation par la bactérie. Cette analyse revêt en effet une importance dans mes travaux de thèse puisque c'est l'une des trois voies du microbiome intestinal, qui a été choisie pour challenger *in vivo* la cholestérolémie.

4.1.2. Synthèse bibliographique : « Démystifier le mécanisme de piégeage du cholestérol par les bactéries du microbiome intestinal »

4.1.2.1. Introduction

De nombreuses données scientifiques ont démontré l'effet du microbiote intestinal sur la cholestérolémie de l'hôte, se concentrant essentiellement sur la dégradation directe du cholestérol, par sa conversion en coprostanol, et indirecte, à travers la voie des hydrolases des sels biliaires (**Ly et al., 2010 ; Choi et al., 2015 ; Park et al., 2018 ; Le Roy et al., 2019 ; Kenny et al., 2020**). Cependant, ils existent les bactéries présentent une autre capacité à interagir directement avec le cholestérol. Le devenir de ce cholestérol piégé dépend du processus réalisé par la bactérie. Cette

propriété regroupe un ensemble mécanismes identifiés sous le terme de « *piégeage* », « *d'assimilation* », « *d'enlèvement de cholestérol dans son milieu initial* », ou de « *co-précipitation avec les sels biliaires* » (Klaver et Van der Meer, 1993 ; Tahri *et al.*, 1996 ; Gilliland *et al.*, 1985 ; Lion et Sha, 2005). Ces nombreux mécanismes bien distincts, regroupent une seule et même fonction pour aboutir *in fine* à une interaction avec le cholestérol. Cependant, nos connaissances sur cette fonctionnalité sont souvent confuses et méconnues dans son intégralité. Etablir les multiples paramètres associés au piégeage de cholestérol par les bactéries est important car cette fonctionnalité participe à des processus biologiques, exercés au sein la cellule bactérienne, allant jusqu'au sein d'un écosystème bactérien (Tomaro-Duchesneau *et al.*, 2014 ; Albano *et al.*, 2018). De plus, le piégeage de cholestérol conditionne également la réponse physiologique de l'hôte, avec une activité qui diminue la cholestérolémie de l'hôte, localisé au niveau de l'environnement intestinal humain (Ding *et al.*, 2019). Ainsi, ces preuves scientifiques de cette synthèse renforcent notre hypothèse et notre compréhension sur cette fonctionnalité microbienne, présent au sein du microbiome intestinal chez homme.

4.1.2.2. Les bactéries piégeuses de cholestérol

La plupart de nos connaissances proviennent de micro-organismes pathogènes. Seules quelques bactéries et des mycoplasmes ont été signalées comme établissant un lien physique avec le cholestérol chez leur hôte ou dans leur environnement (Razin et Tully, 1970 ; Razin, 1975). C'est le cas d'agents pathogènes tels que *Coxiella sp.*, *Anaplasma sp.*, *Ehrlichia sp.*, *Rickettsia sp.*, *Helicobacter sp.* et *Borrelia sp.*, qui séquestrent le cholestérol des cellules de hôtes infectées (Samanta *et al.*, 2017; Huang et London, 2016). Ces microorganismes capturent le cholestérol de leur hôte, pour remodeler et renforcer leur cellule bactérienne afin d'avoir une meilleure adhésion pour envahir les cellules hôtes et faire face aux réponses immunitaires de l'hôte (Toledo et Benach, 2015 ; Allen et Martinez, 2020). Un exemple clé, celui de *Borrelia burgdorferia* qui incorpore le cholestérol de l'hôte au niveau de sa membrane pour former un radeau lipidique. Ce microdomaine membranaire bactérien enrichi en cholestérol devient critique pour la survie du micro-organisme, maintenue en renforçant l'intégrité de la membrane de *B. burgdorferia* en cholestérol (Johnson, 1977 ; Sprong *et al.*, 2001 ; La Rocca *et al.*, 2013).

D'autres évidences présentes dans la littérature soutiennent l'hypothèse que la majorité des bactéries responsables du piégeage du cholestérol sont des bactéries probiotiques (Aydas et Aslim, 2016). Ces micro-organismes probiotiques ont été beaucoup étudiés, en raison de leur potentiel effet hypocholestérolémiant, bénéfique pour la santé de l'hôte (Khare et Gaur, 2020 ; Bhat et Bajaj, 2020 ; Lim et al., 2020). Parmi ces souches probiotiques qui piègent le cholestérol, *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Enterococcus sp.* et *Streptococcus sp.* ont été identifiées (Pereira et Gibson, 2002; Lion et Sha, 2005). Ces bactéries proviennent de plusieurs environnements incluant les produits laitiers ou les aliments fermentés (par exemple, lait, yaourt), de souches référencées (par exemple, *American Type Culture Collection* (ATCC) et *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ)) et également d'un environnement intestinal (Pereira et Gibson, 2002 ; Aloglu et Oner, 2006 ; Castorena-Alba et al., 2017). D'autres genres commensaux ont été récemment évalués, appartenant au genre *Bacillus sp.*, *Bacteroides sp.*, *Alistipes sp.* (Shobharani et Halami, 2016 ; Lynch et al., 2017 ; Majeed et al., 2019). À ce jour, le piégeage de cholestérol est retrouvé chez de nombreuses bactéries issues de plusieurs niches écologiques, incluant l'écosystème intestinal.

4.1.2.3. Les mécanismes bactériens piégeant le cholestérol et leurs fonctions biologiques associées

Le devenir du cholestérol piégé par la bactérie dépend du processus géré par la bactérie. En effet, les bactéries ont accès au cholestérol fourni par l'alimentation et produit par l'hôte dans l'intestin (Iqbal et Hussain, 2009). Ainsi, auxotrophes vis-à-vis du cholestérol, les bactéries intestinales vont disposer de ce cholestérol. Contrairement à d'autres métabolismes microbiens du cholestérol (par exemple, la conversion du cholestérol en coprostanol), le piégeage du cholestérol ne va pas induire la dégradation de la molécule mais son recyclage par les microorganismes (Li, 2002). Dans la littérature, plusieurs catégories associées au mécanisme de piégeage sont décrites (Figure 11). Cet ensemble de processus est orienté vers le fait que les bactéries participent à gérer le cholestérol pour ses propres bénéfices et mais aussi au dépend de l'hôte (Kriaa et al., 2019). Ce piégeage de cholestérol est impliqué dans la pathogénicité de certaines bactéries pathogènes, mais peut aussi favoriser leur interaction symbiotique (Gilk et al., 2013 ; Dadhich et Kapoor, 2020).

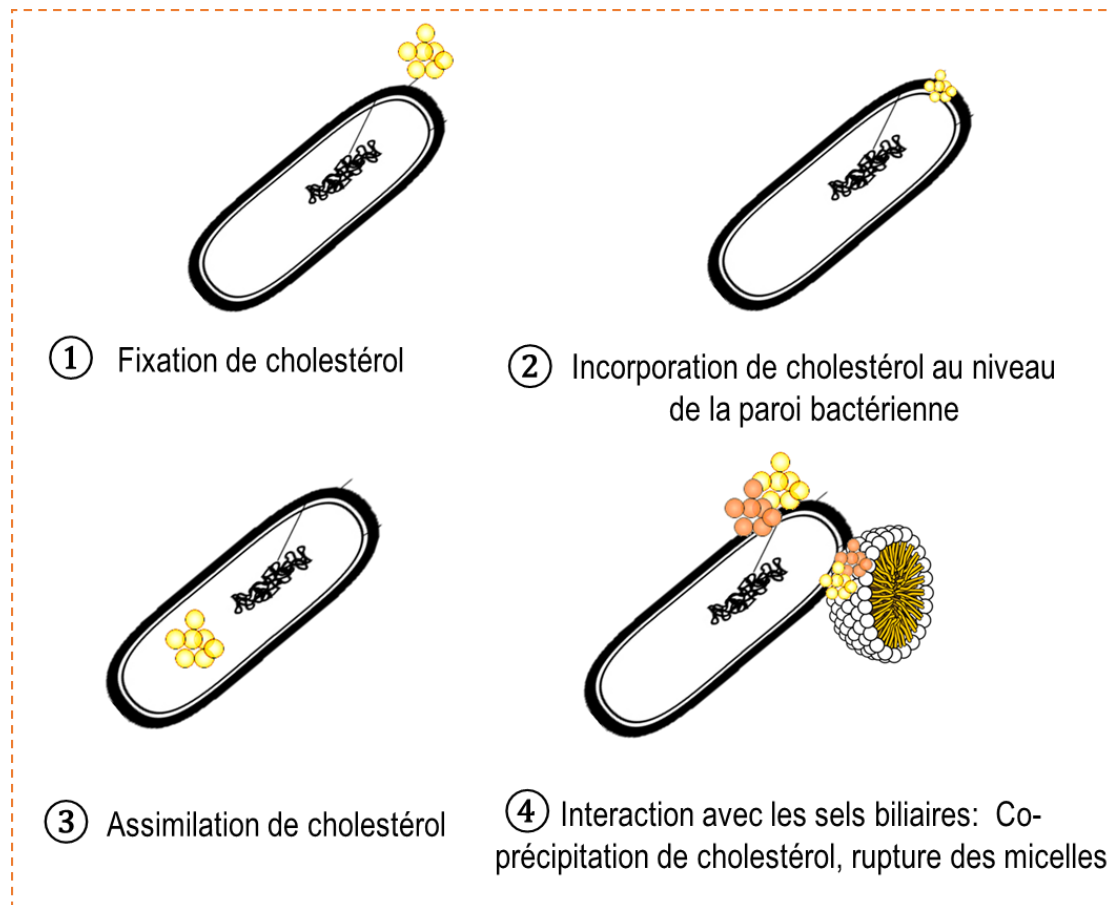


Figure 11 : Les mécanismes de piégeage de cholestérol des micro-organismes

Le mécanisme de piégeage de cholestérol empreinte par le micro-organisme va dépendre du milieu environnant et du devenir fonctionnel du cholestérol. Le premier mécanisme, 1) la fixation de cholestérol se fait par l'intermédiaire des composants situés à la surface de leur paroi. Le second processus, 2) l'incorporation de la molécule de cholestérol dans la paroi du microorganisme. 3) L'assimilation de cholestérol et 4) son interaction avec les sels biliaires semble présenter de fonctions multiples autant pour la bactérie que pour son écosystème associé.

Le mécanisme utilisé par la bactérie va dépendre également d'un ensemble des facteurs environnants physiques, qui peuvent modifier l'environnement du micro-organisme et avoir recours à ce processus pour se défendre (par exemple, les cellules immunitaires de l'hôte, la quantité de cholestérol alimentaire, les antibiotiques) (Falony et De Vuyst, 2009). Un des mécanismes du piégeage de cholestérol par les bactéries se fait à la surface de leur paroi bactérienne. Cette connexion directe du cholestérol avec les composants de la paroi cellulaire bactérienne du cholestérol a été démontré chez certaines souches de bactéries probiotiques, incluant *Lactobacillus sp.*, *Enterococcus sp.* (Yılmaz et Şimşek, 2020 ; Bhat et Bajaj, 2019). Ces études suggèrent que cette caractéristique est possible grâce à l'interaction directe du cholestérol avec les exopolysaccharides²⁷. De façon intéressante, Tok et ses collaborateurs ont démontré qu'il existe une corrélation significative entre la capacité de production de ces exopolysaccharides et de l'efficacité de piégeage de cholestérol (Tok et Aslim, 2010). Cependant, aucunes études scientifiques s'intéressent en profondeur à ce lien exopolysaccharides-cholestérol.

Le cholestérol peut également interagir avec d'autres constituants de la paroi bactérienne, au niveau de la membrane interne et externe des bactéries par l'intermédiaire des lipides membranaires (Usman et Hosono, 1999 ; Kimoto *et al.*, 2002). Des preuves expérimentales ont montré que ces bactéries sont capables d'interférer avec le cholestérol à travers leur membrane cellulaire, notamment avec la souche *L. bulgaricus* par microscopie électronique à balayage (Lye *et al.*, 2010). Par ailleurs, Zanotti *et al.* ont identifié la présence de cholestérol radiomarké au niveau de l'enveloppe cellulaire de cette bifidobactérie *L. bulgaricus*, issue de l'intestin humain (Zanotti *et al.*, 2015). De manière surprenante, on sait également que cette fonction, est présente lors des différentes phases de croissance bactérienne, y compris lors de la phase de latence et de mort cellulaire (Zeng *et al.*, 2011 ; Shehata *et al.*, 2019). Ce phénomène est spécifique de la souche (Kimoto *et al.*, 2002 ; Kimoto-Nira *et al.*, 2007). Le rôle de cette fonction a été décrit à travers des bactéries lactiques, notamment pour certaines souches de *L. casei* et *L. acidophilus*. En

²⁷ Les **exopolysaccharides** sont des polysaccharides bactériens synthétisés et sécrétés dans l'environnement externe ou synthétisés de manière extracellulaire. Il existe une grande diversité des polysaccharides bactériens catégorisé suivant leur structure chimique, leur poids moléculaire et les liaisons. Ces exopolysaccharides ont une fonction architecturale qui favorise la protection des cellules, peuvent être impliqués dans la formation de biofilms et/ou parfois permettent les interactions entre une cellule-composant.

effet, de part cette habilité à piéger le cholestérol, elles modifient leurs profils d'acides gras saturés et insaturés en présence de cholestérol (**Liong et Shah, 2005**). Cette activité fonctionnelle serait intéressante pour enrichir le profil membranaire en acides gras et ainsi, configure la structure et la propriété de leur membrane, en renforçant sa rigidité, comme il a été mentionné avec les souches de *Proteus mirabilis*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* et *L. casei* (**Razin, 1975 ; Kimoto et al., 2002 ; Lye et Liong, 2010 ; Remagni et al., 2013**). De façon intéressante, ces observations ont été également identifiées chez une espèce de *Bacteroides*, un genre prédominant du microbiote intestinal. Plus précisément, cette interaction avec le cholestérol a été reporté et participe à la formation de domaine lipidique de type raft avec des sphingolipides. Ce processus serait impliqué dans la réponse au stress de survie, ce qui pourrait jouer un rôle potentiel dans les stratégies de survie au sein de la bactérie pour maintenir le genre symbiotique *Bacteroides* dans l'intestin (**An et al., 2011**). L'ensemble de ces évidences fonctionnelles a été suggéré comme étant impliquer, comme étant un événement stratégique majeur pour renforcer la membrane cellulaire des micro-organismes en recrutant du cholestérol présent dans l'environnement, pour la survie et le maintien d'une niche de l'écosystème microbien (**Gilk et al., 2013 ; Dadhich et Kapoor, 2020**). Cette fonction est caractéristique propre, décrit notamment par Ly, qui suggère que le cholestérol piégé pourrait être une source de stockage du cholestérol formant des corpus d'inclusion, appelés vésicules de la membrane externe pour effectuer les molécules de signalisation dans l'ensemble de l'écosystème microbien (**Li, 2002 ; Schwechheimer et Kuehn, 2015**). En outre, des rapports ont montré l'intérêt des peptides antimicrobiens, un régulateur clé des interactions entre les microbes commensaux et les tissus de l'hôte (**Cheng et al., 2019**). Le cholestérol est incorporé dans la membrane des domaines de type raft afin de préserver cet équilibre dans la communauté complexe du microbiome et son interaction avec son hôte (**Brender et al., 2012**). Malgré ces avancées, cette interaction entre cholestérol-lipides membranaires microbien dans un environnement donné, doivent encore être approfondit.

Un autre mécanisme associé au piégeage de cholestérol, est défini par l'incorporation du cholestérol avec les sels biliaires. De nombreuses études ont montré que certaines souches de bactéries lactiques, incluant *Lactobacillus fermentum* F53, *KC5b*, *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697, *Enterococcus durans* DSM 20633, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecalis*, sont capables d'éliminer le cholestérol du milieu de culture pendant une croissance anaérobie en

présence d'acides biliaires (Gilliland *et al.*, 1985 ; Rašić *et al.*, 1992 ; Tahri *et al.*, 1996). Cependant, ce phénomène est fréquemment lié à la coprécipitation du cholestérol et de sels biliaires. La coprécipitation a lieu dans des conditions acides avec un pH inférieur à 5,5, alors que l'incorporation du cholestérol ne présente aucune condition préalable (Li, 2012). Bien que le pH du tractus intestinal s'étende à un pH légèrement acide à un pH neutre ($6,5 < \text{pH} < 8$), ce qui pourrait être plutôt rendre inapproprié cette réaction de coprécipitation dans l'intestin (Ridlon *et al.*, 2016). De plus, certaines évidences ont démontré que cette coprécipitation serait associée à l'activité BSH des bactéries (Klaver and Van der Meer, 1993).

Un autre mécanisme de piégeage du cholestérol, issu de la rupture de la micelle. La micelle intestinale, composée de sels biliaires, de phospholipides et de molécules de cholestérol, peut être perturbée. Dans ce contexte, un rôle pertinent dans le processus de séquestration microbienne du cholestérol sera de prendre tout au long de la capacité de solubilisation des micelles de sels biliaires-cholestérol dans l'intestin comme Enright et ses collaborateurs tend à soutenir *in vitro* (Enright *et al.*, 2017). Cependant, peu de connexions fonctionnelles existent en termes de causalité peu étudié ce mécanisme de piégeage de cholestérol. Martinez et al. ont démontré dans l'intestin de modèle animal, que la perturbation des micelles à un pH physiologique permet d'améliorer leur croissance bactérienne de *Lactobacillus reuteri*, *Clostridium histolyticum*, et *Collinsella aerofaciens* (Martinez *et al.*, 2013). Les auteurs ont réalisé des micelles de cholestérol en présence de bactéries et ont confirmé *in vivo* un effet antibactérien spécifique plus marqué grâce à l'interruption de la micelle de cholestérol par les bactéries. Avec des analyses *in vitro* supplémentaires, les chercheurs ont pu rapporter la rupture des micelles artificielles par des souches de *Lactobacillus* (Tsai et al., 2014 ; Tomaro-Duchesneau et al., 2014 ; Song et al., 2015). De plus, un rapport récent a enregistré des preuves supplémentaires que le microbiote humain interagit avec l'hôte humain par le biais d'un commendamide (un N-acyl-amide à longue chaîne), identifié dans l'ordre des Bacteroidales provenant du microbiome humain. Le commendamide est un solubilisateur de cholestérol et peut jouer un rôle important dans la colonisation précoce de l'intestin (Lynch *et al.*, 2017). Des études supplémentaires sont nécessaires pour déchiffrer ce mécanisme de cholestérol derrière le processus, surtout pour décrire la possibilité que ces phénomènes soient produits dans l'environnement actif *in vivo* de l'intestin.

4.1.2.4. Conclusion et perspectives d'avenir

Notre synthèse reporte les études scientifiques pour identifier et mieux comprendre les mécanismes associés au piégeage du cholestérol. Des recherches plus approfondies sont nécessaires pour retracer la chronologie des événements bactériens et le contexte environnant qui conditionne le mécanisme donné qui mène au piégeage du cholestérol. Le rôle de cette fonctionnalité bactérienne est également à approfondir puisqu'elles contribuent à exercer un avantage multiple pour la vie de la bactérie et dans sa niche écologique. Du point de vue de l'hôte, le piégeage du cholestérol peut potentiellement conduire à une interaction dans les processus métaboliques de l'hôte, en modulant le pool de cholestérol intestinal et la signalisation des récepteurs de l'hôte.

4.2. La voie de conversion du cholestérol en coprostanol

4.2.1. Contexte

Bien que cette voie soit prometteuse, les recherches sur la voie de conversion du cholestérol en coprostanol et ses dérivés associés par microbiome intestinal, commencent tout juste à être comprises. Ce composé microbien faiblement absorbé par l'intestin, confère une activité du microbiote intestinal hypocholestérolémiant intéressante. Bien que certaines bactéries présentent la capacité de produire du coprostanol *in vitro*, peu d'évidence scientifique justifie la présence de cette même activité coprostanoligénique *in vivo* (**Potiron, 2017**). Récemment, de nouvelles études ont confirmé que certaines bactéries commensales non cultivables contribuent à la formation de coprostanol *in vivo* chez l'homme (**Kenny et al., 2020**). Les auteurs ont suggéré que ces bactéries coprostanoligéniques pourraient influencer le niveau de cholestérol dans l'intestin et le sang et contribuer *in fine* à l'homéostasie du métabolisme du cholestérol chez l'homme. Un aperçu global de cette activité de formation de coprostanol et de ses dérivés associés sont rapportés dans cette revue « *Microbial Reduction of Cholesterol to Coprostanol : An Old Concept and New Insights* », publiée dans le journal *Catalyst*. Cette revue permet de répertorier l'ensemble des connaissances sur une des trois voies du microbiote intestinal, qui a également été sélectionnée pour challenger *in vivo* la cholestérolémie.

4.2.2. Résumé de la revue scientifique “*Microbial Reduction of Cholesterol to Coprostanol : An Old Concept and New Insights*”

Le microbiote intestinal joue un rôle clé dans le métabolisme du cholestérol, principalement par la réduction du cholestérol en coprostanol. Ce dernier stérol présente des propriétés physico-chimiques distinctes liées à son absorption limitée dans l'intestin. Peu de bactéries ont été signalées comme réduisant le cholestérol en coprostanol. Trois voies microbiennes de production du coprostanol ont été décrites sur la base de l'analyse des intermédiaires de réaction. Cependant, ces voies métaboliques et les gènes qui leur sont associés restent mal étudiés. Dans cette revue, nous faisons la lumière sur les voies métaboliques microbiennes liées à la synthèse du coprostanol.

Dans la première partie de cette revue, nous donnons un aperçu comparatif entre la molécule du cholestérol et le coprostanol. Le cholestérol est une substance lipidique qui joue un rôle clé dans de nombreux processus biochimiques. D'un point de vue de sa structure chimique, le cholestérol est principalement une molécule hydrophobe. Ses propriétés physico-chimiques confèrent une nature amphiphile et une orientation adaptée à son intégration dans les membranes cellulaires. La plupart du cholestérol circulant existe sous une forme estérifiée, ce qui représente la forme de stockage de cholestérol dans la plupart des tissus biologiques et du plasma de l'organisme. Le coprostanol partage la même structure de base que le cholestérol, mais avec une double liaison modifiée et avec un atome d'hydrogène supplémentaire. Ceci donne des propriétés différentes au coprostanol et semble être la seule exception avec une structure cyclique particulière. La faible absorption du coprostanol dans l'intestin a été associée à sa structure, ce qui affecte l'incorporation du coprostanol dans les membranes des cellules muqueuses, et *in fine* limite son absorption intestinale. De façon intéressante, cette conversion efficace du cholestérol en coprostanol a été proposée comme potentiel mécanisme pour réduire les niveaux de cholestérol sérique. L'absorption du cholestérol a lieu principalement dans la partie supérieure de la TGI, tandis que la production de coprostanol a lieu essentiellement dans le gros intestin. Le rôle biologique de ce composé reste à élucider. La seconde partie de la revue s'intéresse aux bactéries coprostanoligéniques et les voies métaboliques impliquées dans la production de ce métabolite

bactérien. En effet, le coprostanol a été détecté principalement en grandes quantités dans les matières fécales chez l'homme, a permis de révéler l'origine de ce produit issu de la conversion bactérienne dans l'intestin. Seules quelques bactéries coprostanoligènes ont été isolées du contenu du cæcum d'espèces animales et dans des fèces humaines telle que la souche D8 de *Bacteroides sp.* Cependant, de nombreux efforts restent à fournir pour caractériser les communautés microbiennes responsables de la synthèse de coprostanol au niveau de l'intestin.

Enfin, la dernière partie de cette revue décrit les mécanismes de conversion du cholestérol en coprostanol et ces trois grandes voies biochimiques. La première est une réduction directe d'une double liaison du cholestérol. La seconde est une voie indirecte, qui a été décrite par l'action de plusieurs bactéries *Eubacterium*, *E. coprostanoligenes*, et *Bacteroides sp. D8*, incubés avec du cholestérol marqué permettait la production de produits intermédiaires, le cholesténone et le coprostanone. La troisième voie consiste en l'isomérisation du cholestérol en allocholestérol, qui est ensuite réduit en coprostanol. Cependant, peu de données existent concernant cette dernière voie métabolique bactérienne. Sur la base de nos connaissances, une investigation via des aspects biochimiques et structuraux, ont été réalisées pour les cholestérol oxydases et les cholestérol réductases de plusieurs microorganismes. Cependant, l'analyse des génomes d'*Eubacterium* et de *Bacteroides sp. D8* présentait 37 % à 46 % de similitude de séquence avec un gène codant pour la cholestérol réductase d'autre bactérie identifiée *Bifidobacterium bifidum PRL2010*. Ces résultats indiquent que seules quelques études fonctionnelles ont été axées sur la réductase, ce qui explique le manque de connaissances mécanistiques concernant ces classes d'enzymes. Ainsi, les gènes et les enzymes impliqués dans la conversion du cholestérol en coprostanol sont encore largement inconnus. A cela, s'ajoute la difficulté d'isolement de bactéries coprostanoligènes, très sensibles à l'oxygène et très difficiles à cultiver. L'isolement de nouvelles souches métabolisant le cholestérol à partir du microbiote intestinal et d'autres niches écologiques sera d'un grand intérêt pour identifier les gènes impliqués dans la réduction du cholestérol en coprostanol. De nouvelles approches pourraient conduire à identifier des gènes candidats et des espèces productrices de coprostanol.

En conclusion, des efforts importants doivent être fournis pour définir de nouvelles approches et/ou de nouveaux outils pour analyser ces voies métaboliques microbiennes et les gènes qui leur sont associés. Le décryptage des caractéristiques biochimiques et structurelles des protéines codées sera intéressant pour comprendre les propriétés de cette réaction de réduction et son importance pour les bactéries.

4.2.3. Revue scientifique “Microbial Reduction of Cholesterol to Coprostanol : An Old Concept and New Insights ”



Microbial Reduction of Cholesterol to Coprostanol: An Old Concept and New Insights

by Aicha Kriaa, Mélanie Bourgin, Héra Mkaouar, Amin Jablaoui, Nizar Akermi, Souha Soussou, Emmanuelle Maguin and Moez Rhimi *

*UMR 1319 Micalis, INRA, Microbiota Interaction with Human and Animal Team (MIHA), AgroParisTech, Université Paris-Saclay, F-78350 Jouy-en-Josas, France

Author to whom correspondence should be addressed.

Catalysts **2019**, *9*(2), 167; <https://doi.org/10.3390/catal9020167>

Received: 23 January 2019 / Revised: 31 January 2019 / Accepted: 2 February 2019 / Published: 8 February 2019

Abstract

The gut microbiota plays a key role in cholesterol metabolism, mainly through the reduction of cholesterol to coprostanol. The latter sterol exhibits distinct physicochemical properties linked to its limited absorption in the gut. Few bacteria were reported to reduce cholesterol into coprostanol. Three microbial pathways of coprostanol production were described based on the analysis of reaction intermediates. However, these metabolic pathways and their associated genes remain poorly studied. In this review, we shed light on the microbial metabolic pathways related to coprostanol synthesis. Moreover, we highlight current strategies and future directions to better characterize these microbial enzymes and pathways.

Keywords: cholesterol; coprostanol; reduction reaction; bacteria; metabolic pathway

1.Introduction

With more than 31% of all global deaths, atherosclerotic cardiovascular disease is now largely recognized as a major concern for global health [1]. A key risk factor for cardiovascular disease includes imbalanced blood cholesterol levels, notably a high serum concentration of low-density lipoprotein cholesterol [2]. Maintaining cholesterol homeostasis is achieved by balancing dietary cholesterol intake through its synthesis, absorption, and excretion [3].

Current therapeutic approaches aiming at reducing plasma cholesterol levels in humans rely on (i) the inhibition of cholesterol biosynthesis, (ii) an increased elimination of cholesterol from tissues into the intestinal lumen, and (iii) the reduction of cholesterol absorption from the gastrointestinal tract (GIT) [4,5,6]. While these three approaches seem attractive, they display several limitations including a significant proportion of non-responders among patients (20–30%), and the omission of the intestinal microbiota impact on cholesterol cycle [7]. On a daily basis, around 1 g of cholesterol from diet, bile, and desquamated intestinal cells reaches the human colon. This cholesterol amount is metabolized by commensal bacteria to coprostanol [8]. Unlike cholesterol, coprostanol is poorly absorbed by the human intestine [9]. For this reason, it was suggested to have an impact on cholesterol metabolism and modulating serum cholesterol levels [8]. This takes more importance if we consider the existence of an inverse relationship between plasma cholesterol levels and the ratio of cholesterol to coprostanol conversion in the feces [10]. Indeed, cholesterol displays chemical behaviors different from coprostanol, which confer to the latter a feeble intestinal absorption [9]. Cholesterol conversion to coprostanol could therefore constitute a new strategy, allowing a better management of cholesterol homeostasis in humans without influencing host physiology [8]. Notably, some studies reported that cholesterol metabolites could be associated with procarcinogenic effects and an increased risk of colon cancer [11,12]. The reduction of cholesterol to coprostanol and the properties of this reaction remain largely unknown. This concept is still poorly understood, as few studies are available regarding cholesterol-metabolizing bacteria and their associated genes. Therefore, achieving a molecular characterization of these bacterial pathways represents a challenge in this field of research in setting out new hypocholesterolemic strategies.

In this review, we provide an overview of cholesterol and coprostanol chemical behaviors, and outline the coprostanoligenic bacteria. Moreover, we analyze the current knowledge related to the reduction of cholesterol to coprostanol, and highlight available approaches and future opportunities to better characterize these metabolic pathways.

2. Cholesterol versus Coprostanol

2.1. Chemical Behaviors

Cholesterol, a major sterol in body tissues, was first discovered in solid form in gallstones and bile [13]. It is a complex lipid substance that plays a key role in many biochemical processes [14,15,16]. From a structural point of view, cholesterol ($C_{27}H_{46}O$) is mostly a hydrophobic molecule that has a rigid, steranic core coupled to a hydrophilic hydroxyl group at position 3. Such a unique structure is composed of four, fused hydrocarbon rings: A, B, C and D (**Figure 1**). Its physicochemical properties confer an amphiphilic nature and a specific orientation (i.e., A/B ring: *trans*) adapted to its integration into cell membranes [17,18]. Most plasma cholesterol exists in an esterified form (with a fatty acid attached at C3), making the molecule even more hydrophobic [19]. Cholesterol ester is the form of storage under which cholesterol is found in most tissues and plasma [19]. As a main structural component of cell membranes, cholesterol regulates membrane fluidity and cellular signaling, and serves as a precursor of important molecules including steroid hormones (e.g., progesterone, estrogen, etc.), vitamin D, and bile acids [20].

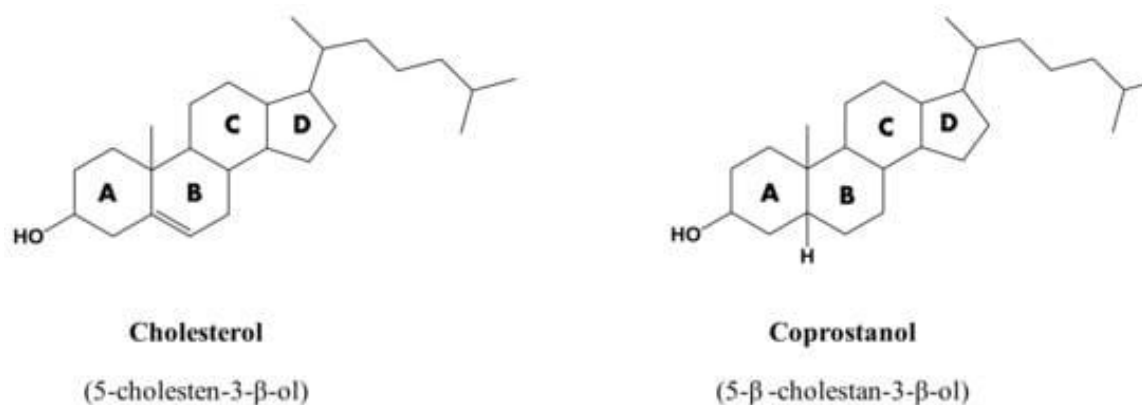


Figure 1. Chemical structures of cholesterol (Molecular weight (Mw): 386,654 g/mol) and coprostanol (Mw: 388,6756 g/mol).

Coprostanol, a saturated analog of cholesterol, was first isolated in the mid-1800s and characterized as an alcohol ($C_{27}H_{48}O$) [21]. This sterol shares the same basic structure as cholesterol, but it lacks the 5–6 double bond and it has an additional hydrogen atom at position 5. This gives different properties to the sterane nucleus, making it less rigid (**Figure 1**) [21]. At room temperature, coprostanol is a white crystalline solid with a melting point of 101 °C [22]. Like cholesterol, coprostanol is highly soluble in hexane, benzene, and chloroform. However, both sterols are insoluble in polar solutions like methanol [22]. The solubility of such sterols in alcoholic solvents increases with an increasing chain length of the alcohol–hydrocarbon moiety [23]. Accordingly, they tend to be more soluble in ethanol, but completely soluble in butan-1-ol [23]. Notably, cholesterol is insoluble in water at concentrations less than 1 µg/mL at 30 °C [24]; nevertheless, no report exists on coprostanol solubility.

Unlike most saturated sterols found in nature, which are *A/B-trans*, coprostanol seems to be the only exception with a *cis*-oriented A/B ring structure (the 3-hydroxyl group in coprostanol is in an equatorial configuration on ring A) [25]. The biological role of this compound remains to be elucidated.

2.2. Intestinal Uptake

The poor absorption of coprostanol in the intestine was associated with its very low uptake through the intestinal mucosa and its limited esterification in mucosal cells [9]. Indeed, the *cis*-A/B ring structure in coprostanol, driving the difference in the 3-hydroxyl group from the axial to equatorial position, was suggested to affect coprostanol incorporation into mucosal cell membranes, thereby limiting its intestinal uptake [26]. Hence, a high-efficiency conversion of cholesterol to coprostanol was proposed to lower serum cholesterol levels [27,28]. Cholesterol absorption takes place mostly in the upper GIT [29,30], while coprostanol production occurs essentially in the large intestine [31]. This concept remains highly controversial, as earlier studies revealed the presence of significant amounts of coprostanol in the first half of the small intestine in rats [32,33] and humans [34].

3. Microbial Conversion of Cholesterol to Coprostanol

3.1. Coprostanoligenic Bacteria

Cholesterol conversion to coprostanol by intestinal bacteria was first reported in the 1930s [35]. Since coprostanol was not detected in tissues, but mainly in larger amounts in feces (more than 50% of total sterols in humans), this product was proposed to derive from bacterial conversion in the intestine [35,36]. A key role for the gut microbiota in this biotransformation was further investigated by comparing fecal sterols of conventional and germ-free rats. In fact, contrary to the conventional group, germ-free rats excreted only unmodified cholesterol [37]. These data provide evidence for the role of gut microbiota in cholesterol metabolism, including coprostanol synthesis. Numerous reports were aimed at identifying bacteria that were able to reduce cholesterol to coprostanol [38,39,40,41,42,43]. As anaerobic strains are difficult to culture, only few coprostanoligenic bacteria were isolated from rat cecal contents [38], baboons [40], and human feces [44,45]. Surprisingly, most strains exhibited similar properties and were assigned to the genus *Eubacterium* [40,41,42,43,44], except *Bacteroides* sp. strain D8 [45]. Bacteria belonging to *Bifidobacterium*, *Clostridium*, and *Lactobacillus* were also reported to reduce cholesterol to coprostanol in vitro [46,47,48], yet they were not explored in vivo. Based on metagenomic analysis, new bacterial phylotypes from Lachnospiraceae and Ruminococcaceae families were recently associated with high coprostanol levels in healthy humans [49]. Notably, associations of these bacterial taxa with coprostanol levels require further functional studies in order to elucidate the eventual causal relationship between these microbial communities and coprostanol synthesis.

3.2. Two Patterns depending on Gut Microbiota

In humans, microbial conversion of cholesterol to coprostanol is bimodal, with a majority of high producers (almost complete cholesterol conversion) that display low cholesterolemia and a minority of low, or inefficient, producers (coprostanol content representing less than one-third of the fecal neutral sterol content) [50,51]. Such conversion patterns were found to be equally distributed with respect to sex, and were independent of age [51,52,53]. Factors affecting cholesterol conversion were defined and proposed to be closely related to the abundance of cholesterol-metabolizing bacteria [39,46]. In fact, low converters harbored less than 10^6 cholesterol-metabolizing bacteria per gram of stool, while more than 10^8 cholesterol-

metabolizing bacteria per gram of stool led to nearly complete cholesterol conversion [52]. Remarkably, Sekimoto et al. (1983) reported the existence of an inverse relationship between serum cholesterol levels and the coprostanol/cholesterol ratio in feces [9]. These findings denote that the conversion of cholesterol into coprostanol can significantly decrease the blood cholesterol level. A correlation between fecal microbial community structure and the conversion rate of cholesterol to coprostanol was also reported [46]. Interestingly, the high density of bacteria in the colon can explain the significant production levels of coprostanol seen in this part of the GIT. In fact, we previously reported the identification of the first human bacterium (*Bacteroides* sp. D8) that displayed a high coprostanol production level in human feces [45,54]. Furthermore, feeding the cholesterol-reducing bacterium *Eubacterium coprostanoligenes* significantly reduced plasma cholesterol levels in hypercholesterolemic rabbits [27]. Accordingly, greater coprostanol/cholesterol ratios were detected in the digestive contents of bacteria-fed rabbits [27]. Such effect was further ascribed to the reduction of cholesterol to coprostanol in the intestine, seeing that *E. coprostanoligenes* colonized and reduced cholesterol in the jejunum and ileum (sites for cholesterol absorption) [27]. The progress in functional knowledge related to the human gut microbiota, and the availability of new microbial culture facilities, offer a unique opportunity to isolate new coprostanoligenic bacteria belonging to different taxa.

3.3. Metabolic Pathways

The mechanism of cholesterol conversion to coprostanol was investigated and three major pathways were proposed [38,55,56,57,58]. The first one is a direct, stereospecific reduction of the 5,6-double bond of cholesterol, without an intermediate formation of a ketone at C3 (**Figure 2**) [59,60]. This statement was supported by the use of labeled cholesterol that led only to coprostanol synthesis [59,60]. The second one is an indirect pathway, which was described through the action of several bacteria on marked cholesterol (**Figure 2**). In fact, it was reported that cecal rat contents (*Eubacterium* strain, *E. coprostanoligenes*, and *Bacteroides* sp. D8) incubated with labeled cholesterol allowed for the production of cholestenone and coprostanone intermediates, demonstrating that this microbial pathway involved at least three steps [45,61,62]. The third pathway consisted of the isomerization of cholesterol to allocholesterol, which can be reduced to

coprostanol by *Eubacterium* ATCC21, 408, and 403 species [38,57,58]. However, few data exist regarding this last bacterial metabolic pathway.

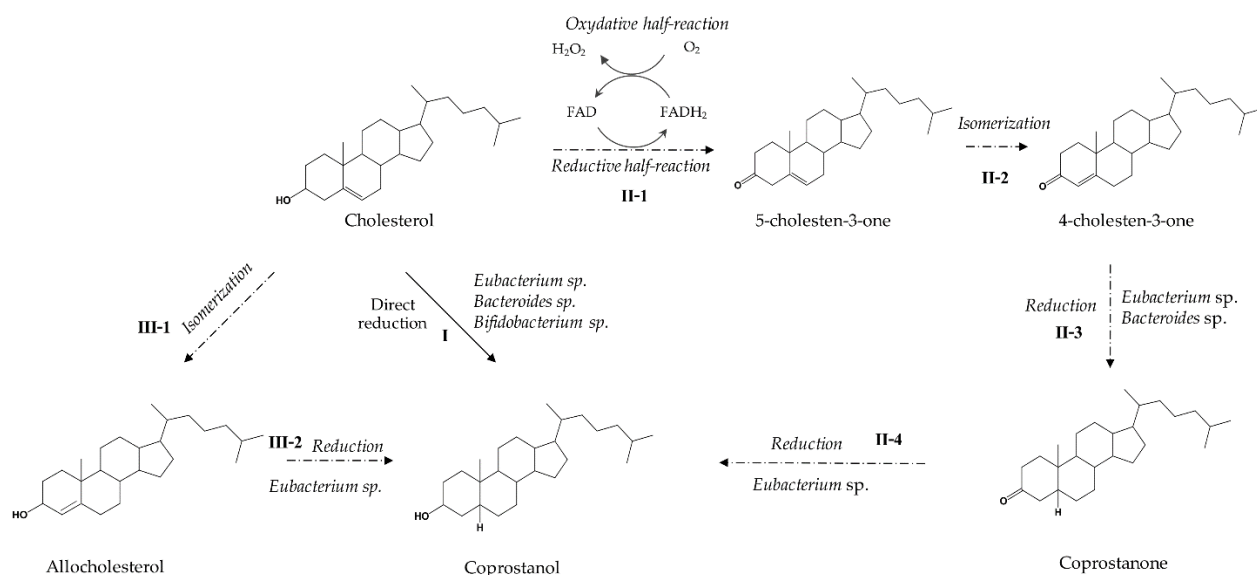


Figure 2. Metabolic pathways for cholesterol conversion to coprostanol. I: direct pathway; II: indirect pathway; II-1: Oxidation of the 3-β-hydroxyl group moiety catalyzed by cholesterol oxidase; II-2: Isomerization of Δ5 double bond to Δ4 by cholesterol oxidase; II-3: Reduction of the Δ4 double bond by 3-oxo-Δ4-steroid 5β-reductase; II-4: Reduction leading to coprostanol; III-1: Isomerization of cholesterol to allocholesterol; III-2: Reduction to coprostanol.

The first two steps of the indirect pathway are catalyzed by a single enzyme, cholesterol oxidase (EC 1.1.3.6), and result in the formation of 4-cholesten-3-one with a reduction of oxygen to hydrogen peroxide (**Figure 2**). Briefly, the 3-β-hydroxyl group of the steroid A ring is first oxidized to the corresponding ketone using the FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) cofactor, which is reduced during this process (reductive first-reaction). Since the 5-cholesten-3-one intermediate is not stable and susceptible to radical oxygenation, the Δ5 double bond in the oxidized steroid ring is then isomerized to Δ4 to form 4-cholesten-3-one, the final steroid product.

During the oxidative half-reaction, the FAD is finally re-oxidized by dioxygen to form hydrogen peroxide (**Figure 2**) [63,64]. To efficiently catalyze both reactions (oxidation and

isomerization), distinct and essential features are required for cholesterol oxidase. As a starting point, the substrate (cholesterol) must be properly oriented to the cofactor to allow for hydride transfer from the steroid C3 site to the N5 site of the cofactor [64]. Then, during the dehydrogenation step a base is needed to: (i) deprotonate the steroid C3-OH, and (ii) transfer protons during the isomerization reaction [64].

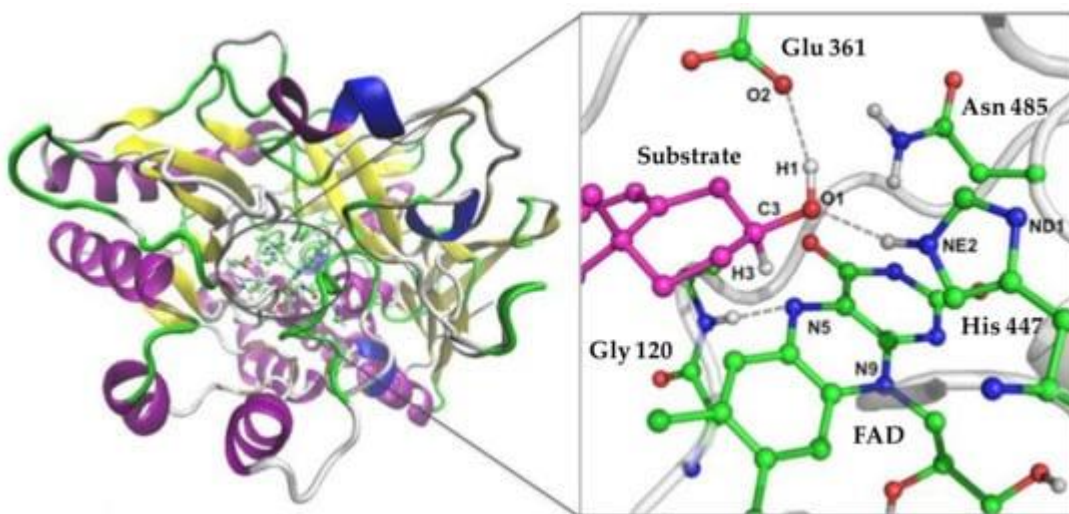


Figure 3. Structure of the cholesterol oxidase enzyme (pdb ID: 4U2T) with a close-up view of the active site showing the key catalytic residues. The substrate is shown in magenta and the dashed lines indicate the H-bond interactions. Atomic color designation: H, white; C, green; O, red; and N, blue (Adapted from Yu et al., 2017 [72]).

Biochemical and structural studies were performed for cholesterol oxidases of several microorganisms, mostly deriving from soil [65,66,67,68,69]. Structural studies revealed the existence of two forms of cholesterol oxidases: one with the FAD linked covalently to the enzyme, and another with the FAD non-covalently bound [64]. Despite topological differences in these two forms, both enzymes exhibit a large buried hydrophobic pocket, able to accommodate the steroid substrate (Figure 3). In both forms, the binding site for cholesterol is sealed off by a number of amphipathic loops to prevent potential aggregation. Once opened, these loops allow the sterol to exit from the membrane so that the 8-carbon isoprenyl tail of cholesterol can pack and bind to the protein [64]. Following substrate binding, hydrophobic interactions between cholesterol and hydrophobic residues minimize energy loss. Two active-site residues, Histidine and Glutamate,

were shown as important to catalyze the oxidation and isomerization reactions (Figure 3). The Histidine residue binds to the C3-OH of the steroid, allowing for proper positioning of cholesterol relative to the FAD cofactor. Glutamate acts as a base during the isomerization reaction [70,71]. The third step in the conversion of 4-cholesten-3-one to coprostanone includes a reduction of the Δ^4 double bond into 3-oxo- Δ^4 -steroid by microbial 3-oxo- Δ^4 -steroid 5 β -reductase (EC 1.3.1.3). Purification and activity monitoring of this reductase was performed initially in cecal contents from rats [68]. This process was found to involve a partial transfer of hydrogen from the 4 β -position of NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide) to the 5 β -position of the steroid [73].

Based on transcriptomic studies using *Bifidobacterium bifidum* PRL2010, Zanotti et al. (2015) reported the up-regulation of three genes encoding for a putative cholesterol reductase in the presence of cholesterol [74]. The *in silico* study of these genes demonstrate that they display significant similarities with human cholesterol reductase (34% similar), thus, highlighting their potential involvement in the conversion of cholesterol to coprostanol [74]. A comparative study showed that all *Bifidobacterium* genomes contained genes 26% to 100% similar to *Bifidobacterium bifidum* reductase PRL2010. [74]. Recently, we analyzed the *Eubacterium* genomes, and no significant similarities were found with reductase genes [75]. The same study demonstrated that the *Bacteroides* sp. D8 genome showed 37% to 46% similarity with a cholesterol reductase-encoding gene from *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 [75]. Overall, these results indicate that only few functional studies were focused on reductase, explaining the lack of mechanistic knowledge concerning this class of enzyme.

4. Towards a Better Understanding of the Coprostanol Production Pathway

Although cholesterol metabolism by gut microbiota has been known for almost a century, the genes and enzymes involved in the conversion of cholesterol to coprostanol are still largely unknown. Only a few coprostanoligenic bacteria have been isolated so far, and very few cholesterol-metabolizing strains are available [42,45]. Such strains are highly oxygen-sensitive, very difficult to grow, and seem to be non-dominant species within the human gut microbiota of high converters. Isolation of new cholesterol-metabolizing strains from the gut microbiota, and other ecological niches, will be of great interest to identify the genes involved in the reduction of

cholesterol to coprostanol. Many approaches aiming at identifying bacterial functions are available, including activity-based screening and phenotypic assays [48]. With the availability of sequenced bacterial genomes and the diversity of coprostanol producing bacteria, comparative genomic approaches may also enable the identification of genes shared among coprostanoligenic microbial species [74]. The analysis of up-regulated genes in the presence of cholesterol using omic approaches can lead to the identification of candidate genes. Furthermore, functional metagenomics is a powerful way to characterize coprostanoligenic pathways from uncultured and metagenomic species. High throughput coprostanol analysis, coupled with targeted mutagenesis and genomic/metagenomic libraries, may provide additional mechanistic insights [76]. An in-depth, functional profiling of metagenomic data combined with biochemical insights may also help to achieve this goal.

5. Conclusions

Several reports stressed the key role of gut microbiota in cholesterol metabolism, essentially through the conversion of cholesterol to coprostanol. Microbial metabolic pathways remain poorly understood, as well as their relevance and distribution in the human gut microbiome. Significant efforts have been made to isolate new cholesterol-metabolizing bacteria and analyze their genomes. Unfortunately, these strategies did not allow the identification of genes responsible for coprostanol synthesis. Therefore, a critical need exists to set out new approaches and/or tools to analyze these microbial metabolic pathways and their associated genes. Deciphering the biochemical and structural features of the encoded proteins will be of interest to understand the properties of this reduction reaction and its importance for bacteria.

Author Contributions

A.K., M.B., H.M., A.J., N.A., S.S., E.M. and M.R. conceived the scientific ideas and designed the work; A.K., H.M., S.S., M.B. and M.R. performed the literature research and provided the first draft; A.K., A.J., N.A. and M.R. generated the figures; A.K., M.B., H.M., A.J., N.A., S.S., E.M. and M.R. discussed the work and edited the manuscript; E.M. and M.R. supervised the project. All authors reviewed the manuscript and provided critical feedbacks.

Funding

This work received a funding from the Microbiology and the Food Chain division (MICA) of the INRA institute through the metaprogramme MEM—Meta-omics and microbial ecosystems. AK, HM, NA, SS and AJ were supported by the project CMCU-PHC Utique (n°14G0816)-Campus France (n°30666QM).

Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to S. Bolotine for his helpful discussion concerning the analysis of genomic sequences of coprostanoligenic bacteria.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Benjamin, E.J.; Virani, S.S.; Callaway, C.W.; Chamberlain, A.M.; Chang, A.R.; Rosamond, W.D.; Sampson, K.A.; Satou, G.M.; Shah, S.H.; Spartano, N.L.; et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation* **2018**, *137*, e67–e492.
2. Krobot, K.J.; Yin, D.D.; Alemao, E.; Steinhagen-Thiessen, E. Realworld effectiveness of lipid-lowering therapy in male and female outpatients with CHD: Relation to pre-treatment LDL-cholesterol, pre-treatment CHD risk and other factors. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **2005**, *1*, 37–450.
3. Groen, A.K.; Bloks, V.W.; Verkade, H.; Kuipers, F. Cross-talk between liver and intestine in control of cholesterol and energy homeostasis. *Mol. Aspects Med.* **2014**, *37*, 77–88.
4. Lee, S.D.; Gershkovich, P.; Darlington, J.W.; Wasan, K.M. Inhibition of cholesterol absorption: Targeting the intestine. *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 3235–3250.
5. Chugh, A.; Ray, A.; Gupta, J.B. Squalene epoxidase as hypocholesterolemic drug target revisited. *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42*, 37–50.
6. Goldstein, J.L.; Brown, M.S. A century of cholesterol and coronaries: From plaques to genes to statins. *Cell* **2015**, *161*, 161–172.
7. Hou, R.; Goldberg, A.C. Lowering low-density lipoprotein cholesterol: Statins, ezetimibe, bile acid sequestrants, and combinations: Comparative efficacy and safety. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **2009**, *38*, 79–97.

8. Gérard, P. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota. *Pathogens* **2014**, 3, 14–24.
9. Bhattacharyya, A.K. Differences in uptake and esterification of saturated analogues of cholesterol by rat small intestine. *Am. J. Physiol.* **1986**, 251, 495–500
10. Sekimoto, H.; Shimada, O.; Makanishi, M.; Nakano, T.; Katayama, O. Interrelationship between serum and fecal sterols. *Jpn. J. Med.* **1983**, 22, 14–20.
11. Reddy, B.S.; Martin, C.W.; Wynder, E.L. Fecal bile acids and cholesterol metabolites of patients with ulcerative colitis, a high-risk group for development of colon cancer. *Cancer Res.* **1977**, 37, 1697–1701
12. Nomura, A.M.; Wilkins, T.D.; Kamiyama, S.; Heilbrun, L.K.; Shimada, A.; Stemmermann, G.N.; Mower, H.F. Fecal neutral steroids in two Japanese populations with different colon cancer risks. *Cancer Res.* **1983**, 43, 1910–1913.
13. Dam, H. Historical introduction to cholesterol. In *Chemistry, Biochemistry and Pathology*; Cooked, R.P., Ed.; Academic Press: New York, NY, USA, 1958; pp. 1–14.
14. Liscum, L.; Underwood, K.W. Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 15443–15446.
15. Simons, K.; Ikonene, E. How cells handle cholesterol. *Science* **2000**, 290, 1721–1725.
16. Sheng, R.; Chen, Y.; Yung Gee, H.; Stec, E.; Melowic, H.R.; Blatner, N.R.; Tun, M.P.; Kim, Y.; Källberg, M.; Fujiwara, T.K.; et al. Cholesterol modulates cell signaling and protein networking by specifically interacting with PDZ domain-containing scaffold proteins. *Nat. Commun.* **2012**, 3, 1249
17. Ohvo-Rekilä, H.; Ramstedt, B.; Leppimäki, P.; Slotte, J.P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.* **2002**, 41, 66–97.
18. Róg, T.; Pasenkiewicz-Gierula, M.; Vattulainen, I.; Karttunen, M. Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, 1788, 97–121.
19. Do, T.Q.; Moshkani, S.; Castillo, P.; Anunta, S.; Pogosyan, A.; Cheung, A.; Marbois, B.; Faull, K.F.; Ernst, W.; Chiang, S.M.; et al. Lipids including cholesteryl linoleate and cholesteryl arachidonate contribute to the inherent antibacterial activity of human nasal fluid. *J. Immunol.* **2008**, 181, 4177–4187.

20. Tiangang, L.; Chiang, Y.L. Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs. *PPAR Res.* **2009**, 2009, 501739.
21. Walker, R.W.; Wun, C.; Litsky, W. Coprostanol as indicator of faecal pollution. *Crit. Rev. Env. Control* **1982**, 12, 91–112.
22. Singley, J.E.; Kirchmer, C.J.; Miura, R. *Analysis of Coprostanol, an Indicator of Fecal Contamination*; Environmental Protection Agency, Office of Research and Development: Washington, DC, USA, 1974; pp. 4–8.
23. Christie, W.W. *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*, 2nd ed.; Pergamon Press: Oxford, UK, 1982.
24. Saad, H.Y.; Higuchi, W.I. Water solubility of cholesterol. *J. Pharm. Sci.* **1965**, 54, 1205–1206.
25. Kanazawa, A.; Teshima, S.I. The occurrence of coprostanol, an indicator of fecal pollution in seawater and sediments. *Oceanol. Acta* **1978**, 1, 39–44.
26. Freier, T.A. Isolation and Characterization of Unique Cholesterol-Reducing Anaerobes. Ph.D. Thesis, Iowa State University, Ames, IA, USA, 1991.
27. Li, L.; Buhman, K.K.; Hartman, P.A.; Beitz, D.C. Hypocholesterolemic effect of *Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222 in rabbits. *Lett. Appl. Microbiol.* **1995**, 20, 137–140.
28. Li, L.; Batt, S.M.; Wannemuehler, M.; Dispirito, A.; Beitz, D.C. Effect of feeding of a cholesterol-reducing bacterium, *Eubacterium coprostanoligenes*, to germ-free mice. *Lab. Anim. Sci.* **1998**, 48, 253–255.
29. Iqbal, J.; Hussain, M.M. Intestinal lipid absorption. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2009**, 296, E1183–E11894.
30. Swell, L.; Troutec, J.; Hopper, J.R.; Fieldh, J.; Treadwell, C.D. Mechanism of cholesterol absorption. II. Changes in free and esterified cholesterol pools of mucosa after feeding cholesterol-4-C14. *J. Biol. Chem.* **1958**, 233, 49–53.
31. Kellogg, T.F. On the site of the microbiological reduction of cholesterol to coprostanol in the rat. *Lipids* **1973**, 8, 658–659.
32. Setty, C.S.; Ivy, A.C. Intestinal absorption of coprostanol (coprosterol) in the rat. *Am. J. Physiol.* **1960**, 199, 1008–1010.

33. Wells, W.; Anderson, S.A.; Ma, Q. Lactose diets and cholesterol metabolism. I. Cholesterol absorption, coprostanol formation and bile acid excretion in the rat. *J. Nutr.* **1960**, *71*, 405–410.
34. Rosenfeld, R.S.; Zumoff, B.; Hellman, L. Metabolism of coprostanol-C14 and cholestanol-4-C14 in man. *J. Lipid Res.* **1963**, *4*, 337–340.
35. Schoenheimer, R. New contributions in sterol metabolism. *Science* **1931**, *74*, 579–584.
36. Koppel, N.; Maini Rekdal, V.; Balskus, E.P. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science* **2017**, *356*, eaag2770.
37. Kellogg, T.F. Steroid balance and tissue cholesterol accumulation in germfree and conventional rats fed diets containing saturated and polyunsaturated fats. *J. Lipid Res.* **1974**, *15*, 574–579.
38. Eyssen, H.J.; Parmentier, G.G.; Compennolle, F.C.; De Pauw, G.; Piessens-Denef, M. Biohydrogenation of sterols by *Eubacterium* ATCC 21408 nova species. *Eur. J. Biochem.* **1973**, *36*, 411–421.
39. Brinkley, A.W.; Gottesman, A.R.; Mott, G.E. Growth of cholesterol-reducing *Eubacterium* on cholesterol-brain agar. *Appl. Environ. Microbiol.* **1980**, *40*, 1130–1132.
40. Brinkley, A.W.; Gottesman, A.R.; Mott, G.E. Isolation and characterization of new strains of cholesterol-reducing bacteria from baboons. *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, *43*, 86–89.
41. Freier, T.A.; Beitz, D.C.; Li, L.; Hartman, P.A. Characterization of *Eubacterium coprostanoligenes* sp. nov., a cholesterol-reducing anaerobe. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1994**, *44*, 137–142.
42. Li, L. Characterization and Application of a Novel Cholesterol-Reducing Anaerobe, *Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222. Ph.D. Thesis, Iowa State University, Ames, IA, USA, 1995.
43. Mott, G.E.; Brinkley, A.W. Plasménylethanolamine: Growth factor for cholesterol reducing *Eubacterium*. *J. Bacteriol.* **1979**, *139*, 755–760.
44. Sadzikowski, M.R.; Sperry, J.F.; Wilkins, T.D. Cholesterol-reducing bacterium from human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **1977**, *34*, 355–362.

45. Gérard, P.; Lepercq, P.; Leclerc, M.; Gavini, F.; Raibaud, P.; Juste, C. *Bacteroides* sp. strain D8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 5742–5749.
46. Snog-Kjaer, A.; Prange, I.; Dam, H. Conversion of cholesterol into coprosterol by bacteria in vitro. *J. Gen. Microbiol.* **1956**, *14*, 256–260.
47. Crowther, J.S.; Drasar, B.S.; Goddard, P.; Hill, M.J.; Johnson, K. The effect of a chemically defined diet on the faecal flora and faecal steroid concentration. *Gut* **1973**, *14*, 790–793.
48. Lye, H.S.; Rusul, G.; Liong, M.T. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 1383–1392.
49. Antharam, V.C.; McEwen, D.C.; Garrett, T.J.; Dossey, A.T.; Li, E.C.; Kozlov, A.N.; Mesbah, Z.; Wang, G.P. An Integrated metabolomic and microbiome analysis identified specific gut microbiota associated with fecal cholesterol and coprostanol in *Clostridium difficile* Infection. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148824.
50. Midtvedt, A.C.; Midtvedt, T. Conversion of cholesterol to coprostanol by the intestinal microflora during the first two years of human life. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **1993**, *17*, 161–168.
51. Wilkins, T.D.; Hackman, A.S. Two patterns of neutral steroid conversion in the feces of normal North Americans. *Cancer Res.* **1974**, *34*, 2250–2254.
52. Veiga, P.; Juste, C.; Lepercq, P.; Saunier, K.; Beguet, F.; Gérard, P. Correlation between faecal microbial community structure and cholesterol-to-coprostanol conversion in the human gut. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *242*, 81–86.
53. Macdonald, I.A.; Bokkenheuser, V.D.; Winter, J.; McLernon, A.M.; Mosbach, E.H. Degradation of steroids in the human gut. *J. Lipid Res.* **1983**, *24*, 675–700.
54. Gérard, P.; Béguet, F.; Lepercq, P.; Rigottier-Gois, L.; Rochet, V.; Andrieux, C.; Juste, C. Gnotobiotic rats harboring human intestinal microbiota as a model for studying cholesterol-to-coprostanol conversion. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2004**, *47*, 337–343.
55. Rosenfeld, R.S.; Fukushima, D.K.; Hellman, L.; Gallagher, T.F. The transformation of cholesterol to coprostanol. *J. Biol. Chem.* **1954**, *211*, 301–311.
56. Rosenfeld, R.S.; Hellman, L.; Gallagher, T.F. The transformation of cholesterol-3d to coprostanol-d. Location of deuterium in coprostanol. *J. Biol. Chem.* **1956**, *222*, 321–323.

57. Mott, G.E.; Brinkley, A.W.; Mersinger, C.L. Biochemical characterization of cholesterol-reducing *Eubacterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1980**, *40*, 1017–1022.
58. Cuevas-Tena, M.; Alegría, A.; Lagarda, M.J. Relationship Between Dietary Sterols and Gut Microbiota: A Review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2018**, *120*, 1800054.
59. Rosenfeld, R.S.; Gallagher, T.F. Further studies of the biotransformation of cholesterol to coprostanol. *Steroids* **1964**, *4*, 515–520.
60. Björkhem, I.; Gustafsson, J.A. Mechanism of microbial transformation of cholesterol into coprostanol. *Eur. J. Biochem.* **1971**, *21*, 428–432.
61. Parmentier, G.; Eyssen, H. Mechanism of biohydrogenation of cholesterol to coprostanol by *Eubacterium* ATCC 21408. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *348*, 279–284.
62. Ren, D.; Li, L.; Schwabacher, A.W.; Young, J.W.; Beitz, D.C. Mechanism of cholesterol reduction to coprostanol by *Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222. *Steroids* **1996**, *61*, 33–40.
63. García, J.L.; Uhía, I.; Galán, B. Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria. *Microb. Biotechnol.* **2012**, *5*, 679–699.
64. Vrielink, A.; Ghisla, S. Cholesterol oxidase: Biochemistry and structural features. *FEBS J.* **2009**, *276*, 6826–6843.
65. Cheetham, P.S.; Dunnill, P.; Lilly, M.D. The characterization and interconversion of three forms of cholesterol oxidase extracted from *Nocardia rhodochrous*. *Biochem. J.* **1982**, *201*, 515–521.
66. Tomioka, H.; Kagawa, M.; Nakamura, S. Some enzymatic properties of 3 β -hydroxysteroid oxidase produced by *Streptomyces violascens*. *J. Biochem.* **1976**, *79*, 903–915.
67. Fukuyama, M.; Miyake, Y. Purification and some properties of cholesterol oxidase from *Schizophyllum commune* with covalently bound flavin. *J. Biochem.* **1979**, *85*, 1183–1193.
68. Sojo, M.; Bru, R.; Lopez-Molina, D.; Garcia-Carmona, F.; Arguelles, J.C. Cell-linked and extracellular cholesterol oxidase activities from *Rhodococcus erythropolis* isolation and physiological characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *47*, 583–589.

69. Vrielink, A.; Lloyd, L.F.; Blow, D.M. Crystal structure of cholesterol oxidase from *Brevibacterium sterolicum* refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **1991**, *219*, 533–554.
70. Sampson, N.S.; Kwak, S. Catalysis at the membrane interface: Cholesterol oxidase as a case study. In Proceedings of the 3rd International Symposium on Experimental Standard Conditions of Enzyme Characterizations (ESCEC), Rudesheim Rhein, Germany, 23–26 September 2008; pp. 13–22.
71. Joseph, K.; Sampson, N.S. Cholesterol oxidase: Physiological functions. *FEBS J.* **2009**, *276*, 6844–6856.
72. Yu, L.J.; Golden, E.; Chen, N.; Zhao, Y.; Vrielink, A.; Karton, A. Computational insights for the hydride transfer and distinctive roles of key residues in cholesterol oxidase. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 17265.
73. Björkhem, I.; Gustafsson, J.A.; Wrangé, O. Microbial transformation of cholesterol into coprostanol. Properties of a 3-oxo-4-steroid-5 beta-reductase. *Eur. J. Biochem.* **1973**, *37*, 143–147.
74. Zanotti, I.; Turróni, F.; Piemontese, A.; Mancabelli, L.; Milani, C.; Viappiani, A.; Prevedini, G.; Sanchez, B.; Margolles, A.; Elviri, L.; et al. Evidence for cholesterol-lowering activity by *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 through gut microbiota modulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 6813–6829.
75. Bolotine, A.; (INRA-paris-Saclay University, Jouy-en-Josas, France). Personal communication, 2017.
76. Lynch, A.; Crowley, E.; Casey, E.; Cano, R.; Shanahan, R.; McGlacken, G.; Marchesi, J.R.; Clarke, D.J. The Bacteroidales produce an N-acylated derivative of glycine with both cholesterol-solubilising and hemolytic activity. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13270.

4.3. La voie des hydrolases des sels biliaires

4.3.1. Contexte

La dernière voie du métabolisme bactérien du cholestérol, est celle des hydrolases des sels biliaires (BSH, *Bile Salt Hydrolases*). A l'échelle de l'écosystème intestinal, les activités BSH et les espèces microbiennes porteuses de ces activités sont souvent mal connues. Ces enzymes sont responsables de la déconjugaison des sels biliaires primaires, composés plus hydrophobes (appelés sels biliaires secondaires) excrétés dans les selles (**Kriaa et al., 2019**). Cette revue “ *Bile Salt Hydrolases : At the Crossroads of Microbiota and Human Health* ” a été établie afin de mieux comprendre le microbiome responsable de l'activité BSH et son impact global sur la santé de son hôte. Cette revue a été écrite lors de ma troisième année de thèse et a été publiée lors de ma troisième année de thèse, dans le journal, *Microorganisms*.

4.3.2. Résumé de la revue scientifique “*Bile Salt Hydrolases : At the Crossroads of Microbiota and Human Health*”

Au cours des dernières décennies, le microbiote intestinal a été de plus en plus lié à l'état de santé et aux maladies métaboliques. Plusieurs médiateurs ont été suggérés pour influencer le métabolisme des lipides et les réponses métaboliques associées. Un médiateur microbien a suscité beaucoup d'importance clinique en tant qu'enzyme les Hydrolases des Sels Biliaires (*Bile Salt Hydrolase*, BSH). La première partie de cette revue fait un court rappel pour resituer le contexte dans lequel se situent les BSH, à l'interface du microbiote intestinal en relation étroite avec le métabolisme des sels biliaires de l'hôte.

La seconde partie de cette revue s'intéresse aux bactéries productrices de BSH issues principalement du microbiote intestinal. Le rôle de ces dernières dans l'écosystème bactérien est également évoqué. En effet, les bactéries actives dotées de BSH permettraient d'apporter notamment une protection contre les conditions menaçantes, et serait un facteur de persistance dans le TGI. Un focus sur le profil biochimique et le comportement catalytique des BSH est également décrit. De façon particulière, les BSH adoptent principalement une topologie globale similaire, ils présentent des efficacités catalytiques et des préférences de substrat différentes. Des

exemples de comportements des activités catalytiques des BSH de *Lactobacillus salivarius*, *Clostridium perfringens* et de *Bacteroides thetaiotaomicron* sont citées pour essayer de mieux comprendre le large spectre catalytique des BSH lors de la formation du complexe enzyme-substrat.

La troisième partie de cette revue décrit la diversité fonctionnelle des BSH dans le microbiome humain. De récentes avancées techniques ont permis de caractériser les activités enzymatiques des BSH à partir d'échantillons biologiques complexes et sont résumées synthétiquement. C'est l'exemple de d'approche combinée, la chimio-protéomique ciblée, qui établit un profil de l'activité fonctionnelle des BSH dans le microbiote intestinal humain sain. La quatrième partie de cette revue s'intéresse à l'implication de l'activité du BSH dans la santé et la maladie de l'hôte. À ce jour, de nombreuses approches holistiques mettent en évidence l'impact de l'activité BSH. C'est le cas de Heinken *et al.* qui ont montré que chaque BSH issue du microbiote intestinal semble contribuer à élargir le répertoire des AB de l'hôte. Ces AB sont largement connus comme des molécules de signalisation clés qui stimulent de nombreuses voies de signalisation pour réguler plusieurs processus biologiques. Les rôles des récepteurs nucléaires le récepteur X du farnesoïde (FXR) et celui du récepteur membranaire TGR-5, ont été largement explorés en ce qui concerne la régulation du métabolisme des lipides, du glucose et de l'énergie chez l'hôte. L'activation de ces récepteurs, par l'intermédiaire des AB déconjugués par l'activité BSH, est d'une grande importance dans le contexte des troubles métaboliques.

La dernière partie de cette revue propose une stratégie biothérapeutique pertinente à travers le rôle des BSH du microbiome, pour contribuer au maintien de la santé humaine. L'émergence de nouvelles bactéries, nous permet de considérer les BSH comme des potentielles cibles thérapeutiques via la manipulation du microbiome BSH dans le cas de troubles métaboliques, infectieux et associés aux AB. La littérature disponible démontre de nouvelles orientations thérapeutiques prometteuses à travers le gain de l'activité BSH, par une transplantation de microbiote fécal. Dans d'autres maladies infectieuses gastro-intestinales, la restauration de ces activités à travers ces mêmes approches, a été envisagée. C'est le cas des protozoaires parasites intestinaux humains, *Giardia lamblia*, responsables de la giardiose ou dans le cas des infections à

Clostridium difficile. Des études *in vitro* ont démontré que les bactéries actives du BSH, comme *Bacteroides ovatus*, inhibent la germination de cet agent pathogène. Un ensemble de preuves mécanistiques ont été évoquée favorisant un rétablissement de l'environnement intestinal fonctionnel favorable à l'homéostasie des AB dans le contexte de la maladie.

En conclusion, cette revue montre que les BSH du microbiote intestinal jouent un rôle important dans de nombreux processus métaboliques de l'hôte, notamment dans la régulation du métabolisme du cholestérol, de l'énergie et de l'homéostasie de l'inflammation. Ainsi, elle peut servir de stratégie prometteuse pour contrôler les maladies métaboliques chez l'homme. Des études mettant en évidence les aspects moléculaires des enzymes BSH, notamment la structure des protéines et la régulation génétique, seraient certainement très utiles pour aborder et évaluer pleinement les implications des BSH en tant qu'outil clinique.

4.3.3. Revue scientifique “*Bile Salt hydrolases: At the Crossroads of Microbiota and Human Health*”



Review

Bile Salt Hydrolases: At the Crossroads of Microbiota and Human Health

Mélanie Bourgin ^{1,2}, Aicha Kriaa ², Héra Mkaouar ¹, Vincent Mariaule ¹, Amin Jablaoui ¹, Emmanuelle Maguin ¹, Jean-Claude Desfontis ¹ and Rhimi Moez ^{1*}

¹ Institut Micalis, INRAE, Microbiota Interaction with Human and Animal Team (MIHA), AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

² UPSP NP3 (2017.B146), Nutrition, Pathophysiology and Pharmacology, Oniris, College of Veterinary Medicine, Food Sciences and Engineering, Atlanpôle-La Chantrerie, Route de Gachet, 5 BP, Nantes, France

* Correspondence: moez.rhimi@inrae.fr

Abstract: The gut microbiota has been increasingly linked to metabolic health and disease over the last few decades. Several factors have been suggested to be involved in lipid metabolism and metabolic responses. One mediator that has gained great interest as a clinically important enzyme is bile salt hydrolase (BSH). BSH enzymes are widely distributed in human gastrointestinal microbial communities and are believed to play key roles in both microbial and host physiology. In this review, we discuss the current evidence related to the role of BSHs in health and provide useful insights that may pave the way for new therapeutic targets in human diseases.

Keywords: Bile salt hydrolases; microbiome; bile acids; human health; gut microbiota; holobiont

Citation: Bourgin, M.; Kriaa, A.; Mkaouar, H.; Mariaule, V.; Jablaoui, A.; Maguin, E.; Rhimi, M. Bile Salt Hydrolases: At the Crossroads of Microbiota and Human Health. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1122. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061122>

Academic Editor: Elías R. Olivera

Received: 19 April 2021

Accepted: 18 May 2021

Published: 22 May 2021

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

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The gastrointestinal tract hosts a large and complex community of microorganisms, collectively known as the gut microbiota. This community consists of around 1014 microorganisms and is dominated by the presence of about 500–1000 different bacterial species [1,2]. The gut microbiota lives in a close relationship with the host and is crucial for many physiological processes [3,4]. Several mechanisms have been proposed to mediate the effects of these microorganisms on metabolic health. One important function carried out by the human gut microbiota is the deconjugation of primary bile acids (BAs) by BSH enzymes and their impact on host health [5,6]. The presence of active BSHs has long been recognized as a selection criterion for defining potential probiotics. BAs are amphipathic molecules that are initially produced by the host and subsequently transformed by the gut microbiota. Host primary BAs (CA, cholic acid; CDCA, chenodeoxycholic

acid) are synthesized from cholesterol and conjugated with glycine or taurine in the liver (GCA and GCDCA, glycocholic acid and glycochenodeoxycholic acid; TCA and TCDCA, taurocholic acid and taurochenodeoxycholic acid). Conjugation improves the solubility of such hydrophobic BAs and reduces the potential damage of the cell membranes. Conjugated BAs are then excreted into the duodenum from the biliary duct, where they contribute to the solubilization of dietary lipids and their absorption through the small intestine and colon [7,8]. Around 95% of BAs are reabsorbed in the distal ileum. They are further effluxed into portal circulation, redirected, and stored in the liver through the enterohepatic cycle (EHC). The remaining primary BAs that escape EHC undergo further microbial biotransformations, including deconjugation, oxidation, epimerization, 7-dehydroxylation, esterification, and desulfatation by the gut microbiota [9]. The prominent secondary BAs are comprised of deoxycholic acid (DCA) and lithocholic acid (LCA), which result from the dehydroxylation of CA and CDCA, respectively [10,11]. Both primary and secondary BAs serve as signaling molecules that influence several processes, including lipid, glucose, and energy metabolism as well as inflammation [12,13].

Recently, increasing attention has been paid to better explore (i) the variety of enzymes catalyzing BA biotransformation, (ii) their distribution, and (iii) their relevance to the host's health and to disease [14,15,16,17,18,19].

In this review, we discuss the current evidence related to microbial bile acid deconjugation, with a focus on gut bacterial bile salt hydrolases, and highlight its potential therapeutic interest.

2. Overview of bile salt hydrolase enzymes

Bile salt hydrolase (BSH; EC 3.5.1.24) is an enzyme produced by the intestinal microbiota that catalyzes the hydrolysis of amide bonds in conjugated BAs, resulting in the release of free amino acids [20]. These enzymes belong to the N-terminal nucleophilic (Ntn) hydrolase superfamily and share a similar $\alpha\beta\alpha$ -core structure to an N-terminal catalytic cysteine residue [20]. This residue is critical to the catalysis mechanism and acts both as a nucleophile and a proton donor [21]. The N-terminal amino group serves as the proton acceptor and activates the nucleophilic thiol group of the cysteine side chain. Besides the cysteine residue, other amino acids conserved in most BSHs are also relevant to the catalytic reaction, including Arg18, Asp21, Asn82, Asn175, and Arg228 [20]. Numerous studies aimed to define the key amino acids and the secondary structural elements that are potentially involved in the substrate binding in BSHs [22,23]. These reports showed that BSHs are able to recognize their substrates via hydrophobic interactions with steroid moiety [24,25]. From the BSHs discovered, mainly intracellular enzymes were characterized as being from the *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus*, and *Bifidobacterium* species [14]. Although most enzymes exhibited a similar overall topology, they displayed different catalytic efficiencies and substrate specificities. Additional biochemical reports suggested that around 58% of

purified BSHs could recognize glyco-conjugated BAs [26]. To date, little data are available on the structural basis of BSH functions. Only five three-dimensional structures of the BSH enzymes from *Bifidobacterium longum* [27], *Lactobacillus salivarius* [23], *Enterococcus faecalis* [28], *Clostridium perfringens* [25], and *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 [29] were reported.

A deeper understanding of the structural features that contribute to substrate binding would offer further insights into the diverse preferences and functions of BSH enzymes.

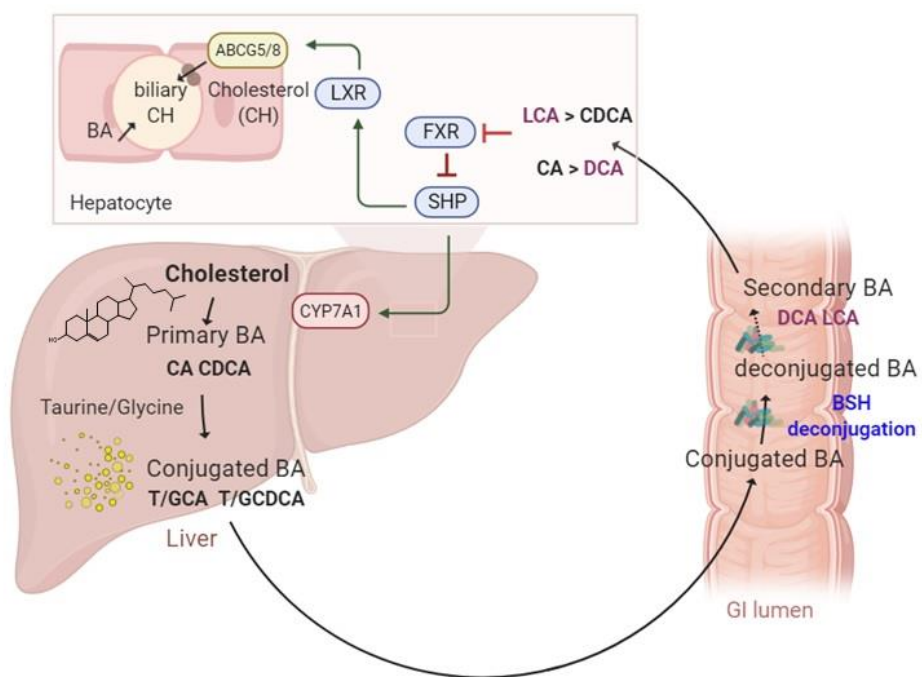
3. Distribution of BSH activity within the gut microbiota

Many reports described that most studied BSHs are encoded by lactic acid bacteria and are used as probiotics to prevent mainly metabolic disorders in humans [30,31,32]. Recently, it was demonstrated that the human gut microbiota plays key a role in contributing to host health [33]. Among these microbial functions, the deconjugation of BAs by BSH enzymes comprises an imperative gateway reaction in the metabolism of BAs [6]. Considering the importance of BAs as biomolecules, gaps in our knowledge of these enzymes need to be filled. To uncover BSH gene abundance and their activity distribution in the gut microbiota, different approaches such as biochemical assays and metagenomic analysis are currently used; however, both approaches have inherent limitations. Indeed, standard biochemical assays that measure substrate consumption or product generation are unsuitable for defining and characterizing BSH enzymatic activities from complex biological samples. Through functional and comparative metagenomic analysis, Jones *et al.* highlighted the presence of BSH activity in all major bacterial divisions and the enrichment of BSHs in the human gut metagenomes of healthy subjects. Indeed, most metagenomic BSH-active clones were found to belong to Firmicutes, Bacteroidetes, and Actinobacteria [34]. Recently, taxonomic analyses among 11 different worldwide healthy populations have revealed 591 BSH enzymes, which are distributed over 117 genera and 447 bacterial strains [26]. The majority of the identified BSHs in the study belong to five genera, namely *Bacteroides*, *Blautia*, *Eubacterium*, *Clostridium*, and *Roseburia*. Around 27% of BSH-encoding bacteria behave as paralogs and are mainly assigned to *Bacteroides*. Given that the presence of paralogs introduces significant BSH sequence dissimilarity, Song *et al.* proposed an eight phylotype classification based on a phylogenetic tree as a more rational alternative than the classification by genera. A multivariable regression analysis showed that the relative abundance of BSHs does not significantly correlate with gender, age, and body mass index (BMI), while BSH distribution varies among populations from different geographical regions. At the biochemical level, enzyme activity assays highlighted different deconjugation selectivity between the phylotypes, in agreement with previous reports [26,35]. For example, while the T0 (*Clostridium*, *Intestinibacter*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*), T1 (*Eubacterium*, *Blautia*, *Clostridium*, *Roseburia*, *Ruminococcus*), T3 (*Lactobacillus*), T4 (*Bifidobacterium* and *Collinsella*), and T7 (mainly *Blautia*) groups have significant specific activity for most bile salts, the T5 and T6 groups (assigned to *Bacteroides*)

exhibit lower specificity towards GCA and both GCA/TCA, respectively. In contrast, the T1, T3, and T4 groups display the highest specific activities with GCA. When GCDCA and TCDCA are used as substrates, the highest specific activity is observed for group T2. Using a chemoproteomic approach to target BSH activities in the gut, Parasar *et al.* (2019) showed that this activity increases during intestinal inflammation, which results in higher deconjugated BAs [36]. Further studies are required to understand the relevance of gut BSH activities in host diseases.

4. BSH activity in health and disease

Several studies have investigated BSH-active bacteria for their clinical efficiency in lowering hypercholesterolemia [15, 40-42]. BSH-active bacteria have been shown to increase BA deconjugation, which in turn decreases cholesterol absorption by enterocytes and enhances its fecal excretion [14]. Increased BSH activity may alter bile acid composition as well and influence farnesoid X receptor (FXR) signaling. It has been demonstrated that reduced FXR activity promotes the downregulation of small heterodimer partner (SHP) and increased the synthesis of BA from cholesterol through the rate limiting enzyme cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) (Thomas *et al.* 2008) [43] (Figure 1). Such downregulation of SHP results in increased liver X receptor (LXR) activation which in turn, upregulates adenosine triphosphate-binding cassette transporters G5 and G8 (ABCG5/G8) and promotes cholesterol transport into the bile (Johnson *et al.* 2010, Yoon *et al.* 2011) [44-45] (Figure 1). The effect of BSH activity may be extended to weight gain through FXR signaling and the membrane receptor TGR-5. The use of Tempol, an anti-oxidant, prevents obesity in mice through reduction of BSH activity resulting in FXR inhibition via accumulating tauro-beta muricholic acid. Furthermore, high-fat diet-fed FXR null mice show reduced diet obesity [12, 46]. Interestingly, TGR-5 receptor BA-activation leads to weight reduction [47] which highlights potential interaction between FXR and TGR-5. Obesity is often associated to several liver-related diseases including steatosis, hepatic cancer and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) linked with a modified gut microbiota community. NAFLD is a chronic liver disease with inflammation, hepatocyte injury, steatosis and fibrosis as pathological features. Strategy for the treatment of NAFLD targets the gut microbiome mainly its ability to modulate insulin sensitivity and metabolism related to host energy, choline and BA. Of note, a clinical trial shows that VSL#3, a combination of eight types of probiotics, improves NAFLD through the increase in GPL-1 [48]. Other probiotics, tested either in combination or isolated, also show beneficial effects on NAFLD improvement [49-50]. Recently, Huang *et al.* demonstrated that *in vitro* *Lactobacillus plantarum* AR113 and *L. casei* pWQH0, both displaying high BSH activity, decrease hepatic lipid accumulation in NAFLD cell models potentially mediated by the BSH activity [51]. Besides cholesterol and lipid metabolism, BSH activity may be linked to inflammation disorders. Gut metagenomic analysis revealed a reduced abundance in *bsh* gene for patients suffering from Inflammatory Bowel Disease (IBD) and type-2 diabetes [52-53]. In IBD context, the induced modification of BA profile would alter the protective



effect on intestinal barrier mediated by FXR [53]. Repression of secondary BA metabolism *via* the modulation of BSH activity may represent a new therapeutic way for hepatic cancer treatment. In fact, primary BA have been shown to stimulate liver accumulation of hepatic NKT cells and antitumor immunity thus inhibiting tumorigenesis in a mice model [54]. Altogether, all these data pointed BSH activity and bile acid receptors as therapeutic target in numerous diseases.

Figure 1: A schematic illustration of enterohepatic circulation and intestinal BA metabolism by BSH enzymes. The BAs are synthesized and conjugated with either taurine or glycine in the liver. They are further spilled over from the enterohepatic circulation and deconjugated by BSH-active gut bacteria. The hydrolysis of the conjugated BAs to deconjugated BAs and subsequent production of the secondary BAs can modulate several functions, including farnesoid X receptor (FXR), small heterodimer partner (SHP), cholesterol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A1), liver X receptor (LXR), and ATP-binding cassette transporters G5/G8 heterodimer (ABCG5/8), which transports cholesterol into the bile canaliculi.

5. Therapeutic Relevance on BSH-Active Bacteria

This global overview leads us to focus on the analysis of the relevant roles of BSHs on human health and their potential as therapeutic alternatives to treat human diseases.

5.1. Metabolic Disorders

Hypercholesterolemia is reflected by high plasma levels of both the total and LDL-cholesterol (LDL-c), while the HDL-cholesterol (HDL-c) levels decrease. High cholesterol levels are a major risk factor in the development of

atherosclerosis and cardiovascular disease (CVD), the leading cause of mortality in the world [54]. Nowadays, BSH-active bacteria represent the main candidate for the prevention of hypercholesterolemia [14,55,56,57]. Several studies aiming to characterize the BSH encoding members of the gut microbiota were reported [34,35,58]. Not surprisingly, numerous potential probiotics with high BSH activity significantly reduce circulating cholesterol levels. This includes specific *Lactobacillus* and bifidobacterial species such as *B. longum*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, and *L. reuteri* [16,37,56,59]. Interestingly, Sridevi et al. (2009) demonstrated that the oral administration of immobilized BSH from *Lactobacillus buchneri* significantly reduced both triglycerides and serum cholesterol using a rodent model of hypercholesterolemia [60]. Using a placebo-controlled, randomized study, Ooi et al. (2010) reported that the administration of a symbiotic capsule containing a BSH-active strain of *L. gasseri* with inulin resulted in significant reductions in total cholesterol and LDL-c compared to the placebo group [38]. Similar results were obtained with the *L. reuteri* strains. The effect of yogurts containing microencapsulated *L. reuteri* NCIMB 30242 was evaluated using a randomized, double-blinded study on hypercholesterolemic subjects. BSH-positive *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 consumption over 6 and 9 weeks in [15,61], respectively, resulted in higher plasma deconjugated bile acid levels but lower total cholesterol, LDL-c, and non-HDL-c compared to the placebo group. Of note, *Lactobacillus reuteri* NCIMB30242 was the first strain of probiotics to be marketed (Cardioviva®) for cholesterol-reducing purposes based on BSH and the bile salt deconjugation mechanism. In another clinical trial, the consumption of yogurt containing *L. reuteri* CRL 1098 significantly decreased the total circulating cholesterol and LDL-c as well, while levels of HDL and triglycerides were unchanged [62]. Overall, these studies show that microbial BSH activity is able to impact lipid metabolism and reduce hypercholesterolemia. Most *Lactobacillus* species described as having a hypocholesterolemic effect in human trials have been patented [63,64,65,66]. The obtained hypocholesterolemic effects rely on the ability of BSH activity to deconjugate the primary intestinal BAs, thereby reducing cholesterol reabsorption [67].

In addition to cholesterol-lowering, accumulating research has been conducted to establish potential interplay between weight gain and/or obesity and gut microbiota-encoded BSHs through FXR signaling. Indeed, increasing evidence demonstrates that the microbiota, BAs, and FXR signaling are mandatory to induce obesity [12,68]. Additionally, the gut microbiota analysis of antibiotic-treated children revealed a correlation between body weight gain and prolonged reduction in overall BSH gene abundance [69]. In line with these findings, numerous BSH-expressing probiotics were shown to protect mice from weight gain and obesity as well as to influence the BA pool by modulating FXR signaling [70,71]. Advanced clinical studies showed that fecal microbiota transplantation in obese subjects did not reduce BMI but resulted in a BA profile similar to that of the donor [72,73]. Overall, these data support the hypothesis that targeted BSH enzymes can be delivered in order to control host lipidemia and to protect against weight gain. These effects may be particularly relevant seeing as some

Lactobacillus and *Bifidobacterium* strains exhibiting BSH activity are regularly used in dairy products. In recognition of the importance of ensuring the host's safety, these strains are commonly subjected to extensive characterization [74]. Furthermore, new therapeutic directions are focused on semi-synthetic FXR agonists, derived from the CDCA molecule [75]. Owing to the emergence of new BSH active probiotics, these strains can be tested to generate deconjugated BAs as FXR agonists.

On the other hand, previous reports have suggested potential adverse effects of increased BSH activity in the intestine. High BSH activity is believed to generate significant amounts of unconjugated BAs, which may result in lipid malabsorption and trigger steatorrhea [76]. Increased BSH activity may also compromise lipid metabolism and colonic mucosal functions, thereby contributing to gallstone formation and colon cancer [77,78].

5.2. Infectious Diseases: Case of *Giardia lamblia* and *Clostridium difficile*

Giardia duodenalis (also named *G. lamblia* or *G. intestinalis*) is a protozoan parasite that infects humans and many animals through oro-fecal transmission [79,80,81]. *G. duodenalis* is widely distributed in the environment as a resistant cystic form; once ingested, these cysts differentiate into trophozoite (a flagelled replicative form) by excystation in the correct GI tract conditions [82]. The resulting enteropathogen can reach the colon and can cause giardiasis, one of the most common intestinal infectious diseases worldwide [83,84]. Considered a public health concern, several anti-infectious molecules have been developed to treat giardiasis [81]. However, the emergence of drug resistant strains limits the efficacy of the available treatments [81]. Recent reports established a strong interaction between *G. duodenalis* and the gut microbiota. In fact, it was highlighted that giardiasis susceptibility is highly influenced by the composition of the gut microbiota [85,86,87]. In turn, *G. duodenalis* colonization leads to gut microbiota composition changes [86]. Intriguingly, Riba et al. (2020) reported that *Giardia* infection alters the enteric microbiota composition in neonatal mice and modulates BAs and lipid metabolism, leading to reduced body weight gain and growth, as noted in infected infants [88]. Previous studies investigated the effect of probiotic bacteria (*L. johnsonii* La1, *L. gasseri* CNCM I-4884) in the field of giardiasis [89,90,91]. Both strains promote immune response, protect against *Giardia*-mediated tissue injury, and prevent trophozoite proliferation in murine models [89,91]. Of note, *L. gasseri* is more effective in vivo than *L. johnsonii* since *L. gasseri* reduces the cystic pool of the parasite [89]. Other lactobacillus strains, including *L. casei* MTCC 1423 and *L. rhamnosus*, have been tested in a murine model, showed similar protective effects, and reduced the severity/duration of giardiasis [92,93,94]. Interestingly, Shukla et al. (2020) reported an anti-*giardia* effect and enhanced mucosal immunity by the probiotic protein from *L. rhamnosus* as well as the heat-killed strain [95]. Although the underlying mechanism remains poorly understood [96,97,98], recent reports demonstrate a potential association between BSH activity and the protective effect against *G. duodenalis* infection [99,100]. As BSH activity allows for the conversion of primary BAs into

deconjugated bile acids, it was suggested that the subsequent release of secondary BAs has a toxic effect and may alter parasite growth and survival. To address this hypothesis, the direct effects of conjugated and deconjugated BAs on the parasite were tested. Both tauro- and glyco-conjugated BAs were inert and did not inhibit parasite growth, while deconjugated BAs (DC and CDC) were toxic in a dose-dependent manner and exhibited a significant deleterious effect on the parasite [99]. Moreover, the simultaneous incubation of *G. duodenalis* with unconjugated BAs and BSH from *C. perfringens* allowed for the conversion of incubated BAs into their conjugated forms and consequently led to a killing effect on the parasite [99]. In addition, engineered *E. coli* to express BSH from *L. johnsonii* confirmed that BSH antagonized *Giardia* proliferation in vitro in a dose dependent manner as well as in vivo [100]. Altogether, these results support the promising prospect of using BSH active probiotics as a new therapeutic strategy to treat/prevent *G. duodenalis* infection.

Another example of a gastrointestinal infectious disease includes *Clostridium difficile* infection (CDI). *C. difficile* is a spore-forming pathogen that might colonize the gut of patients treated by broad-spectrum antibiotics [101,102]. CDI includes a broad range of disorders ranging from diarrhea to colitis and toxic megacolon [101]. Their incidence, severity, and costs are in continuous increase. In addition, they have evolved as a significant cause of mortality during the past decade [101,103,104]. Upon germination, vegetative cells are generated from spores, and the bacterium produces toxins that result in tissues damage, inflammation, and diarrhea [105,106]. In the GI tract, the germination process is mediated by a host-derived molecule including BA sensing through the bile acid germinant receptor [105,107,108,109]. In fact, TCA, CA, and DCA activate germination, while CDCA acts as a competitive inhibitor [110]. Other studies indicate that DCA is a potent inhibitor of this process, as reported with *C. scindens*. Upon administration, this strain enhances the resistance to infection in a DCA dependent fashion [111]. Recent reports revealed that severe and relapsing CDI patients display high levels of TCA, followed by a reduced abundance of BSH-producing species [112,113]. However, fecal transplantation is effective in treating these patients and increases their resistance to CDI [112,113,114]. Further analysis demonstrates that, following FMT, key bacterial genera responsible for BSH production are recovered, BSH activity and BSH gene copy numbers are balanced, and secondary BAs are restored [112,113]. Interestingly, unlike patients pre-FMT, the BA profiles, similar to that in patients post-FMT, were able to inhibit spores outgrowth into vegetative forms [115]. In addition, supernatants from either engineered *E. coli* expressing highly active BSH or naturally BSH-producing organisms (*Bacteroides ovatus*, *Collinsella aerofaciens*, *Bacteroides vulgatus*, and *Blautia obeum*) effectively reduced TCA-mediated *C. difficile* germination. These effects were also confirmed in a recurrent CDI mouse model, using the recombinant *E. coli* strain for BSH [112]. These distinctive features pave the way towards the potential use of BSH active probiotics to treat CDI. However, active research must be conducted in this field to unravel the molecular mechanism of how secondary BAs may inhibit *C. difficile* outgrowth, colonization, and the subsequent inhibition of infection.

5.3. Other Human Pathologies

Several reports highlighted the association of many human disorders to BA dysregulation. In this context, we recently demonstrated the impact of the gut microbiota, cholesterol, and BA metabolism in hypercholesterolemia and cardiovascular diseases [116]. Furthermore, IBD, including ulcerative colitis and Crohn's disease, are chronic immune-mediated inflammatory diseases that affect the gastrointestinal system. Targeted drugs are directed at the overactive immune response in these diseases [117]. Interestingly, several reports have suggested BA dysmetabolism as a contributing factor in IBD and irritable bowel syndrome (IBS) pathogenesis [118,119,120,121]. Among the potential mechanisms, the modification of the gut microbiota composition may lead to altered BA transformations in the gut and modulation of the circulating BAs. Direct enzyme activity assays in IBD patients revealed impaired deconjugation, dehydroxylation and, desulfation [122]. Otherwise, cholestatic diseases are also linked to changes in Bas, which are characterized by accumulated BAs levels in the biliary system. This dysfunction causes liver inflammation and injury [123].

Recently, the effect of ursodeoxycholic acid (UDCA) was studied in the context of the intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) [124]. The reported results demonstrated that this BA counterbalances higher levels of BAs [124,125]. A recent study examined the clinical responses of the efficacy of the biotherapeutic agent UDCA in the case of the ICP cohort [124]. In this work, the authors were interested in the reaction mechanism associated with the effectiveness of UDCA, which counterbalances higher levels of BAs [124]. Such beneficial effects of UDCA were mediated by the gut microbiota through the enrichment of the BSH-expressing bacteria belonging to the Bacteroidetes phylum.

Modification of the BA metabolism is also linked to other human diseases such as liver disorders, including the primary sclerosing cholangitis (PSC). In this context, the gut microbiota and bile acid composition were analyzed in a mice model and demonstrated that the illness severity was increased in germ-free mice [126]. Moreover, Tabibian *et al.* (2016) described that PSC is reduced by the addition of UDCA, highlighting the protective potential of the gut microbiota and BA against PSC [126].

6. Conclusions

BSH enzymes play important roles in a wide range of host metabolic processes, including the regulation of cholesterol metabolism, energy, and inflammation homeostasis. BSHs have mainly been described in lactic acid bacteria. However, functional analysis of the gut microbiota revealed a high number of these enzymes in this ecological niche. The modulation of such activity has been shown to exhibit widespread effects on the host and resident microbiota. As the unique enzymes involved in the crucial deconjugation reaction, BSHs may serve as a promising strategy to control numerous diseases ranging from metabolic disorders to inflammatory and infectious diseases. Studies highlighting the molecular aspects of BSH enzymes including protein structure and genetic regulation would certainly be of great

relevance to fully address and evaluate the implications of BSHs as a clinical tool.

Author Contributions: MB, AK, HM, VM, AJ and MR conceived the scientific ideas. MB, AK, HM, VM, AJ, EM, JCD and MR performed and discussed the work and edited the manuscript. All authors reviewed the manuscript and provided critical feedbacks. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work received a funding from the Microbiology and the Food Chain division (MICA) of the INRAE Institute, ONIRIS and the Twinning European project MICAfrica 952583.

Acknowledgments: The authors would like to express their gratitude to Dr N. Akermi for his kind help concerning the analysis of the BSH from the gut microbiota.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

Funding: This work received funding from the Microbiology and the Food Chain Division (MICA) of the INRAE Institute, ONIRIS and the Twinning European Project MICAfrica (952583).

Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to N. Akermi for his kind help concerning the analysis of the BSH in the gut microbiota.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bäckhed, F.; Ley, R.E.; Sonnenburg, J.L.; Peterson, D.A.; Gordon, J.I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005, 307, 1915–1920.
2. Gill, S.R.; Pop, M.; Deboy, R.T.; Eckburg, P.B.; Turnbaugh, P.J.; Samuel, B.S.; Gordon, J.I.; Relman, D.A.; Fraser-Liggett, C.M.; Nelson, K.E. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006, 312, 1355–1359.
3. Marchesi, J.R.; Adams, D.H.; Fava, F.; Hermes, G.D.; Hirschfield, G.M.; Hold, G.; Quraishi, M.N.; Kinross, J.; Smidt, H.; Tuohy, K.M.; et al. The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. *Gut* 2016, 65, 330–339.
4. Contijoch, E.J.; Britton, G.J.; Yang, C.; Mogno, I.; Li, Z.; Ng, R.; Llewellyn, S.R.; Hira, S.; Johnson, C.; Rabinowitz, K.M.; et al. Gut microbiota density influences host physiology and is shaped by host and microbial factors. *eLife* 2019, 8, e40553.
5. Geng, W.; Lin, J. Bacterial bile salt hydrolase: An intestinal microbiome target for enhanced animal health. *Anim. Health Res. Rev.* 2016, 17, 148–158.
6. Foley, M.H.; O'Flaherty, S.; Barrangou, R.; Theriot, C.M. Bile salt hydrolases: Gatekeepers of bile acid metabolism and host-microbiome crosstalk in the gastrointestinal tract. *PLoS Pathog.* 2019, 15, e1007581.
7. Russell, D.W. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 2003, 72, 137–174.
8. Russell, D.W. Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J. Lipid Res.* 2009, 50, S120–S125. [Google Scholar] [CrossRef]

9. Ridlon, J.M. Conceptualizing the Vertebrate Sterolbiome. *Appl. Environ. Microbiol.* 2020, 86, e00641-20.
10. Gérard, P. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota. *Pathogens* 2013, 3, 14–24.
11. Ridlon, J.M.; Bajaj, J.S. The human gut sterolbiome: Bile acid-microbiome endocrine aspects and therapeutics. *Acta Pharm. Sin.* 2015, 5, 99–105.
12. Li, F.; Jiang, C.; Krausz, K.W.; Li, Y.; Albert, I.; Hao, H.; Fabre, K.M.; Mitchell, J.B.; Patterson, A.D.; Gonzalez, F.J. Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nat. Commun.* 2013, 4, 2384. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
13. De Aguiar Vallim, T.Q.; Tarling, E.J.; Edwards, P.A. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab.* 2013, 17, 657–669.
14. Begley, M.; Hill, C.; Gahan, C.G. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 1729–1738.
15. Jones, M.L.; Martoni, C.J.; Parent, M.; Prakash, S. Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. *Br. J. Nutr.* 2012, 107, 1505–1513.
16. Joyce, S.A.; MacSharry, J.; Casey, P.G.; Kinsella, M.; Murphy, E.F.; Shanahan, F.; Hill, C.; Gahan, C.G. Regulation of host weight gain and lipid metabolism by bacterial bile acid modification in the gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014, 111, 7421–7426.
17. Ridlon, J.M.; Harris, S.C.; Bhowmik, S.; Kang, D.J.; Hylemon, P.B. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes* 2016, 7, 22–39.
18. Chand, D.; Avinash, V.S.; Yadav, Y.; Pundle, A.V.; Suresh, C.G.; Ramasamy, S. Molecular features of bile salt hydrolases and relevance in human health. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2017, 1861, 2981–2991.
19. Dong, Z.; Lee, B.H. Bile salt hydrolases: Structure and function, substrate preference, and inhibitor development. *Protein Sci.* 2018, 27, 1742–1754.
20. Ridlon, J.M.; Kang, D.J.; Hylemon, P.B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* 2006, 47, 241–259.
21. Oinonen, C.; Rouvinen, J. Structural comparison of Ntn-hydrolases. *Protein Sci.* 2000, 9, 2329–2337.
22. Yadav, R.; Singh, P.K.; Puniya, A.K.; Shukla, P. Catalytic interactions and molecular docking of bile salt hydrolase (BSH) from *L. plantarum* RYPR1 and its prebiotic utilization. *Front. Microbiol.* 2017, 7, 2116.
23. Xu, F.Z.; Guo, F.F.; Hu, X.J.; Lin, J. Crystal structure of bile salt hydrolase from *Lactobacillus salivarius*. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* 2016, 72, 376–381.
24. Lambert, J.M.; Siezen, R.J.; De Vos, W.M.; Kleerebezem, M. Improved annotation of conjugated bile acid hydrolase superfamily members in Gram-positive bacteria. *Microbiology* 2008, 154, 2492–2500.
25. Rossocha, M.; Schultz-Heienbrok, R.; von Moeller, H.; Coleman, J.P.; Saengers, W. Conjugated bile acid hydrolase is a tetrameric N-terminal thiol

- hydrolase with specific recognition of its cholyl but not of its tauryl product. *Biochemistry* 2005, 44, 5739–5748.
26. Song, Z.; Cai, Y.; Lao, X.; Wang, X.; Lin, X.; Cui, Y.; Kalavagunta, P.K.; Liao, J.; Jin, L.; Shang, J.; et al. Taxonomic profiling and populational patterns of bacterial bile salt hydrolase (BSH) genes based on worldwide human gut microbiome. *Microbiome* 2019, 7, 9.
 27. Kumar, R.S.; Brannigan, J.A.; Prabhune, A.A.; Pundle, A.V.; Dodson, G.G.; Dodson, E.J.; Suresh, C.G. Structural and functional analysis of a conjugated bile salt hydrolase from *Bifidobacterium longum* reveals an evolutionary relationship with penicillin V acylase. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 32516–32525.
 28. Chand, D.; Panigrahi, P.; Varshney, N.; Ramasamy, S.; Suresh, C.G. Structure and function of a highly active Bile Salt Hydrolase (BSH) from *Enterococcus faecalis* and post-translational processing of BSH enzymes. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 2018, 1866, 507–518.
 29. Adhikari, A.A.; Seegar, T.C.M.; Ficarro, S.B.; McCurry, M.D.; Ramachandran, D.; Yao, L.; Devlin, A.S. Development of a covalent inhibitor of gut bacterial bile salt hydrolases. *Nat. Chem. Biol.* 2020, 16, 318–326.
 30. Patel, A.K.; Singhania, R.R.; Pandey, A.; Chincholkar, S.B. Probiotic bile salt hydrolase: Current developments and perspectives. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010, 162, 166–180.
 31. Tsai, C.C.; Lin, P.P.; Hsieh, Y.M.; Zhang, Z.Y.; Wu, H.C.; Huang, C.C. Cholesterol-lowering potentials of lactic acid bacteria based on bile-salt hydrolase activity and effect of potent strains on cholesterol metabolism in vitro and in vivo. *Sci. World J.* 2014, 2014, 690752.
 32. Tanaka, H.; Doesburg, K.; Iwasaki, T.; Mierau, I. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *J. Dairy Sci.* 1999, 82, 2530–2535.
 33. Cho, I.; Blaser, M.J. The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 2012, 13, 260–270.
 34. Jones, B.V.; Begley, M.; Hill, C.; Gahan, C.G.; Marchesi, J.R. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 13580–13585.
 35. Yao, L.; Seaton, S.C.; Ndousse-Fetter, S.; Adhikari, A.A.; DiBenedetto, N.; Mina, A.I.; Banks, A.S.; Bry, L.; Devlin, A.S. A selective gut bacterial bile salt hydrolase alters host metabolism. *eLife* 2018, 7, e37182.
 36. Parasar, B.; Zhou, H.; Xiao, X.; Shi, Q.; Brito, I.L.; Chang, P.V. Chemoproteomic Profiling of Gut Microbiota-Associated Bile Salt Hydrolase Activity. *ACS Cent. Sci.* 2019, 5, 867–873.
 37. Damodharan, K.; Lee, Y.S.; Palaniyandi, S.A.; Yang, S.H.; Suh, J.W. Preliminary probiotic and technological characterization of *Pediococcus pentosaceus* strain KID7 and in vivo assessment of its cholesterol-lowering activity. *Front. Microbiol.* 2015, 6, 768.
 38. Ooi, L.G.; Ahmad, R.; Yuen, K.H.; Liong, M.T. *Lactobacillus gasseri* [corrected] CHO-220 and inulin reduced plasma total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol via alteration of lipid transporters. *J. Dairy Sci.* 2010, 93, 5048–5058.

39. Thomas, C.; Pellicciari, R.; Pruzanski, M.; Auwerx, J.; Schoonjans, K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008, 7, 678–693. [
40. Johnson, B.J.; Lee, J.Y.; Pickert, A.; Urbatsch, I.L. Bile acids stimulate ATP hydrolysis in the purified cholesterol transporter ABCG5/G8. *Biochemistry* 2010, 49, 3403–3411.
41. Yoon, H.S.; Ju, J.H.; Kim, H.; Lee, J.; Park, H.J.; Ji, Y.; Shin, H.K.; Do, M.S.; Lee, J.M.; Holzapfel, W. *Lactobacillus rhamnosus* BFE 5264 and *Lactobacillus plantarum* NR74 Promote Cholesterol Excretion Through the Up-Regulation of ABCG5/8 in Caco-2 Cells. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 2011, 3, 194–203.
42. Gonzalez, F.J.; Jiang, C.; Patterson, A.D. An Intestinal Microbiota-Farnesoid X Receptor Axis Modulates Metabolic Disease. *Gastroenterology* 2016, 151, 845–859.
43. Stanimirov, B.; Stankov, K.; Mikov, M. Bile acid signaling through farnesoid X and TGR5 receptors in hepatobiliary and intestinal diseases. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 2015, 14, 18–33.
44. Alisi, A.; Bedogni, G.; Baviera, G.; Giorgio, V.; Porro, E.; Paris, C.; Giammaria, P.; Reali, L.; Anania, F.; Nobili, V. Randomised clinical trial: The beneficial effects of VSL#3 in obese children with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2014, 39, 1276–1285.
45. Famouri, F.; Shariat, Z.; Hashemipour, M.; Keikha, M.; Kelishadi, R. Effects of Probiotics on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Obese Children and Adolescents. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2017, 64, 413–417.
46. Vajro, P.; Mandato, C.; Licenziati, M.R.; Franzese, A.; Vitale, D.F.; Lenta, S.; Caropreso, M.; Vallone, G.; Meli, R. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2011, 52, 740–743.
47. Huang, W.; Wang, G.; Xia, Y.; Xiong, Z.; Ai, L. Bile salt hydrolase-overexpressing *Lactobacillus* strains can improve hepatic lipid accumulation in vitro in an NAFLD cell model. *Food Nutr. Res.* 2020, 64.
48. Labbé, A.; Ganopolsky, J.G.; Martoni, C.J.; Prakash, S.; Jones, M.L. Bacterial bile metabolising gene abundance in Crohn's, ulcerative colitis and type 2 diabetes metagenomes. *PLoS ONE* 2014, 9, e115175.
49. Ogilvie, L.A.; Jones, B.V. Dysbiosis modulates capacity for bile acid modification in the gut microbiomes of patients with inflammatory bowel disease: A mechanism and marker of disease? *Gut* 2012, 61, 1642–1643.
50. Ma, C.; Han, M.; Heinrich, B.; Fu, Q.; Zhang, Q.; Sandhu, M.; Agdashian, D.; Terabe, M.; Berzofsky, J.A.; Fako, V.; et al. Gut microbiome-mediated bile acid metabolism regulates liver cancer via NKT cells. *Science* 2018, 360, eaan5931.
51. De Smet, I.; Van Hoorde, L.; Vande Woestyne, M.; Christiaens, H.; Verstraete, W. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 1995, 79, 292–301.
52. De Boever, P.; Wouters, R.; Verschaeve, L.; Berckmans, P.; Schoeters, G.; Verstraete, W. Protective effect of the bile salt hydrolase-active *Lactobacillus*

- reuteri against bile salt cytotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000, 53, 709–714.
53. Grill, J.P.; Cayuela, C.; Antoine, J.M.; Schneider, F. Isolation and characterization of a *Lactobacillus amylovorus* mutant depleted in conjugated bile salt hydrolase activity: Relation between activity and bile salt resistance. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 89, 553–563.
 54. Mendis, S.; Puska, P.; Norrving, B.; World Health Organization; World Heart Federation. *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2011; pp. 2–7.
 55. Jones, M.L.; Tomaro-Duchesneau, C.; Martoni, C.J.; Prakash, S. Cholesterol lowering with bile salt hydrolase-active probiotic bacteria, mechanism of action, clinical evidence, and future direction for heart health applications. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2013, 13, 631–642.
 56. Wang, G.; Huang, W.; Xia, Y.; Xiong, Z.; Ai, L. Cholesterol-lowering potentials of *Lactobacillus* strain overexpression of bile salt hydrolase on high cholesterol diet-induced hypercholesterolemic mice. *Food Funct.* 2019, 10, 1684–1695.
 57. Kriaa, A.; Bourgin, M.; Potiron, A.; Mkaouar, H.; Jablaoui, A.; Gérard, P.; Maguin, E.; Rhimi, M. Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism: Current status and future prospects. *J. Lipid Res.* 2019, 60, 323–332.
 58. Yoon, S.; Yu, J.; McDowell, A.; Kim, S.H.; You, H.J.; Ko, G. Bile salt hydrolase-mediated inhibitory effect of *Bacteroides ovatus* on growth of *Clostridium difficile*. *J. Microbiol.* 2017, 55, 892–899.
 59. Gu, X.C.; Luo, X.G.; Wang, C.X.; Ma, D.Y.; Wang, Y.; He, Y.Y.; Li, W.; Zhou, H.; Zhang, T.C. Cloning and analysis of bile salt hydrolase genes from *Lactobacillus plantarum* CGMCC No. 8198. *Biotechnol. Lett.* 2014, 36, 975–983.
 60. Sridevi, N.; Vishwe, P.; Prabhune, A. Hypocholesteremic effect of bile salt hydrolase from *Lactobacillus buchneri* ATCC 4005. *Food Res. Int.* 2009, 42, 516–520.
 61. Jones, M.L.; Martoni, C.J.; Prakash, S. Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: A randomized controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2012, 66, 1234–1241.
 62. Malpeli, A.; Taranto, M.; Cravero, R.; Tavella, M.; Fasano, V.; Vicentin, D.; Ferrari, G.; Magrini, G.; Hébert, E.; Valdez, G.; et al. Effect of Daily Consumption of *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 on Cholesterol Reduction in Hypercholesterolemic Subjects. *Food Nutr. Sci.* 2015, 6, 1583–1590.
 63. Prakash, S.; Jones, M.L.; Martoni, C. Bacterial Compositions for Prophylaxis and Treatment of Degenerative Disease. U.S. Patent 10,660,857, 26 May 2020.
 64. Castellana, J.C. *Lactobacillus plantarum* Strains as Hypocholesterolemic Agents. U.S. Patent 8,668,906, 11 March 2014.
 65. Zhen-Mei, L.; Mei-Gi, H.; Wen-Hsin, L. *Lactobacillus plantarum* bb9 Capable of Adhering to Gastrointestinal Tract and Cholesterol Removal. U.S. Patent 12/622,428, 19 May 2011.
 66. Rothschild, P.; Connolly, E.; Möllstam, B. Use of Selected Lactic Acid Bacteria for Reducing Atherosclerosis. U.S. Patent 11/786,356, 23 October 2008.

67. Liong, M.T.; Shah, N.P. Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. *Int. Dairy J.* 2005, 15, 391–398.
68. Parséus, A.; Sommer, N.; Sommer, F.; Caesar, R.; Molinaro, A.; Ståhlman, M.; Greiner, T.U.; Perkins, R.; Bäckhed, F. Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut* 2017, 66, 429–437.
69. Korpela, K.; Salonen, A.; Virta, L.J.; Kekkonen, R.A.; Forslund, K.; Bork, P.; de Vos, W.M. Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. *Nat. Commun.* 2016, 7, 10410.
70. Kim, B.; Park, K.Y.; Ji, Y.; Park, S.; Holzapfel, W.; Hyun, C.K. Protective effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG against dyslipidemia in high-fat diet-induced obese mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016, 473, 530–536.
71. Degirolamo, C.; Rainaldi, S.; Bovenga, F.; Murzilli, S.; Moschetta, A. Microbiota modification with probiotics induces hepatic bile acid synthesis via downregulation of the Fxr-Fgf15 axis in mice. *Cell Rep.* 2014, 7, 12–18.
72. Zhang, Z.; Mocanu, V.; Cai, C.; Dang, J.; Slater, L.; Deehan, E.C.; Walter, J.; Madsen, K.L. Impact of Fecal Microbiota Transplantation on Obesity and Metabolic Syndrome-A Systematic Review. *Nutrients* 2019, 11, 2291.
73. Allegretti, J.R.; Kassam, Z.; Mullish, B.H.; Chiang, A.; Carrellas, M.; Hurtado, J.; Marchesi, J.R.; McDonald, J.; Pechlivanis, A.; Barker, G.F.; et al. Effects of Fecal Microbiota Transplantation with Oral Capsules in Obese Patients. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2019, 18, 855–863.
74. Jarocki, P.; Podleśny, M.; Glibowski, P.; Targoński, Z. A new insight into the physiological role of bile salt hydrolase among intestinal bacteria from the genus *Bifidobacterium*. *PLoS ONE* 2014, 9, e114379.
75. Han, C.Y. Update on FXR Biology: Promising Therapeutic Target? *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 2069.
76. Kim, G.; Lee, B. Biochemical and Molecular Insights into Bile Salt Hydrolase in the Gastrointestinal Microflora—A Review. *Anim. Biosci.* 2005, 18, 1505–1512.
77. Bongaerts, G.P.; Severijnen, R.S.; Tangerman, A.; Verrips, A.; Tolboom, J.J. Bile acid deconjugation by *Lactobacilli* and its effects in patients with a short small bowel. *J. Gastroenterol.* 2000, 35, 801–804.
78. Choi, S.B.; Lew, L.C.; Yeo, S.K.; Nair Parvathy, S.; Liong, M.T. Probiotics and the BSH-related cholesterol lowering mechanism: A Jekyll and Hyde scenario. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2015, 35, 392–401.
79. Hooshyar, H.; Rostamkhani, P.; Arbabi, M.; Delavari, M. *Giardia lamblia* infection: Review of current diagnostic strategies. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench* 2019, 12, 3–12.
80. Thompson, R.A.; Monis, P. *Giardia*—From genome to proteome. *Adv. Parasitol.* 2012, 78, 57–95.
81. Gardner, T.B.; Hill, D.R. Treatment of giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001, 14, 114–128.
82. Ankarklev, J.; Jerlström-Hultqvist, J.; Ringqvist, E.; Troell, K.; Svärd, S.G. Behind the smile: Cell biology and disease mechanisms

- of *Giardia* species. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, 8, 413–422. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
83. Thompson, R.C.; Reynoldson, J.A.; Mendis, A.H. *Giardia* and giardiasis. *Adv. Parasitol.* 1993, 32, 71–160.
 84. Allain, T.; Amat, C.B.; Motta, J.P.; Manko, A.; Buret, A.G. Interactions of *Giardia* sp. with the intestinal barrier: Epithelium, mucus, and microbiota. *Tissue Barriers* 2017, 5, e1274354.
 85. Burgess, S.L.; Gilchrist, C.A.; Lynn, T.C.; Petri, W.A., Jr. Parasitic Protozoa and Interactions with the Host Intestinal Microbiota. *Infect. Immun.* 2017, 85, e00101-17.
 86. Barash, N.R.; Maloney, J.G.; Singer, S.M.; Dawson, S.C. *Giardia* alters commensal microbial diversity throughout the murine gut. *Infect. Immun.* 2017, 85, e00948-16.
 87. Torres, M.F.; Uetanabaro, A.P.T.; Costa, A.F.; Alves, C.A.; Farias, L.M.; Bambirra, E.A.; Penna, F.J.; Vieira, E.C.; Nicoli, J.R. Influence of bacteria from the duodenal microbiota of patients with symptomatic giardiasis on the pathogenicity of *Giardia duodenalis* in gnotoxenic mice. *J. Med. Microbiol.* 2000, 49, 209–215.
 88. Riba, A.; Hassani, K.; Walker, A.; van Best, N.; von Zeschwitz, D.; Anslinger, T.; Sillner, N.; Rosenhain, S.; Eibach, D.; Maiga-Ascofaré, O.; et al. Disturbed gut microbiota and bile homeostasis in *Giardia*-infected mice contributes to metabolic dysregulation and growth impairment. *Sci. Transl. Med.* 2020, 12, eaay7019.
 89. Allain, T.; Chaouch, S.; Thomas, M.; Travers, M.A.; Valle, I.; Langella, P.; Grellier, P.; Polack, B.; Florent, I.; Bermúdez-Humarán, L.G. Bile Salt Hydrolase Activities: A Novel Target to Screen Anti-*Giardia* Lactobacilli? *Front. Microbiol.* 2018, 9, 89.
 90. Pérez, P.F.; Minnaard, J.; Rouvet, M.; Knabenhans, C.; Brassart, D.; De Antoni, G.L.; Schiffrin, E.J. Inhibition of *Giardia intestinalis* by Extracellular Factors from Lactobacilli: An In Vitro Study. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 5037–5042.
 91. Humen, M.A.; De Antoni, G.L.; Benyacoub, J.; Costas, M.E.; Cardozo, M.I.; Kozubsky, L.; Saudan, K.Y.; Boenzli-Bruand, A.; Blum, S.; Schiffrin, E.J.; et al. *Lactobacillus johnsonii* La1 antagonizes *Giardia intestinalis* in vivo. *Infect. Immun.* 2005, 73, 1265–1269.
 92. Shukla, G.; Devi, P.; Sehgal, R. Effect of *Lactobacillus casei* as a probiotic on modulation of giardiasis. *Dig. Dis. Sci.* 2008, 53, 2671–2679.
 93. Shukla, G.; Sidhu, R.K. *Lactobacillus casei* as a probiotic in malnourished *Giardia lamblia*-infected mice: A biochemical and histopathological study. *Can. J. Microbiol.* 2011, 57, 127–135.
 94. Goyal, N.; Rishi, P.; Shukla, G. *Lactobacillus rhamnosus* GG antagonizes *Giardia intestinalis* induced oxidative stress and intestinal disaccharidases: An experimental study. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 29, 1049–1057.
 95. Shukla, G.; Kamboj, S.; Sharma, B. Comparative analysis of anti-giardial potential of heat inactivated and probiotic protein of probiotic *Lactobacillus*

- rhamnosus GG in murine giardiasis. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 2020, 12, 271–279.
96. Travers, M.A.; Florent, I.; Kohl, L.; Grellier, P. Probiotics for the control of parasites: An overview. *J. Parasitol. Res.* 2011, 2011, 610769.
 97. Vitetta, L.; Saltzman, E.T.; Nikov, T.; Ibrahim, I.; Hall, S. Modulating the Gut Micro-Environment in the Treatment of Intestinal Parasites. *J. Clin. Med.* 2016, 5, 102.
 98. Bustos, A.Y.; de Valdez, G.F.; Fadda, S.; Taranto, M.P. New insights into bacterial bile resistance mechanisms: The role of bile salt hydrolase and its impact on human health. *Food Res. Int.* 2018, 112, 250–262.
 99. Travers, M.A.; Sow, C.; Zirah, S.; Deregnaucourt, C.; Chaouch, S.; Queiroz, R.M.; Charneau, S.; Allain, T.; Florent, I.; Grellier, P. Deconjugated Bile Salts Produced by Extracellular Bile-Salt Hydrolase-Like Activities from the Probiotic *Lactobacillus johnsonii* La1 Inhibit *Giardia duodenalis* In vitro Growth. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 1453.
 100. Allain, T.; Chaouch, S.; Thomas, M.; Vallée, I.; Buret, A.G.; Langella, P.; Grellier, P.; Polack, B.; Bermúdez-Humarán, L.G.; Florent, I. Bile-Salt-Hydrolases from the Probiotic Strain *Lactobacillus johnsonii* La1 Mediate Anti-giardial Activity in Vitro and in Vivo. *Front. Microbiol.* 2018, 8, 2707.
 101. Smith, A.B.; Soto Ocana, J.; Zackular, J.P. From Nursery to Nursing Home: Emerging Concepts in *Clostridioides difficile* Pathogenesis. *Infect. Immun.* 2020, 88, e00934-19.
 102. Rupnik, M.; Wilcox, M.H.; Gerding, D.N. *Clostridium difficile* infection: New developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009, 7, 526–536.
 103. Lessa, F.C.; Winston, L.G.; McDonald, L.C.; Emerging Infections Program C. *difficile* Surveillance Team. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *N. Engl. J. Med.* 2015, 372, 2369–2370.
 104. Rineh, A.; Kelso, M.J.; Vatansever, F.; Tegos, G.P.; Hamblin, M.R. *Clostridium difficile* infection: Molecular pathogenesis and novel therapeutics. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2014, 12, 131–150.
 105. Zhu, D.; Sorg, J.A.; Sun, X. *Clostridioides difficile* Biology: Sporulation, Germination, and Corresponding Therapies for *C. difficile* Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018, 8, 29.
 106. Abt, M.C.; McKenney, P.T.; Pamer, E.G. *Clostridium difficile* colitis: Pathogenesis and host defence. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016, 14, 609–620.
 107. Francis, M.B.; Sorg, J.A. Dipicolinic Acid Release by Germinating *Clostridium difficile* Spores Occurs through a Mechanosensing Mechanism. *mSphere* 2016, 1, e00306-16.
 108. Francis, M.B.; Allen, C.A.; Shrestha, R.; Sorg, J.A. Bile acid recognition by the *Clostridium difficile* germinant receptor, CspC, is important for establishing infection. *PLoS Pathog.* 2013, 9, e1003356.
 109. Francis, M.B.; Allen, C.A.; Sorg, J.A. Spore cortex hydrolysis precedes dipicolinic acid release during *Clostridium difficile* spore germination. *J. Bacteriol.* 2015, 197, 2276–2283.

110. Sorg, J.A.; Sonenshein, A.L. Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. *J. Bacteriol.* 2008, 190, 2505–2512.
111. Buffie, C.G.; Bucci, V.; Stein, R.R.; McKenney, P.T.; Ling, L.; Gobourne, A.; No, D.; Liu, H.; Kinnebrew, M.; Viale, A.; et al. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* 2015, 517, 205–208.
112. Mullish, B.H.; McDonald, J.; Pechlivanis, A.; Allegretti, J.R.; Kao, D.; Barker, G.F.; Kapila, D.; Petrof, E.O.; Joyce, S.A.; Gahan, C.; et al. Microbial bile salt hydrolases mediate the efficacy of faecal microbiota transplant in the treatment of recurrent *Clostridioides difficile* infection. *Gut* 2019, 68, 1791–1800.
113. Weingarden, A.R.; Chen, C.; Bobr, A.; Yao, D.; Lu, Y.; Nelson, V.M.; Sadowsky, M.J.; Khoruts, A. Microbiota transplantation restores normal fecal bile acid composition in recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2014, 306, G310–G319.
114. van Nood, E.; Vrieze, A.; Nieuwdorp, M.; Fuentes, S.; Zoetendal, E.G.; de Vos, W.M.; Visser, C.E.; Kuijper, E.J.; Bartelsman, J.F.; Tijssen, J.G.; et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.* 2013, 368, 407–415.
115. Weingarden, A.R.; Dosa, P.I.; DeWinter, E.; Steer, C.J.; Shaughnessy, M.K.; Johnson, J.R.; Khoruts, A.; Sadowsky, M.J. Changes in Colonic Bile Acid Composition following Fecal Microbiota Transplantation Are Sufficient to Control *Clostridium difficile* Germination and Growth. *PLoS ONE* 2016, 11, e0147210.
116. Le Roy, T.; Lécuyer, E.; Chassaing, B.; Rhimi, M.; Lhomme, M.; Boudebouze, S.; Ichou, F.; Haro Barceló, J.; Huby, T.; Guerin, M.; et al. The intestinal microbiota regulates host cholesterol homeostasis. *BMC Biol.* 2019, 17, 94.
117. Beaugerie, L.; Kirchesner, J. Balancing Benefit vs. Risk of Immunosuppressive Therapy for Individual Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2019, 17, 370–379.
118. Staley, C.; Weingarden, A.R.; Khoruts, A.; Sadowsky, M.J. Interaction of gut microbiota with bile acid metabolism and its influence on disease states. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 101, 47–64.
119. Das, P.; Marcišauskas, S.; Ji, B.; Nielsen, J. Metagenomic analysis of bile salt biotransformation in the human gut microbiome. *BMC Genomics* 2019, 20, 517.
120. Heinken, A.; Ravcheev, D.A.; Baldini, F.; Heirendt, L.; Fleming, R.M.T.; Thiele, I. Systematic assessment of secondary bile acid metabolism in gut microbes reveals distinct metabolic capabilities in inflammatory bowel disease. *Microbiome* 2019, 7, 75.
121. Ringel, Y.; Chou, C.J.; Bruce, S.J.; Henry, H.; Lauber, C.; Betrisey, B.; Goun, E.; Ringel-Kulka, T. Reduced Bacteria-Derived Bile Salt Hydrolase Enzymatic Activity—A Possible Mechanism for Symptoms Severity in Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 2019, 156, S-235.
122. Duboc, H.; Rajca, S.; Rainteau, D.; Benarous, D.; Maubert, M.A.; Quervain, E.; Thomas, G.; Barbu, V.; Humbert, L.; Despras, G.; et al. Connecting

- dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut* 2013, 62, 531–539.
123. Chiang, J.Y.L. Bile acid metabolism and signaling in liver disease and therapy. *Liver Res.* 2017, 1, 3–9.
124. Ovadia, C.; Perdonés-Montero, A.; Fan, H.M.; Mullish, B.H.; McDonald, J.; Papacleovoulou, G.; Wahlström, A.; Ståhlman, M.; Tsakmaki, A.; Clarke, L.; et al. Ursodeoxycholic acid enriches intestinal bile salt hydrolase-expressing *Bacteroidetes* in cholestatic pregnancy. *Sci. Rep.* 2020, 10, 3895.
125. Manna, L.B.; Ovadia, C.; Lövgren-Sandblom, A.; Chambers, J.; Begum, S.; Seed, P.; Walker, I.; Chappell, L.C.; Marschall, H.U.; Williamson, C. Enzymatic quantification of total serum bile acids as a monitoring strategy for women with intrahepatic cholestasis of pregnancy receiving ursodeoxycholic acid treatment: A cohort study. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 2019, 126, 1633–1640.
126. Tabibian, J.H.; O'Hara, S.P.; Trussoni, C.E.; Tietz, P.S.; Splinter, P.L.; Mounajjed, T.; Hagey, L.R.; LaRusso, N.F. Absence of the intestinal microbiota exacerbates hepatobiliary disease in a murine model of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2016, 63, 185–196.

Chapitre 3 – Les objectifs scientifiques du projet de thèse

Les éléments scientifiques présentés dans les chapitres introductifs 1 et 2 démontrent la pertinence de considérer le microbiote intestinal comme un nouvel acteur du métabolisme du cholestérol. La recherche des facteurs impliqués dans la régulation de la cholestérolémie est essentielle notamment par l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles afin d'améliorer la prise en charge des pathologies associées aux MCVs. Ces analyses descriptives ont permis d'affiner notre compréhension des mécanismes potentiels impliquant le microbiote intestinal dans la régulation de la cholestérolémie. Plus précisément, la fixation du cholestérol, sa conversion en coprostanol et la voie des BSH des bactéries du microbiote intestinal semblent être des cibles intéressantes. Cependant, nous ne savons pas laquelle de ces voies métaboliques majeures se révèle la plus efficace pour moduler la cholestérolémie. Le but de ce projet de thèse est d'étudier l'impact du microbiote intestinal sur la cholestérolémie au travers de ces 3 voies métaboliques.

L'objectif de ce projet est de comprendre comment le microbiote intestinal contribue à gérer la cholestérolémie au moyen de ces activités métaboliques. Pour cela, il s'agira de répondre à 3 questions scientifiques qui constitueront les différentes tâches de ce travail de thèse (**Figure 12**) :

① Explorer plus globalement les effets de l'impact du microbiote intestinal sur le métabolisme du cholestérol.

Pour cela, il s'agira d'établir un modèle du métabolisme du cholestérol, en prenant en compte l'influence du microbiote intestinal. Par la suite, ce modèle prédictif permettra de déterminer

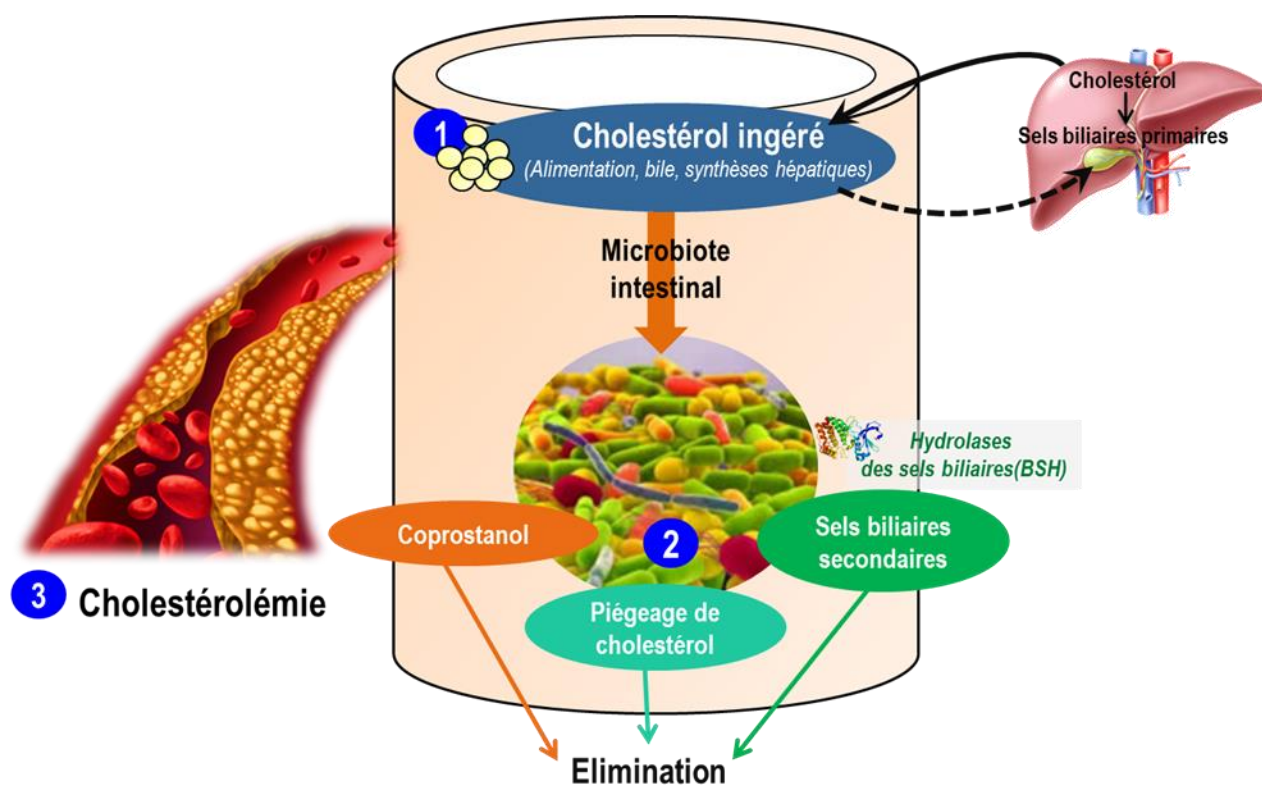


Figure 12 : Déterminer la contribution des activités du microbiote intestinal à la cholestérolémie

Les objectifs scientifiques sont de savoir ① Quel est la distribution de cholestérol dans l'organisme ? et d'identifier, ② Quelle activité bactérienne vis-à-vis des stérols, est la plus efficace pour diminuer la cholestérolémie ? et , ③ Est-ce que le microbiote peut être considéré comme une approche alternative aux traitements existants pour traiter l'hypercholestérolémie ?

si le cholestérol présent dans l'intestin est suffisamment biodisponible pour être métabolisé par le microbiote intestinal. Ce modèle reproduit la dynamique de la cholestérolémie à l'échelle de l'individu, en incluant l'activité du microbiote intestinal à travers ces activités métaboliques les plus décrites. Cet objectif sera traité dans le **chapitre 5 : article 1 de thèse**.

② Sélectionner la voie métabolique microbienne la plus efficace pour moduler la cholestérolémie.

A partir d'une collection de bactéries commensales isolées à partir du microbiote intestinal humain, il s'agira de sélectionner pour chacune des 3 voies métaboliques (fixation, conversion en coprostanol, BSH) une bactérie ayant l'efficacité la plus importante et ce, par des approches *in vitro*. Puis, il s'agira de tester chacune de ces bactéries sélectionnées en utilisant un modèle souris possédant un microbiote humain neutre vis à vis de ces activités microbiennes envers les stérols. Ceci permettra d'établir l'impact de chacune des activités bactériennes sur la cholestérolémie de l'hôte. L'activité bactérienne qui présente le potentiel hypocholestérolémiant *in vivo* le plus efficace, sera sélectionnée comme bactérie commensale candidate. Cette question sera traitée dans le chapitre 6 : article 2 de thèse.

③ Évaluer si la bactérie commensale candidate peut être considérée comme une alternative biothérapeutique efficace pour diminuer la cholestérolémie dans un modèle plus proche de l'homme.

Cette étude propose d'estimer le potentiel biothérapeutique préventif de cette bactérie candidate dans un contexte pathologique, à l'aide d'un modèle lapin présentant une hypercholestérolémie, associée aux premiers stades de développement de l'athérosclérose. Cette question sera abordée dans le **chapitre 6 : article 2 de thèse**.

Chapitre 4 – Les stratégies expérimentales

Ce nouveau chapitre offre une vue d'ensemble générale et rationnelle sur la méthodologie expérimentale élaborée dans ce projet visant à explorer les activités du microbiote intestinal qui challenge la cholestérolémie. Les informations du matériel et des méthodes sont décrites de façon plus précises et approfondies dans le chapitre 5 et 6, correspondant à l'**article 1** et à l'**article 2**.

1. Design expérimental du projet de thèse

Un récapitulatif de la démarche de ce travail est présenté ci-dessous (**Figure 13**).

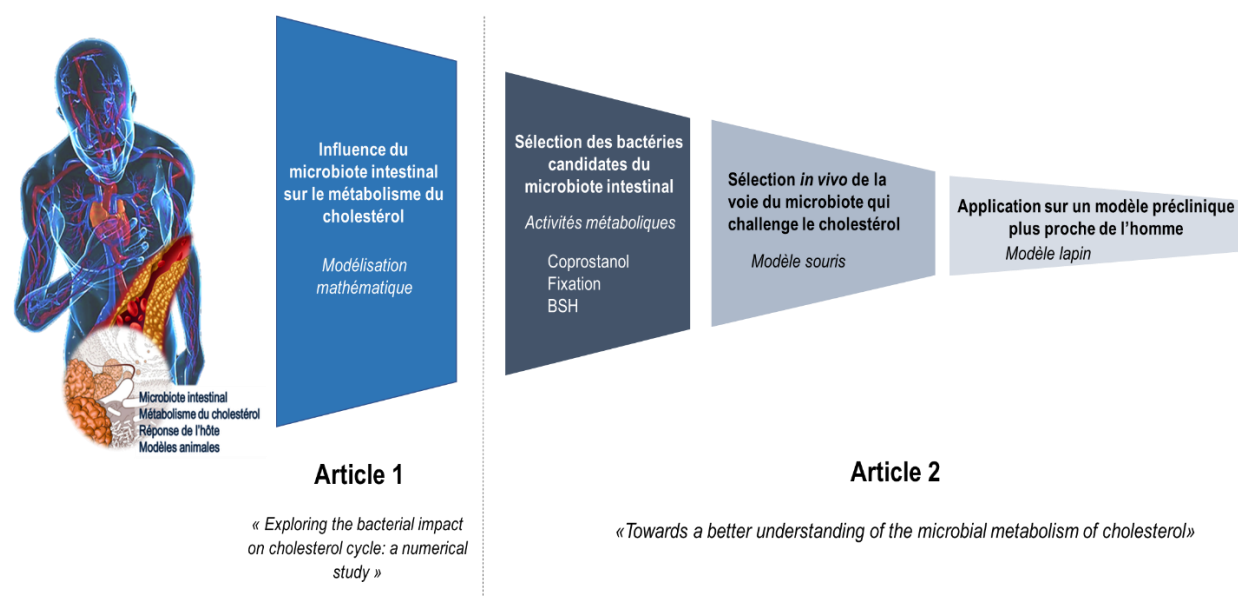


Figure 13 : Une vue globale de la démarche expérimentale de ce projet de thèse.

Les études présentées dans cette de thèse visent à intégrer l'ensemble des connaissances de l'étude de l'impact du microbiote intestinal dans le métabolisme du cholestérol. L'étude de l'article 1 conduit à identifier si le microbiote intestinal influence le métabolisme du cholestérol. L'article 2 regroupe un ensemble d'objectifs scientifiques progressifs qui aboutit à l'identification de la voie métabolique du microbiote intestinal qui modifie le métabolisme du cholestérol et valide l'effet de la bactérie candidate dans des modèles *in vivo* préclinique plus proche de l'homme.

2. Impact du microbiote intestinal sur le métabolisme : validation mathématique

Notre compréhension limitée du métabolisme microbien du cholestérol chez l'homme et sa complexité rendent difficile à associer ses fonctions métaboliques et son impact sur la cholestérolémie. De nouvelles approches basées sur la biologie des systèmes peuvent nous aider à renforcer cette vision mécanistique de cette interaction dynamique entre l'écosystème intestinal dynamique avec son hôte. Pour répondre à notre premier objectif scientifique, cette approche systémique par la mise en place de modèle mathématique a été proposée pour regrouper un ensemble d'entités biologiques, qui régulent la cholestérolémie, incluant le microbiote intestinal. Ce premier article apporte un premier aspect conceptuel de l'impact du microbiote intestinal sur la cholestérolémie de l'hôte.

2.1. *Le modèle mathématique du métabolisme du cholestérol*

L'utilisation de modèles mathématiques permet de prédire et d'instaurer une distribution du métabolisme du cholestérol chez l'homme. Cependant, aucun de ces modèles répertoriés inclut les paramètres de la dynamique du métabolisme du cholestérol par le microbiote intestinal. En collaboration avec l'équipe MaIAGE (Mathématiques et Informatique Appliquées du génome à l'Environnement, S. Labarthe et B. Laroche), le modèle est actualisé à partir de nouveaux paramètres (McAuley *et al.*, 2012 ; Van De Pass *et al.*, 2011). L'assemblage de notre modèle, nous a permis d'identifier des équations différentielles ordinaires (ODE). Ces ODE illustrent l'ensemble des composantes biologiques essentielles, associées au microbiote intestinal (e.g. biosynthèse de cholestérol dans l'intestin, apport de cholestérol alimentaire en fonction des repas), qui impactent sur la cholestérolémie de l'hôte. Ce choix de modèle estime les principaux mécanismes impliqués dans la régulation de la cholestérolémie au cours du temps.

2.2. *La modélisation des activités du microbiote intestinal influençant la cholestérolémie*

Ce modèle évalue la contribution des activités métaboliques du microbiote intestinal à travers des populations microbiennes commensales sélectionnées pour leur capacité à mimer *in vitro* le métabolisme microbien du cholestérol. Spécifiquement, une dynamique de l'écosystème intestinal a été modélisée à travers la croissance bactérienne et ses activités métaboliques *in vitro* dans un

environnement similaire à celui de l'intestin. Seules, les activités du microbiote intestinal les plus décrites dans la littérature ont été introduites dans ce modèle. L'activité BSH est représentée à travers l'étude de la bactérie *Bacteroides xylanisolvens* XB1A et l'activité de production de coprostanol à travers la bactérie *Bacteroides sp. D8*. Ces deux bactéries commensales sont intégrées dans notre modèle mathématiques via des populations bactériennes fonctionnelles impliquées dans l'activité BSH à travers : i) ses activités de déconjugaison des sels biliaires primaires, notées PBSB (PBSB, *primary-bile-salts deconjugation*) et ii) celle responsable de la conversion de cholestérol en coprostanol, notée CCC (CCC, *cholesterol-to-coprostanol conversion*). Ces données expérimentales relatives au microbiote intestinal, ont été intégrées dans notre modèle et connectées à l'ensemble des paramètres biologiques qui régissent la cholestérolémie de l'hôte.

2.2.1. Les bactéries et les tests d'activités BSH et de production de coprostanol

Bacteroides xylanisolvens XB1A et *Bacteroides sp. D8* ont été cultivées dans un milieu de culture standard, le milieu BHI supplémenté. Toutes les cultures ont été cultivées à 37°C en conditions anaérobies pendant 24 h. Pour modéliser l'activité BSH de la bactérie *Bacteroides xylanisolvens* XB1A, l'effet des acides biliaires sur la croissance bactérienne a été testé dans un milieu BHI complété par 1 et 30 mM d'un mixte de sels biliaires. Pour la préparation du lysat cellulaire, les culots ont été lavés deux fois dans un tampon phosphate de sodium de 100 mM à pH 6,5 et remis en suspension dans le même tampon. La lyse cellulaire a été réalisée par sonication à 4°C pendant 1 min (trois cycles d'impulsions de 10 s à une amplitude de 40%) à l'aide d'un sonificateur Vibra-Cell TM 72408 ; ensuite, les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation (12 000 g, 30 min à 4°C). La concentration en protéines a été déterminée au Nanodrop. L'activité du BSH a été mesurée par la détermination de la quantité de résidus d'acides aminés libérés en utilisant deux BS comme indiqué précédemment (Tanaka *et al.*, 1999). Dans des conditions standard, le mélange réactionnel contenait 50 µL de préparation enzymatique à une dilution appropriée (10mM ou 1mM), de SB conjugué à la glycine ou à la taurine avec 10 mmol/L de phosphate de sodium pH 6,5. Le volume réactionnel est de 1 mL. Pour l'activité de production de coprostanol à travers *Bacteroides sp. D8*, l'extraction des stérols a été réalisée à été réalisée à partir de 1 mL de culture puis les échantillons ont été analysés par GC-MS selon la méthode décrite par Gérard *et al.* (Gérard *et al.*, 2007).

2.2.2. La modélisation mathématique des souches bactériennes, *Bacteroides xylanisolvens* XB1A et *Bacteroides* sp. D8

Les systèmes dynamiques décrivant la croissance bactérienne et la dynamique de la concentration des métabolites ont été réalisés à partir des tests de croissance de *Bacteroides xylanisolvens* XB1A et de *Bacteroides* sp D8. Une équation différentielle ordinaire (ODE) a été conçue pour modéliser la croissance de *Bacteroides* sp. D8 et de *Bacteroides xylanisolvens* XB1A. Ces données expérimentales ont été incorporées au modèle mathématique.

2.2.3. Distribution du cholestérol au sein de l'organisme

A partir de notre objectif scientifique et notre modèle mathématique actualisé, certaines données qualitatives des modèles préexistants dans la littérature propre à l'étude de notre thématique sont absentes et indispensables à la mise en place de notre modèle. C'est pour cette raison qu'il est nécessaire de déterminer la quantité de cholestérol distribuée dans l'ensemble de l'organisme, notamment biodisponible pour le microbiote intestinal. Dans cette optique, nous avons déterminé la distribution de cholestérol marqué dans les compartiments physiologiques de la souris (**Figure 14**).

2.2.3.1. Animaux et design expérimental

Un groupe expérimental de souris conventionnels mâles C57BL/6J, EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique), âgées de onze semaines (Laboratoire Janvier, Le Gesnest, St Isle, France), sont maintenues dans nos animaleries (INRA, UMR1319 Micalis, Anaxem). Tout au long de la période expérimentale, les souris ont bénéficié d'un accès libre à l'eau et d'un régime alimentaire standard contenant 0,02 % de cholestérol (SAFE, R03-40). Pour limiter la coprophagie²⁸ pendant l'étude, les animaux ont été logés dans des cages métaboliques individuelles à fond grillagé. Toutes les procédures ont été effectuées conformément aux règles de la Communauté européenne et approuvées par le Comité d'éthique (C2E-45 COMETHEA) avec le numéro d'autorisation A78-322-6.

²⁸ La **coprophagie** désigne un comportement animal qui consiste à consommer des matières fécales. Ce comportement est un mode d'alimentation normal, souvent complémentaire, pour de nombreux animaux, qui joue un rôle essentiel dans les mécanismes de métabolisation et de recyclage de la matière organique.

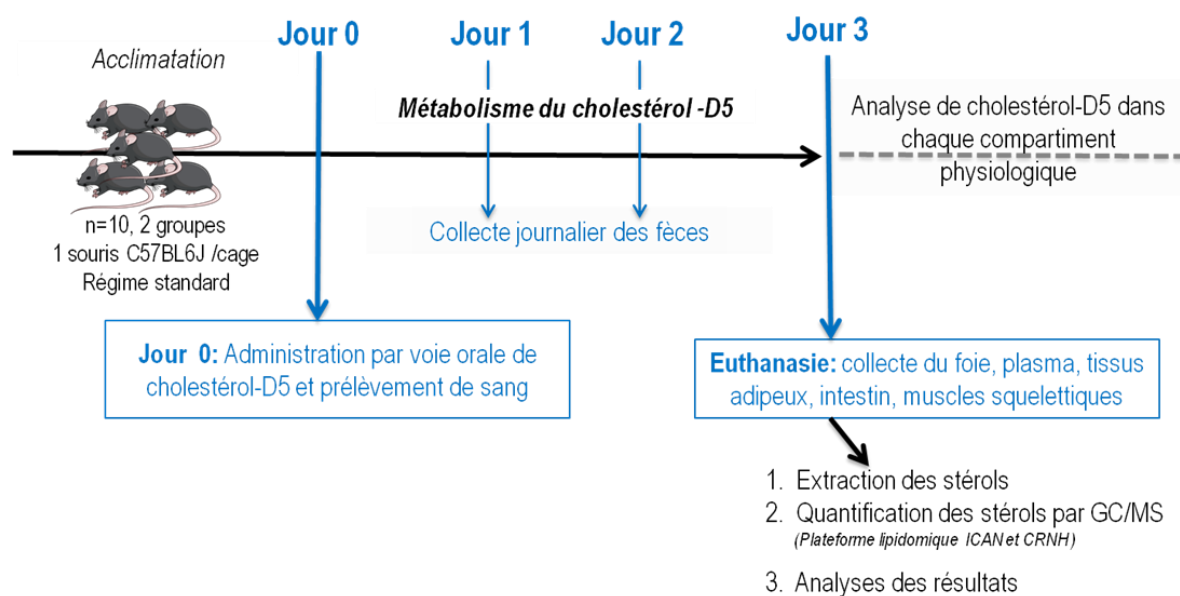


Figure 14 : La procédure expérimentale 1 pour établir la distribution de cholestérol dans l'organisme

Brièvement, un groupe expérimental de souris ($n = 6$) reçoit une dose de cholestérol deutéré – D5 par voie oro-gastrique pour analyser le devenir de cette molécule *in vivo*. Un groupe de souris témoins reçoit la solution dépourvue de cholestérol deutéré. La durée de l'expérience est de 3 jours, temps nécessaire à l'absorption totale du cholestérol deutéré dans les principaux compartiments physiologiques. Après 3 jours, les fèces ont été récupérées pour la quantification des stérols ($n = 3$). Des échantillons des compartiments physiologiques ont été prélevés après l'euthanasie des animaux à savoir : sang, foie, intestin (Duodénum, jéjunum, iléon, cæcum, contenu caecal, côlon, fèces), tissus adipeux, muscle squelettique. A partir de ces tissus, la quantification de cholestérol marqué est réalisée par la méthode d'extraction des stérols qui suit la méthode décrite par Folch (**Folch *et al.*, 1957**). Les échantillons sont analysés par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) par les ingénieurs experts de la plateforme spécialisée, la plateforme ICAnalytics de lipidomique à l'institut de cardiométabolisme et de nutrition (ICAN). Ces données expérimentales seront intégrées à notre modèle mathématique du métabolisme du cholestérol chez la souris. Elles seront utilisées afin d'évaluer le potentiel du microbiote intestinal sur le métabolisme du cholestérol.

3. Démarche expérimentale Article 2

L'article 2 de thèse regroupe plusieurs axes qui amènent progressivement à identifier la voie métabolique du microbiote la plus efficace pour challenger la cholestérolémie et ses troubles associés. Pour répondre à ces deux derniers objectifs scientifiques, la mise en place d'approche *in vitro* et de modèles *in vivo* déterminés, a été proposée. Ce second article apporte plus de connaissances concernant l'impact du microbiote intestinal sur la cholestérolémie de l'hôte.

3.1. Sélection des bactéries commensales représentatives des 3 voies métaboliques du cholestérol

Le milieu d'infusion cerveau-cœur (BHIS) complété par un extrait de levure (0,5 %, Difco), de l'hémine (0,5 mg/mL ; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), maltose (0,5 mg/mL ; Sigma-Aldrich), cellobiose (0,5 mg/mL ; Sigma-Aldrich), la cystéine (0,5 mg/mL ; Sigma-Aldrich) et la vitamine K1 (0,098 mg/L ; Sigma-Aldrich) a été choisi pour cultiver nos bactéries d'intérêt. La sélection des bactéries commensales anaérobies est effectuée à partir d'une collection répertoriée,

antérieurement isolée à partir du microbiote intestinal humain d'un individu sain. Des travaux préliminaires de criblages des activités métaboliques ont permis d'identifier les meilleures bactéries commensales suivant leur capacité à convertir le cholestérol en coprostanol et leur activités BSH (Potiron, 2017 ; Bourgin, 2016). Brièvement, la capacité de production de coprostanol de chaque bactérie commensale d'intérêt a été testée selon la méthode rapportée par Gérard *et al.*, (Gérard *et al.*, 2007). L'activité BSH a été réalisée à partir du protocole établi, suivant les procédures précédemment décrites (Tanaka *et al.*, 1999). Pour finir, la voie de fixation du cholestérol a été testée via la méthode d'assimilation de cholestérol sous des conditions qui simulent l'environnement intestinal (présence de sels biliaires, de cholestérol en condition d'anaérobiose) (Pereira et Gibson, 2002 ; Tomaro-Duchesneau *et al.*, 2014).

Afin d'évaluer les trois activités métaboliques vis-à-vis du cholestérol, une activité de référence connue a été utilisée comme témoin positif pour établir le potentiel métabolique de nos bactéries candidates, et ceci pour chacune des voies métaboliques de ce travail : *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 pour la voie BSH, *Bacteroides* sp. D8., pour la voie de production de coprostanol et *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 pour celle de la fixation du cholestérol (Jones *et al.*, 2012 ; Gérard *et al.*, 2007 ; Potiron, 2017 ; Tomaro-Duchesneau *et al.*, 2014).

Tableau 4 : Les bactéries représentatives des voies métaboliques du microbiote intestinal vis-à-vis des stérols

Voie métabolique microbienne du cholestérol	Désignation	Références
BSH	AS99	Dans ce travail
Production de coprostanol	AS147	Dans ce travail
Fixation du cholestérol	AS113	Dans ce travail

À partir de ces résultats précédents, des critères de sélections indispensables ont permis de choisir les bactéries candidates : *i*) Une forte activité métabolique vis-à-vis des stérols, soit pour le cholestérol ou pour les sels biliaires, *ii*) une activité vis-à-vis d'un stérol est sélectionnée, si elle présente une activité faible vis-à-vis des autres stérols, *iii*) Les bactéries possédant cette activité

d'intérêt doivent présenter une facilitée de culture (e.g. biomasse bactérienne suffisante, lyse bactérienne minimisée lors de la croissance bactérienne), et *iv*) l'assignation taxonomique de la bactérie doit être confirmée. L'espèce ne doit pas être associée à des effets néfastes pour la santé de l'hôte. Ces derniers critères, nous permettent de sélectionner la bactérie commensale sur la base de son efficacité métabolique la plus importante vis-à-vis du cholestérol et de ses dérivés, et ceci pour chacune des 3 activités du microbiote intestinal (fixation, conversion en coprostanol, BSH) (**Tableau 4**). A partir de ces données expérimentales *in vitro*, l'effet de différentes activités du microbiote intestinal sur la cholestérolémie sera testé *in vivo*.

3.2. Sélection du microbiote intestinal humain d'un donneur sain présentant un profil métabolique neutre vis-à-vis des stérols

La sélection d'un microbiote intestinal humain qui présente des activités métaboliques vis-à-vis des stérols est réalisé à la base des travaux antérieurs (**Bourgin et al., 2017 ; Le Roy et al., 2019**). Ces résultats ont permis d'identifier des profils de distribution des activités des stérols faibles du microbiote intestinal. Brièvement, l'activité BSH totale et de production de coprostanol ont été déterminées à partir de prélèvements fécaux d'individu sains selon la méthode de Tanaka *et al.*, et Gérard *et al.*, respectivement (**Tanaka et al., 1999 ; Gérard et al., 2007**). Des critères de sélections indispensables ont permis de sélectionner le donneur humain : i) l'absence d'atteintes physiopathologiques, ii) une absence de prise de traitement antibiotique précédant les trois mois, iii) une activité vis-à-vis BSH et une production de coprostanol faible, iv) une disponibilité facile en vue des prélèvements fécaux pour réaliser les FMT avec du matériel frais, pendant l'expérimentation animale.

3.3. Détermination de la voie du microbiote qui challenge la cholestérolémie

Pour tester l'impact des activités du microbiote intestinal sur la cholestérolémie, une première procédure expérimentale a été mise en place.

3.3.1. Préparation de la solution fécale pour la FMT

Les préparations de la solution fécale ont été réalisées suivant les recommandations de bonnes pratiques cliniques (**Camarota et al., 2017**). Brièvement, les selles de l'individu humain

sélectionné, ont été fraîchement prélevées dans une boîte anaérobie puis transférées dans un environnement en condition d'anaérobie (chambre de Freter réservée à la manipulation de matière fécale, 90 % N₂, 5 % H₂, 5 % CO₂). Elles sont ensuite pesées et diluées : 1 g de selles est prélevé et homogénéisé chimiquement dans une solution de Ringer stérile réduite (0,9 % de NaCl, PBS contenant 0,5 g/L de L-Cystéine, Sigma). Cette solution est ensuite homogénéisée mécaniquement dans un blender. La suspension fécale est filtrée, puis centrifugée à 6 000 × g pendant 15 minutes. Cette solution est ensuite transportée dans une boîte anaérobie jusqu'à l'animalerie et introduite dans les isolateurs. La préparation a ensuite été inoculée (200 µL par souris) par un gavage oro-gastrique aux souris. Cette opération est répétée à chaque fois, toutes les 48 heures d'intervalle pendant la semaine 5 et 6 (**Figure 14**).

3.3.2. Préparation des bactéries commensales

Les bactéries candidates utilisées dans cette étude (**Tableau 4**), ont été cultivées à 37°C dans une chambre anaérobie pendant 16 heures, correspondant à leur début de leur phase exponentielle. Les culots cellulaires ont été obtenus par centrifugation à 4 500 × g pendant 20 min à 4°C. La suspension cellulaire pour administration orale a été préparée en mettant en suspension les cellules bactériennes cultivées dans du PBS réduit avec une densité cellulaire finale de 1 × 10⁹ UFC par mL. La solution contenant les 3 bactéries commensales, est préparée à partir de ces trois cultures indépendantes et rassemblées au dernier moment pour obtenir la solution bactérienne de synergie. De la même façon, une solution fraîche de 20 mg/mL de rosuvastatine est préparée dans du PBS réduit (Rosuvastatine, Sigma). L'ensemble de ces opérations sont répétées chaque jour, six jours sur sept, chaque semaine, de la semaine 5 à la semaine 15 (**Figure 14**). Les solutions fraîchement préparées sont ensuite transportées jusqu'à l'animalerie dans une boîte anaérobie. Elles sont réparties dans les isolateurs et administrées par voie oro-gastrique (200 µL) quotidiennement aux souris.

3.3.3. Les animaux

Cette procédure expérimentale a été réalisée à partir de 60 souris C57BL/6J conventionnels, EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique), âgées de neuf semaines et de la souche C57BL/6J (Laboratoire Janvier, Le Genest St Isle, France). Les souris C57BL/6J

s'avèrent être la souche de souris la plus utilisée pour l'analyse du métabolisme du cholestérol, l'étude de l'effet du microbiote intestinal et pour leurs susceptibilités aux troubles hypercholestérolémiques induits par l'alimentation (**Belsh et al., 2013 ; Safari et al., 2020**). Cette première procédure a été réalisée dans une animalerie spécialisée, dans un environnement contrôlé, en isolateurs à la plateforme Anaxem, spécialisée dans l'étude du dialogue entre les microbiotes commensaux et leur hôte (plateforme de l'institut MICALIS, INRAE, Jouy- en- Josas). Les animaux ont été placés en isolateurs stériles ventilés avec de l'air stérile filtré par HEPA. À l'intérieur des isolateurs, les animaux sont logés dans des cages collectives (5 souris/cages) contenant une litière stérile faite de copeaux de bois. Les souris ont été acclimatées pendant une semaine avant le début des expériences et avaient accès libre à l'eau autoclavée et à un régime standard γ -irradié (45 kGy) (TD.01383, Envigo). Les animaux ont été pesés individuellement et identifiés par micropuces. La salle des animaux a été maintenue à une température de 20-24°C et à un cycle lumière/obscurité de 12 h.

3.3.4. La procédure d'expérimentation animale

Cette procédure a été réalisée en stricte conformité avec les lignes directrices pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire agréés par les autorités vétérinaires françaises (Agrément de l'Etablissement utilisateur numéro 78-3226). Cette procédure expérimentale (**Figure 15**) a été approuvée par le Ministère français de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS #14946- 2017021412338668). Après une semaine d'acclimatation, les selles des souris ont été récoltées individuellement. À partir de la semaine 3, elles ont reçu dans l'eau potable autoclavée une combinaison d'antibiotiques à large spectre pendant 2 semaines (Ampicilline 1 mg/kg, néomycine 100 mg/kg, vancomycine 50 mg/kg et métronidazole 100 mg/kg), pour dépler leur microbiote initial (**Hintze et al., 2014**). Une attention particulière est prise au niveau de la litière et de la nourriture irradiée, remplacées toutes les 48 heures. À la fin de cette période, une détection de la charge bactérienne a été effectuée pour s'assurer de l'absence totale de bactéries détectables dans les fèces. A la 3^{ème} semaine, les selles des individus humains sélectionnés ont été fraîchement prélevées, préparées puis inoculées (200 μ L par souris) par quatre gavages répétés à 48 heures d'intervalle pendant la semaine 5 et 6 (**Figure 15**). Tous les groupes de souris ont reçu le microbiote fécal de l'individu sain et ont été maintenu pendant 10 semaines.

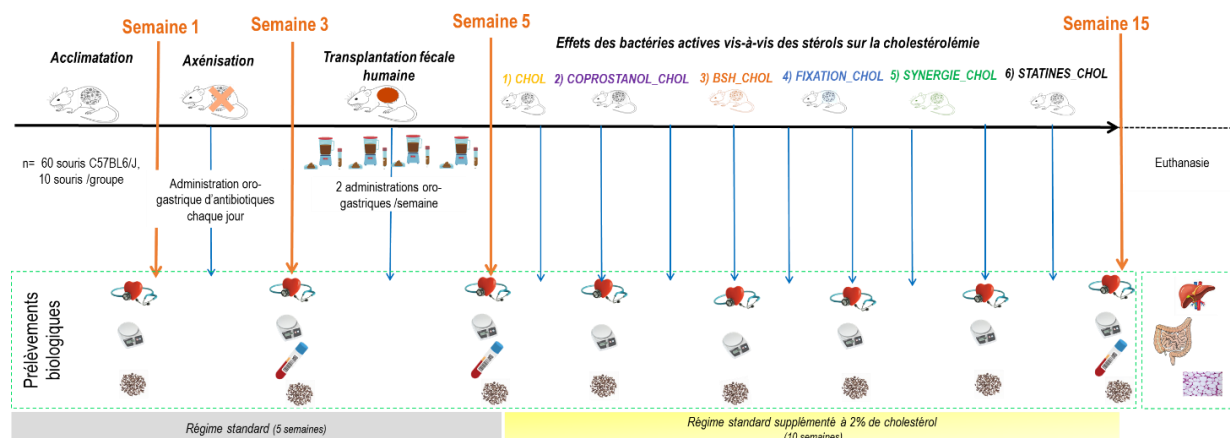






Figure 15 : La procédure expérimentale pour sélectionner la voie métabolique du microbiote intestinal la plus efficace pour challenger la cholestérolémie.

L'expérience a été réalisée sur six groupes composés chacun de 10 souris mâles C57BL/6J, EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique) traitées aux antibiotiques. L'ensemble des animaux ont reçu une transplantation fécale humaine d'un donneur humain, sain, caractérisé par une faible production de coprostanol et d'activité BSH. Ce microbiote sera implanté par transplantation fécale chez six groupes de souris axénisées par un traitement d'antibiotiques. Cette étape permet l'établissement d'un modèle murin humanisé qui présente un profil microbien métabolique neutre vis-vis du cholestérol et de ses dérivés, mimant un environnement de l'écosystème intestinal à la fois complexe et contrôlé, pour optimiser l'effet de nos voies métaboliques d'intérêts. Durant cette période, les souris seront sous régime standard. Suite à l'implantation de ce microbiote, les souris humanisées reçoivent indépendamment les bactéries candidates par voie oro-gastrique chaque jour, comme suit : (1) Groupe 1 receveur de microbiote sain sur régime alimentaire témoin standard supplémenté en cholestérol (2 %), recevant la solution de préparation commune à chaque groupe dépourvu de bactéries/de traitement (CHOL) ; (2) Groupe receveur de microbiote sain, recevant la bactérie commensale productrice de coprostanol, AS 147 (COPROSTANOL_CHOL) ; (3) Groupe 3 receveur de microbiote sur régime standard supplémenté en CHOL, recevant la bactérie commensale dotée d'une forte activité BSH, AS 99 (BSH_CHOL) ; (4) Groupe receveur de microbiote sain, recevant la bactérie commensale présentant la meilleure capacité à fixer le cholestérol, AS 113 recevant la bactérie commensale productrice de coprostanol, AS 147 (FIXATION_CHOL) ; (5) Groupe receveur de microbiote sain, recevant les 3 bactéries commensales (AS147, AS99, AS113) pour tester l'effet synergique des voies du microbiote intestinal (SYNERGIE_CHOL) ; (6) Groupe receveur de microbiote sain, recevant une statine (20 mg/mL), un traitement pharmacologique de référence pour limiter l'augmentation de la cholestérolémie et de comparer in fine l'efficacité des approches passant par le microbiote versus ce traitement ciblant la physiologie de l'hôte (STATINES_CHOL). Après dix semaines d'expérimentation, l'euthanasie des animaux et la collecte des compartiments biologiques sont réalisées : foie, intestin, tissus adipeux. CHOL, régime standard supplémenté en cholestérol pendant une durée de 10 semaines ; Examens cliniques

réalisé ;  Pesée des animaux ;  transplantation fécale humaine d'un donneur humain sain, caractérisé par un faible potentiel vis-à-vis des stérols ;  prélèvements de sang et  de fèces. L'évaluation de l'effet des bactéries sur le métabolisme du cholestérol est réalisée (dosage de cholestérol, histologie). À partir de ces résultats, la bactérie candidate sera sélectionnée pour évaluer son potentiel thérapeutique dans un modèle expérimental plus élaboré.

De la 3^{ème} semaine jusqu'à la fin de l'expérience, les six groupes de souris ont été nourris *ad libitum* pendant 10 semaines avec un régime standard supplémenté par 2 % de cholestérol irradié à 45 kGy (CHOL), pour induire une hypercholestérolémie (TD.01383 + 2 % de cholestérol). Chaque groupe de souris reçoit par voie oro-gastrique, une bactérie précédemment sélectionnée : **(1)** Groupe 1, recevant la solution de PBS commune à chaque groupe dépourvu de bactéries/de traitement (CHOL) **(2)** Groupe 2, recevant la bactérie commensale productrice de coprostanol, AS 147 (COPROSTANOL_CHOL) ; **(3)** Groupe 3, recevant la bactérie commensale dotée d'une forte activité BSH, AS 99 (BSH_CHOL) ; **(4)** Groupe 4, recevant la bactérie commensale présentant la meilleure capacité à fixer le cholestérol, AS 113 (FIXATION_CHOL) ; **(5)** Groupe 5, recevant les trois bactéries commensales (AS147, AS99, AS113) pour tester l'effet synergique des voies du microbiote intestinal (SYNERGIE_CHOL) ; **(6)** Groupe 6, recevant une statine (Rosuvastatine, 20 mg/mL), un traitement pharmacologique de référence pour limiter l'augmentation de la cholestérolémie. Ce témoin permet de comparer *in fine* l'efficacité des approches passant par le microbiote *versus* ce traitement ciblant la physiologie de l'hôte (STATINES_CHOL).

3.3.5. Les mesures *in vivo* de la procédure expérimentale

Pendant le protocole expérimental, le poids corporel, la consommation d'aliments et de boisson, un examen clinique sur l'état du bien-être animal sont contrôlés. Les fèces et le sang des souris ont été collectées individuellement à chaque période de la procédure expérimentale (**Figure 15**).

3.3.6. Le prélèvement des tissus biologiques

Après 10 semaines d'administration oro-gastrique des bactéries d'intérêts, les animaux ont été euthanasiés à la fin de la 15^{ème} semaine de la procédure. Un dernier prélèvement de sang a été réalisé sous anesthésie, avant leur euthanasie par dislocation cervicale. Le foie, l'intestin (duodénum, iléon, jéjunum, cæcum, côlon), et le tissu adipeux ont ensuite été prélevés et conservés à - 80 °C (**Figure 14**).

3.3.7. Les analyses biochimiques

Les niveaux de cholestérol total (Chol-T), de triglycérides (TG), de phospholipase (PL), de cholestérol libre (Chol-L), de cholestérol lié aux lipoprotéines de haute densité (HDL-Chol), de cholestérol lié aux lipoprotéines de basse densité (LDL-Chol), ont été mesurés au sein de la plateforme de spectrométrie de masse du Centre de recherche en nutrition humaine de l'Ouest (CRNH-Ouest, Nantes), suivant la méthode préalablement décrite (**Lambert *et al.*, 2008**).

3.3.8. Les analyses statistiques

Pour toutes les analyses et pour chaque groupe, les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM (*Standard Error Mean*, l'erreur type à la moyenne). Pour les comparaisons multiples, l'analyse statistique a été effectuée au moyen d'un test ANOVA à sens unique ou à double sens, suivie des tests de comparaison multiple de Tukey avec le logiciel GraphPad 6.0. $p < 0.05$ a été considéré comme statistiquement significatif.

3.4. Évaluation du potentiel préventif de notre bactérie candidate sur un modèle lapin plus proche de l'homme

Ce précédent objectif scientifique a permis de sélectionner la voie bactérienne qui challenge le mieux la cholestérolémie chez des souris saines soumises à un régime riche en cholestérol. La dégradation du cholestérol par cette voie bactérienne pourrait contribuer à l'élimination du cholestérol de l'organisme, et ainsi limiter la cholestérolémie et le développement de l'athérosclérose. L'objectif de cette nouvelle procédure est d'évaluer cette voie bactérienne du microbiote pour challenger, de manière préventive, la cholestérolémie dans un modèle préclinique plus proche de l'homme. Le lapin Néo-zélandais a été choisi et soumis à un régime supplémenté en cholestérol. Le deuxième objectif est l'évaluation de l'effet potentiel de cette activité bactérienne au niveau de simple lésions athérogéniques retrouvées dans l'athérosclérose (plaque d'athérome). Cette approche globale permet de mieux appréhender le potentiel de la bactérie candidate dans un contexte pathologique avec le modèle lapin. La force de ce modèle animal préclinique est identifié par la présence de lésions pathologiques initiales (plaques au niveau des artères) identiques à celles observées dans l'évolution de l'athérosclérose chez l'homme,

particulièrement lors des premiers stades de l'athérosclérose, associés à une perturbation du métabolisme du cholestérol (**Phinikaridou et al., 2010 ; Lin et al., 2017**).

3.4.1. Préparation de la bactérie candidate

La bactérie candidate, AS99, représentant la voie BSH est sélectionnée dans cette procédure. Elle a été cultivée de la même façon que la précédente procédure chez la souris (INRAE, MICALIS, Jouy-en-Josas). La solution a été préparée en mettant en suspension les cellules bactériennes cultivées dans une solution de cryoconservation, une solution de PBS réduite et mélangée à 15 % de glycérol. La densité cellulaire finale a été adaptée à l'espèce d'intérêt et optimisée à l'environnement intestinal du lapin, avec une dose de $1,5 \times 10^9$ UFC par mL, préconisée selon des études antérieures (**Kimsé et al., 2012 ; Seyidoglu, et Peker, 2015 ; Bircher et al., 2018**). Après homogénéisation, la préparation est fixée dans l'azote liquide et conservée à -80°C. Les solutions sont ensuite transportées jusqu'au lieu de l'expérimentation animale (ONIRIS, Nantes). Elles sont progressivement décongelées, transportées jusqu'à l'animalerie. L'administration de la solution bactérienne s'effectue par voie orale (1 mL), quotidiennement aux lapins, pendant huit semaines.

3.4.2. Les animaux

Dans notre étude, 24 lapins mâles de souche néo-zélandais blancs (NZW, *New-Zealand White*), de statut sanitaire conventionnel, ont été utilisés (Hypharm, Eurolap, Hycole). Les animaux sont âgés de 4 mois et pèsent entre 2,7 et 3,0 Kg. Ces paramètres favorisent l'établissement d'un modèle animal, qui présente un métabolisme du cholestérol stable et mature (**Dontas et al., 2011**). Les lapins sont logés à raison de 2 lapins par cage à l'animalerie du Centre de Recherche et d'Investigation Préclinique (CRIP, ONIRIS, Nantes). Les lapins ont été pesés individuellement et tatoués. Tous les animaux sont maintenus à température constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) et soumis à un cycle de lumière/obscurité de 12/12 heures.

3.4.3. La procédure expérimentale

Cette procédure a été réalisée en stricte conformité avec les lignes directrices pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire agréés par les autorités vétérinaires françaises des Pays de

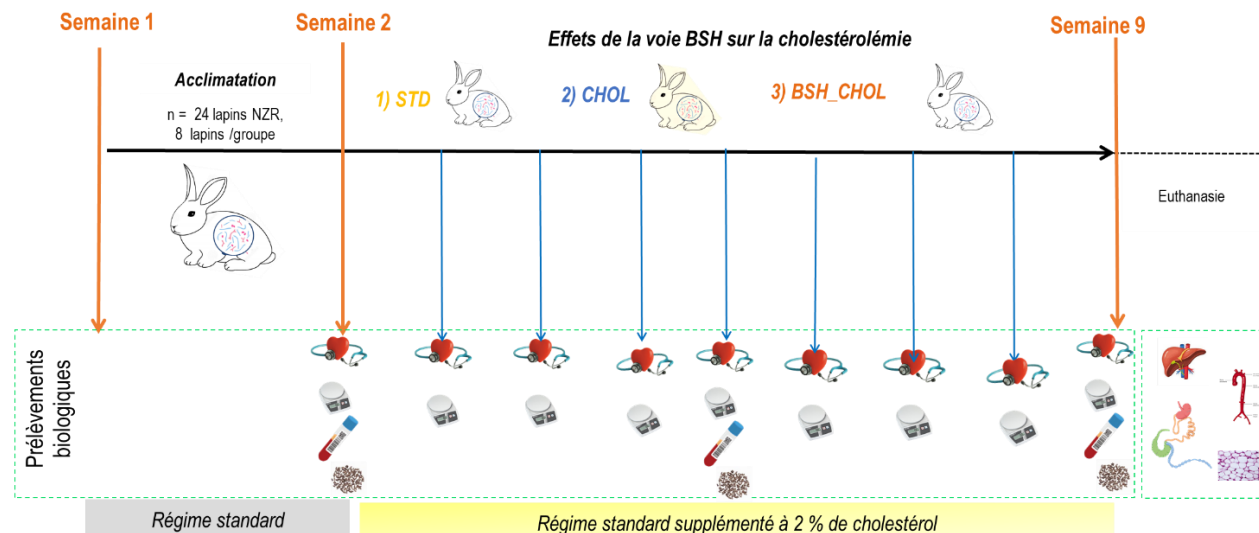





Figure 16 : La procédure expérimentale pour évaluer le potentiel préventif de la voie BSH sur le métabolisme du cholestérol et ces troubles associés.

L'expérience a été réalisée sur trois groupes de lapin, composés chacun de 8 lapins NZW, mâles. Durant la période d'acclimatation, de la semaine 1 à la semaine 2, les lapins sont sous régime standard (TD 2931, Envigo). Un régime standard riche en fibre a été choisi pour préserver la santé digestive des lapins et réduire le risque d'entéro-infections. Les lapins reçoivent indépendamment, les solutions par voie orale chaque jour, comme suit : **(1) Groupe 1**, avec une alimentation standard témoin, recevant un solution de PBS mélangé à 15 % de glycérol ($n = 8$, STD) ; **(2) Groupe 2**, avec une alimentation standard TD 2931 additionné de 2 % de cholestérol témoin, recevant un solution de PBS mélangé à 15 % de glycérol ($n = 8$; CHOL, régime TD 2931 complété de 2% de cholestérol, Envigo) ; **(3) Groupe 3**, aliments standard additionné en cholestérol et recevant la bactérie porteuse d'activité bactérienne d'intérêt (solution bactérienne cryopréservée, dosée à $1,5 \times 10^9$ UFC bactérien par mL) ($n = 8$; BSH_CHOL). Après huit semaines d'expérimentation, l'euthanasie des animaux et la collecte des compartiments biologiques sont réalisées : vaisseaux, foie, intestin, tissus adipeux. STD, régime standard ; CHOL, régime standard supplémenté en cholestérol pendant une

durée de 8 semaines ;  Examens cliniques réalisés ;  Pesée des animaux ;  prélèvements de sang et de fèces. L'évaluation de l'effet des bactéries sur le métabolisme du cholestérol est réalisée (dosage de cholestérol, histologie). A partir de ces résultats, le potentiel biothérapeutique de la voie BSH sera évalué.

Loire (Agrément de l'établissement utilisateur n° F 44 271). Ce projet a été approuvée par le comité d'éthique en expérimentation animale et autorisé par le Ministère de la Recherche (APAFIS N° 22693-2019110516169816v3) (**Figure 16**). Les vingt-quatre lapins NZW ont été répartis en trois groupes, composés chacun de 8 lapins. Les lapins ont été acclimatés pendant une semaine avant le début des expériences et avaient un libre accès à l'eau et à un régime standard γ -irradié (45 kGy), adaptée aux lapins à formule fixe (TD 2931, Envigo). Après une semaine d'acclimatation, les selles des lapins ont été récoltées et un prélèvement sanguin a été réalisé, individuellement. Une attention particulière est prise au niveau de la nourriture, remplacée toutes les 48 heures. De la 2^{ème} semaine jusqu'à la fin de l'expérience, les trois groupes de lapin ont été nourris pendant 8 semaines soit à un régime standard (TD 2931, Envigo), soit à un régime standard additionné de 2 % de cholestérol irradié à 45 kGy (CHOL), pour induire une hypercholestérolémie (TD 2931 + 2 % de cholestérol). Cette période de 8 semaines est également justifiée par rapport au régime standard additionné en cholestérol, basé sur de précédentes publications (**Lin et al., 2017**). Comme indiqué précédemment, ce modèle expérimental d'athérosclérose aortique induite par un régime supplémenté en cholestérol, imite le cadre clinique de l'athérosclérose induite par l'hypercholestérolémie. Cette durée correspond donc à la mise en place d'un modèle expérimental, qui reflète les premiers stades de développement de l'athérosclérose, exprimée par la présence de plaques d'athéromes (**Libby et al., 2019**).

Chaque groupe de lapin reçoit par voie orale : **(1)** Groupe 1, une alimentation standard témoin, recevant une solution de PBS, mélangée à 15 % de glycérol (n = 8, STD) ; **(2)** Groupe 2, une alimentation standard, additionnée de 2 % de cholestérol témoin, recevant une solution de PBS mélangée à 15 % de glycérol (n = 8 ; CHOL, régime TD 2931 complété de 2 % de cholestérol, Envigo) ; **(3)** Groupe 3, un aliment standard additionné en cholestérol et recevant la bactérie porteuse d'activité bactérienne d'intérêt (solution bactérienne cryopréservée, dosée à $1,5 \times 10^9$ UFC bactérien par mL). L'administration de la solution bactérienne s'est poursuivie pendant 8 semaines consécutives, durée pendant laquelle la sécurité et l'efficacité de bactéries probiotiques ont été évaluées lors de précédentes études (**Kimsé et al., 2012 ; Seyidoglu, et Peker, 2015**). Après 8 semaines de procédure expérimentale, les lapins ont été anesthésié avec de la kétamine (35 mg/kg) et de la xylazine (5 mg/kg), par voie intramusculaire, puis euthanasiés par injection

intraveineuse de Dolethal (300 mg / kg). Le sérum et les tissus aortiques et biologiques ont été collectés pour des analyses supplémentaires (**Figure 16**).

3.4.4. Les mesures in vivo de la procédure expérimentale

Pendant le protocole expérimental, l'évaluation de paramètres cliniques, le poids corporel, la consommation d'aliments, un examen clinique sur l'état du bien-être animal sont contrôlés. Un suivi du bien-être des animaux est assuré quotidiennement. Les fèces des lapins ont été collectées individuellement à chaque période de la procédure expérimentale. Les prélèvements de sang (1 mL) sont réalisés au niveau de l'artère médiane. L'oreille est préalablement anesthésiée, localement avec de la crème anesthésique (Lidocaïne, EMLA®). Ce prélèvement de sang servira pour le dosage de la cholestérolémie (1 mL) (**Figure 16**).

3.4.5. Le prélèvement des tissus biologiques

A la fin de la 8^{ème} semaine de la procédure expérimentale de la procédure expérimentale, les animaux ont été euthanasiés. Un dernier prélèvement de sang a été réalisé sous anesthésie puis les lapins ont été euthanasiés. Le foie, l'intestin (duodénum, iléon, jéjunum, cæcum, côlon), l'arc aortique (carotide, artère iléale) et le tissu adipeux ont été prélevés, pesés et conservés à - 80 °C (**Figure 16**).

3.4.6. Les analyses biochimiques

Les niveaux de cholestérol total (Chol-T), de triglycérides (TG), de phospholipase (PL), de cholestérol libre (Chol-L), de cholestérol lié aux lipoprotéines de haute densité (HDL-Chol), de cholestérol lié aux lipoprotéines de basse densité (LDL-Chol), ont été mesurés au sein de la plateforme de spectrométrie de masse du Centre de recherche en nutrition humaine de l'Ouest (CRNH-Ouest, Nantes).

3.4.7. Les analyses histologiques des tissus et des lésions hépatiques et athérosclérotiques

Pour l'analyse histologique, les tissus biologiques ont été fixés avec une solution de formol à 10 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) dans du PBS (pH 7,4) pendant 24 heures, puis enrobés de

paraffine. Après déshydratation en série, les tissus sectionnés ont été colorés avec de l'hématoxyline et de l'éosine (H&E). Les images ont été scannées à l'aide du logiciel 3DHISTECH (Pannoramic Scan 3DHistech slide scanner) au sein de la plateforme @BRIDGe (GABI, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Paris, France).

Pour les analyses des lésions hépatiques, nous avons choisi un système de notation largement utilisé, le score d'activité de la stéatopathie non-alcoolique (NAS) proposé par un ensemble d'experts cliniques internationaux des NASH. Ce système évalue une lésion histopathologique à partir d'un échantillon de foie suivant trois caractéristiques histologiques : la stéatose, le ballonnement hépatocellulaire et l'inflammation lobulaire (**Kleiner *et al.*, 2005 ; Brunt *et al.*, 2011**). Brièvement, la stéatose est évaluée par un score allant de 0 à 3, suivant la quantité de lipides accumulés dans les hépatocytes. Le ballonnement hépatocellulaire présente une note attribuée suivant la prééminence de gonflement des hépatocytes (note de 0-2). L'inflammation des tissus est évaluée à l'aide d'une note, allant de 0 à 3, en fonction du nombre de foyers inflammatoires observés notamment au niveau de la veine portale. Le score total de la NAS représente la somme des scores pour la stéatose, l'inflammation lobulaire et le ballonnement, de 0 à 8. Le diagnostic par le NAS est un complément utilisé pour noter l'activité. Dans cette étude de référence, des scores de NAS de 0 à 2 ont été obtenus dans des cas largement considérés comme non diagnostiques de la NASH, des scores de 3 à 4 ont été répartis de manière égale entre ceux considérés comme non diagnostiques, limites de la NASH. Un score de 5 à 8 est positif pour la NASH et d'autres troubles hépatiques associés.

Pour l'analyse histologique des lésions d'athérosclérose, la carotide a été sélectionnée pour cette analyse. Cette artère a été choisie car c'est une zone la plus propice aux remodelages liés à l'athérosclérose (**Verbeuren *et al.*, 1986 ; Lin *et al.*, 2017 ; Kanshana *et al.*, 2017**). Cette section artérielle a été préparée de la même façon que les autres tissus biologiques pour l'analyse histologique. Les lésions d'athérosclérose macroscopiques ont été évaluées à partir des images scannées et analysées pour observer les changements de l'épaisseur de l'intima et pour caractériser l'épaisseur de la plaque de l'artère d'intérêt (**Kim *et al.*, 2016 ; Lin *et al.*, 2017 ; Zhang *et al.*, 2020**).

3.4.8. Les analyses statistiques

Pour toutes les analyses et pour chaque groupe, les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM. Pour les comparaisons multiples, l'analyse statistique a été effectuée au moyen d'un test ANOVA à un facteur suivi des tests de comparaison multiple de Tukey ou à deux facteurs, suivi d'un Bonferroni ont été utilisés pour calculer la signification statistique avec le logiciel GraphPad 6.0. $P < 0.05$ a été considéré comme statistiquement significatif.

Chapitre 5 : Actualisation conceptuelle du métabolisme du cholestérol chez l'homme

Bourgin, M., Labarthe, S., Kriaa, A., Lhomme, M., Gérard, P., Lesnik, P., Laroche, B., Maguin, E., & Rhimi, M. (2020). Exploring the Bacterial Impact on Cholesterol Cycle: A Numerical Study. *Frontiers in microbiology*, 11, 1121. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01121>

1. Présentation

Le développement d'un modèle mathématique du métabolisme du cholestérol prenant en compte l'action de l'hôte et de son microbiote est entrepris afin de quantifier et de prédire la distribution du métabolisme du cholestérol chez l'homme. En collaboration avec l'équipe MaIAGE (Mathématiques et Informatique Appliquées du génome à l'Environnement, S. Labarthe et B. Laroche), ce modèle est construit à partir de modèles prédictifs préexistants, introduisant une modélisation mécanistique du métabolisme de l'hôte, en incluant des paramètres de la dynamique du métabolisme du cholestérol par le microbiote intestinal. Les travaux ont été publiés en juin 2020 dans *Frontiers Microbiology*, Bourgin *et al.*, 2020.

2. Résumé de l'article 1 “*Exploring the Bacterial Impact on Cholesterol Cycle: A Numerical Study*”

Un taux de cholestérol sanguin élevé est souvent associé à des maladies cardiovasculaires. Des stratégies thérapeutiques, ciblant différentes fonctions impliquées dans le transport ou la synthèse du cholestérol, ont été développées pour contrôler la cholestérolémie chez l'homme. Cependant, le microbiote intestinal est également impliqué dans la régulation du cholestérol par biotransformation directe du cholestérol luminal ou par conversion des sels biliaires, ce qui ouvre la voie à la conception de nouvelles stratégies pour gérer le niveau de cholestérol. Dans ce rapport, nous avons développé pour la première fois un modèle humain du métabolisme du cholestérol, incluant le microbiote intestinal, afin d'étudier l'impact relatif des voies de l'hôte et celles du microbiote à savoir, la voie de conversion du cholestérol en coprostanol et la voie de déconjugaison des sels biliaires, via les BSH. Afin d'évaluer cet impact, nous avons adopté une approche intégrative dans laquelle les connaissances basées sur la littérature ainsi que les données expérimentales *in vitro* et *in vivo* sont utilisées pour générer un modèle mathématique du métabolisme du cholestérol global, prenant en compte l'ensemble de l'organisme humain, et le microbiote intestinal qui lui est associé constituant ainsi, l'*holobionte* humain.

La première partie de cet article consiste à étudier la distribution du cholestérol ingéré dans différents compartiments de l'hôte, et de déterminer la quantité de cholestérol biodisponible dans le tractus gastro-intestinal. Pour analyser le devenir du cholestérol *in vivo*, un groupe de souris sous régime standard, a été gavé avec du cholestérol deutéré pour permettre le suivi de cette molécule *in vivo*. Après 3 jours, durée suffisante au renouvellement du métabolisme du cholestérol, nous avons procédé à l'euthanasie des animaux, puis à la collecte des différents compartiments physiologiques (sang, foie, tissus adipeux, muscle squelettique, duodénum, jéjunum, iléon, côlon, contenu du cæcum et fèces). Les stérols provenant des échantillons biologiques prélevés, ont été extraits et analysés. Les résultats de cette expérience, nous ont permis de déterminer qu'environ la moitié du cholestérol marqué était excrété dans les fèces (48,1 %) et qu'environ un quart (26,4 %) était stocké dans les tissus de la souris (plasma, tissu périphérique et foie) tandis que le dernier quart (25,5 %) circulait encore dans la lumière et les tissus intestinaux. Ces résultats, nous indiquent que le pool de cholestérol disponible pour la biotransformation bactérienne représente une fraction importante du cholestérol ingéré, ce qui suggère que les bactéries pourraient avoir un impact notable sur le devenir du cholestérol.

Dans un second temps, nous avons caractérisé *in vitro* les activités métaboliques vis-à-vis des stérols de bactéries commensales intestinales suivantes : *Bacteroides xyloxydans*, notée B_{xy} pour son activité de déconjugaison des sels biliaires et *Bacteroides sp D8*, notée B_{spD8} , pour sa capacité à convertir le cholestérol en coprostanol. Pour cela, nous avons étudié leur croissance bactérienne dans des conditions physiologiques *in vitro*, pour modéliser leur dynamique et la fonction liée aux stérols de ces deux populations bactériennes dans l'intestin. Ces deux populations bactériennes présentent une activité métabolique de déconjugaison des sels biliaires, noté PBSB. Par ailleurs, CCC présente une capacité de conversion du cholestérol en coprostanol. Ces données ont été calibrées et intégrées à notre modèle mathématique.

Enfin, nous avons développé un modèle mathématique pour relier toutes ces données expérimentales, en partant des modèles mathématiques préexistants dans la littérature. Pour cela, nous avons d'abord détaillé et adapté le compartiment intestinal luminal avec un complexe microbien, représenté par PBSB et CCC, en prenant en compte un ensemble de paramètres physiologiques pour qu'il soit représentatif des activités bactériennes observées *in vivo* (activité

métabolique vis-à-vis des stérols, dynamique du cholestérol luminal comme l'absorption du cholestérol par les tissus intestinaux). Puis, nous avons étendu cette prédiction du microbiote intestinal à l'ensemble des compartiments biologiques de l'hôte, qui régissent le métabolisme du cholestérol de l'organisme.

Par la suite, nous avons utilisé les données expérimentales obtenues sur la distribution du cholestérol *in vivo* chez la souris pour valider notre nouveau modèle mathématique. La distribution obtenue avec notre modèle est comparée à la distribution expérimentale et présente tous deux une forte concordance, notamment au niveau de la répartition des flux entre les compartiments biologiques. De façon intéressante, ces résultats nous ont permis d'observer que le cycle du cholestérol se compose de trois éléments principaux : (i) un axe central épithélium intestinal-système sanguin-axe hépatique, (ii) le compartiment luminal et, (iii) les tissus périphériques.

La suite de cette approche s'est concentrée sur la prédiction de l'impact du microbiote intestinal sur la cholestérolémie, pour fournir une première analyse des deux mécanismes microbiens impliqués. Ainsi, nous avons démontré que l'augmentation des populations PBSB, dotées de l'activité BSH, augmente cette activité et fait chuter le niveau luminal de sels biliaires, d'environ 26 % et amène in fine à une diminution d'environ 5 % des concentrations de HDL-Chol et LDL-Chol. L'augmentation de la population de CCC, responsable de la conversion du cholestérol en coprostanol, entraîne une perte importante de cholestérol intestinal, partiellement compensée par une synthèse intestinale du cholestérol accrue. Nous avons également observé que l'ampleur du flux impliqué dans la régulation indirecte du cholestérol par les sels biliaires était supérieure à la perte directe de cholestérol induite par la bioconversion du cholestérol en coprostanol. L'impact sur les niveaux de cholestérol plasmatique était également important.

La dernière partie est une analyse approfondie de notre modèle, focalisée sur la sensibilité globale. Cette étape permet d'inclure une description de l'impact du métabolisme du microbiote intestinal comparativement à celui de l'hôte. Ainsi, notre modèle confirme que le principal moteur des niveaux plasmatiques des LDL et des HDL est le transport entre le plasma et le foie. La biosynthèse du cholestérol par différents organes et le transport du foie vers le plasma, arrivant en deuxième et en troisième position. La contribution bactérienne cumulée est faible par rapport à

celle liée aux mécanismes de l'hôte, occupant la quatrième place. Cependant, l'activité BSH constitue la majeure partie de la contribution bactérienne aux niveaux de cholestérol plasmatique. Cet impact s'est traduit par une réduction de 27% du cholestérol lié aux LDL et d'une réduction de 49 % du cholestérol hépatique. Ceci indique que l'activité BSH bactérienne peut avoir un impact significatif dans le cycle du cholestérol devenant un élément potentiellement efficace dans la régulation des niveaux de cholestérol de l'hôte.

En conclusion, notre modèle a permis de classer les principaux facteurs qui influencent la distribution du cholestérol dans l'organisme. Une analyse de sensibilité globale a confirmé l'effet réel de l'activité bactérienne sur la cholestérolémie de l'hôte. Si l'impact de la conversion du cholestérol en coprostanol sur le cycle global du cholestérol s'est révélé faible, la conversion bactérienne de la BS avait un effet plus important sur le taux de cholestérol du foie. Les niveaux plasmatiques se sont avérés être principalement contrôlés par les mécanismes de l'hôte (transport entre les compartiments du sang et du foie, biosynthèse du cholestérol), alors que l'impact de l'activité bactérienne sur le pool hépatique de cholestérol est comparable à celui des mécanismes de l'hôte. Le modèle a ensuite permis de prédire l'effet de mécanismes spécifiques sur les différents pools de cholestérol et de les trier par ordre d'efficacité. L'activité bactérienne s'avère donc être une stratégie thérapeutique supplémentaire prometteuse ainsi qu'une alternative thérapeutique potentielle pour les non-répondeurs.

3. Article 1 “*Exploring the Bacterial Impact on Cholesterol Cycle: A Numerical Study*”



Exploring the Bacterial Impact on Cholesterol Cycle: A Numerical Study

Mélanie Bourgin¹, Simon Labarthe^{2*}, Aicha Kriaa¹, Marie Lhomme^{3,4}, Philippe Gérard¹, Philippe Lesnik³, Béatrice Laroche², Emmanuelle Maguin¹ and Moez Rhimi^{1*}

¹ Micalis Institute, Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Jouy-en-Josas, France, ² Université Paris-Saclay, INRAE, MaIAGE, Jouy-en-Josas, France, ³ INSERM, UMRS 1166, Sorbonne Universités, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France, ⁴ ICANalytics, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (IHU-ICAN, ANR-10-IAHU-05), Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Hyun-Seob Song,
University of Nebraska-Lincoln,
United States

Reviewed by:

Mark Mc Auley,
University of Chester, United Kingdom
Paritosh Pande,
Pacific Northwest National Laboratory
(DOE), United States

*Correspondence:

Simon Labarthe
simon.labarthe@inrae.fr
Moez Rhimi
moez.rhimi@inrae.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Systems Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 10 January 2020

Accepted: 05 May 2020

Published: 10 June 2020

Citation:

Bourgin M, Labarthe S, Kriaa A,
Lhomme M, Gérard P, Lesnik P,
Laroche B, Maguin E and Rhimi M
(2020) Exploring the Bacterial Impact
on Cholesterol Cycle: A Numerical
Study. *Front. Microbiol.* 11:1121.
doi: 10.3389/fmicb.2020.01121

High blood cholesterol levels are often associated with cardiovascular diseases. Therapeutic strategies, targeting different functions involved in cholesterol transport or synthesis, were developed to control cholesterolemia in human. However, the gut microbiota is also involved in cholesterol regulation by direct biotransformation of luminal cholesterol or conversion of bile salts, opening the way to the design of new strategies to manage cholesterol level. In this report, we developed for the first time a whole-body human model of cholesterol metabolism including the gut microbiota in order to investigate the relative impact of host and microbial pathways. We first used an animal model to investigate the ingested cholesterol distribution *in vivo*. Then, using *in vitro* bacterial growth experiments and metabolite measurements, we modeled the population dynamics of bacterial strains in the presence of cholesterol or bile salts, together with their bioconversion function. Next, after correct rescaling to mimic the activity of a complex microbiota, we developed a whole body model of cholesterol metabolism integrating host and microbiota mechanisms. This global model was validated with the animal experiments. Finally, the model was numerically explored to give a further insight into the different flux involved in cholesterol turn-over. According to this model, bacterial pathways appear as an important driver of cholesterol regulation, reinforcing the need for development of novel “bacteria-based” strategies for cholesterol management.

Keywords: microbiota, holobiont, microbiome, functional ecology, cholesterol metabolism, whole body model, mathematical model, system biology

1. INTRODUCTION

Cholesterol plays an essential role in the human body (Arnold and Kwiterovich, 2003). It is a key component of cellular membranes, being involved in membrane fluidity, cellular organization, and signaling (Ikonen, 2008; Mesmin and Maxfield, 2009). Cholesterol also serves as a precursor of many biological molecules including bile acids, oxysterols, steroid hormones, and vitamin D (Schroepfer Jr, 2000; Tabas, 2002). In humans, 30% of total body cholesterol derive from the diet (exogenous or dietary cholesterol), the remaining 70% are mainly synthesized in the liver (endogenous cholesterol) (Gylling, 2004). Over the last decades, several studies have aimed at deciphering the pathways involved in cholesterol homeostasis (Gylling, 2004; Iqbal and Hussain, 2009; Russell, 2009; Millar and Cuchel, 2018). In mammalian bodies, cholesterol balance is maintained by tightly regulated interactions between cholesterol synthesis, bile salts (BS) synthesis, absorption, and excretion.

Although cholesterol exhibits multiple physiological functions, high blood cholesterol levels are often associated to cardiovascular diseases (CVD), the leading cause of death in the world (World Health Organization, 2017). Current therapeutic strategies mainly target host cholesterol biosynthesis or transport, with no cholesterolemia reduction in a significant proportion of patients and major side effects (Thompson et al., 2002; Potiron et al., 2015). Recently, the gut microbiota has emerged as a key player that influences metabolic health and disease (Doré et al., 2017). It is possible that the gut microbiota could contribute to cholesterol metabolism mostly through (i) bacterial deconjugation of BS by bile salts hydrolase (BSH) enzymes and (ii) cholesterol conversion into coprostanol, a non-absorbable molecule excreted in feces (Begley et al., 2006; Gérard et al., 2007).

Accumulating data regarding each pathway have been reported (Swann et al., 2011; Jones et al., 2012; Joyce et al., 2014; Ridlon et al., 2014; Kriaa et al., 2019), but functional and mechanistic insights into their impact on whole-body cholesterol homeostasis are still lacking. To better understand the complex interplay between each human compartments, whole-body mathematical models were previously described (van de Pas et al., 2010, 2012; Mc Auley et al., 2012; Morgan et al., 2016; Read and Holmes, 2017). However, existing models were focused on human cholesterol biosynthesis or lipoprotein metabolism and do not include the gut microbiota as a crucial and new player in this complex multicompartment cycle (Pool et al., 2018).

The aim of this work is to provide an estimation of the impact of the microbial activity on the cholesterol cycle. Since BS are naturally present in the small intestine lumen where sterol and BS absorption take place, we hypothesized that bacterial BS deconjugation and cholesterol-to-coprostanol conversion could impact the cholesterol fate in the host body compartments. In order to assess this impact, we adopted an integrative approach in which literature based knowledge as well as *in vitro* and *in vivo* experimental data are used to generate a whole-body mathematical model of cholesterol metabolism in human holobiont including its associated gut microbiota. In a dedicated experiment, cholesterol was tracked in mice, in order to investigate the distribution of ingested cholesterol in different host compartments, and determine the amount of bioavailable cholesterol in the gastrointestinal tract. We also characterized *in vitro* BS deconjugation and cholesterol-to-coprostanol conversion activity in several commensal bacterial strains. Finally, we developed a mathematical model to link all the experimental data, starting from existing models in the literature (van de Pas et al., 2010, 2012; Mc Auley et al., 2012; Morgan et al., 2016). The different bacterial pathways for cholesterol and BS metabolism were calibrated and integrated in the model, allowing for differential comparison. Numerical exploration was then conducted to decipher the relative impact of the host and the microbiota metabolisms on the overall cholesterol cycle.

2. METHODS AND MATERIALS

2.1. Chemicals, Media, and Reagents

Deuterated cholesterol-d5 [cholesterol-2,2,4,4,6-d5] was purchased from Medical Isotopes, Inc. Medium-chain

triglycerides (MCT) were purchased from Now food (Healthcenter). Reagents and standards were supplied for sterol extraction by gas-chromatographic/mass-spectrometry analysis (GC/MS). Chloroform, cyclohexane, methanol were purchased from Merck. Butylated Hydroxytoluene (BHT) was supplied from Sigma and used to prepare BHT solution in methanol (5 mg mL⁻¹). Hexandithylether was purchased from VWR Chemicals. Analytical standard of desmosterol-d6 [cholest-5,24-dien-3-ol] was purchased (Avanti® Polar lipid, Inc.). Desmosterol solution was prepared (200 μmol L⁻¹) with chloroform and used for cholesterol quantification. Derivatization reagent N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) with 1% trimethylchlorosilane (TMCS) was obtained from REGIS technology, Inc. Cholesterol, sodium taurocholate hydrate, sodium glycocholate hydrate, sodium taurodeoxycholic acid hydrate and sodium glycodeoxycholic acid hydrate, sodium taurochenodeoxycholic acid hydrate and sodium glycochenodeoxycholic acid hydrate, ninhydrin, and trichloroacetic acid were purchased from Sigma-Aldrich. Bacteria were grown in Brain Heart Infusion-Yeast extract-Hemin medium (BHI-YH) containing: 5 g L⁻¹ of yeast extract, 5 mg L⁻¹ of hemin, 2 mg L⁻¹ of vitamin K, and 0.5 g L⁻¹ of cysteine (all products from Sigma-Aldrich). This media was supplemented when necessary with cholesterol and BS according to the supplier recommendations.

2.2. Bacterial Growth Procedure and BSH Assays

Bacteroides xylanisolvens XB1A and *Bacteroides* sp. D8 were grown in standard BHI-YH broth. All cultures were grown at 37°C in anaerobic conditions (Freter chamber Jacomex, France, 85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂) during 24 h. Effect of bile acids on bacterial growth was tested in BHI-YH supplemented with 1 and 30 mM of bile acids (Sigma). For cell lysate preparation pellets were washed twice in 100 mM sodium-phosphate buffer pH 6.5 and resuspended in the same buffer. Cell disruption was done by sonication at 4°C during 1 min (three cycles of 10 s pulses at amplitude of 40%) using a Vibra-Cell TM 72408 Sonicator then, cell debris were removed by centrifugation (12,000 g, 30 min at 4°C). Protein concentration was determined by measuring the UV absorption at 280 nm using a Nanodrop device (Thermo Fisher Scientific). The BSH activity was measured by the determination of the amount of the released amino acid residues using two BS as previously reported (Tanaka et al., 1999). At standard conditions, the reaction mixture contained 50 μL of enzyme preparation at a suitable dilution, 10 mM glyco and tauro-conjugated BS with 10 mM sodium phosphate pH 6.5 in a final volume of 1 mL.

The mixture was incubated for 30 min at 37°C then the reaction was stopped by adding 20% trichloroacetic acid and incubated at 37°C during 30 min. Subsequently, the reaction mixture was centrifuged (12,000 g, 15 min, 4°C) and the supernatant was recovered. For 200 μL of sample we added 500 μL of 1% ninhydrin, 1.2 mL of glycerol 30% and 200 μL of 500 mM citrate buffer pH 5.5. Then, the amount of amino acid released from conjugated bile acids was determined by measuring the absorbance at 570 nm using a UV-spectrophotometer

(Spectro-biochrom LibraS11). One unit of BSH activity was defined as the amount of enzyme catalyzing the release of 1 μmol of amino acids per min under the above specified conditions.

2.3. Animals and Experimental Design

Eleven-week-old male wild type C57BL/6 mice were purchased from the Laboratory Janvier (Le Gesnest, St Isle, France), and maintained in our animal facilities (INRA, UMR1319 Micalis, Anaxem facilities) under specific pathogen-free conditions. Throughout the experimental period, mice were provided free access to water and a standard diet containing 0.02% of cholesterol (SAFE, R03-40) (Wang and Carey, 2003). To curtail coprophagy during the study, animals were housed in individual metabolic cages with wire mesh bottoms (Wang et al., 2001). All procedures were performed according to the European Community Rules and approved by the Animal Care Committee (C2E-45 COMETHEA) with authorization number A78-322-6. Then, a group of experimental mice received an oral dose of 0.6 mg deuterated cholesterol-d5 dissolved in 200 μL MCT ($n = 6$) and a group of control mice received 200 μL of MCT as previously reported (Jakulj et al., 2016). After 3 days, feces were recovered for sterol quantification ($n = 3$). Blood collected and tissue samples were collected following animal euthanasia. Serum was collected after centrifugation (3,000 g during 10 min, 4°C) in presence of 2 mM EDTA. All samples were frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C .

2.4. Sterol Extraction and Quantification

Plasma, feces and tissue sterols were extracted in the presence of an internal standard, deuterated desmosterol-d6 (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) according to the Folch method with some modifications (Folch et al., 1957). Each tissue and feces was dried (approximately 0.3 g), powdered and homogenized in chloroform-methanol (2:1 v/v) at 63°C overnight (Igel et al., 2003). The same protocol was used for plasma aliquots (200 μL) after previous homogenization during 1 h. After addition of water (1:1 v/v), samples were centrifuged and the organic phase was collected. The organic dried extract, was resuspended in 2 mL methanol-NaOH 1 M, 40 μL BHT-Methanol and 40 μL methanol-EDTA at 60°C during 1 h allowing the lipids saponification. Subsequently, lipids were again extracted using hexan-diethyl-ether (1:1 v/v). After mixture and centrifugation of samples, the organic phase was collected and dried followed by reconstitution in 1.4 mL of cyclohexane. The silylation of sterols was performed with 60 μL of BSTFA with 1% TMCS and 1 h incubation at 60°C. After homogenization and centrifugation pellets were suspended in 60 μL of cyclohexane. The samples were stored at -80°C until the GC/MS analysis.

2.5. Mathematical Model of Specialized Bacterial Strains in Cholesterol and BS Metabolisms

Dynamical systems describing bacterial growth and metabolite concentration dynamics were fitted with the growth assays of *Bacteroides xylanisolvens* XB1A and *Bacteroides* sp D8. A minimal logistic ordinary differential equation (ODE) (resp. delayed differential equation (DDE)) was designed to model *Bacteroides* sp. D8 (resp. *Bacteroides xylanisolvens* XB1A) growth,

TABLE 1 | MCMC parameter estimation results.

Parameter	Mean	Std	Geweke
<i>Bacteroides</i> Sp D8			
μ_{BspD8}	0.44772	0.0281	0.98987
k_{ccD8}	0.27441	0.21987	0.76473
K_{D8}	1.6681	1.2765	0.94418
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>			
μ_{Bxy}	1.9375	0.95771	0.82175
β_{Bxy}	1.1186	0.57418	0.8144
δ	24.495	0.29425	0.99817
K_{Bxy}	0.10439	0.0936	0.88024

We indicate, for each parameter, the mean and the standard deviation of the posterior parameter distribution given by the MCMC Bayesian estimation, together with the Geweke index of the corresponding Markov chains. The corresponding posteriors are given in Figure S1.

supplemented by metabolic and repression mechanisms (see Results section for the detailed models). The equation parameters were inferred with a Bayesian inference method based on the DRAM sampling method (Haario et al., 2006) and a normal likelihood function, or linear regression (for BSH assays) after removal of outliers. Markov chains convergence was checked with the Geweke criterion.

2.6. Whole Body Model of Cholesterol Metabolism

We built our compartment dynamic model on the global structure of a previously reported whole-body model (Mc Auley et al., 2012; Morgan et al., 2016), which included the enterohepatic BS cycle, the plasmatic regulation and transport of cholesterol from the intestine toward the peripheral tissues and the liver, the coupling between bile acids and cholesterol metabolism through bile production, and the intestinal flux: dietary influx, hepatic cholesterol release in the digestive track, and excretion in feces. As in Morgan et al. (2016), a luminal compartment was introduced including the luminal primary BS and the luminal cholesterol, to which we added the microbiota. Furthermore, we simplified several uptake and transport processes that were not relevant for our study, following (van de Pas et al., 2011, 2012). A global view of the model is presented in Figure 3, the precise model description can be found in section 3.3, and the model parameter in the Table S1, Table 1).

2.7. Whole-Body Model Calibration

We adapted a strategy previously used for model calibration (van de Pas et al., 2011, 2012). Documented steady-state flux and levels of cholesterol in mice were collected, discarding at this stage the bacterial metabolism. The unknown flux were reconstructed through mass-conservation equations: at steady state, flux balance equations involving the unknown flux are derived. Additional equations are set to conserve the ratio of transport flux between blood and liver compartments. At end, as many conservation equations as unknown flux are defined. All

the parameters were then obtained straightforwardly by direct computation of the parameters, given the flux and cholesterol levels at steady-state, as indicated in Table S1. Next, we upscaled the growth models of specialized strains obtained *in vitro* to mimic the metabolism of a complex microbiota *in vivo*: the dynamics of coprostanol degradation was calibrated on *in vivo* data collected from the literature (see Table S1 and Table 2 for references), and the BS degradation was deduced from the BSH activity measured during the animal experiments. Finally, time was rescaled between the *in vitro* and the whole-body model, which allowed to replace the DDE for *Bacteroides xylanisolvens* XB1A by a non-delayed ODE (cf section 3.3 for details).

2.8. Numerical Implementation

The model was implemented in the Matlab software (MathWorks, Natick, MA, USA). The time integration of the ODEs and DDEs was achieved with, respectively, the `ode15s` and the `dde23` matlab functions. Bayesian inference was performed with the MCMC matlab toolbox (<https://mjlaine.github.io/mcmcstat/>) (Haario et al., 2001, 2006). Linear regression was performed with the R `lm` function.

2.9. Sensitivity Analysis

We first studied the local sensitivity of model outputs respectively to the bacterial levels. Namely, we applied to the BS and cholesterol converter carrying capacity (respectively $PBSD_{MAX}$ and CCC_{MAX}) a multiplicative coefficient $q \in [\frac{1}{100}, \frac{1}{50}, \frac{1}{20}, \frac{1}{10}, \frac{1}{5}, \frac{1}{2}, 2, 5, 10, 20, 50, 100]$, and we observed the impact of these variations on steady-state cholesterol and BS flux and levels. We then studied the global sensitivity of our model to flux parameters by computing parameter Sobol index (Saltelli et al., 1999) and Partial Correlation Coefficients (PCC) (Saltelli et al., 2000) of the $d = 14$ main parameters involved in the flux of the BS and cholesterol cycles. Namely, we selected for the BS enterohepatic cycle the bacterial carrying capacity of BS converters ($PBSD_{MAX}$), BS synthesis rate (k_{HBSs}), BS release in the lumen (k_{HBSa}) and absorption by the intestinal epithelium (k_{LPBSa}). For the cholesterol cycle, we selected the bacterial capacity for cholesterol converters (CCC_{MAX}), cholesterol synthesis rates (ICS_{max} , HCS_{max} and PCS_{max} for respectively the intestinal epithelium, the liver and the peripheral tissues, that were shifted all together), transport from blood to liver ($k_{LDL,ha}$ and $k_{HDL,ha}$, shifted conjointly), transport from liver to blood (k_{HCo}), cholesterol release (BCR_{max}) and dietary intake (f_{meal}). We sampled uniformly ($n = 11 \cdot 10^5$ samples) the parameter hypercube ranging in $\pm 50\%$ the basal value obtained after model calibration, except for the bacterial carrying capacities that were uniformly shifted between 0.01 and 100 times the basal value, with the fast99 method (Saltelli et al., 1999). The R package sensitivity (<https://cran.r-project.org/web/packages/sensitivity> Iooss and Lemaitre, 2015) was used to build the experimental design and to compute the first order Sobol index and the PCC with the function `fast99` and `pcc` respectively.

3. RESULTS

3.1. In-vivo Cholesterol Body Distribution

To check the cholesterol body distribution, we gave to three mice a standard diet supplemented with a dose of deuterated cholesterol. The distribution of labeled cholesterol among compartments after 3 days is displayed in Figure 1. We observed that about half of the labeled cholesterol was excreted in the feces (48.1%) and about one quarter (26.4%) was stocked in the mice tissues (plasma, peripheral tissue and liver) while the last quarter (25.5%) was still circulating in the intestinal lumen and tissues. This indicates that the cholesterol pool available for bacterial biotransformation represents an important fraction of the ingested cholesterol, suggesting that bacteria could have a noticeable impact on cholesterol fate.

3.2. In vitro Data-Based Models of Bacterial Cholesterol and BS Metabolism

We next used the bacterial growth assays to model the bacterial population dynamics and their functions related to cholesterol and BS. For each assay, we tested several models and chose the simplest one, i.e., the model providing the best trade off between goodness of fit and number of parameters.

3.2.1. Bacteroides sp. D8 Cholesterol Conversion

We first modeled the dynamics of *Bacteroides* sp D8 normalized density ($B_{spD8} := \frac{[B_{spD8}]}{[B_{spD8}]_{max}}$), where $[B_{spD8}]$ is the bacterial concentration ($[CFU\ mL^{-1}]$) and $[B_{spD8}]_{max}$ is the maximal observed bacterial concentration), with the logistic equation

$$\partial_t B_{spD8} = \mu_{B_{spD8}} B_{spD8} (1 - B_{spD8}). \quad (1)$$

Note that no dependency with cholesterol levels was introduced in the logistic model. This simple model has been selected because we aimed at modeling the bacterial growth in a complex nutritional environment, and not only the catabolic capabilities obtained from cholesterol degradation. The multiple pathways activated during the growth on BHI-YH are summed up in the growth rate of the logistic model.

Cholesterol (Cl) is converted to coprostanol (Cp) so that their respective fraction follow equations

$$\partial_t Cl = -k_{ccD8} \frac{B_{spD8} Cl}{K_{D8} + B_{spD8}}, \quad \partial_t Cp = k_{ccD8} \frac{B_{spD8} Cl}{K_{D8} + B_{spD8}}. \quad (2)$$

The parameter $\mu_{B_{spD8}}$, k_{ccD8} , and K_{D8} were inferred with Bayesian inference, processing conjointly the growth assays with different initial BS concentrations. We used the uniform prior $\mu_{B_{spD8}} \sim U_{(0.1\alpha_{B_{spD8}}, 2\alpha_{B_{spD8}})}$, $k_{ccD8} \sim U_{(10^{-5}, 1)}$, and $K_{D8} \sim U_{(10^{-3}, 4)}$ where $\alpha_{B_{spD8}}$ is an approximation of the B_{spD8} growth rate during the log-phase. The posterior parameter distributions are displayed in Figure S1 and the mean and variance values can be found in Table 1, together with the corresponding geweke index of markov chain convergence. Bacteria and metabolite levels and data fit are displayed in Figure 2.

TABLE 2 | Parameters used for the calibration of the whole-body cholesterol cycle.

Parameter	Value	Unit	Description	References
Cholesterol steady state fluxes in the whole body model				
SS_{in}	0.78	mg day ⁻¹	Steady state dietary cholesterol influx.	van de Pas et al., 2011
$SS_{KL,Ce}^{ref}$	0.8734	mg day ⁻¹	Reference total steady state fecal cholesterol excretion.	Van der Velde et al., 2007
$SS_{chol,copro}^{ref}$	0.1	mg day ⁻¹	Steady state excreted coprostanol to cholesterol ratio.	Sekimoto et al., 1983
$SS_{KL,Ce}$	1.2352	mg day ⁻¹	Total steady state fecal cholesterol excretion. $SS_{KL,Ce} = (1 - SS_{chol,copro}^{ref}) / (1 + SS_{chol,copro}^{ref}) SS_{KL,Ce}^{ref}$	MC
SS_{KCC}	0.12352	mg day ⁻¹	Steady state conversion of cholesterol to coprostanol. $SS_{KCC} = SS_{chol,copro}^{ref} / (1 + SS_{chol,copro}^{ref}) SS_{KL,Ce}^{ref}$	MC
$SS_{KL,Co}$	0.4852	mg day ⁻¹	Steady state direct luminal release of intestinal cholesterol.	Van der Velde et al., 2007
$SS_{B,Cmax}$	0.1941	mg day ⁻¹	Steady state hepatic cholesterol biosynthesis.	van de Pas et al., 2011
$SS_{KL,Ca}$	0.097	mg day ⁻¹	Steady state uptake of luminal cholesterol $SS_{KL,Ca} = SS_{KL,Co} + SS_{B,Cmax} + SS_{KL,Co} - SS_{KL,Ce} - SS_{KCC}$.	MC
$SS_{ICS,max}$	0.87	mg day ⁻¹	Steady state intestinal cholesterol biosynthesis.	van de Pas et al., 2011
$SS_{1,\theta_1,KCo}$	0.097	mg day ⁻¹	Steady state uptake of intestinal cholesterol by HDL.	Van der Velde et al., 2007
$SS_{\theta_1,KCo}$	0.3882	mg day ⁻¹	Steady state uptake of intestinal cholesterol by LDL $SS_{\theta_1,KCo} = SS_{KL,Ca} + SS_{ICS,max} - SS_{1,\theta_1,KCo} - SS_{KL,Co}$.	MC
$SS_{HCS,max}$	1.75	mg day ⁻¹	Steady state hepatic cholesterol biosynthesis.	van de Pas et al., 2011
$SS_{KH,Cest}$	0.9705	mg day ⁻¹	Steady state hepatic cholesterol esterification rate.	Van der Velde et al., 2007
$SS_{KH,Cunest}$	0.9705	mg day ⁻¹	Steady state rate of unesterification $SS_{KH,Cunest} = SS_{KH,Cest}$.	MC
$SS_{\theta_1,KHCo}$	0.9705	mg day ⁻¹	Steady state hepatic cholesterol uptake by LDL.	van de Pas et al., 2011
$SS_{1,\theta_1,KHCo}^{ref}$	0.7764	mg day ⁻¹	Reference Steady state hepatic cholesterol uptake by HDL.	Van der Velde et al., 2007
$SS_{KL,DLha}^{ref}$	1.1646	mg day ⁻¹	Reference steady state absorption of LDL cholesterol by liver.	Van der Velde et al., 2007
$SS_{KH,DLha}^{ref}$	1.7469	mg day ⁻¹	Reference steady state HDL cholesterol absorption by liver.	van de Pas et al., 2011
$SS_{KL,DLha}$	1.2542	mg day ⁻¹	Steady state absorption of LDL cholesterol by the liver. $SS_{KL,DLha} = (SS_{\theta_1,KHCo} + SS_{KH,DLha}) / (1 + \frac{SS_{KL,DLpa}^{ref}}{SS_{KL,DLha}^{ref}})$.	MC
$SS_{KH,DLha}$	1.5856	mg day ⁻¹	Steady state absorption of LDL cholesterol by the liver. $SS_{KH,DLha} = (SS_{HCS,max} + SS_{KL,DLha} - SS_{\theta_1,KHCo} - SS_{KH,BSS} - SS_{B,Cmax}) / (\frac{SS_{1,\theta_1,KHCo}^{ref}}{SS_{KH,DLha}^{ref}} - 1)$.	MC
$SS_{1,\theta_1,KHCo}$	0.7047	mg day ⁻¹	Steady state uptake of hepatic cholesterol by HDL $SS_{1,\theta_1,KHCo} = (SS_{HCS,max} + SS_{KL,DLha} - SS_{\theta_1,KHCo} - SS_{KH,BSS} - SS_{B,Cmax}) / (1 - \frac{SS_{KH,DLha}^{ref}}{SS_{1,\theta_1,KHCo}^{ref}})$.	MC
SS_{θ_H}	2.9115	mg day ⁻¹	Total steady state absorption of cholesterol by the liver from the blood. $SS_{\theta_H} = SS_{KL,DLha} + SS_{KH,DLha}$	MC
$SS_{PCS,max}$	1.16	mg day ⁻¹	Steady state peripheral cholesterol biosynthesis.	van de Pas et al., 2011
$SS_{KL,DLpa}^{ref}$	0.0970	mg day ⁻¹	Ref. steady state absorption of LDL cholesterol by peripheral tissues.	Van der Velde et al., 2007
$SS_{KL,DLpa}$	0.1045	mg day ⁻¹	Steady state absorption of LDL cholesterol by the peripheral tissues. $SS_{KL,DLpa} = (SS_{\theta_1,KHCo} + SS_{KH,DLha}) / (1 + \frac{SS_{KL,DLpa}^{ref}}{SS_{KL,DLpa}^{ref}})$.	MC
$SS_{1,\theta_P,KPCo}$	0.7839	mg day ⁻¹	Steady state uptake of peripheral cholesterol by HDL $SS_{1,\theta_P,KPCo} = SS_{PCS,max} + SS_{KL,DLpa} - SS_{K,Ploss}$.	MC
$SS_{K,Ploss}$	0.4852	mg day ⁻¹	Steady state cholesterol loss by peripheral metabolism $SS_{K,Ploss} = SS_{KL,Ca} + SS_{HCS,max} + SS_{PCS,max} + SS_{ICS,max} - SS_{B,Cmax} - SS_{KH,BSS} - SS_{KL,Co}$.	MC

We define for each compartment, the steady state fluxes involved in the cholesterol transport processes and a reference in the literature. MC: parameter derived from mass conservation arguments with the given equation. BS cycle steady state fluxes are given in **Table S6** (Supplementary Material).

3.2.2. *Bacteroides xylanosolvens* BS Conversion

We then modeled the *Bacteroides xylanosolvens* normalized population dynamics ($B_{xyl} := \frac{[B_{xyl}]}{[B_{xyl}]_{max}}$, where $[B_{xyl}]$ is the bacterial concentration ($[CFU\ mL^{-1}]$) and $[B_{xyl}]_{max}$ is the maximal observed bacterial concentration), with a logistic equation and a repression term that model the bacterial sensitivity to the primary bile salts (PBS) with delay δ :

$$\begin{aligned} \partial_t B_{xyl}(t) = & \mu_{B_{xyl}} B_{xyl}(t) (1 - B_{xyl}(t)) \\ & - \beta_{B_{xyl}} \frac{B_{xyl} [PBS](t - \delta)}{K_{B_{xyl}} + [PBS](t - \delta)}. \end{aligned} \quad (3)$$

The deconjugation of PBS into secondary bile salts (SBS) follows the equations

$$\begin{aligned} \partial_t [PBS] = & -\tilde{k}_{B_{xyl}}(B_{xyl})[PBS](t), \\ \partial_t [SBS] = & \tilde{k}_{B_{xyl}}(B_{xyl})[PBS](t). \end{aligned} \quad (4)$$

The parameter $\tilde{k}_{B_{xyl}}(B_{xyl})$ ($[h^{-1}]$) representing the degradation rate induced by the bacteria (that varies with B_{xyl}) was given by the enzyme assays with the following heuristic.

The enzyme assays allowed to measure A_{BSH} ($[nmol\ min^{-1}\ mg_{prot}^{-1}]$) which was the SBS production rate by gram of total proteins in the sample for an initial BS concentration $[BS]_0$ ($[nmol\ mL^{-1}]$) in the growth media. Note that A_{BSH} varied with B_{xyl} so that $A_{BSH} := A_{BSH}(B_{xyl})$. Hence

$$\tilde{k}_{B_{xyl}}(B_{xyl}) := \tilde{T}_k \frac{\lambda(B_{xyl})}{[BS]_0} A_{BSH}(B_{xyl})$$

where $\tilde{T}_k = 60\ min\ h^{-1}$ was a time rescaling coefficient and $\lambda(B_{xyl})$ ($[mg_{prot}\ mL^{-1}]$) was the total protein production by mL of the population B_{xyl} . The dependence of BSH activity $A_{BSH}(B_{xyl})$ to bacteria levels was first approximated by linear regression on the data, giving $A_{BSH}(B_{xyl}) := a_{BSH} B_{xyl} + b_{BSH}$ with $a_{BSH} = 19.2466$ ($p < 2.10^{-3}$) and $b_{BSH} = -0.9437$ ($p = 0.807$). As the intercept value was not significant, b_{BSH} was left null, so that $A_{BSH}(B_{xyl}) := a_{BSH} B_{xyl}$. The total protein levels in bacterial cells $\lambda(B_{xyl})$ was derived from the literature by writing

$$\lambda(B_{xyl}) := \tilde{C}_\lambda d_c (1 - c_w) c_p V_c [B_{xyl}]_{max} B_{xyl}$$

with $\tilde{C}_\lambda = 10^{-9}\ mg\ g^{-1}\ mL\ \mu m^{-3}$ a concentration rescaling coefficient, d_c ($[g\ mL^{-1}]$) the bacterial mass density, c_w ($[-]$) the proportion of water in the cell, c_p ($[-]$) the fraction of protein in the dry mass, and V_c the volume of one bacteria, assumed to be $1\ \mu m^3\ CFU^{-1}$. The value of the different parameters can be found in Table S2.

Hence, noting $k_{B_{xyl}} := \frac{\tilde{T}_k a_{BSH}}{[BS]_0} \tilde{C}_\lambda d_c (1 - c_w) c_p V_c [B_{xyl}]_{max}$, we rewrite Equation (4) with

$$\begin{aligned} \partial_t [PBS] = & -k_{B_{xyl}} B_{xyl}(t)^2 [PBS](t), \\ \partial_t [SBS] = & k_{B_{xyl}} B_{xyl}(t)^2 [PBS](t). \end{aligned} \quad (5)$$

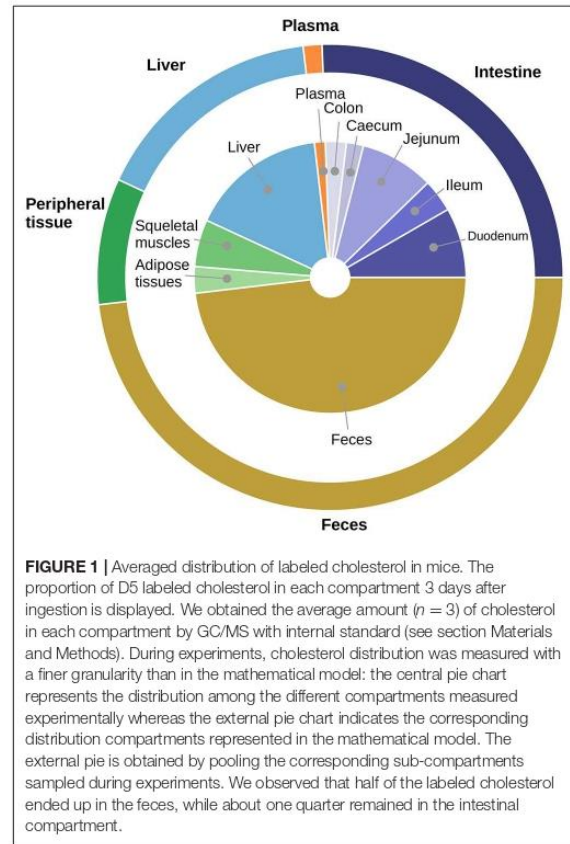
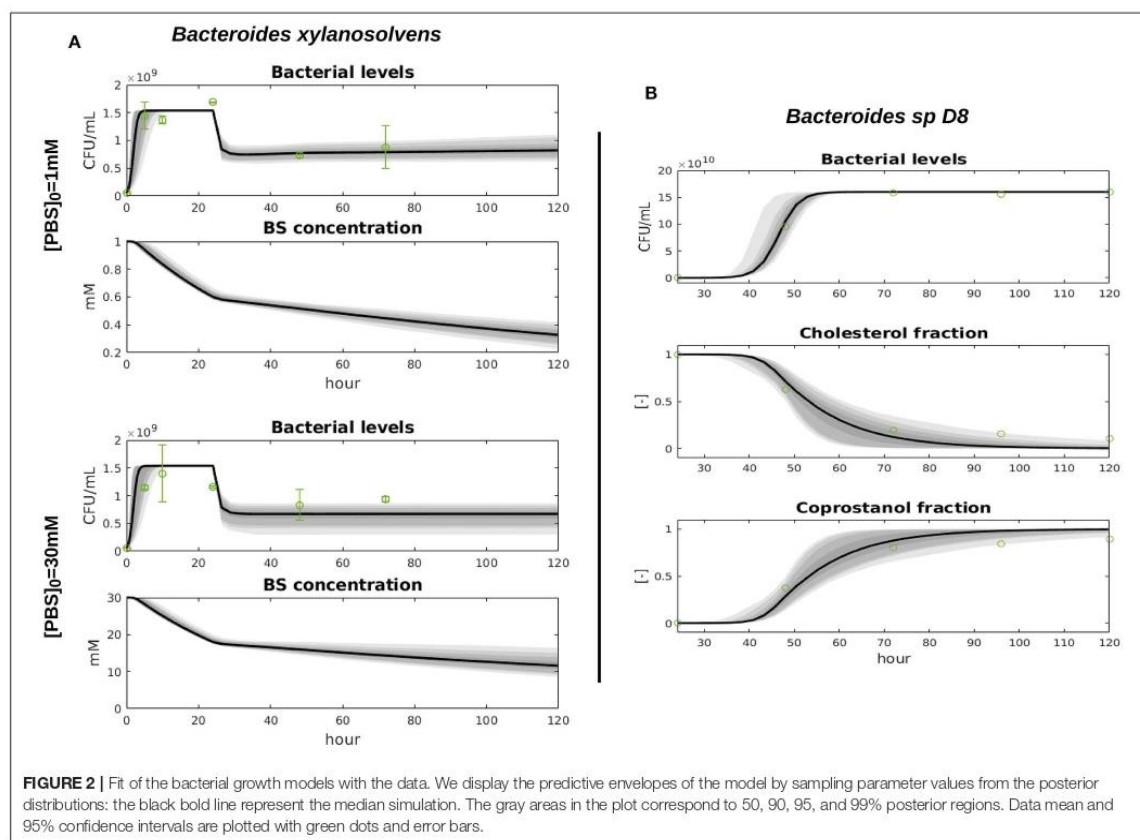


FIGURE 1 | Averaged distribution of labeled cholesterol in mice. The proportion of D5 labeled cholesterol in each compartment 3 days after ingestion is displayed. We obtained the average amount ($n = 3$) of cholesterol in each compartment by GC/MS with internal standard (see section Materials and Methods). During experiments, cholesterol distribution was measured with a finer granularity than in the mathematical model: the central pie chart represents the distribution among the different compartments measured experimentally whereas the external pie chart indicates the corresponding distribution compartments represented in the mathematical model. The external pie is obtained by pooling the corresponding sub-compartments sampled during experiments. We observed that half of the labeled cholesterol ended up in the feces, while about one quarter remained in the intestinal compartment.

The parameters $\mu_{B_{xyl}}$, $\beta_{B_{xyl}}$, δ and $K_{B_{xyl}}$ were inferred with the uniform prior $\mu_{B_{xyl}} \sim U_{(0.6\alpha_{B_{xyl}}, 10\alpha_{B_{xyl}})}$, $\beta_{B_{xyl}} \sim U_{(10^{-4}, 8)}$, $K_{B_{xyl}} \sim U_{(10^{-3}, 3)}$, and $\delta \sim U_{(15, 25)}$ where $\alpha_{B_{xyl}}$ approximates the B_{xyl} growth rate during the log-phase from the data. The posterior distributions are displayed in Figure S1 and the mean and variance values can be found in Table 1, together with the corresponding geweke index of markov chain convergence. Model output and data fit are displayed in Figure 2.

3.3. Whole Body Model Including the Gut Microbiota

We first detailed the luminal intestinal compartment, where the bacterial activity takes place: we upscaled the *in vitro* model to be representative of bacterial activities observed *in vivo*. We next presented the remaining processes of the whole body model of cholesterol cycle, all located in host compartments. A global view of the model is presented in Figure 3. A nomenclature of the different unknowns of the model can be found in Table S3.



3.3.1. Luminal Compartment Including Microbiota

Bacterial growth: the dynamics of the functional bacterial populations involved in cholesterol-to-coprostanol conversion ($CCC[-]$) or primary-bile-salts deconjugation ($PBSD[-]$) in the gut were derived from the *in vitro* experiments by taking

$$\partial_t CCC = \mu_{CCC} CCC (CCC_{MAX} - CCC), \quad (6)$$

$$\partial_t PBSD = \mu_{PBSD} PBSD (PBSD_{MAX} - PBSD) - d_{PBSD} \frac{[LPBS] PBSD}{(K_{PBSD} + [LPBS])}. \quad (7)$$

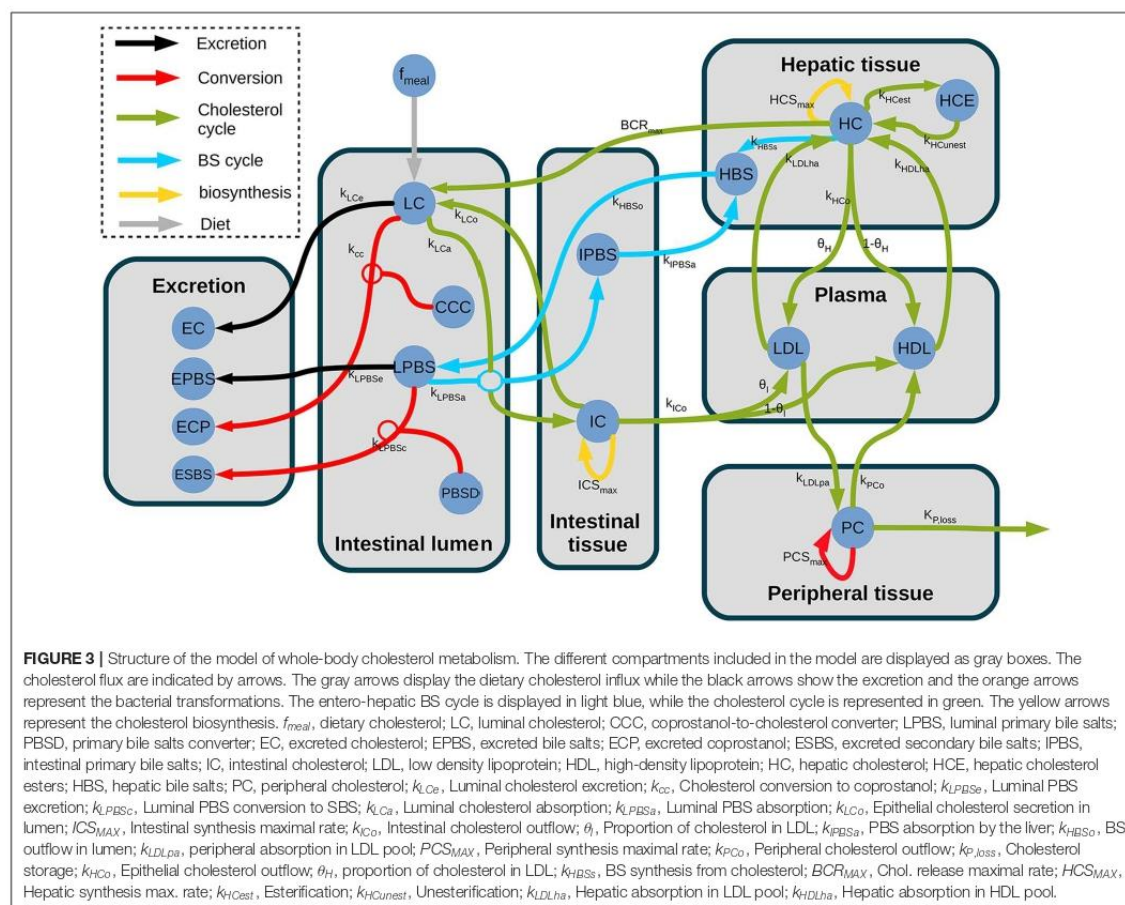
The rescaled growth rates $\mu_{CCC} := 24\mu_{B_{spD8}} \frac{b_{gut,max}}{[B_{spD8}]_{max}} (\text{day}^{-1})$ and $\mu_{PBSD} := 24\mu_{B_{xyl}} \frac{b_{gut,max}}{[B_{xyl}]_{max}} (\text{day}^{-1})$ were derived from the inferred growth rates of Equations (1)–(3), and $b_{gut,max} = 5.0 \times 10^9 \text{ CFU mL}^{-1}$, the bacterial levels in the small intestine (Bazett et al., 2016). The terms $d_{PBSD} := 24\beta_{B_{xyl}}$ and $K_{PBSD} := w_{PBS} K_{B_{xyl}}$ set the $PBSD$ population susceptibility to luminal PBS concentration $[LPBS](\text{mg.L}^{-1})$, where $w_{PBS} := 467,847 \text{ mg.mmol}^{-1}$ was the molecular weight of PBS. Note that we removed in (7) the delay term δ of Equation (3). Indeed, after time rescaling, the delay had very little impact:

when we replaced Equation (7) by its time-delayed original version (3), we observed a relative difference lower than 10^{-6} in $L^2(0, T)$ norm. The parameters CCC_{MAX} and $PBSD_{MAX}$ represent the bacterial carrying capacity. They are set to 1 in the basal simulations but will be shifted during model exploration (cf. sections 3.5, 3.6).

Luminal primary bile salts (LPBS) dynamics: next, we adapted the *in vitro* BS conversion model to the BSH activity of a complex microbial *in vivo* with a suitable upscale of the parameters. Namely, k_{PBSD} , the rate of primary to secondary BS conversion by the microbiota, was derived from the formula

$$k_{PBSD} := k_{B_{xyl}} \frac{A_{BSH,mic} b_{gut,max}}{A_{BSH}([B_{xyl}]_{max})}$$

where $A_{BSH,mic}([\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}_{prot}^{-1}])$ was the BSH activity measured in the feces collected during the *in vivo* experiments. Additional mechanisms of the $LPBS$ dynamics were the release of hepatic bile salts HBS through the canaliculi with rate $k_{HBS_0} ([\text{day}^{-1}])$ — first step of the enterohepatic circulation. A major part of PBS is reabsorbed in the distal ileum through direct absorption by the epithelium of an emulsion of cholesterol and



BS with rate k_{LCo} ($[L\ mg^{-1}\ day^{-1}]$). A residual excretion through the feces was modeled with the rate k_{LPBSa} ($[day^{-1}]$). This resulted in the equation

$$\partial_t[LPBS] = \frac{V_H}{V_L} k_{HBSa}[HBS] - k_{LPBSa}[LPBS] - k_{LCo}[LC][LPBS] - k_{LPBSa}[LPBS]. \quad (8)$$

where V_L and V_H ($[L]$) were the volumes of the luminal and hepatic compartments.

Luminal cholesterol (LC) dynamics: LC mainly comes from the dietary intake f_{meal} and an hepatic flux through the biliary canal, modulated by the hepatic cholesterol concentration $[HC]$ (Mc Auley et al., 2012). When $[HC]$ is above an hepatic cholesterolemia threshold BCR_t , the flux reaches a maximal rate BCR_{MAX} while it collapses when the hepatic cholesterol level is below BCR_t . The sensitivity of this regulation is driven by the parameter BS ($[-]$). An additional influx comes from the intestinal epithelium, with rate k_{LCo} , modulated by LPBS (Van der Velde et al., 2007). Additional sinks are the natural

excretion modeled by a constant outflow k_{LCe} , and the cholesterol absorption by the intestinal tissues promoted by the bile salt.

To characterize *in vivo* the cholesterol-to-coprostanol conversion, we used literature data for the ratio $Q_{col,cop} := \frac{[EC]}{[ECP]}$ between excreted cholesterol ($[EC]$) and coprostanol ($[ECP]$) levels in the feces. Low human converters have a ratio $Q_{col,cop} \simeq 0.01$, whereas high human converters have a ratio up to $Q_{col,cop} \simeq 4$ (Sekimoto et al., 1983). We assumed an intermediary conversion ratio by taking $Q_{col,cop} = 0.1$ and we set the conversion time rate $k_{cc} := Q_{col,cop} k_{LCe}$. Furthermore, we properly rescale the K_{D8} Monod constant by taking $K_{CCC} = K_{D8} \frac{[BspD8]_{max}}{b_{gut,max}}$. We got at end

$$\partial_t[LC] = \frac{f_{meal}}{V_L} + \frac{V_H}{V_L} \frac{BCR_{MAX}}{1 + \left(\frac{BCR_t}{[HC]}\right)^{BS}} - k_{LCo}[LC][LPBS] + \frac{V_I}{V_L} k_{LCo}[IC][LPBS] - k_{LCe}[LC] - k_{cc} \frac{[LC]CCC}{K_{CCC} + CCC}. \quad (9)$$

3.3.2. Enterohepatic BS Cycle

A part of the *LPBS* is directly excreted into the faecal compartment *EPBS* with rate k_{LPBS_e} or is degraded by the BSH producers into the excreted secondary bile salts compartment *ESBS*. The total amount of excreted compounds was followed up, but a density was computed when needed by dividing by the total excretion volume $V_E(t)$ at time t , estimated from the daily stool volume V_{st} with formula $V_E(t) = V_{st}t$. The other part is absorbed together with cholesterol with rate k_{LCa} to constitute an intestinal tissue *PBS* pool. Then, cholesterol and BS are transported with rate k_{IPBSa} to the liver through the portal vein in order to continue the enterohepatic cycle. In the liver, cholesterol-to-BS biotransformation takes place; it was modeled by an overall transformation rate k_{HBS} modulated by a negative retro-control of the hepatic bile salts levels *HBS*. We finally got the dynamics of the BS in the excreted compartment *EPBS* and *ESBS*, in the intestinal tissues (*IPBS*) and in the liver (*HBS*):

$$\partial_t EPBS = V_L k_{LPBS_e} [LPBS], \quad (10)$$

$$\partial_t ESBS = V_L k_{LPBS_d} [LPBS] PBS D^2, \quad (11)$$

$$\partial_t [IPBS] = \frac{V_L}{V_I} k_{LCa} [LC] [LPBS] - k_{IPBSa} [IPBS], \quad (12)$$

$$\partial_t [HBS] = k_{HBS} \frac{[HC]}{[HBS]} - k_{HBS_0} [HBS] + \frac{V_I}{V_H} k_{IPBSa} [IPBS]. \quad (13)$$

We also had $[EPBS](t) = EPBS(t)/V_E(t)$ and $[ESBS](t) = ESBS(t)/V_E(t)$.

3.3.3. Whole-Body Dynamics of Cholesterol

In the lumen, the cholesterol is distributed between the intestinal tissues (through absorption) and the excretion compartment.

3.3.3.1. Excreted cholesterol

A part of the luminal cholesterol is transported into the excreted cholesterol pool (*EC*) in the feces while another part is biotransformed into coprostanol: we assumed that the coprostanol created in the lumen was directly excreted into the feces in the excreted coprostanol pool (*ECP*). Again, we tracked the total amount of excreted components, and recovered density by dividing by $V_E(t)$.

$$\partial_t EC = V_L k_{LC_e} [LC], \quad (14)$$

$$\partial_t ECP = V_L k_{\alpha} \frac{[LC] CCC}{K_{CCC} + CCC}, \quad (15)$$

3.3.3.2. Cholesterol in intestinal tissues

In the intestinal mucosa, additionally to the absorption of the luminal cholesterol and the direct release of cholesterol into the lumen, an endogenous cholesterol synthesis was considered. As in Mc Auley et al. (2012), we assumed that the intestinal tissues activate the cholesterol synthesis when the free cholesterol pool reaches a minimal threshold IC_t . The cholesterol is then produced with a constant rate ICS_{max} and the transition between the production and the resting regimes is modulated by a

sensitivity parameter IS . Finally, intestinal cholesterol flows toward the plasmatic compartment with a rate k_{ICo} . We got

$$\begin{aligned} \partial_t [IC] = & \frac{V_L}{V_I} k_{LCa} [LC] [LPBS] - k_{ICo} [IC] [LPBS] + \frac{ICS_{max}}{1 + \left(\frac{[IC]}{IC_t}\right)^{IS}} \\ & - k_{ICo} [IC]. \end{aligned} \quad (16)$$

3.3.3.3. Plasmatic cholesterol

The cholesterol is transported in the plasma by lipoproteins that are usually separated in distinct lipoproteins populations according to their content of cholesterol and triglycerids. Here, we considered only two lipoproteins compartments which are the most significant for cholesterolemia: high (*HDL*) and low density lipoproteins (*LDL*). We considered an absorption flux k_{ICo} (resp. k_{HCo}) from the intestinal (resp. hepatic) tissues which is dispatched into the plasmatic compartments with proportion θ_I (resp. θ_H) for the *LDL* compartment and $(1 - \theta_I)$ (resp. $(1 - \theta_H)$) for the *HDL* compartment. We assumed that the peripheral cholesterol flows in the *HDL* pool only (van de Pas et al., 2011) with rate k_{PCo} . The internal flux between *HDL* and *LDL* pools are reduced to the maturation from high to low density lipoproteins with rate k_{HDLc} (van de Pas et al., 2011). The reverse process occurs with rate k_{LDLc} . We finally modeled outgoing fluxes toward the hepatic and peripheral tissues with, respectively, rates k_{LDLha} and k_{LDLpa} for the *LDL* compartment and k_{HDLha} for the *HDL* carriers (peripheral absorption of *HDL* cholesterol is not included). We then obtained, noting V_B and V_P the volume of the blood and peripheral compartments,

$$\begin{aligned} \partial_t [HDL] = & \frac{V_I}{V_B} (1 - \theta_I) k_{ICo} [IC] + \frac{V_H}{V_B} (1 - \theta_H) k_{HCo} [HC] \\ & + \frac{V_P}{V_B} k_{PCo} [PC] - k_{HDLha} [HDL], \end{aligned} \quad (17)$$

$$\begin{aligned} \partial_t [LDL] = & \frac{V_I}{V_B} \theta_I k_{ICo} [IC] + \frac{V_H}{V_B} \theta_H k_{HCo} [HC] \\ & - (k_{LDLha} + k_{LDLpa}) [LDL]. \end{aligned} \quad (18)$$

3.3.3.4. Hepatic cholesterol

We separated the liver cholesterol metabolism in three main pathways: (1) an endogenous cholesterol synthesis with parameters HC_t , HCS_{max} , and HS like in the intestine; (2), esterification/de-esterification of free cholesterol with conversion rates k_{HCest} and $k_{HCunest}$; (3) ingoing/outgoing flux from the plasma with the rates k_{LDLha} , k_{HDLha} , and k_{HCo} . Hepatic discharge of cholesterol through the canaliculi is modeled with the term $\frac{BCR_{max}}{1 + \left(\frac{BCR_t}{[HC]}\right)^{BS}}$ that was introduced in the description of the luminal compartment. This is expressed in Equations (19) and (20)

$$\begin{aligned} \partial_t [HC] = & \frac{V_B}{V_H} k_{LDLha} [LDL] + \frac{V_B}{V_H} k_{HDLha} [HDL] - k_{HCo} [HC] \\ & + \frac{HCS_{max}}{1 + \left(\frac{[HC]}{HC_t}\right)^{HS}} - k_{HCest} [HC] + k_{HCunest} [HCE] \\ & - k_{HBS} \frac{[HC]}{[HBS]} - \frac{BCR_{max}}{1 + \left(\frac{BCR_t}{[HC]}\right)^{BS}}, \end{aligned} \quad (19)$$

$$\partial_t [HCE] = k_{HCest} [HC] - k_{HCunest} [HCE]. \quad (20)$$

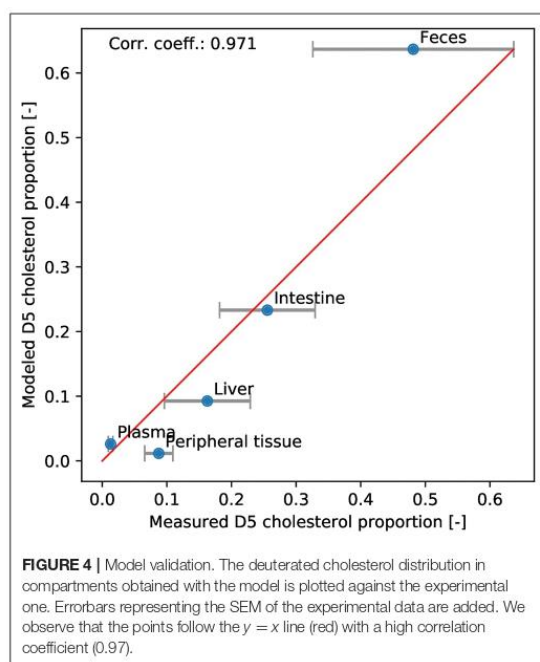


FIGURE 4 | Model validation. The deuterated cholesterol distribution in compartments obtained with the model is plotted against the experimental one. Errorbars representing the SEM of the experimental data are added. We observe that the points follow the $y = x$ line (red) with a high correlation coefficient (0.97).

3.3.3.5. Peripheral cholesterol

Plasmatic cholesterol can be stored in the remaining body tissues, represented by the peripheral cholesterol pool (PC). Both LDL and HDL plasmatic cholesterol are uptaken with rate k_{LDLpa} and k_{LDLha} , respectively. Cholesterol synthesis parameters are PCS_{max} , PC_t , and PS. Finally, a global loss is taken into account through the parameter k_{ploss} , to model storage in adipose tissues. We finally got

$$\partial_t[PC] = \frac{V_B}{V_P} k_{LDLpa}[LDL] - k_{PCo}[PC] + \frac{PCS_{max}}{1 + \left(\frac{[PC]}{PC_t}\right)^{PS}} - k_{ploss}[PC]. \quad (21)$$

All the model parameters (except the bacterial growth model parameters that were inferred as presented in section 3.2), were obtained with steady-state flux and concentration data from the literature (see Tables S5, S6, and Table 2) and the calibration strategy detailed in section 2.7 and in Table S1. No additional inference was performed to fit the whole body model with the *in vivo* experimental data.

3.4. Model Validation

3.4.1. Validation From Deuterated Cholesterol Experimental Data

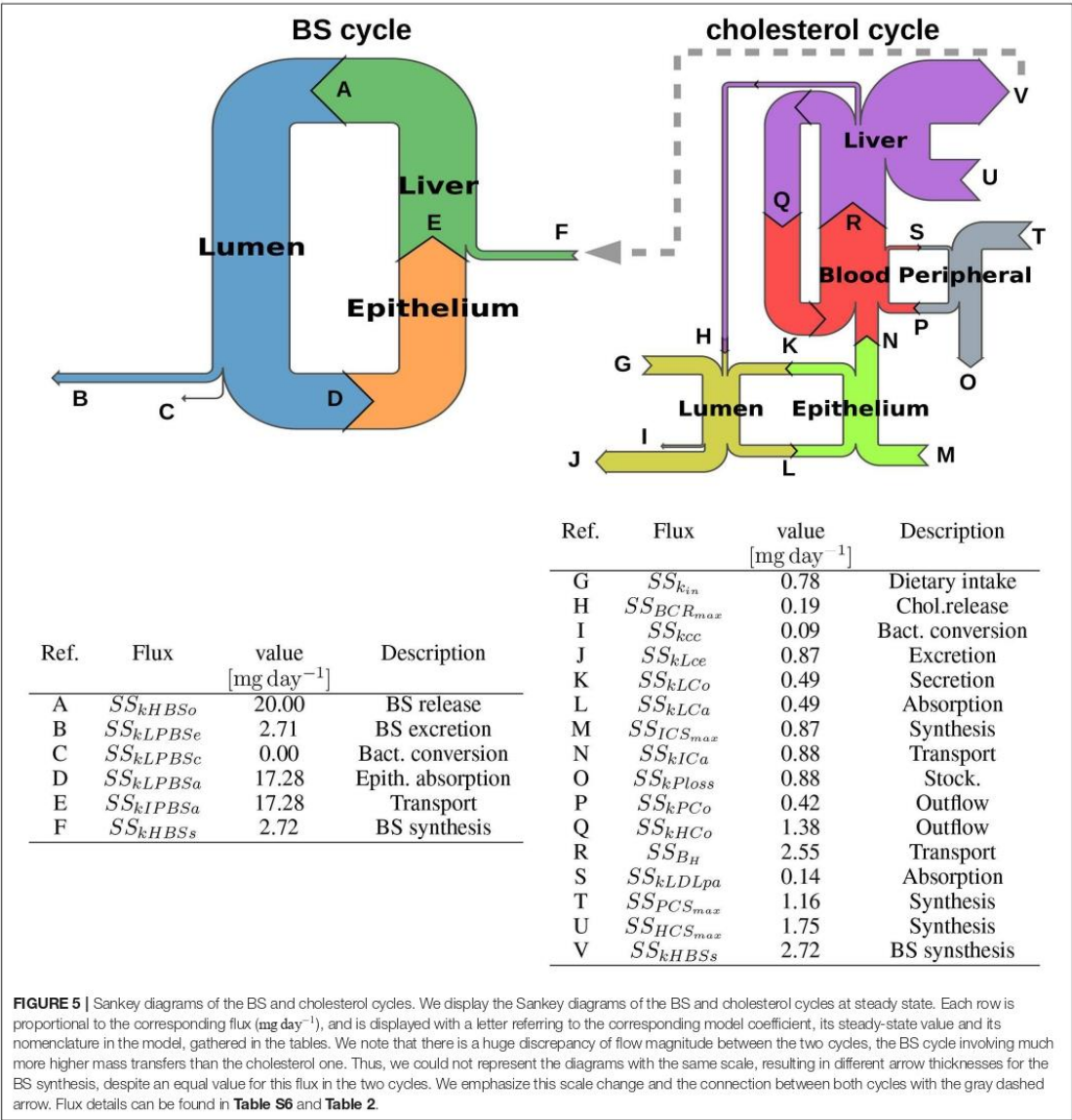
We used *in vivo* labeled cholesterol data to validate our new model. We duplicated all the cholesterol and BS pools in order to separate the deuterated and normal sterols and monitored their respective dynamics. The resulting model is presented in Equations (S1) to (S28) in the **Supplementary Material**.

At initial state, the deuterated components are set to zero in every compartments. Then, the dietary influx of deuterated cholesterol is set to correspond to the experimental levels. After 3 days, the simulation is stopped and the different pools of normal and labeled cholesterol and BS are recomposed to reconstruct the intestinal, excreted, plasmatic, peripheral and hepatic levels of normal and labeled cholesterol. Then, the distribution obtained with the model is compared to the experimental distribution (Figure 4). We observed that the points of the scatter plot followed the $y = x$ line with a correlation coefficient of 0.97. This strong agreement between model and data indicated that the model correctly captured the flux between the different compartments.

3.4.2. Flux Repartition at Steady State

We computed a basal simulation until steady state and observed the resulting flux between compartments. As expected, we recovered the steady state flux from published data that were used for the model calibration (see Tables S5, S6, and Table 2, Supplementary Data). We represented the flux in a Sankey graph (Figure 5) of the cholesterol and BS whole body cycles. The Sankey graph helped visualizing mass transfers since it displayed the flux distribution with arrows proportional to the flux that they represent. The large discrepancy between BS and cholesterol flux was particularly emphasized with this representation. For example, while the BS biosynthesis (ss_{KHBS} in the model) is a major sink for the cholesterol cycle, it only represents a minor influx for the BS cycle, counterbalancing the small BS excretion (Figure 5, gray dashed arrow). The BS pool conservation mainly relies on BS recycling, which is fueled by large absorption and transport capacities in the lumen, the intestine and the liver. The basal bacterial conversion to SBS represents a negligible outflux compare with the BS circulation (Figure 5, left).

We observed that the cholesterol cycle was roughly separated in three main entities (Figure 5, right). (i) A central axis (intestinal epithelium-blood system-liver axis) supports the main part of cholesterol transfers. (ii) The luminal compartment represents the second cholesterol route; it is connected to the central axis by the epithelial interface and the biliary cholesterol release. The net balance of the cholesterol exchanges with the main central stream is slightly negative: the cholesterol absorption by the epithelium is counterbalanced by the cholesterol secretion while the small biliary cholesterol release supports the luminal cholesterol levels. Again, the basal cholesterol-to-coprostanol bacterial conversion is secondary. (iii) The third entity is composed by the peripheral tissues. In this compartment, the cholesterol biosynthesis is nearly entirely balanced by the cholesterol storage in adipose tissues, giving a slightly positive contribution to the main central cholesterol flux. In the central axis, the BS biosynthesis is by far the principal outflux of the cholesterol cycle, and is mainly fueled by the hepatic and epithelial cholesterol biosynthesis. The two-side cholesterol exchanges between the liver and the blood constitute an important cholesterol sub-cycle: this loop could be seen as a buffer that regulate the BS biosynthesis outflux, by absorbing cholesterol fluctuations.



3.5. Numerical Exploration of the Bacterial Impact on Cholesterolemia

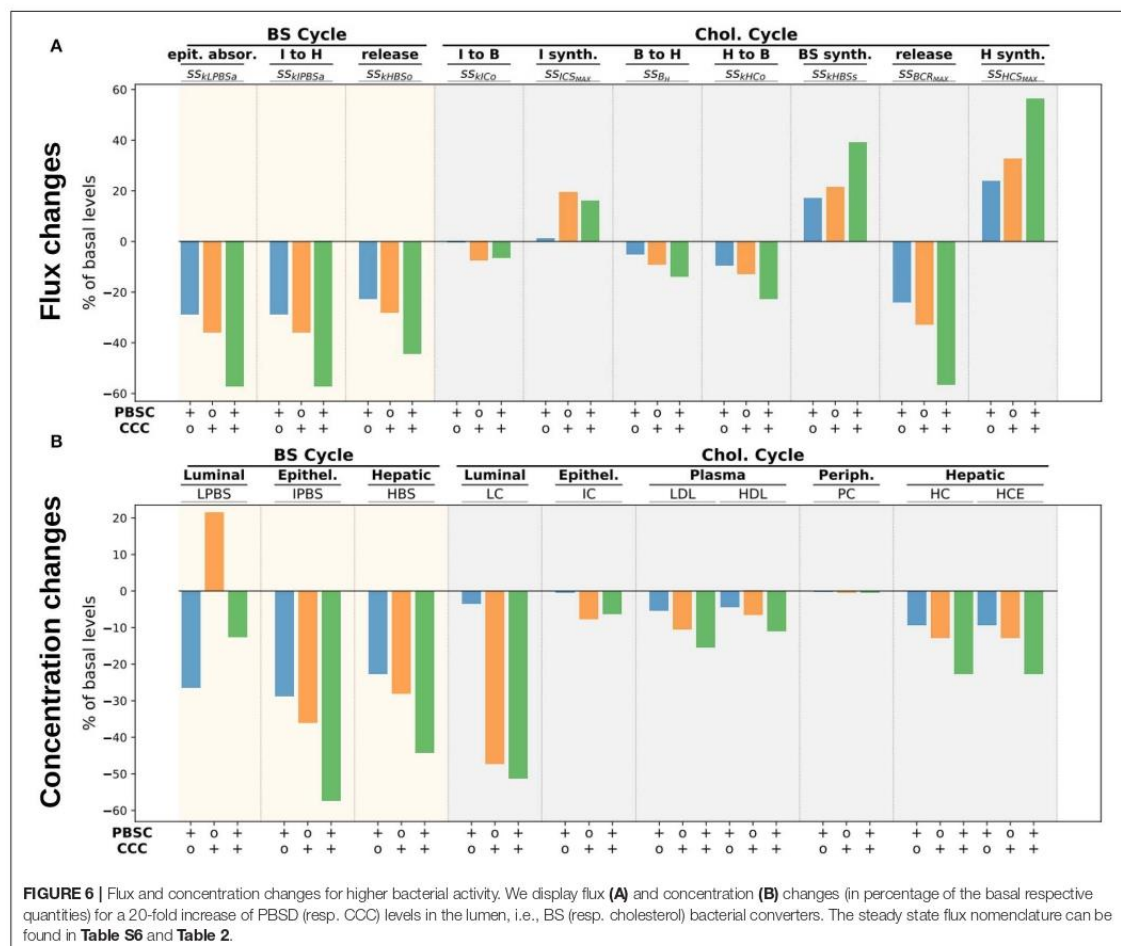
To illustrate the impact of bacterial metabolism on the whole-body cholesterol cycle and to provide a first analysis of the mechanisms involved, we performed three new simulations enhancing, respectively, (i) the bacterial carrying capacity of the BS converters, (ii) the cholesterol converters, or (iii) both. Namely, we multiplied by 20 the $PBSD_{MAX}$ (resp. CCC_{MAX}) parameter

which represents a 20-fold growth of the corresponding population, i.e., a small bacterial increase compared to the several log fold changes that can occur during bacterial colonization of the digestive track. We then displayed the corresponding Sankey graphs of the steady state BS and cholesterol cycles (**Figure S3**) with bar plots (**Figure 6, Supplementary Material**) representing the relative variations comparatively to the basal simulation of the different flux and pool concentrations.

The enhancement of the BS converter populations *PBSD* increased the bacterial activity which dropped down the luminal level of BS by about 26% (Figure 6, bottom, LPBS). This reduction induced a 28% decrease of the epithelial absorption of luminal BS, but also of luminal cholesterol (Figure 6, top, ss_{kLPBSa}). In the mean time, the cholesterol intestinal excretion was decreased so that the net balance of cholesterol exchanges with the central axis was only slightly reduced (Figure S3, top), buffering the reduction of the cholesterol absorption and reducing its impact on the whole-body cholesterol cycle. However, the decrease of the BS epithelial absorption had stronger effects on the cholesterol regulation. To counterbalance this loss, the BS biosynthesis was increased by about 17% (Figure 6, top, ss_{kHBSa}), fueled by a 23% growth of the liver cholesterol biosynthesis. Worthy of note, the contribution to the cholesterol cycle of the intestinal biosynthesis remained unchanged, whereas the liver-plasma exchanges were reduced by

9% to free up cholesterol for the BS biosynthesis. HDL and LDL cholesterol concentrations decreased by about 5%.

The increase of the CCC population had a different impact on the cholesterol and BS cycles. The higher loss of cholesterol in the lumen by direct excretion or conversion into coprostanol led to a huge decrease (47%) of the luminal cholesterol level (Figure 6, bottom, LC) which reduced by 35% the cholesterol and BS absorption, leading to a 21% increase of BS level in the lumen (Figure 6, top, ss_{kLPBSa} , and bottom, LPBS). In turn, higher luminal BS level increased the excretion and promoted the intestinal cholesterol secretion, inducing a net negative cholesterol flux from the intestinal epithelium to the lumen (Figure S3, bottom right). This local reduction of cholesterol influx in the intestinal epithelium was partially balanced by a stronger intestinal cholesterol synthesis by 19%, but the net contribution of the intestinal tissues to the central cholesterol stream was reduced by 0.06 mg day^{-1} comparatively to the basal



activity (Figure S3, bottom right, and Figure 5), showing that the conversion of luminal cholesterol had a direct impact on the cholesterol cycle. In addition to this direct action on the central cholesterol stream, the same indirect mechanism that took place in the high *PBSD* experiment occurred. The reduced BS absorption was compensated by a higher BS biosynthesis, with a higher magnitude (21% increase for high *CCC* vs. 17% increase for high *PBSD* populations). Again, the BS biosynthesis increase was allowed by a higher cholesterol hepatic biosynthesis (32%) and by a reduced transport between the liver and the blood (12%, Figure 6, top, $ss_{HCS_{MAX}}$ and ss_{kHCO}). We observed that the magnitude of the flux involved in the indirect BS-mediated regulation of the cholesterol was higher than the direct loss of cholesterol allowed by the bio-conversion of cholesterol to coprostanol (Figure S3, bottom right). The impact on the plasmatic cholesterol levels was also more important, with a 6.6 and 10.4% reduction for the HDL and LDL, respectively.

When the two bacterial functions were both enforced, the mechanisms tended to sum up, leading to a lower BS and cholesterol absorption by the epithelium (approximately a 60% decrease) and an increase of the BS synthesis by 40%. The plasmatic levels of HDL and LDL reduced by 10.9 and 15.3%, respectively. We finally observed that the impact on the peripheral cholesterol was very weak in the three cases.

3.6. Local and Global Sensitivity Analysis of the Model

After this first exploration of the bacterial impact on the cholesterol fate, we went deeper in the analysis by conducting a systematic numerical exploration. We first conducted a local sensitivity analysis of the model, relatively to the bacterial converter carrying capacities in the gut microbiota, in order to study the model response when the bacterial levels evolved. Then, we performed a global sensitivity analysis by shifting the parameters that govern eleven flux of the BS and cholesterol cycles, in order to study the relative importance of each flux in the output variability.

3.6.1. Local Sensitivity Analysis

We present the result of the local sensitivity analysis in Figure S4, where different fluxes and concentrations variations were plotted against log-fold changes of the bacterial carrying capacities of the *CCC* (orange lines, crosses) and *PBSD* (blue lines, circles) populations, comparatively to the basal carrying capacities. We observed that decreasing the bacterial levels had little impact on the overall behavior of the model. When the cholesterol converters carrying capacity was weaker, a slight increase of cholesterol levels (luminal cholesterol *LC*, intestinal cholesterol *IC*, LDL, Figure S4) was observed, but smaller BS converter levels had no effect on the cholesterol or BS cycles due to the negligible basal BS conversion (Figure 5). Conversely, a monotonous evolution of the different flux and concentrations was observed when the bacterial populations levels were increased. No saturation effects could be observed.

Several features previously observed in Figure S3 and Figure 6 for a 20-fold increase were confirmed. When the cholesterol conversion activity was enhanced, we observed a

constant increase of luminal BS concentration, together with a decrease of the BS intestinal absorption ($LPBS$ and ss_{LPBSa} , Figure S4). Varying *PBSD* levels had a very limited impact on the intestinal cholesterol, on the transport from the intestinal tissues to the blood stream and on the intestinal cholesterol synthesis (LC , IC , ss_{kICo} , and $ss_{ICS_{MAX}}$, Figure S4). This observation enforced the claim that the interaction of the BS conversion with the cholesterol cycle mainly occurred through the BS synthesis, and not through a direct variation of the cholesterol absorption. Finally, the impact of the bacterial activity on peripheral cholesterol remained very weak whatever bacterial level (*PC*, Figure S4).

The bacterial effect on the whole-body cholesterol and BS cycles varied differently when the *CCC* and *PBSD* carrying capacities changed. For intermediate bacterial concentrations (1 log-fold change comparatively to the basal levels), the cholesterol converters provided higher effects on the cholesterol and BS pools. But for higher bacterial levels (2 log-fold change), the BS converters had a stronger impact on the different flux and concentrations that were observed, except in the intestinal tissue compartment where the luminal BS modulation induced by the bacterial converters had little effects (LC , IC , ss_{kICo} , and $ss_{ICS_{MAX}}$, Figure S4). We noted that the variations reached 50% for the highest *CCC* population in the luminal cholesterol compartment, while for the highest BS converter population, this level of variation is obtained all along the enterohepatic cycle ($LPBS$, $IPBS$, HBS) and for the hepatic cholesterol concentrations (HC and HCE).

3.6.2. Global Sensitivity Analysis

A global sensitivity analysis was performed by modifying 11 parameters controlling the flux involved in the enterohepatic BS cycle and the whole-body cycle of cholesterol including the dietary cholesterol intake (k_{in}), the biliary cholesterol release (BCR_{MAX}), the luminal cholesterol absorption (k_{LCa}), the cholesterol transport from the liver to the blood ($kHCO$) and the reverse flux ($B \rightarrow H$, sum of k_{LDLha} and k_{HDLha} that were shifted simultaneously), the cholesterol synthesis (by shifting at the same time the ICS_{MAX} , HCS_{MAX} , and PCS_{MAX} parameters driving, respectively, the intestinal, hepatic and peripheral cholesterol biosynthesis), the cholesterol and BS epithelial absorption (k_{LPBSa}), the BS release in the lumen (k_{HBSa}), the BS biosynthesis (k_{HBSs}) and the bacterial population carrying capacities ($PBSD_{MAX}$ and CCC_{MAX}). We displayed the Sobol first order index, and the PCC of the different parameters for the concentration outputs in each compartment (namely, the luminal *LPBS*, the intestinal epithelium *IPBS*, the hepatic *HBS* levels for the BS cycle, and the luminal *LC*, epithelial *IC*, plasmatic HDL and LDL, peripheral *PC* and hepatic *HC* and *HCE* cholesterol pools). The Sobol index measures the contribution of a given parameter to the variability of the observed output while PCC quantifies the correlation between parameter and output variations. Both criteria are complementary: while the former helps identifying the main drivers of a given output the later also provides feedback on the sign of the interaction between parameter and output. The total sum of the Sobol indices was nearly 1 for almost all compartments, indicating that the total

variance was entirely explained by the individual variation of the parameters tested. However, for the compartments modeling the enterohepatic cycle and the LC pool a residual variance was observed, meaning that parameter interactions contributed significantly to the total variance.

As expected, the bacterial carrying capacities had a stronger negative impact on the concentration of their respective substrates in the lumen, i.e., *LPBS* (resp. *LC*) for the *PBSD* population (resp. *CCC*). The dietary intake also positively impacted the luminal cholesterol *LC* but had very little influence on the other compartments. We noted that the *PBSD* population was the main parameter that tuned down the whole enterohepatic cycle, whereas the effect of the *CCC* population was concentrated on the luminal compartment, the main (positive) contributor to the cholesterol cycle variations being the cholesterol biosynthesis. A notable impact of the BS deconjugation on the hepatic cholesterol concentrations was detected. It must be related to the strong variations noticed for *LPBS* in the local sensitivity analysis (Figure S4). Interestingly, the impact on hepatic cholesterol variations was distributed among several parameters, mainly biosynthesis, BS production, BS release and *PBSD* populations activity, all being negative but the cholesterol biosynthesis.

The main driver of the LDL and HDL plasmatic levels, which are the main biomarkers for cholesterolemia, was the hepatic cholesterol absorption: the most efficient way to reduce plasmatic cholesterol was enhancing the transport between the plasma and the liver. The cholesterol biosynthesis by the different organs and the transport from the liver to the plasma came in second and third position. The cumulative bacterial contribution was small and occupied the fourth rank, with an impact similar to the BS biosynthesis or the BS release. While the impact of the cholesterol converters was minor, the BS converters supported the main part of the bacterial contribution to the plasmatic cholesterol levels. This impact was up to a 27 and 49% reduction for, respectively, the LDL and hepatic cholesterol for a 2-log increase of BS converter levels (see Figure S4).

4. DISCUSSION

4.1. Mathematical Modeling Provided Improved Insights in the Cholesterol Cycle

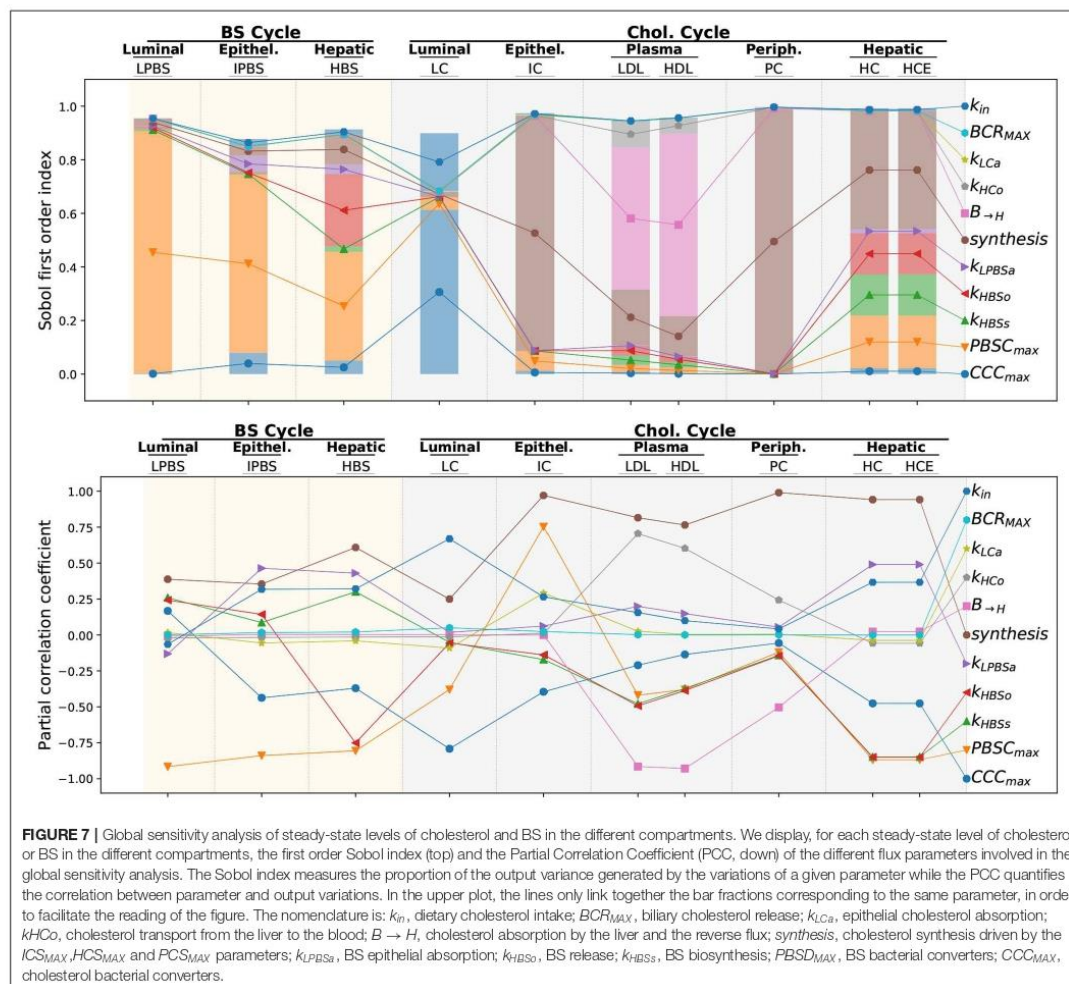
In system biology, mathematical models can be used to link heterogeneous data taken at different scales. Modeling allows to connect these observations with a sequence of mechanisms involved in regulatory processes, enabling the co-interpretation of the data otherwise difficult to achieve without the model.

Here, we used a mathematical model to interpret together *in vitro* bacterial activity with *in vivo* animal experiment data. The *in vitro* model provided a quantitative evaluation of bacterial uptake and production rates on BS and cholesterol, which was upscaled to represent the microbial activity in the small intestine. This microbial metabolism was then plugged into a whole-body model of cholesterol and BS cycle to study the systemic impact of the different cycle drivers. This whole-body model was derived from existing models. The overall structure and rate expression of the main mechanisms

was taken from Mc Auley et al. (2012) and Morgan et al. (2016), and substantially simplified according to van de Pas et al. (2010). Compared to Morgan et al. (2016), the very detailed description of cholesterol metabolism was simplified by keeping primary and final metabolites only. An accurate population model of cholesterol transport in lipoprotein has been developed in Sips et al. (2014), that we summed up by considering only two lipoprotein compartments: HDL and LDL. The model was calibrated using the method and values taken from van de Pas et al. (2011). An additional cholesterol outflow has been added from the intestinal tissue into the lumen, as observed and measured in Van der Velde et al. (2007). The outputs of the complete model were compared to the animal experiment data. As a whole, this modeling approach allowed to integrate the different data in a comprehensive framework and showed the consistency of the modeled mechanisms with the experiments.

The model provided a simplified description of cholesterol distribution at steady-state. The BS cycle appeared to be well-balanced, showing similar flux levels across its different components in a Sankey graph (see Figure 5). Unlike BS cycle, the cholesterol cycle presents an uneven repartition, the flux crossing the liver and the blood being sensibly higher than those involved in the other compartments (see Figure 5). This systemic view suggests that BS biosynthesis is the principal cholesterol flux, mainly supported by cholesterol synthesis in the liver, and by a buffering pool composed by cholesterol exchanges between the blood and the liver. This simplified view allows one to hypothesize that blood cholesterol levels will be mainly driven by the transport mechanisms between the blood and the liver, whereas liver cholesterol reduction could be strongly impacted by the biosynthesis of cholesterol (positively) and BS (negatively). In the cholesterol and BS cycles, the bacterial fluxes are small compared to others. But as BS fluxes are one order of magnitude higher than cholesterol fluxes, a small sink flux in the BS cycle can have a significant impact in the cholesterol cycle, making bacterial BSH activity a potential effective driver of cholesterol levels in the hosts.

In depth numerical exploration of the model allowed ranking the main factors that influence the distribution of cholesterol in the body. Global sensitivity analysis confirmed the actual effect of bacterial activity on host cholesterolemia (see Figure 7). If the impact of cholesterol-to-coprostanol conversion on the overall cholesterol cycle was small, bacterial BS conversion had greater effect on the liver cholesterol level. Plasmatic levels proved to be massively controlled by host mechanisms (mainly transport between blood and liver compartments closely followed by cholesterol biosynthesis), whereas bacterial activity impacts as strongly as other host mechanism the hepatic cholesterol pool. We note that the importance of cholesterol transport for plasmatic cholesterol regulation has already been highlighted by both modeling and experimental studies (Field and Gibbons, 2000; Morgan et al., 2016). The model then helped to predict the effect of targeting specific mechanisms to manage the different cholesterol pools, and to sort them by efficiency.



4.2. Limitations and Potential Improvements for Model Validation

Some assumptions have been made during the model construction that are important to keep in mind for correct interpretation. A first limitation is that the model has been built on mice data: all the flux and steady-state values used for model calibration (see Table S1) have been picked up in mice studies, as well as the model validation data taken from our animal model. The insights in regulation mechanisms obtained during this study are valid for mice, and the transposition to humans would need further studies.

Our model entails a drastic reduction of microbiota and host physiology complexity. In this study, the individual activity of two selected bacterial strains with known cholesterol

or BS activity was assumed to be representative of the overall activity of a complex microbiota after rescaling, and included in the whole body model. A more realistic mechanistic model of the bacterial activity related to cholesterol metabolism in a complex microbiota would ideally require an ecological model able to track the bacterial phenotypic diversity and interactions with the environment through metabolic models including the relevant metabolic pathways, as this was done for fiber degradation (Muñoz-Tamayo et al., 2010; Labarthe et al., 2019). The complexification and validation of the microbiota model would necessitate the dynamic screening *in vivo* of the BSH activity and cholesterol-to-coprostanol conversion of a complex microbiota. This could be achieved through multi-Omics analyses of feces.

Metagenomic data would indicate the metabolic potential of the microbial community regarding cholesterol metabolism, metatranscriptomic data would give the metabolic activity effectively expressed and targeted metabolomics would show the dynamics of key metabolites (e.g., BS, cholesterol, coprostanol). Our analysis suggests that BS metabolism could be the main target.

In the same way, host physiology has been sketched: we chose to provide as well simple phenomenological models of cholesterol host metabolism. Whereas complete metabolic pathways include a cascade of elementary reactions, we only modeled the global resulting relationship between raw substrate and final metabolites. Here again, odel validation could be completed with additional experiments. As our model is not static, model calibration and validation require both steady state pool values, to capture the physiological levels of the different pools, and flux values between compartments, to describe the regulation processes. Measuring fluxes experimentally is challenging since it necessitates several time points with dedicated reporters, inducing multiple animal sacrifices and significant replicates to mitigate inter-individual variability. That is why we chose to rely on published data for model calibration (for both flux and steady-states), and to check the consistency between the model predictions and the observed distribution of ingested cholesterol after 3 days. Actually, screening labeled cholesterol fate in the host tissue provides a much better picture of the system dynamics than measuring steady state levels only. Indeed, steady state levels could possibly be reproduced by the model if the compartment net fluxes were null, even with inaccurate fluxes between compartments. On the contrary, a correct distribution of labeled cholesterol after 3 days requires correct fluxes, otherwise D5-cholesterol propagation between compartments would not be correctly modeled. The animal experiments then allowed to both validate fluxes and steady-state values, and represented a good balance between experimental load and significance for model validation.

4.3. Is Bacterial Activity an Effective Driver of Cholesterolemia Control?

Functional characterization of bacteria isolated from gut microbiota samples allowed to identify functions related to cholesterol and BS turn-over. The main microbial mechanisms for cholesterol loss that were identified are direct cholesterol biotransformation into coprostanol, BS deconjugation and cholesterol incorporation into microbial membranes (Krija et al., 2019), which make the microbial communities a potential driver of cholesterol regulation. However, a classical counter-argument being raised is the spatial segregation between cholesterol and BS absorption, mainly located in the small intestine, and the bacterial populations, mainly located downstream in the large intestine: microbial communities could hardly be an important actor of cholesterol management if they do not have a physical access to cholesterol and BS substrates in order to degrade it before absorption by the human host.

We addressed this issue in two ways. First, we experimentally checked that cholesterol and BS were available in the large intestine by measuring in mice labeled sterol levels in the caecum and the large intestine 3 days after ingestion of the labeled cholesterol. Caecal and colonic cholesterol represented 4.5% of the overall labeled cholesterol. It demonstrates that cholesterol is available to colon microbiome and is present in luminal content and intestinal tissues. Second, we calibrated the bacterial activity of BS deconjugation to be representative of microbial populations located in the small intestine, smaller than colic populations but active. Indeed, we selected the scaling parameter $b_{gut,max}$ of BS deconjugation activity which represents the nominal bacterial concentration, as a proxy of the bacterial levels measured in the small intestine. Furthermore, BSH production is involved in BS tolerance by bacteria (Begley et al., 2005) and may be active in the upper part of the intestinal track where BS levels are high. This was taken into account in the model by mimicking the activity and functional dynamics of the *Bacteroides xylanisolvens* XB1A strain, a BS deconjugation specialist.

4.4. Relative Impact of Host and Bacterial Pathways in Cholesterol Metabolism

The contribution of bacterial pathways to the global cholesterol and BS regulation is complex. Bacterial metabolism is the main driver impacting BS turn-over. On the contrary, the impact of the bacteria on the epithelial and peripheral cholesterol is relatively weak compared to cholesterol biosynthesis by the host. To manage plasmatic and hepatic cholesterol pools, more drivers are available. If transport between blood and liver compartment is the preponderant factor of plasmatic cholesterol variations, the contribution of bacterial pathways is not null. In the liver, the impact of the bacterial pathways have the same order of magnitude than other flux, such as BS production, BS release or cholesterol biosynthesis. Hence, managing the host microbiota to enhance BS and cholesterol conversions in the lumen qualifies as a promising tool to control hepatic, and to a lower extent plasmatic cholesterol, in addition to the usual strategies aiming at controlling cholesterol synthesis and transport between compartments.

5. CONCLUSION

We derived a whole body model of cholesterol dynamics that includes microbial metabolism. This model, based on existing models lacking bacterial compartment, is grounded by *in vitro* experiments to capture the bacterial conversion of BS and cholesterol, and by *in vivo* experiments with labeled cholesterol that allowed model validation. The labeled cholesterol provided a snapshot of the deuterated cholesterol distribution after 3 days, and the model gave a precise view of the flux between compartments in the whole cholesterol and BS cycles. This study showed that cholesterol conversion to BS is the main flux of cholesterol cycle, making bacterial BS degradation a promising target for cholesterol management. An extensive model exploration confirmed numerically the impact of the bacterial activity, and the greater influence of BS degradation

on plasmatic cholesterol levels for high converters. Finally, a global sensitivity analysis indicated that transport from plasma to liver is the main driver of plasmatic cholesterol reduction, but that BS degradation is in second position, with the other BS cycle drivers: BS biosynthesis and BS release in the lumen. Bacterial activity is then a promising additional therapeutic strategy able to provide alternatives for non-responders to existing therapies.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/**Supplementary Material**.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Animal Care Committee (C2E-45 COMETHEA) INRA, Centre de Jouy-en-Josas, France.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MB and MR performed the *in vitro* and *in vivo* experiments. MB and AK produced the experimental data. ML and PL performed the mass spectrometry analysis. MB and SL developed the mathematical model. SL performed the numerical explorations and produced the figures. MB, SL, and MR drafted the paper. SL, PG, BL, EM, and MR contributed to the conception, design,

and funding of the study. All authors contributed to manuscript revision, read and approved the submitted version.

FUNDING

Funding for this work was from INRA metaprogramme MEM (Modchocycle project), SATT Paris-Saclay Micro-chol project 2016-12111. AK was supported by the project CMCU-PHC Utique (no 19G0819)-Campus France (no 41786NC). This publication has been written with the support of the AgreenSkills+ fellowship programme which has received funding from the EU's Seventh Framework Programme under grant agreement N° FP7-609398 (AgreenSkills+ contract).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to express their gratitude to Dr. Aline Potiron for her helpful discussion regarding the analysis of coprostanol producing bacteria. This work was supported by the Microbiology and the Food Chain division (MICA) of the INRAE Institute through the Metaprogramme MEM - Meta-omics and microbial ecosystems.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01121/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Arnold, D., and Kwiterovich, P. (2003). "Cholesterol-absorption, function and metabolism," in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Vol. 2, eds B. Caballero, C. L. Trugo, and M. P. Finglas (Amsterdam: Academic Press), 1226–1237. doi: 10.1016/B0-12-227055-X/00225-X
- Bazett, M., Bergeron, M.-E., and Haston, C. K. (2016). Streptomycin treatment alters the intestinal microbiome, pulmonary T cell profile and airway hyperresponsiveness in a cystic fibrosis mouse model. *Sci. Rep.* 6:19189. doi: 10.1038/srep19189
- Begley, M., Gahan, C. G., and Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 625–651. doi: 10.1016/j.femsre.2004.09.003
- Begley, M., Hill, C., and Gahan, C. G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1729–1738. doi: 10.1128/AEM.72.3.1729-1738.2006
- Doré, J., Multon, M.-C., Behier, J.-M., Affagard, H., Andreumont, A., Barthelemy, P., et al. (2017). The human gut microbiome as source of innovation for health: which physiological and therapeutic outcomes could we expect? *Thérapie* 72, 21–38. doi: 10.1016/j.therap.2016.12.007
- Field, P. A., and Gibbons, G. F. (2000). Decreased hepatic expression of the low-density lipoprotein (LDL) receptor and LDL receptor-related protein in aging rats is associated with delayed clearance of chylomicrons from the circulation. *Metabolism* 49, 492–498. doi: 10.1016/S0026-0495(00)80014-1
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Gérard, P., Lepercq, P., Lederer, M., Gavini, F., Raibaud, P., and Juste, C. (2007). *Bacteroides* sp. strain d8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5742–5749. doi: 10.1128/AEM.02806-06
- Gylling, H. (2004). Cholesterol metabolism and its implications for therapeutic interventions in patients with hypercholesterolaemia. *Int. J. Clin. Pract.* 58, 859–866. doi: 10.1111/j.1742-1241.2004.00351.x
- Haario, H., Laine, M., Mira, A., and Saksman, E. (2006). Dram: Efficient adaptive MCMC. *Stat. Comput.* 16, 339–354. doi: 10.1007/s11222-006-9438-0
- Haario, H., Saksman, E., and Tamminen, J. (2001). An adaptive metropolis algorithm. *Bernoulli* 7, 223–242. doi: 10.2307/3318737
- Igel, M., Giesa, U., Lütjohann, D., and von Bergmann, K. (2003). Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols, and stanols in mice. *J. Lipid Res.* 44, 533–538. doi: 10.1194/jlr.M200393-JLR200
- Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:125. doi: 10.1038/nrm2336
- Iooss, B., and Lemaître, P. (2015). "A review on global sensitivity analysis methods," in *Uncertainty Management in Simulation-Optimization of Complex Systems*, eds G. Dellino and C. Meloni (Boston, MA: Springer), 101–122. doi: 10.1007/978-1-4899-7547-8_5
- Iqbal, J., and Hussain, M. M. (2009). Intestinal lipid absorption. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E1183–E1194. doi: 10.1152/ajpendo.90899.2008
- Jakulj, L., van Dijk, T. H., de Boer, J. F., Kootte, R. S., Schoneville, M., Paalvast, Y., et al. (2016). Transintestinal cholesterol transport is active in mice and humans and controls Ezetimibe-induced fecal neutral sterol excretion. *Cell Metab.* 24, 783–794. doi: 10.1016/j.cmet.2016.10.001
- Jones, M., Martoni, C., and Prakash, S. (2012). Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* ncimb 30242: a randomized controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* 66:1234. doi: 10.1038/ejcn.2012.126
- Joyce, S. A., Shanahan, F., Hill, C., and Gahan, C. G. (2014). Bacterial bile salt hydrolase in host metabolism: potential for influencing gastrointestinal microbe-host crosstalk. *Gut Microbes* 5, 669–674. doi: 10.4161/19490976.2014.969986

- Kriaa, A., Bourgin, M., Potiron, A., Mkaouer, H., Jablaoui, A., Gérard, P., et al. (2019). Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism: current status and future prospects. *J. Lipid Res.* 60, 323–332. doi: 10.1194/jlr.R088989
- Labarthe, S., Polizzi, B., Phan, T., Goudon, T., Ribot, M., and Laroche, B. (2019). A mathematical model to investigate the key drivers of the biogeography of the colon microbiota. *J. Theor. Biol.* 462, 552–581. doi: 10.1016/j.jtbi.2018.12.009
- Mc Auley, M. T., Wilkinson, D. J., Jones, J. J., and Kirkwood, T. B. (2012). A whole-body mathematical model of cholesterol metabolism and its age-associated dysregulation. *BMC Syst. Biol.* 6:130. doi: 10.1186/1752-0509-6-130
- Mesmin, B., and Maxfield, F. R. (2009). Intracellular sterol dynamics. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1791, 636–645. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.03.002
- Millar, J. S., and Cuchel, M. (2018). Cholesterol metabolism in humans: a review of methods and comparison of results. *Curr. Opin. Lipidol.* 29, 1–9. doi: 10.1097/MOL.0000000000000475
- Morgan, A. E., Mooney, K. M., Wilkinson, S. J., Pickles, N., and Mc Auley, M. T. (2016). Mathematically modelling the dynamics of cholesterol metabolism and ageing. *Biosystems* 145, 19–32. doi: 10.1016/j.biosystems.2016.05.001
- Muñoz-Tamayo, R., Laroche, B., Walter, E., Doré, J., and Leclerc, M. (2010). Mathematical modelling of carbohydrate degradation by human colonic microbiota. *J. Theor. Biol.* 266, 189–201. doi: 10.1016/j.jtbi.2010.05.040
- Pool, F., Currie, R., Sweby, P. K., Salazar, J. D., and Tindall, M. J. (2018). A mathematical model of the mevalonate cholesterol biosynthesis pathway. *J. Theor. Biol.* 443, 157–176. doi: 10.1016/j.jtbi.2017.12.023
- Potiron, A., Gérard, P., Le Roy, T., Lesnik, P., Maguin, E., and Rhimi, M. (2015). Recent patents on hypocholesterolemic therapeutic strategies: an update. *Recent Adv. DNA Gene Seq.* 9, 36–44. doi: 10.2174/2352092210666151216143459
- Read, M. N., and Holmes, A. J. (2017). Towards an integrative understanding of diet-host-gut microbiome interactions. *Front. Immunol.* 8:538. doi: 10.3389/fimmu.2017.00538
- Ridlon, J. M., Kang, D. J., Hylemon, P. B., and Bajaj, J. S. (2014). Bile acids and the gut microbiome. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 30:332. doi: 10.1097/MOG.0000000000000057
- Russell, D. W. (2009). Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J. Lipid Res.* 50(Suppl.):S120–S125. doi: 10.1194/jlr.R800026-JLR200
- Saltelli, A., Chan, K., and Scott, E. (2000). *Sensitivity Analysis*. Chichester: John Wiley and Sons.
- Saltelli, A., Tarantola, S., and Chan, K.-S. (1999). A quantitative model-independent method for global sensitivity analysis of model output. *Technometrics* 41, 39–56. doi: 10.1080/00401706.1999.10485594
- Schroepfer, G. J. Jr. (2000). Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* 80, 361–554. doi: 10.1152/physrev.2000.80.1.361
- Sekimoto, H., Shimada, O., Mikanishi, M., Nakano, T., and Katayama, O. (1983). Interrelationship between serum and fecal sterols. *Jpn. J. Med.* 22, 14–20. doi: 10.2169/internalmedicine1962.22.14
- Sips, F. L., Tiemann, C. A., Oosterveer, M. H., Groen, A. K., Hilbers, P. A., and van Riel, N. A. (2014). A computational model for the analysis of lipoprotein distributions in the mouse: translating FPLC profiles to lipoprotein metabolism. *PLoS Comput. Biol.* 10:e1003579. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003579
- Swann, J. R., Want, E. J., Geier, F. M., Spagou, K., Wilson, I. D., Sidaway, J. E., et al. (2011). Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108(Suppl. 1), 4523–4530. doi: 10.1073/pnas.1006734107
- Tabas, I. (2002). Cholesterol in health and disease. *J. Clin. Investig.* 110, 583–590. doi: 10.1172/JCI0216381
- Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T., and Mierau, I. (1999). Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *J. Dairy Sci.* 82, 2530–2535. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75506-2
- Thompson, G., O'Neill, F., and Seed, M. (2002). Why some patients respond poorly to statins and how this might be remedied. *Eur. Heart J.* 23, 200–206. doi: 10.1053/ehuj.2001.3071
- van de Pas, N. C., Soffers, A. E., Freidig, A. P., van Ommen, B., Woutersen, R. A., Rietjens, I. M., et al. (2010). Systematic construction of a conceptual minimal model of plasma cholesterol levels based on knockout mouse phenotypes. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1801, 646–654. doi: 10.1016/j.bbalip.2010.02.009
- van de Pas, N. C., Woutersen, R. A., van Ommen, B., Rietjens, I. M., and de Graaf, A. A. (2011). A physiologically-based kinetic model for the prediction of plasma cholesterol concentrations in the mouse. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1811, 333–342. doi: 10.1016/j.bbalip.2011.02.002
- van de Pas, N. C., Woutersen, R. A., van Ommen, B., Rietjens, I. M., and de Graaf, A. A. (2012). A physiologically based *in silico* kinetic model predicting plasma cholesterol concentrations in humans. *J. Lipid Res.* 53, 2734–2746. doi: 10.1194/jlr.M031930
- Van der Velde, A. E., Vries, C. L., Van den Oever, K., Kunne, C., Elferink, R. P. O., Kuipers, F., et al. (2007). Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology* 133, 967–975. doi: 10.1053/j.gastro.2007.06.019
- Wang, D. Q., and Carey, M. C. (2003). Measurement of intestinal cholesterol absorption by plasma and fecal dual-isotope ratio, mass balance, and lymph fistula methods in the mouse: an analysis of direct versus indirect methodologies. *J. Lipid Res.* 44, 1042–1059. doi: 10.1194/jlr.D200041-JLR200
- Wang, D. Q., Paigen, B., and Carey, M. C. (2001). Genetic factors at the enterocyte level account for variations in intestinal cholesterol absorption efficiency among inbred strains of mice. *J. Lipid Res.* 42, 1820–1830. Available online at: <https://www.jlr.org/content/42/11/1820.short>
- World Health Organization (2017). Cardiovascular diseases (CVDs). Available online at: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Bourgin, Labarthe, Kriaa, Lhomme, Gérard, Lesnik, Laroche, Maguin and Rhimi. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Chapitre 6 : L'impact du microbiote intestinal sur la cholestérolémie

1. Présentation

La régulation du cholestérol sanguin est un axe majeur des mesures de prévention des maladies cardiovasculaires. Récemment, il a été établi que le microbiote intestinal module la cholestérolémie et pourrait constituer de nouvelles pistes préventives prometteuses. Ces activités métaboliques cibles sont principalement le piégeage du cholestérol, la production de coprostanol et les activités hydrolases des sels biliaires. L'objectif de ce travail est d'étudier leur impact bénéfique sur la cholestérolémie de l'hôte. Tout d'abord, nous avons examiné et identifié des bactéries candidates qui sont capables d'exercer ces activités métaboliques vis-à-vis du cholestérol dans l'intestin et qui représente ces trois voies métaboliques microbiennes. À travers plusieurs modèles animaux complémentaires, nous avons choisi de tester ces bactéries candidates pour évaluer le potentiel thérapeutique de la voie microbienne du microbiote intestinal la plus prometteuse comme nouvelle opportunité thérapeutique. Ces travaux sont présentés dans l'article 2 de ce chapitre. Cet article intitulé « *Understanding cholesterol metabolism through the human gut microbiota : the BSH pathway as a new therapeutic target opportunity* », a été écrit pour ce manuscrit.

2. Résumé de l'article 2

Le cholestérol est l'un des principaux éléments pour la santé humaine. Cependant, l'hypercholestérolémie entraîne le développement de maladies cardiovasculaires, telle que l'athérosclérose. D'autres troubles métaboliques sont également présents au niveau du foie, retrouvés dans le cas des NASH. Les stratégies hypocholestérolémiantes ont partiellement réduit les facteurs de risque de MCV, en ciblant directement la synthèse, l'absorption et le transport de cholestérol. Une ligne directrice d'experts cliniques a identifié l'importance de nouvelles approches pour renforcer le champ thérapeutique. Récemment, le microbiote intestinal a été reconnu comme une nouvelle source d'innovation thérapeutique et comme nouveau facteur de

gestion de la cholestérolémie. Dans ce travail, notre compréhension s'est tournée vers les interactions complexes hôte-bactéries intestinales-cholestérol et leur impact sur la cholestérolémie et, plus largement, sur la physiopathologie de l'hôte. Plusieurs voies métaboliques du microbiote intestinal, ont été attribué à cet effet hypocholestérolémiant : les hydrolases des sels biliaires (BSH), la conversion du cholestérol en coprostanol et le piégeage de cholestérol. Néanmoins, notre connaissance sur ces trois voies microbiennes semble et leur impact sur le métabolisme du cholestérol de l'hôte est encore limité.

La première partie de ce travail, s'est axé sur l'identification des bactéries intestinales humaines qui possèdent une activité microbienne catabolique vis-à-vis des stérols (piégeage du cholestérol, production de coprostanol, activités BSH), à partir d'une collection de bactéries commensales provenant du microbiote humain d'individus sains. Nos travaux ont conduit à sélectionner les 5 meilleures souches pour les activités métaboliques du cholestérol. Pour identifier la bactérie candidate la plus efficace pour chacune des trois voies d'intérêts, nous avons corrélé cette activité métabolique par rapport aux autres activités métaboliques des stérols. Ainsi, nous avons choisi AS147, comme la bactérie candidate, responsable de la formation de coprostanol, AS99, la souche représentative de la voie du BSH et AS113, pour la voie de piégeage du cholestérol.

Dans une seconde partie, nous avons cherché à évaluer le meilleur impact de ces voies de microbiote intestinal sur la cholestérolémie. Pour répondre à cette question, nous avons mis en place un modèle de souris humanisée, qui présente un profil métabolique microbien de stérols neutres. Ceci permet de reproduire un environnement à la fois complexe et contrôlé des activités métaboliques du microbiote intestinal. Puis, nous avons traité ces souris avec un régime alimentaire standard complété par 2 % de cholestérol et avec les bactéries sélectionnées précédemment AS147 (Coprostanol AS147), ou AS 99 (BSH AS99), AS 113 (Piégeage de cholestérol, AS113), ou ces 3 bactéries commensales pour tester l'effet synergique des voies des microbiotes intestinaux (synergie). Un traitement pharmacologique de référence, la rosuvastatine, est administré pour comparer l'efficacité des approches, le microbiote intestinal contre ce ciblage de la physiologie de l'hôte (Statines). Après 10 semaines de traitements, les groupes traités par la solution synergie, la solution de piégeage du cholestérol AS113 et le coprostanol AS147, ont montré une réduction significative de la prise de poids. Il est frappant de constater qu'après 10 semaines, la moyenne des niveaux de cholestérol total dans le plasma du groupe traité avec le BSH

AS99 a été significativement abaissée aux mêmes niveaux que le groupe traité avec des statines. Dans l'ensemble, le traitement par le BSH AS99, une voie microbienne représentative du BSH, a l'impact le plus efficace sur le taux de cholestérol.

Suite à ces résultats, nous avons sélectionné, la bactérie candidate BSH pour renforcer son étendu thérapeutique microbien dans un contexte liés au trouble du métabolisme du cholestérol, l'athérosclérose et les NASH dans des modèles précliniques de lapin. Ce modèle de lapin est nourri avec une alimentation enrichie en pour représenter un modèle qui présente des lésions initiatrices de l'athérosclérose, des plaques d'athérome visible au niveau des artères de l'animal. Pour cela, vingt-quatre lapins NZW, répartis en trois groupes. Les lapins ont été nourris pendant 8 semaines : un groupe reçoit un régime standard (STD), un autre groupe est nourrit avec un régime standard avec 2 % de cholestérol (CHOL), et un dernier groupe avec un régime standard avec 2 % de cholestérol, qui est traité avec une solution bactérienne BSH AS99. Après 8 semaines de traitement, le traitement BSH AS99 CHOL a permis de réduire le poids corporel de 46,6 % par rapport au groupe du régime Chol. Le groupe BSH AS 99 semble avoir une diminution de 15,03 %, du niveau de cholestérol total (T-Chol) et de 15,7 % de cholestérol LDL (LDL-Chol) et de 24,0 % de triglycérides (TG) par rapport au groupe du régime CHOL.

Par ailleurs, nous avons également évalué l'effet de la bactérie BSH AS99 CHOL au niveau des lésions hépatiques liées au NASH. Le traitement au BSH AS 99 n'a pas modifié le poids physiologique du foie. En ce qui concerne l'architecture des hépatocytes, nous pouvons différencier les structures des lobules hépatiques dans tous les groupes traités. La présence de stéatose microvésiculaire dans les groupes Chol-diet et BSH AS 99 Chol-diet. Pour évaluer l'étendue de la stéatose, nous procédons à un score histologique de la stéatose, le score d'activité de la NAS, établie à partir de trois critères : la stéatose, l'inflammation et le ballonnement hépatocytaire. Ainsi, le traitement BSH AS99 semble améliorer la stéatose hépatique.

Enfin, nous avons cherché à renforcer son étendue thérapeutique de notre bactérie représentative BSH AS99 sur les lésions d'athérosclérose. Les analyses histopathologiques ont permis d'identifier la présence de plaques d'athérome au niveau de la carotide, utilisée comme marqueur de l'athérosclérose. Avec ce protocole, les lapins ont développé des plaques d'athéromes

avec le régime standard avec 2 % de cholestérol. Cependant, il est important de noter que le changement macroscopique de l'intima de l'artère carotide n'est pas significatif chez les lapins traités par le BSH AS99 que chez le groupe Chol.

Pour compléter notre réponse, on pourrait proposer d'étudier l'impact mécaniste des voies du BSH AS 99 sur le métabolisme de l'hôte. Notamment, sur les gènes impliqués dans le métabolisme du glucose (*glucose-6-phosphatase*), dans les récepteurs immunitaires innés, les récepteurs de type toll-like (*Tlr1*, *Tlr2*, *Tlr4*). La voie BSH semble surtout exercer un impact sur les gènes qui régulent l'expression du *récepteur X du farnesoid* (FXR) et du récepteur membranaire TGR5, impliqués dans la régulation du métabolisme des lipides, du glucose et de l'énergie chez l'hôte. L'activation de FXR dans le foie et l'intestin joue un rôle crucial dans la régulation i) des niveaux de BA dans la circulation entéro-hépatique ii) de l'homéostasie des lipides, iii) des réponses inflammatoires iv) de la fonction barrière et de la prévention de la translocation bactérienne dans le tractus gastro-intestinal.

En résumé, nous avons démontré l'impact du microbiote intestinal sur le métabolisme du cholestérol et les troubles associés dans deux modèles précliniques. La voie du BSH a effectivement diminué le gain de poids, la cholestérolémie, et a atténué l'évolution du dysfonctionnement du foie vers une NASH. Nos résultats révèlent une voie spécifique du BSH dans l'intestin pour le soulagement des troubles du cholestérol et fournissent des indications sur le mécanisme thérapeutique ciblant le microbiote intestinal.

3. Article 2 « *Towards a better understanding of the microbial metabolism of cholesterol* »

Towards a better understanding of the microbial metabolism of cholesterol

Mélanie Bourgin ^{1,2}, Aicha Kriaa ^{1,2}, Héra Mkaouar ¹, Aline Potiron¹, Samira Boudebouze ¹,
Emmanuelle Maguin¹, Jean-Claude Desfontis², Moez Rhimi¹

¹ Institut Micalis, INRAE, Microbiota Interaction with Human and Animal Team (MIHA), AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

² UPSP NP3 (2017.B146), Nutrition, Pathophysiology and Pharmacology, Oniris, College of Veterinary Medicine, Food Sciences and Engineering, Atlanpôle-La Chantrerie, Route de Gachet, 5 BP, Nantes, France

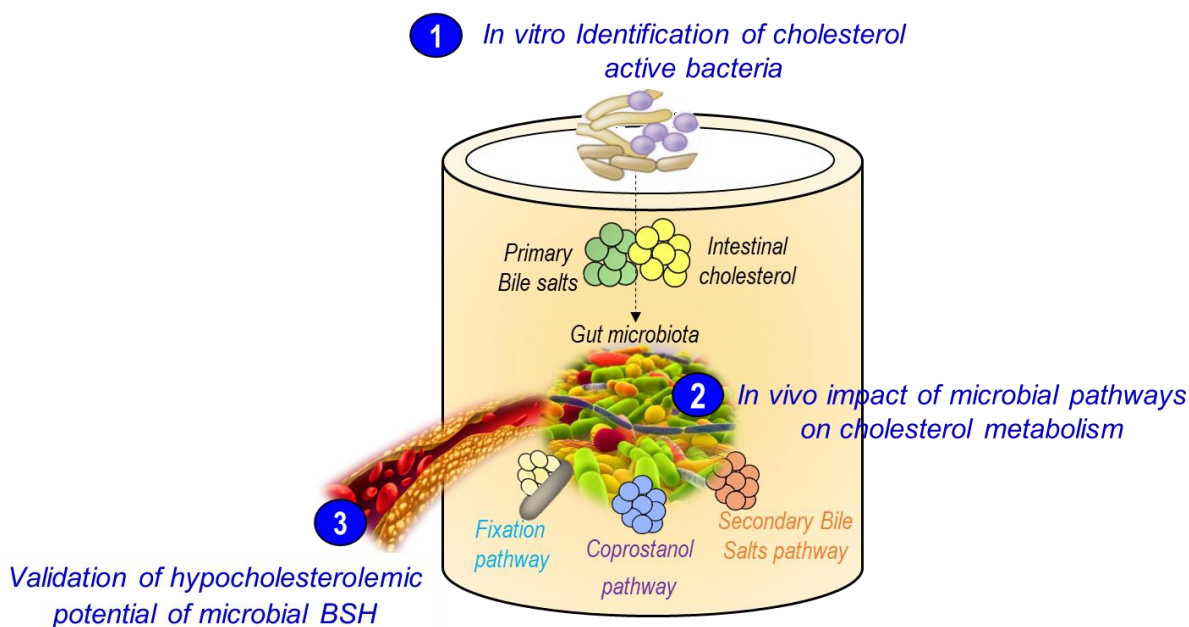
Abstract

Gut microbiota is associated to several host metabolism disorders, such as cholesterolemia. In this context, the gut microbiota could have also a beneficial impact through different microbial pathways including mainly: entrapment of cholesterol, coprostanol production and the bile salt hydrolase activities. In this report, we identified three new gut bacteria displaying each one of these 3 microbial metabolic pathways. Analysis of the impact of these microbial metabolic pathways in mice gives evidence that BSH constitutes the most important lever for the management of cholesterolemia. To reinforce these data, we confirmed the attractive hypocholesterolemic potential of BSH-active bacteria by using a rabbit model. Our results highlight the use of gut bacterium with BSH activity as probiotic strategy to face hypercholesterolemia.

Keywords: Cholesterol; coprostanol; cholesterol entrapment; bile salt hydrolases; human microbiome; holobiont.

Graphical abstract

Strategies for studying the human gut microbiota on the cholesterol metabolism



Introduction

Cholesterol is one of the main important components for human health. At least cholesterol is a precursor for the steroid sex hormones and vitamin D syntheses (**Ikonen *et al.*, 2008**). Cholesterol is transported by lipoproteins and distributed within the human body (**Feingold *et al.*, 2018**). Level of blood cholesterol is managed by i) the cholesterol entrance pathway (hepatic biosynthesis, dietary intake), ii) the intestinal cholesterol absorption into the circulatory system and iii) the cholesterol elimination pathways including storage in the peripheral tissues, production of bile salts (BSs) and production of coprostanol (**Grundy, 1983; Wang, 2007; Farkas *et al.*, 1973; Russel, 2003; Kriaa *et al.*, 2019**).

High cholesterol is also a major risk factor for the development of cardiovascular diseases (CVDs) (**Goldstein and Brown, 2015; Stary *et al.*, 1995; Libby *et al.*, 2019**). To down this cholesterol increase, several hypocholesterolemic strategies have been developed (**CTT *et coll*, 2015; NCD-RisC, 2020; Wadhera *et al.*, 2016**). These therapeutic approaches, including mainly statins, display several limits such as significant proportion of non-responders among patients (20 - 30 %) and the omission of the impact of the gut microbiota on the cholesterol cycle. The use of probiotic to reduce the cholesterol level was also reported; however, these strategies remain with limited success to face hypercholesterolemia (**Grundy *et al.*, 2019; Mach *et al.*, 2020**). Recently, by using fecal microbiota transplantation experiments, we demonstrated that the gut microbiota plays a key role in the cholesterol metabolism (**Le Roy *et al.*, 2019**). To better understand the cholesterol metabolism in human, several mathematical models for cholesterol cycle were previously established aiming to the prediction of the cholesterol distribution in human. However, these models lack the description of the microbiota as a physiological component influencing the cholesterolemia. Lately, we set out a new mathematical model of cholesterol cycle including the gut microbiota as a key factor influencing the cholesterol level in the body (**Bourgin *et al.*, 2020**). In fact, bacteria can alter the cholesterol level through other activities such as i) the deconjugation of bile acids by their bile salt hydrolases (BSH), ii) the conversion of cholesterol into coprostanol and iii) the binding of cholesterol to the bacterial surfaces and possibly for given species, the incorporation of cholesterol into the bacterial membrane. However, the relative importance of the host and microbiota metabolism in the management of cholesterol and cholesterolemia remains unknown.

In this report, the impact of BSH, coprostanol production and cholesterol entrapment were analyzed and their contribution to the downregulation of cholesterolemia was evaluated. To do that new human gut bacteria encoding for one of each microbial activity on cholesterol were isolated and their impact on cholesterolemia was studied using a mice model fed with high cholesterol diet. Our results showed that BSH pathway is the most important microbial pathway to manage the cholesterol. The attractive potential of BSH as a promising hypocholesterolemic was also confirmed by using a rabbit model of hypercholesterolemia.

Results

Identification of cholesterol active bacteria

To identify cholesterol active commensal bacteria, we screened our collection of commensal bacteria for coprostanol production, BSH activity and cholesterol entrapment (**Figure 2**). Analysis of the conversion of cholesterol into coprostanol demonstrates that few strains were able to produce coprostanol. Interestingly, we found a new strain assigned to *Bacteroides vulgatus* AS147 displaying a high rate of coprostanol production (comparatively to already known strains including *Bacteroidetes* sp. D8). Moreover, *Bacteroides vulgatus* AS147 showed a low BSH and cholesterol entrapment activities (**Figure 2A**). Concerning the BSH activity, we isolated *Bacteroides uniformis* AS133 as a very high BSH producer when compared to already reported commensal strains. Notably, *Bacteroides uniformis* AS133 did not show a significant cholesterol entrapment and coprostanol production. For this reason, AS99, a *Bacteroides* strain, is the appropriate candidate to represent the BSH pathway (**Figure 2B**). Analysis of the entrapment of cholesterol showed that commensal bacteria displayed important level of cholesterol fixation. Interestingly, *Bacteroides caccae* AS127 showed one of the highest averages of cholesterol entrapment of about 82 % and a low BSH activity and coprostanol production (**Figure 2C**). These functional screenings permit the selection of the three best bacteria representative of each microbial cholesterol pathway.

A

Classification	Bacteria	Coprostanol production rate (%)	BSH Activity (U/mg)	Cholesterol assimilation (%)
Positive control coprostanol pathway	<i>Sp. D8</i>	30	ND	38.8±2
	BV	9	34.3±5	69.6±0.3
1	AS147	19.68	ND	72.8± 4
2	AS133	5.39	787.5± 115	75.2± 4
3	AS127	4.9	9.97± 1	82.4± 2

B

Classification	Bacteria	Coprostanol production rate (%)	BSH Activity (U/mg)	Cholesterol assimilation (%)
Positive control BSH pathway	<i>L. reuteri</i> NCIMB 30242	ND	79±10	83.8± 3.78
1	AS133	5.39	787.1± 115	75.2± 4
2	AS99	2.3	163± 9	62.3± 1
3	AS146	1.8	75± 15	64.8± 4

C

Classification	Bacteria	Coprostanol production rate (%)	BSH Activity (U/mg)	Cholesterol assimilation (%)
Positive control cholesterol entrapment pathway	<i>L. acidophilus</i> ATCC314	ND	3.3± 1.7	19.9±1
1	AS96	ND	33±1	98.1±1
2	AS127	4.9	9.97±1	82.4±2
3	AS113	ND	95±1	80.5±2

Figure 2: Selective human gut bacteria with microbial cholesterol activities.

(A) Coprostanol production of the best three prevalent *Bacteroidetes* strains are represented in Figure 2A. Representative values were expressed in coprostanol production rate (%). The strains were evaluated with two reference bacteria, *Bacteroides sp. D8*. and *Bacteroides vulgatus*. (B) BSH activities of three prevalent *Bacteroides* strains, with one reference strains *Lactobacillus reuteri* NCIMB. Activity was tested with the most of representative glyco- or tauro-conjugated primary BA found in human intestinal tracts. Assays were performed in triplicate. (C) Cholesterol entrapment was determined by cholesterol assimilation method from the culture commensal bacteria medium. Assays were performed in biological duplicate. ND: Not detected.

In vivo impact of microbial pathways on cholesterol metabolism

During the 10 weeks period of treatment by high cholesterol diet and probiotics, body weight changes were recorded every week (**Figure 3A**). Compared to the vehicle group, we note that statin treatment of HCD fed mice did not reduce the body weight gain during the overall period. While all mice treated with selected strains displayed lower body weight gain during the same period (**Figure 3A**). Notably, a significant effect was obtained by AS147 and AS99, two bacterial strains that displayed coprostanol production ability and BSH activity, respectively. The most important effect on body weight was obtained with AS113 (entrapment of cholesterol). In fact, AS113 reduced the body weight by around 30 % from the third week until the end of experiments, compared to non-treated group (vehicle). Similar observation was also obtained using a mixture of the three combined bacteria (**Figure 3A**). These results demonstrate that, unlike statins, bacterial pathways can reduce the body weight gain caused by HCD.

According to the analysis of the lipid profile after 10 weeks of supplementation, statins significantly reduced total cholesterol by 20 % compared to diseased group (**Figure 3B**). As expected, total serum cholesterol was significantly lower in all groups treated with selected strains. In fact, AS113 and AS147 reduced cholesterol blood level by 11 % and 4 % respectively. Interestingly, AS99 displayed the most important effect and reduced total cholesterol level by 20 % compared to vehicle group (**Figure 3 B**). Such effects were similar to those obtained with statins and reflect the importance of BSH pathway in cholesterol metabolism. When combined in a mixture, the three bacterial species were also effective and resulted in low cholesterol level of about 15 % (102 mg/ml vs 120 mg/ml for vehicle group). These results indicated the key role of BSH pathway. In coherence with these effects, similar results were obtained regarding the serum LDL-Chol level. In fact, bacterial mixture allowed LDL-Chol reduction by 21.5 % (**Figure 3C**). Furthermore, when supplemented alone, all selected strains led to a significant decrease in serum LDL-Chol. AS99 strain was distinguishable by the highest effect, which was similar to statins (both of them reduce LDL-Chol by 35 % compared to vehicle control). Conversely, the weakest effect was obtained with AS147 (reduction of LDL-Chol by 7.2 % compared to vehicle group). Consistent with circulating cholesterol and LDL-Chol, statins as well as selected strains supplementation allowed plasma triglyceride decrease compared to non-treated group (vehicle).

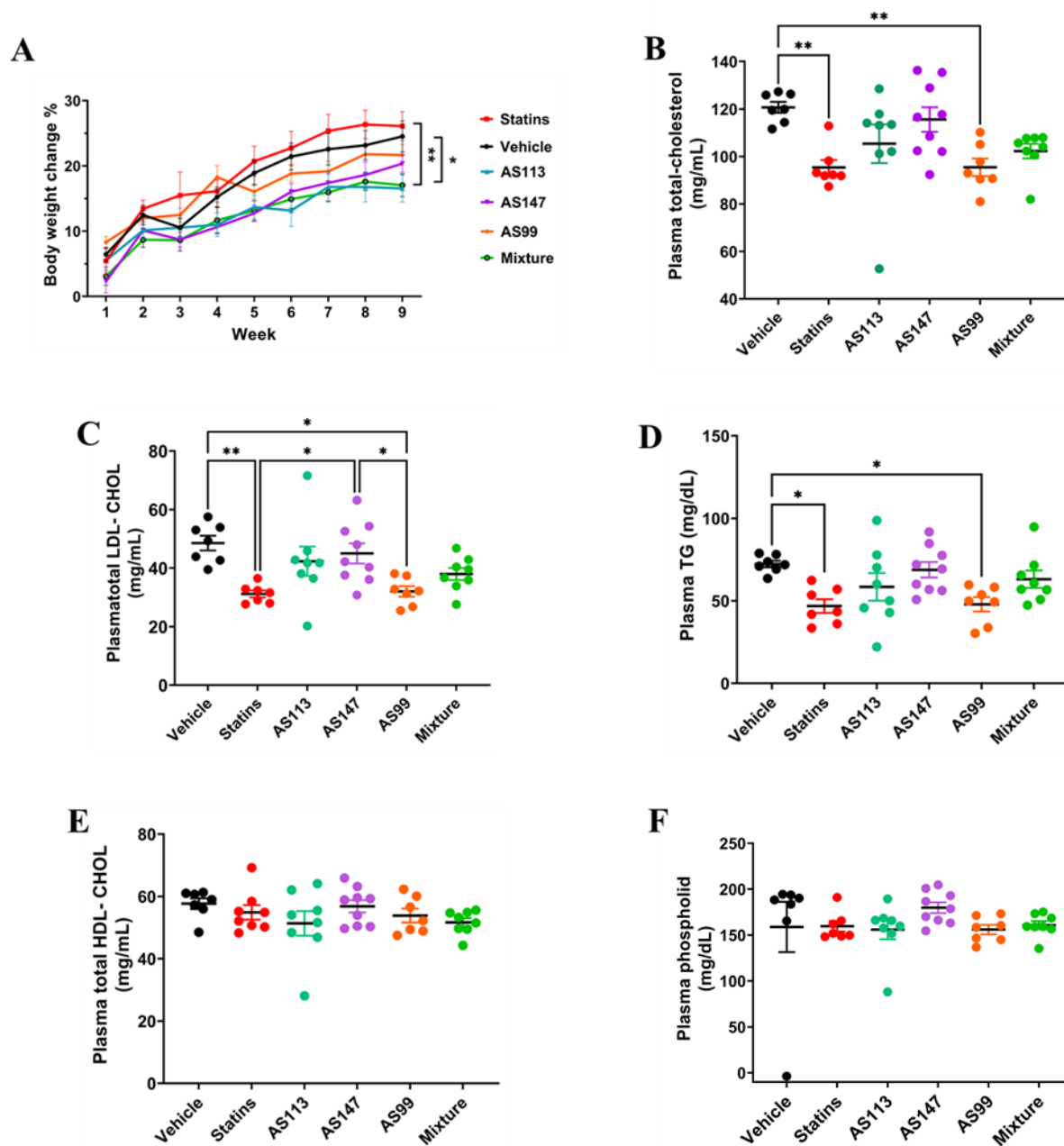


Figure 3: Effect of the gut microbiota cholesterol-lowering pathways in mice.

(A) Body weight change curve. Lipide profile (B-E) Plasma total cholesterol (B), LDL-Chol (C), plasma triglycerides (TG) (D) and HDL-Chol (E), (F) Plasmatic phospholipase levels. Data presented as mean, (SEM) or numbers. N=7-8 mice par groups. All groups received a standard diet supplemented with 2 % of cholesterol (CHOL); (Vehicle) group received vehicle and CHOL-diet; (COPROSTANOL AS147) received group CHOL-diet and *Bacteroides vulgatus*, AS 147 (Entrapment of cholesterol AS 113) AS 113 (BSH_CHOL) AS 99; (SYNERGIE) 3 commensal bacteria (AS147, AS99, AS113). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test for (C) and two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test for (B). (P): *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

Non-significant effect was obtained following AS147 administration, while AS113 reduced TG level by 19 % (**Figure 3D**). Similar level was obtained upon gavage by bacterial mixture (a reduction by 12 %). By contrast, AS99 displayed similar effect to statins, and efficiently reduced TG level to 47.89 mg/ml compared to 72.33 mg/ml for vehicle group (**Figure 3D**). Unlike circulating cholesterol, LDL-Chol and TG, no significant effect was obtained with HDL-Chol and phospholipids. In fact, AS147 administration did not change HDL-Chol level, while it was slightly decreased by AS113, AS99, bacterial mixture as well as statins. Regarding the effect on phospholipase, only AS147 administration slightly increased this enzyme level, while other probiotics supplementation as well as statins had no effect.

Validation of hypocholesterolemic potential of microbial BSH

Along the 8-week treatment of control (STD), cholesterol-enriched (CHOL) and AS99 CHOL diet, NZW rabbit weight was recorded everyday (**Figure 4A**). Strikingly, the weight gain of rabbit under standard diet was higher than the weight gain from rabbit under CHOL diet. These body weight gain difference may be explained by small cumulative food intake. Conversely, we observed that treatment with AS99 CHOL diet led to reduction of 46.6 % of the weight gain compared to control diet. These results indicates that AS99 strain could reduce body weight gain induced by cholesterol intake.

Similar effect was observed at the lipid profile level. After the 8-week treatment, CHOL diet caused a significant increase in total cholesterol, LDL-Chol and TG plasmatic levels compared to STD diet group as expected. Upon AS99 treatment, a reduction by 15 % of total cholesterol level was observed compared to CHOL group (**Figure 4B**). In terms of LDL plasmatic level, AS99 had similar effect and reduced by 15.7 % the increased LDL level (**Figure 4C**). Consistent with total cholesterol and LDL level decrease, AS99 induced a significant reduction of 24 % in triglyceride levels (**Figure 4E**). Strikingly, administration of CHOL diet led to a significant increase of plasmatic HDL levels compared to control STD group (**Figure 4D**). Furthermore, BSH AS99 seemed to induce a slight reduction in HDL-Chol levels (**Figure 4D**). In agreement with the association between atheromatous plaques and phospholipase, high cholesterol diet significantly increased the level of phospholipase compared to standard diet (**Figure 4F**). Following BSH AS99 administration, a decrease of phospholipids level was induced when compared to CHOL group. Hypercholesterolemia is amongst the most leader risks of NASH (Non-Alcoholic steatohepatitis),

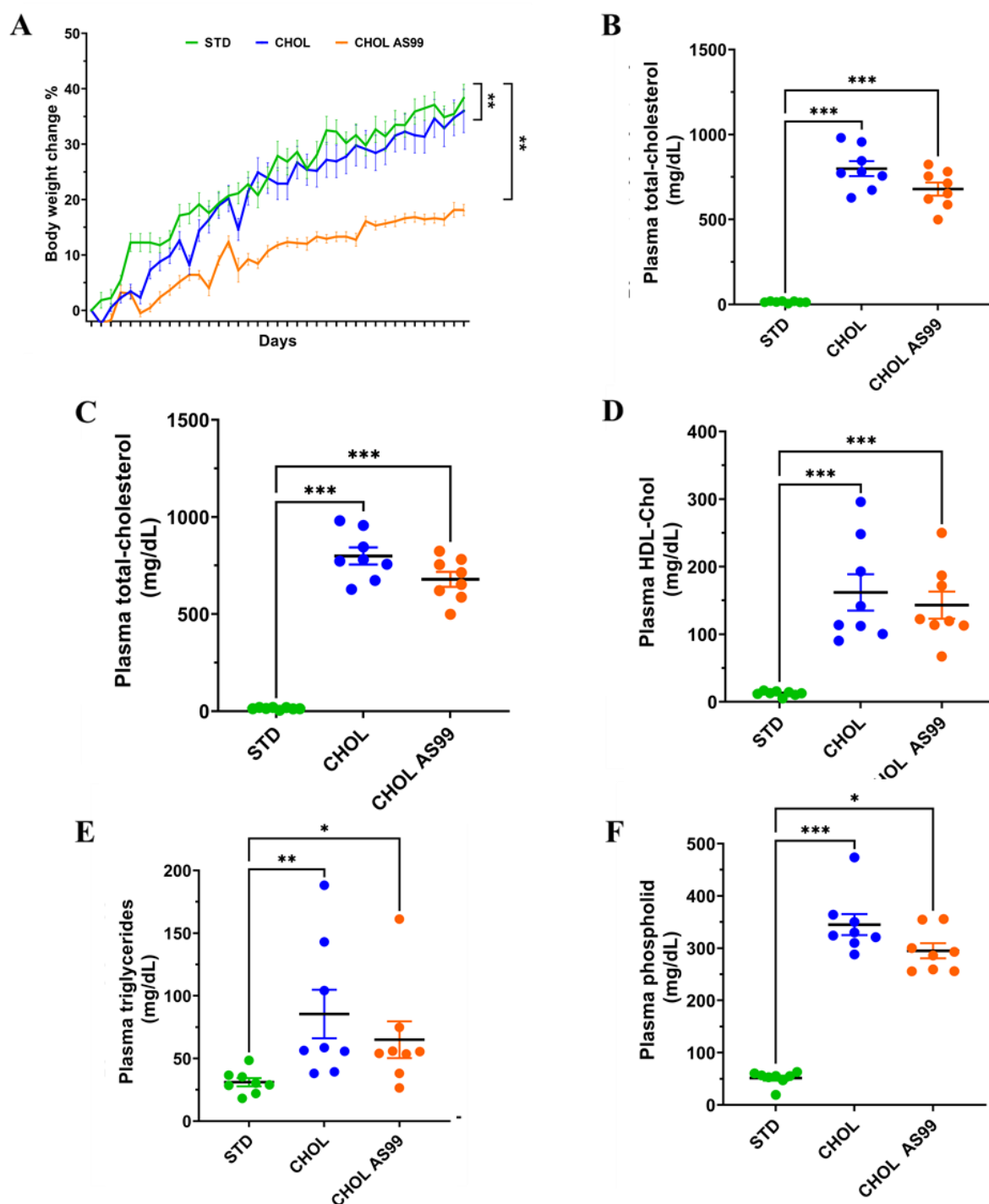


Figure 4: Evaluation of the BSH pathways on the cholesterol metabolism disorders in rabbit.

(A) Cumulative weigh change curve (%). (B-E) Lipidic profile: Plasma total cholesterol (B), LDL-Chol (C), HDL-Chol (D) and plasmatic triglycerides (TG) (E). Plasmatic phospholipase levels (F). Data presented as mean, (SEM) or numbers. N=8 rabbits par groups. All groups received a standard diet (STD-diet) or a standard diet supplemented with 2 % of cholesterol (CHOL-diet); Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test for (B-F) and two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test for (A). (P): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

a severe form of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) typically characterized by i) prominent fatty liver (steatosis), ii) inflammatory cells infiltration (inflammation) and iii) hepatocyte swelling. Therefore, based on these three criteria, we determined the NAS activity score to assess the extent of the steatosis (**Figure 5C and 5D**). In the control group, livers were smaller with pointed borders. They were a dark-red and bright color (**Figure 5A**). While livers in the CHOL diet group were yellow-pallid color and greasy, those from the AS99 group were yellow-red and bright color. In both last groups, rabbit displayed liver hypertrophy with rough borders (**Figure 5A**). The liver to body weight ratio is shown in **Figure 5C**. Consistent with liver surface analysis, after eight weeks of a high-cholesterol diet, the liver size to body weight ratio had obviously increased compared to the control group. This ratio was unchanged after the AS99 administration (**Figure 5C**). Histological analysis revealed structured lobules in the control group. Each lobule was centered on visible circular central vein; it contained neatly ranked hepatocytes with clear nucleus. There was no lipid accumulation in livers within this group (**Figure 5B**). However, cholesterol supplementation induced extensive changes in liver physiological features. HE staining indicated that rabbits fed with CHOL diet had extensive liver cords disorder with ballooning hepatocytes and unclear cell boundaries. Notably, there was a pronounced inflammatory cells infiltration. Large adipocytes were also present and fat vacuoles in hepatocytes, a typical feature of hepatic steatosis, appeared. These observations were consistent with the NAS score since this parameter was 16 times higher in group fed with CHOL-diet compared to rabbit fed with normal diet (**Figure 5D**). AS99 group presented more arranged hepatocytes relatively to HCD group. In addition, AS99 administration could effectively alleviate hepatic steatosis caused by cholesterol supplementation, since less inflammatory cells infiltration and mild accumulation of lipid droplets were observed (**Figure 5C**). Subsequently, these effects allowed the reduction of NAS score by 18.75 % compared to CHOL diet group (**Figure 5D**).

Hypercholesterolemia is also a main risk factor of CAS (carotid atherosclerosis). This lesion of the arterial walls leads to narrowing of the arteries and increases the risk of cardiovascular disease. CAS is usually comorbid with atherosclerotic plaque development characterized by arterial media and intima thickening, together with extracellular lipid accumulation and foamy cell infiltration. To assess the impact of AS99 strain, HES staining of artery aorta and the measure of the ratio intima/media thickness were performed.

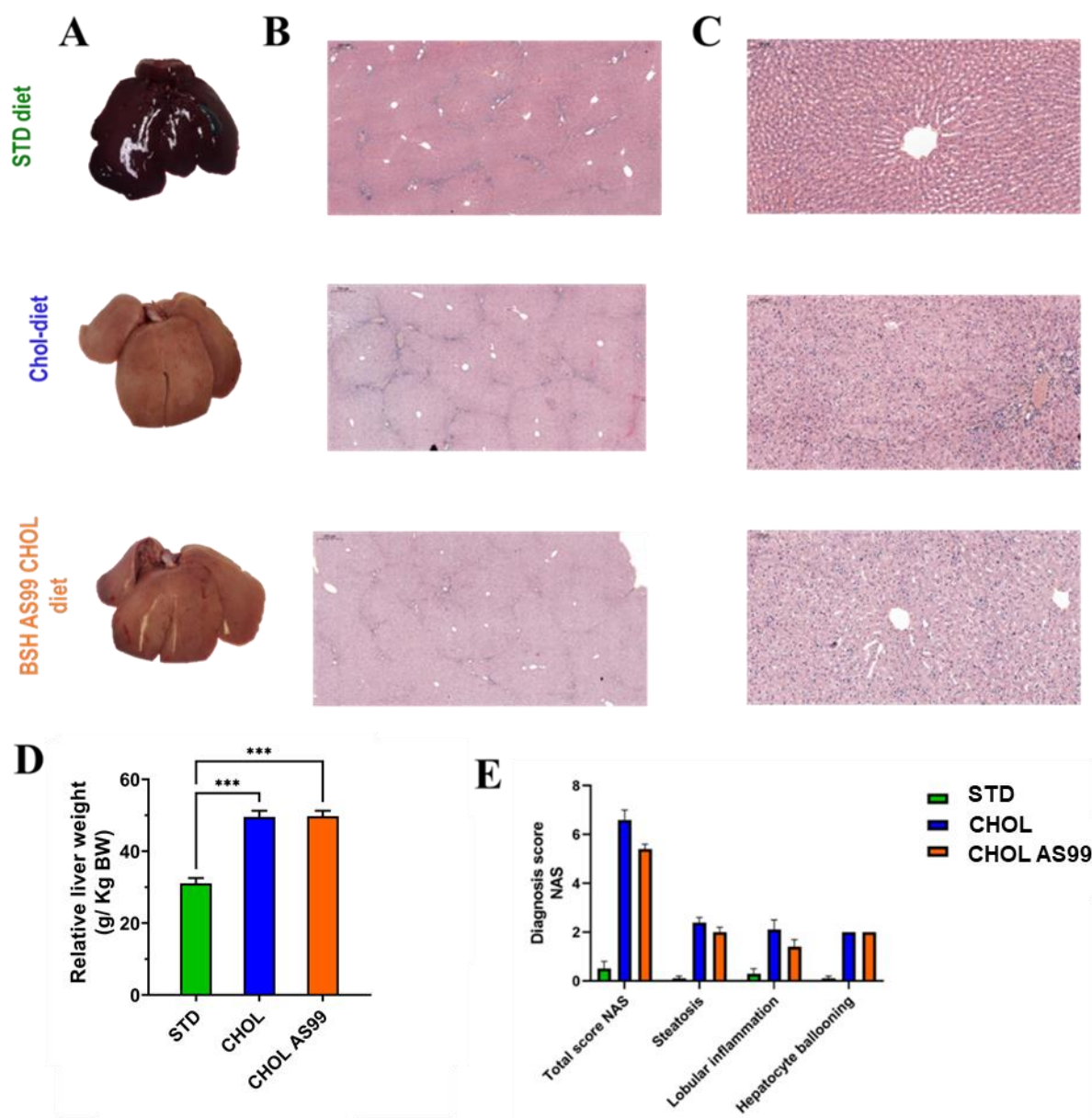


Figure 5: Macroscopic and histological changes in the livers of rabbits. (A) Liver morphology of each group. (B) Liver histology sections stained with H&E revealed the presence of vessels with the portal triad and hepatic lobule structure(x2). Histopathological feature of the liver parenchyma. Microscopy finding (10x). (C) Liver histology sections with 100x, Bar length = 500µm. (D) Pathological diagnosis with NASH activity score (NAS) graded three histological features namely steatosis, hepatocellular ballooning, and lobular inflammation, accorded to NASH clinical score. Data presented as mean and SEM with numbers, N=8 rabbits/ groups. All groups received a standard diet (STD-diet) or a standard diet supplemented with 2 % of cholesterol (CHOL-diet); (BSH_AS99) *Bacteroides xylanisolvens*. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test for (D). (P): *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

As shown in figure 6A, arterial wall in control group was complete and the intima was composed of a monolayer of endothelial cells adherent to the elastic plate (**Figure 6A**). The endothelial cell layer maintained its integrity and the diameter of the lumen was uniform. No aortic lesions or presence of foam cells were noted in rabbits from this group (**Figure 6A**). By the contrast, histological examination of coronary aorta in the group fed with CHOL diet revealed thickening of intima and arterial media. These observations were confirmed by a considerable increase of the intima/media thickness ratio, which was 31 times higher compared to normal control group (**Figure 6D**). The thickest section of arteries showed lipids deposits and foamy cell infiltration, thereby indicating an early phase of atherosclerosis development (**Figure 6B**). HE staining and thickness ratio analysis indicated that AS99 gavage did not exert a statistically significant decrease of intima and media thickness (**Figure 6C, 6D**). Nevertheless, this strain alleviated atherosclerotic lesion through the prominent reduction of foamy cells infiltration and lipid accumulation (**Figure 6C**).

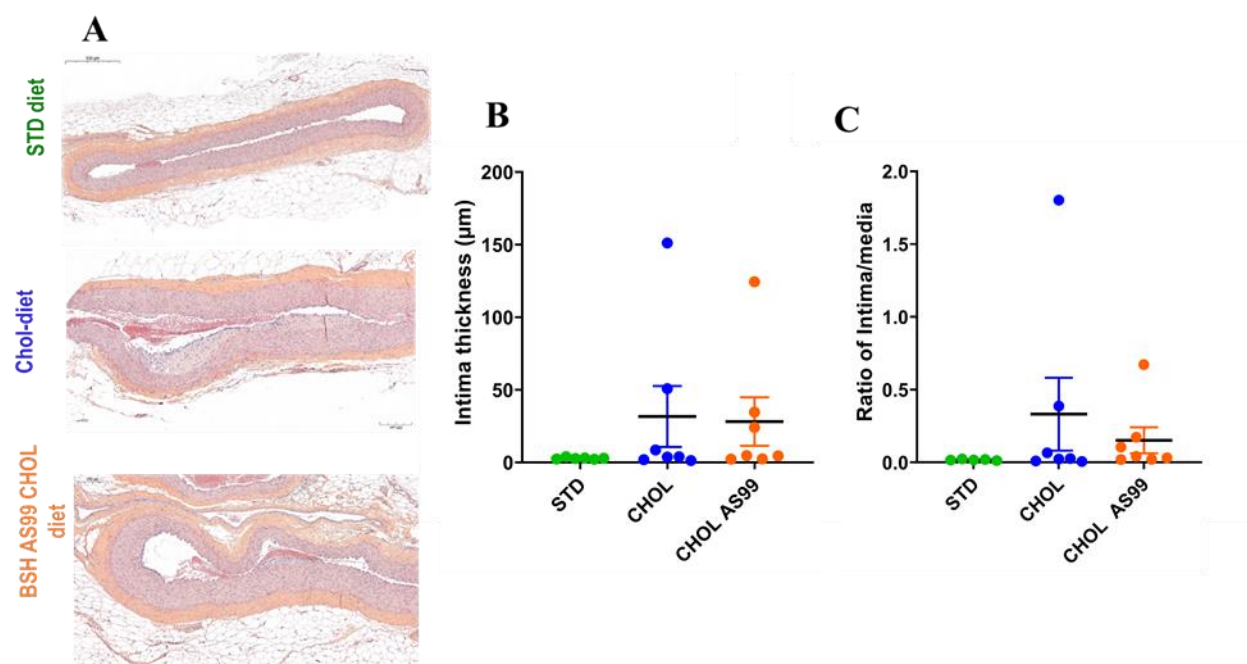


Figure 6: The effect of AS99 strain on atherosclerosis. (A) Microscopic study of the intimal layer thickness of (x 6). (B) The intima thickness in three groups from the carotid. (C) Analysis of the ratio of intima to media thickness in three groups from the carotid. Mean \pm SEM. n= 8 rabbits.

Discussion

The role of the gut microbiota in health and diseases has raised growing interest over past years. While interactions between the gut microbiota and host metabolism are beneficial in healthy conditions, changes in gut microbiota composition and metabolic potential are contributing factors to diseases development including CVD (**Tang et al., 2017**). Although cholesterol is a major risk factor of CVDs development, gut bacterial mechanisms impairing cholesterol metabolism have been scarcely investigated. In the present study, we investigated the contribution of 3 microbial gut metabolic activities, namely cholesterol entrapment, cholesterol conversion into coprostanol and bile acids deconjugaison (BSH) activity to cholesterol metabolism. To that aim, we first focus on the identification of gut commensal bacteria displaying *in vitro* a strong activity for each one of the 3 microbial metabolic pathways (**Figure 2 A-C**). In terms of cholesterol conversion into coprostanol, under the same operating conditions, the amount of coprostanol produced by *Bacteroides vulgatus* AS147 is higher than that of the positive control strain *Bacteroides vulgatus*. In addition, contrary to AS133 and AS127 strain, AS147 did not exhibit BSH activity and displayed lower cholesterol assimilation. Consequently, AS147 was selected as bacterial candidate for the coprostanol pathway. With regards to BSH activity, both AS133 and AS99 had a BSH activity 10 and 2-fold higher respectively when compared to the control strain *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242. However, AS99 appeared as a better candidate to study the contribution of BSH activity to cholesterol-lowering due to its low coprostanol and cholesterol entrapment activity compared to AS133 strain. Commensal bacteria showed a higher cholesterol entrapment activity than other gut bacteria (**Pereira et al., 2002**). In fact, AS113 displayed the highest rate of cholesterol entrapment, no coprostanol production and low BSH activities, thus fulfilling our selection criteria for cholesterol entrapment bacterial candidate. Next, we explored the effects of each microbial pathway to cholesterol lowering in a hypercholesterolemic mice model.

Different groups of mice were treated during 10 weeks by the selected strain. Results demonstrated that AS99 and AS113 significantly reduced the serum TC, accompanied by a decrease in LDL-Chol and TG in hypercholesterolemic mice (**Figure 3 B-D**). No significant effect was obtained on HDL-Chol or phospholipase. Such results were consistent with some other studies using different probiotic (**Liang et al., 2020; Wang et al., 2019; Jones et al., 2012**). Interestingly, the highest effect was obtained with AS 99, which led to a reduced level of sterols similar to statin

group. Inversely, no significant effect was shown using AS147. These observations were confirmed by the mix group. In fact, when combined in mixture, these three bacteria had a similar effect as the AS113 group. We concluded that instead of acting in synergy, the addition of AS 113 and AS 147 could not ameliorate the AS 99 effect. Altogether, these findings indicated that deconjugation of bile salts by BSH was potentially the most important pathway that could impact cholesterol metabolism in vivo. Such results were in agreement with previous reports (**Bourgin et al., 2020; Yao et al., 2018; Kumar et al., 2012; Begley et al., 2006**). In fact, we previously generated a whole-body model of cholesterol dynamics that includes microbial metabolism. Our data demonstrated that cholesterol conversion to BS is the main flux affecting the cholesterol cycle, making bacterial BS degradation a promising target for cholesterol management (**Bourgin et al., 2020**). Several studies characterizing BSH encoding members of the gut microbiota have emerged (**Jones et al., 2008; Joyce et al., 2014; Labbé et al., 2014; Mullish et al., 2018; Yao et al., 2018; Song et al., 2019**), and several studies have used animal models to establish the link between cholesterol metabolism and BSH-positive probiotics. Not surprisingly, numerous potential probiotics with high BSH activity, significantly reduced circulating cholesterol level. This included some *Lactobacillus* and *bifidobacterial* species such as *B. longum*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. reuteri* (**Jones et al., 2012; Fuentes et al., 2013; Choi et al., 2015; Costabile, 2017**). For instance, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4524 had reduced total serum cholesterol as well as triglyceride and LDL-Chol in rats fed a high cholesterol diet (**El-Shafie et al., 2009**). Another independent study had obtained similar effects, subsequent to oral administration of immobilized BSH from *Lactobacillus buchneri*, in a rodent model of hypercholesterolemia (**Sridevi et al., 2009**).

Excessive cholesterol is usually accumulated in hepatocytes and resulted in NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease), the most prevalent chronic liver disease (**Younossi et al., 2016**). NAFLD is an inflammatory syndrome spanning from steatosis to NASH and is an important risk factor for atherosclerosis (**Brunt, 2010**) which is a main cause of morbidity and mortality worldwide (**WHO, 2020**). Therefore, it is important to evaluate this new BSH active strain on steatosis and atherosclerosis related lesions. To this aim, we used rabbit model known to reproduce a large number of pathological features similar to those seen in patients (**Fan et al., 2015; Wang et al., 2018**). In agreement with previous studies, rabbits fed a high-cholesterol diet had greatly

increased levels of serum TC, LDL-Chol and TG compared to rabbits fed the normal diet ($p < 0.01$), signaling that hypercholesterolemia was established. As expected, daily administration of AS 99 administration resulted in TC and LDL-Chol lowering by almost 15 % and TG by 24 %, compared to the hyperlipidemic group. These results confirmed the effect of AS 99 seen in mice model. Similar studies reported 43.5 % reduction of LDL-Chol in hypercholesterolemic rabbit upon administration of *L. pentosus* KF 923750 (**Bendali et al., 2017**). However, this *Lactobacillus* starin allowed 19 % and 20% reduction in the serum total cholesterol and TG respectively, similar to AS 99 (**Bendali et al., 2017**). Conversely, no significant difference on HDL-Chol levels was observed between the two groups fed by high cholesterol-diet. This parameter was unchanged with rabbits treated by *L. pentosus* KF 923750 (**Bendali et al., 2017**) or with hypercholesterolemic rats treated by *L. plantarum* LP91 and other probiotic strains using rodent models (**Bendali et al., 2017; Kumar et al., 2012**). Although the delicate differences between bile acids composition in human and used animal models, clinical trials on humans tended to confirm the observed beneficial effect of BSH-active bacteria on cholesterol lowering. Using, a placebo-controlled, randomized study, Ooi et al. (2010) reported that administration of symbiotic capsule containing a BSH- active strain of *L. acidophilus* with inulin resulted in significant reductions in total and LDL cholesterol compared to the placebo group (**Ooi et al., 2010**). Similarly, BSH-positive *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 consumption over 6 weeks resulted in significant reductions in total cholesterol, LDL-cholesterol and non-HDL-cholesterol in patients compared to the placebo group (**Jones et al., 2012**). Phospholipid level, a parameter associated to atheromatous plaques, was shown to be increased by the cholesterol rich diet compared to standard diet, suggesting that atherosclerosis might be developed in cholesterol fed animals. Compared to the HCD group, AS99 administration allowed a decrease of phospholipase by 14.2 % which suggested that AS 99 can act on atherosclerosis. No weight gain was observed in rabbits fed the cholesterol rich diet when compared to the controls. Similar data were previously reported by other groups (**Wang et al., 2018; Al-Sheraji et al., 2012**). However daily administration of AS 99 significantly reduced the body weight.

With regard to steatosis, cholesterol supplementation induced hypertrophy, paleness and greasy liver compared to healthy animals. Similar data were previously reported by other groups (**Wang et al., 2018b; 2019**). In agreement with these morphological changes, histological analysis

demonstrated that rabbits receiving CHOL diet show intra-hepatic accumulation of lipid droplet vacuoles concomitantly with the appearance of large adipocytes. These observations were compatible with the high cholesterol level seen in this group, and indicated that excessive sterols were accumulated in the liver as reported by Wang et al. (2018b). In addition to lipid accumulation, this group was also characterized by inflammatory cells infiltration. It was previously highlighted that cholesterol accumulation in hepatocytes together with macrophage infiltration induced the increase of hepatic cells volume (Cancello *et al.*, 2006; Dou *et al.*, 2020). Same effects were also observed in the present work. In fact, HCD fed rabbits presented swollen hepatocytes with unclear cell boundaries, the cytoplasm was loose and hepatocytes were extensively disordered. Such histological changes were also obtained in other works, using high cholesterol fed rabbits (Liang *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2018b; Bendali *et al.*, 2017). This result was also confirmed by NAS score, which was eight folds increased relative to healthy rabbits. Interestingly, microscopic observation of livers of the AS99 treated rabbits revealed improvement of hepatic lesions, consistent with the reduced serum cholesterol levels compared to rabbits fed with CHOL diet. This group exhibited more organized hepatocytes, lower accumulation of lipid droplets and adipocytes and reduced cells infiltration. Consequently, AS 99 supplementations allowed the reduction of NAS score by 18.75 % compared to CHOL diet group. Altogether, these results underlined that AS 99 administration reduced serum sterol levels, relieved lipid accumulation in the liver, and thereby enhanced hepatic steatosis. Similar results were obtained using some *Lactobacillus* probiotics. In facts *L. plantarum* KCTC3928, *L. plantarum* AR113 and *L. casei* pWQH01 were shown to improve induced hepatic lesions in hypercholesterolemic mice (Jeun *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2019). These effects were also shown in hypercholesterolemic rabbits treated by *L. pentosus* (Bendali *et al.*, 2017).

Nutritional monitoring using high cholesterol and high fat diet has been used to develop animal models of atherosclerosis including rabbits (Nabi *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2018). Rabbit models were widely used and share most of the pathophysiological features with human atherosclerosis and lipid metabolism. In agreement with other works, CHOL-fed rabbits displayed lipids accumulation and foamy cell infiltration in vascular wall, two critical processes leading to advanced atherosclerotic development (Insull, 2009; Bui et al., 2009). Unlike group fed with CHOL diet, daily administration of AS 99 to hypercholesterolemic rabbits allowed a significant

reduction of lipids accumulation and foamy cell infiltration in vascular wall, concomitantly to the reduction of circulating cholesterol and lipids. Numerous lactobacillus strains were suggested to be responsible on benefic effects attributed to fermented aliments. These strains potentially reduced hypercholesterolemia and alleviated atherosclerosis in rabbit model (**Nabi *et al.*, 2016**). Since AS99 display BSH activity, we hypothesized that obtained hypocholesterolemic effects relied on the ability of BSH activity to deconjugate primary intestinal BAs. Some research previously related the ability of some *Lactobacillus* strains to reduce hypercholesterolemia, with the BSH enzymes (**Chand *et al.*, 2017; Malpeli *et al.*, 2015**). These microbial activities acted on conjugated BA in the gut to release free BA, which are discharged in feces due to their lower solubility. To restore the BAs pool, the de novo BAs synthesis are increased from the endogenous cholesterol. These results highlighted the impact of BSH in the regulation of cholesterol metabolism. Our data confirmed the mathematical model of cholesterol cycle stressing the BSH pathway as a key player to monitor cholesterol level in the body (**Bourgin *et al.*, 2020**). Further molecular studies are required to decipher the host response in this study.

Materials & Methods

1. Strain identification and culture

The intestinal commensal strains were isolated from the healthy human intestinal tract. All bacteria were grown in Brain Heart Infusion-Yeast Extract-Hemin medium (BHI-YH) as previously described (**Cuffaro *et al.*, 2020**). This media was supplemented when necessary with 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of cholesterol-phosphatidylcholine and 0.3 % of BSs mixture. To evaluate their *in vitro* and *in vivo* cholesterol lowering activities, bacterial pellets were suspended in PBS to a final cell density of 10^9 CFU/mL before use.

Strains were identified using 16S rRNA sequencing. The total DNA was extracted from bacterial culture using Guanidium Thiocyanate and the mechanical bead-beating disruption method as previously described (**Godon *et al.*, 1997**). Extracted DNA was then amplified using primer pairs designed for V3-V4 fragments, F343 5'CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG'3 and R784 5'GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT'3. The amplicon lengths were about 450 bp (depending on the species). Because MiSeq sequencing enables paired 250 bp reads, the ends of each read overlap and can be stitched together to generate

extremely high-quality, full-length reads covering the entire V3-V4 region. Single multiplexing was performed using a homemade 6bp index, which was added during a second PCR with 12 cycles using the forward primer 5'AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGAC3' and the modified reverse primer 5'CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-index-GTGACTGGAGTTCAGACGTGT'3. The resulting PCR products were purified and sequenced. The 16S rRNA gene sequences were compared with the NCBI reference database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Bacteria evaluated in the present study are listed in **Table 1**.

Table 1. Bacterial strains and origins

BACTERIAL STRAINS	SOURCE
AS99	This work
AS147	This work
AS113	This work
ATCC314	Tomaro-Duchesneau <i>et al.</i> , 2014
<i>Bacteroides</i> spD8	Gerard <i>et al.</i> , 2013
30242	Jones <i>et al.</i> , 2012

2. Screening bacteria from their *In vitro* cholesterol-lowering metabolic abilities

2.1. Entrapment of cholesterol assays

The ability of strains to entrap cholesterol was investigated under conditions mimicking cholesterol and BSs levels in the intestinal tract as described in Pereira and Gibson methods (Pereira and Gibson, 2002). Cholesterol concentration was determined using Rudel and Morris method (Rudel and Morris, 1973). Assays were performed in duplicate. Strains were compared for cholesterol entrapment in terms of their specific cholesterol uptake. *Lactobacillus acidophilus*

ATCC314 strain was used as positive control as its cholesterol entrapment ability has been previously demonstrated (Tomaro-Duchesneau *et al.*, 2014).

2.2. Coprostanol production assays

Bacteria are tested for their ability to produce coprostanol in a BHI-YH or DON liquid culture medium supplemented with a mixture of soluble cholesterol (0.2 g/L cholesterol and 1 g/L phosphatidylcholine). After 3 days of incubation, the extraction of neutral sterols is performed according to the method described by Gerard *et al.* (Gérard *et al.*, 2007). Identification of sterol compounds was obtained by GCMS analysis at the MetaboHUB facilities. Each extract was assayed for the detection of coprostanol in duplicates. *Bacteroides* spD8. strain was defined as the positive control strain for coprostanol production assays.

2.3. Screening of BSH activities

Individual strains were tested for their total BSH activities with the most of representative glyco- or tauro-conjugated primary BA found in human intestinal tracts: GCA (glycocholic acid), TCA (taurocholic acid), GCDCA (glycochenodeoxycholic acid), TCDCA (taurochenodeoxycholic acid), GDCA (glycodeoxycholic acid), TDCA (taurodeoxycholic acid). The choice of the concentration of each bile salt solution was defined according to the concentration of human bile salts discharged into the intestine (Fuchs et Dressman, 2014). BSH activity was determined as previously reported (Bourgin *et al.*, 2020).

3. Impact of bacterial metabolic pathways on cholesterol in mouse

3.1. Animal groups

Sixty male C57BL/6J mice aged 9 weeks were obtained from the Janvier laboratory (Le Gesnest, St Isle, France). Mice were housed under axenic conditions and had free access to γ -irradiated standard diet and autoclaved water. After 1 week of acclimatization, mice were subjected to microbiota depletion and fecal microbiota transplantation. All mice received then standard diet supplemented with 2 % cholesterol to induce hypercholesterolemia and were randomly divided into 6 groups. The groups were control (PBS administered orally), Statin group (Rosuvastatin administered orally), AS 113, AS 147, AS 99 (bacterial strain administered orally for each group)

and Mix (mixture of three commensal bacteria (AS 113, AS 147, AS 99) administered orally). The experimental protocols were approved by the ethics committee of the INRAE (C2E-45 COMETHEA, authorization number #14946- 2017021412338668).

3.2. Fecal microbiota transplantation (FMT) and bacterial administration

Microbiota depletion was performed after acclimation period by oral administration of antibiotic mixture (neomycin, metronidazole, ampicillin and vancomycin) during two weeks (**Hintze et al., 2014**). After this period, all mice received the fecal microbiota from the healthy individual donor two times/week, for two weeks. The preparations of the fecal solution have been carried out according to the recommendations of common clinical practice (**Cammarota et al., 2017**). Upon FMT, humanized mice were then fed *ad libitum* for 10 weeks by high cholesterol diet and received 200µl of PBS, Rosuvastatin (20 mg/mL) or bacterial suspension (1×10^9 CFU per mL) by oral gavage. During the experimental protocol, clinical examination, body weight, food and drink consumption were recorded. The blood of each animal was collected at the beginning and at the end of the experimental procedure. At the end of experiments, animals were anesthetized with isoflurane, and blood samples were realized for further serum preparation (**Bourgin et al., 2020**) and cholesterol levels analysis.

4. Validation of the BSH activity effect in rabbits

4.1. Animal group and treatment

White New Zealand rabbits were provided by Hypharm, (Groupe Grimaud, Sèvremoine, France). A total of 24 male rabbits (16 weeks old, specific pathogen free) were maintained on a 12-h day/night cycle at a controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), with *ad libitum* access to food and water in the housing facility of ONIRIS (Authorisation number F 44 271). After a week of acclimatization, rabbits were randomly divided into three groups: The control group (n=8) was fed with a standard rabbit chow diet and received orally 2 mL PBS, while the two remaining groups were given a chow diet supplemented with 2% cholesterol to induce hypercholesterolemia. The HCD group (n=8) received oral gavage of PBS with the AS 99 group received oral gavage of 1 mL of cryopreserved AS 99 bacterial suspension (1.5×10^9 CFU/mL). Daily treatments were continued for 8 weeks. All animals received care in compliance according to the French veterinary authorities' guidelines on animal care and use and the study was approved by the Animal

Experimentation Ethics Committee (APAFIS N° 22693-20191105169816v3). The body weight was measured once a week to calculate the average weight of each group. Blood samples were collected from the ear marginal veins at the beginning and at the end of the experiment for measurement of plasma triglycerides, TC, LDL-Chol, HDL-Chol, triglycerides and phospholipase. After 8 weeks of treatment, tissue samples were collected following euthanasia, and stored for further histological analysis. Livers were immediately weighed and macroscopically (color and morphology) analyzed before storage.

4.2 Histological analysis

Aorta and livers were harvested from rabbits, placed immediately in formaldehyde 10 %. 24 h later, samples were embedded in paraffin, sectioned, stained with hematoxylin-eosin (H&E) and further scanned to assess pathological changes. This step was performed at the @BRIDGE platform (INRAE-Jouy-en-Josas). Liver lesions was determined as described by Kleiner and colleagues (Kleiner *et al.*, 2005; Brunt *et al.*, 2011). The severity of the hepatic steatosis was scored from 0 to 3 as follows: 0, < 5% hepatocytes involved; 1, 5-33% hepatocytes involved; 2, 33-66% hepatocytes involved; and 3, > 66% hepatocytes involved (Kim *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019). For atherosclerosis analysis, stained area representing atherosclerotic plaques were measured and the results were expressed as the intima thickness as well as the ratio of intima thickness over the media thickness (Kim *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020).

5. Examination of serum lipid levels

Blood samples collected on EDTA from mice and rabbits were centrifuged at 3000 g (10 min, 4°C) to separate serum. Total cholesterol (TC), triglyceride (TG), phospholipase (PL), high density lipoprotein cholesterol (HDL-Chol) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-Chol) were measured in serum by mass spectrometry at The Research Center in Human Nutrition platform (CRNH-Ouest, Nantes), following the method previously described (Lambert *et al.*, 2008).

6. Statistical analyses

Results are presented as mean \pm SEM. Graphs were plotted using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, USA). Data were subjected to the analysis of variance (ANOVA),

one-way ANOVA with Tukey's post-tests and two-way ANOVA with Bonferroni post-tests were used to compare the groups. Significant differences were considered when $P < 0.05$.

References

- Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., & Hassan, F. A. (2012). Hypocholesterolaemic effect of yoghurt containing *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 or *Bifidobacterium longum* BB536. *Food Chemistry*, 135(2), 356-361.
- Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), 1729–1738.
- Bendali, F., Kerdouche, K., Hamma-Faradji, S., & Drider, D. (2017). In vitro and in vivo cholesterol lowering ability of *Lactobacillus pentosus* KF923750. *Beneficial microbes*, 8(2), 271–280.
- Bourgin, M., Labarthe, S., Kriaa, A., Lhomme, M., Gérard, P., Lesnik, P., Laroche, B., Maguin, E., & Rhimi, M. (2020). Exploring the Bacterial Impact on Cholesterol Cycle: A Numerical Study. *Frontiers in microbiology*, 11, 1121.
- Brunt, E. M., Kleiner, D. E., Wilson, L. A., Belt, P., Neuschwander-Tetri, B. A., & NASH Clinical Research Network (CRN) (2011). Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 53(3), 810–820.
- Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, Fulcher, J., O'Connell, R., Voysey, M., Emberson, J., Blackwell, L., Mihaylova, B., Simes, J., Collins, R., Kirby, A., Colhoun, H., Braunwald, E., La Rosa, J., Pedersen, T. R., Tonkin, A., Davis, B., Sleight, P., Franzosi, M. G., Baigent, C., & Keech, A. (2015). Efficacy and safety of LDL-lowering therapy among men and women: meta-analysis of individual data from 174,000 participants in 27 randomised trials. *Lancet* (London, England), 385(9976), 1397–1405.
- Cammarota, G., Ianiro, G., Tilg, H., Rajilić-Stojanović, M., Kump, P., Satokari, R., Sokol, H., Arkkila, P., Pintus, C., Hart, A., Segal, J., Aloï, M., Masucci, L., Molinaro, A., Scaldaferri, F., Gasbarrini, G., Lopez-Sanroman, A., Link, A., de Groot, P., de Vos, W. M., ... European FMT Working Group (2017). European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*, 66(4), 569–580.
- Cancello, R., Tordjman, J., Poitou, C., Guilhem, G., Bouillot, J. L., Hugol, D., Coussieu, C., Basdevant, A., Bar Hen, A., Bedossa, P., Guerre-Millo, M., & Clément, K. (2006). Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes*, 55(6), 1554–1561.
- Chand, D., Avinash, V. S., Yadav, Y., Pundle, A. V., Suresh, C. G., & Ramasamy, S. (2017). Molecular features of bile salt hydrolases and relevance in human health. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1861(1 Pt A), 2981–2991.

- Choi, S. B., Lew, L. C., Yeo, S. K., Nair Parvathy, S., & Liong, M. T. (2015). Probiotics and the BSH-related cholesterol lowering mechanism: a Jekyll and Hyde scenario. *Critical reviews in biotechnology*, 35(3), 392–401.
- Costabile, A., Buttarazzi, I., Kolida, S., Quercia, S., Baldini, J., Swann, J. R., Brigidi, P., & Gibson, G. R. (2017). An in vivo assessment of the cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* ECGC 13110402 in normal to mildly hypercholesterolaemic adults. *PloS one*, 12(12), e0187964.
- Cuffaro, B., Assouhoun, A., Boutillier, D., Súkeníková, L., Desramaut, J., Boudebouze, S., Salomé-Desnoullez, S., Hrdý, J., Waligora-Dupriet, A. J., Maguin, E., & Grangette, C. (2020). In Vitro Characterization of Gut Microbiota-Derived Commensal Strains: Selection of *Parabacteroides distasonis* Strains Alleviating TNBS-Induced Colitis in Mice. *Cells*, 9(9), 2104.
- Dou, L., Shi, X., He, X., & Gao, Y. (2020). Macrophage Phenotype and Function in Liver Disorder. *Frontiers in immunology*, 10, 3112. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03112>
- El-Shafie, H. A., Yahia, N. I., Ali, H. A., Khalil, F. A., El-Kady, E. M., & Moustafa, Y. A. (2009). Hypocholesterolemic action of *Lactobacillus plantarum* NRRL-B-4524 and *Lactobacillus paracasei* in mice with hypercholesterolemia induced by diet. *Aus J Basic Appl Sci*, 3, 218-228.
- Fan, J., Kitajima, S., Watanabe, T., Xu, J., Zhang, J., Liu, E., & Chen, Y. E. (2015). Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacology & therapeutics*, 146, 104–119.
- Farkas, J., Angel, A., & Avigan, M. I. (1973). Studies on the compartmentation of lipid in adipose cells. II. Cholesterol accumulation and distribution in adipose tissue components. *Journal of lipid research*, 14(3), 344–356.
- Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. [Updated 2018 Feb 2]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-.
- Fuchs, A., & Dressman, J. B. (2014). Composition and physicochemical properties of fasted-state human duodenal and jejunal fluid: a critical evaluation of the available data. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103(11), 3398–3411.
- Fuentes, M. C., Lajo, T., Carrión, J. M., & Cuñé, J. (2013). Cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529 in hypercholesterolaemic adults. *The British journal of nutrition*, 109(10), 1866–1872.
- Gérard P, Lepercq P, Leclerc M, Gavini F, Raibaud P, Juste C. *Bacteroides* sp. strain D8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(18):5742-5749.
- Godon JJ; Zumstein E, Dabert P; Habouzit F, Moletta R. Microbial 16S rDNA diversity in an anaerobic digester. *Water Science and Technology* 1997; 36:49–55

Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2015). A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell*, 161(1), 161–172.

Grundty, S. M. (1983). Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Annual review of nutrition*, 3(1), 71-96.

Grundty, S. M., Stone, N. J., Bailey, A. L., Beam, C., Birtcher, K. K., Blumenthal, R. S., Braun, L. T., de Ferranti, S., Faiella-Tommasino, J., Forman, D. E., Goldberg, R., Heidenreich, P. A., Hlatky, M. A., Jones, D. W., Lloyd-Jones, D., Lopez-Pajares, N., Ndumele, C. E., Orringer, C. E., Peralta, C. A., Saseen, J. J., ... Yeboah, J. (2019). 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, 73(24), 3168–3209.

Hintze, K. J., Cox, J. E., Rompato, G., Benninghoff, A. D., Ward, R. E., Broadbent, J., & Lefevre, M. (2014). Broad scope method for creating humanized animal models for animal health and disease research through antibiotic treatment and human fecal transfer. *Gut microbes*, 5(2), 183–191.

Ikonen E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(2), 125–138.

Insull W., Jr (2009). The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *The American journal of medicine*, 122(1 Suppl), S3–S14.

Jeun, J., Kim, S., Cho, S. Y., Jun, H. J., Park, H. J., Seo, J. G., Chung, M. J., & Lee, S. J. (2010). Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 26(3), 321–330.

Jones, B. V., Begley, M., Hill, C., Gahan, C. G., & Marchesi, J. R. (2008). Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), 13580–13585.

Jones, M. L., Martoni, C. J., Parent, M., & Prakash, S. (2012). Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. *The British journal of nutrition*, 107(10), 1505–1513.

Joyce SA, Shanahan F, Hill C, Gahan CG. Bacterial bile salt hydrolase in host metabolism: Potential for influencing gastrointestinal microbe-host crosstalk. *Gut Microbes*. 2014 ;5(5):669-674.

Kim, J. S., Lee, S. G., Oh, J., Park, S., Park, S. I., Hong, S. Y., Kim, S., Lee, S. H., Ko, Y. G., Choi, D., Hong, M. K., & Jang, Y. (2016). Development of Advanced Atherosclerotic Plaque by Injection of Inflammatory Proteins in a Rabbit Iliac Artery Model. *Yonsei medical journal*, 57(5), 1095–1105.

- Kumar, R., Grover, S., & Batish, V. K. (2012). Bile Salt Hydrolase (Bsh) Activity Screening of Lactobacilli: In Vitro Selection of Indigenous Lactobacillus Strains with Potential Bile Salt Hydrolysing and Cholesterol-Lowering Ability. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 4(3), 162–172.
- Kleiner D.E., Brunt E.M., Van Natta M., Behlinh C., Contos M.J., Cummings O.W., Ferrell L.D., Liu Y.-C., Torbenson M.S., Unalp-Arida A., Yeh M., McCullough A.J., Sanyal A.J. for the Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41:1313-1321, 2005.
- Kriaa, A., Bourgin, M., Potiron, A., Mkaouar, H., Jablaoui, A., Gérard, P., Maguin, E., & Rhimi, M. (2019). Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism: current status and future prospects. *Journal of lipid research*, 60(2), 323–332.
- Labbé, A., Ganopoulosky, J. G., Martoni, C. J., Prakash, S., & Jones, M. L. (2014). Bacterial bile metabolising gene abundance in Crohn's, ulcerative colitis and type 2 diabetes metagenomes. *PloS one*, 9(12), e115175.
- Lambert, G., Ancellin, N., Charlton, F., Comas, D., Pilot, J., Keech, A., Patel, S., Sullivan, D. R., Cohn, J. S., Rye, K. A., & Barter, P. J. (2008). Plasma PCSK9 concentrations correlate with LDL and total cholesterol in diabetic patients and are decreased by fenofibrate treatment. *Clinical chemistry*, 54(6), 1038–1045.
- Le Roy, T., Lécuyer, E., Chassaing, B., Rhimi, M., Lhomme, M., Boudebouze, S., Ichou, F., Haro Barceló, J., Huby, T., Guerin, M., Giral, P., Maguin, E., Kapel, N., Gérard, P., Clément, K., & Lesnik, P. (2019). The intestinal microbiota regulates host cholesterol homeostasis. *BMC biology*, 17(1), 94.
- Li, G. (2012). Intestinal Probiotics: Interactions with Bile Salts and Reduction of Cholesterol. *Procedia Environmental Sciences*, 12 (Part B), Pages 1180-1186.
- Liang, X., Lv, Y., Zhang, Z., Yi, H., Liu, T., Li, R., & Zhang, L. (2020). Study on intestinal survival and cholesterol metabolism of probiotics. *LWT*, 124, 109132.
- Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., ... Lewis, E. F. (2019). Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1).
- Lin, P. Y., Lee, F. Y., Wallace, C. G., Chen, K. H., Kao, G. S., Sung, P. H., Chua, S., Ko, S. F., Chen, Y. L., Wu, S. C., Chang, H. W., Yip, H. K., & Shao, P. L. (2017). The therapeutic effect of rosuvastatin and propylthiouracil on ameliorating high-cholesterol diet-induced rabbit aortic atherosclerosis and stiffness. *International journal of cardiology*, 227, 938–949.
- Mach, F., Baigent, C., Catapano, A. L., Koskinas, K. C., Casula, M., Badimon, L., Chapman, M. J., De Backer, G. G., Delgado, V., Ference, B. A., Graham, I. M., Halliday, A., Landmesser, U., Mihaylova, B., Pedersen, T. R., Riccardi, G., Richter, D. J., Sabatine, M. S., Taskinen, M. R., Tokgozoglu, L., ... ESC Scientific Document Group (2020). 2019 ESC/EAS Guidelines for the

management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *European heart journal*, 41(1), 111–188

Mullish BH, Pechlivanis A, Barker GF, Thursz MR, Marchesi JR, McDonald JAK. Functional microbiomics: Evaluation of gut microbiota-bile acid metabolism interactions in health and disease. *Methods*. 2018; 149:49-58.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) (2020). Repositioning of the global epicentre of non-optimal cholesterol. *Nature*, 582(7810), 73–77.

Nabi, X. H., Ma, C. Y., Manaer, T., Heizati, M., Wulazibieke, B., & Aierken, L. (2016). Anti-atherosclerotic effect of traditional fermented cheese whey in atherosclerotic rabbits and identification of probiotics. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 309.

Ooi, L. G., Ahmad, R., Yuen, K. H., & Liong, M. T. (2010). *Lactobacillus gasseri* [corrected] CHO-220 and inulin reduced plasma total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol via alteration of lipid transporters. *Journal of dairy science*, 93(11), 5048–5058.

Pereira, D.I., & Gibson, G.R. (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and Bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4689–4693. doi:10.1128/AEM.68.9.4689-4693.2002

Rudel, L. L., & Morris, M. D. (1973). Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *Journal of lipid research*, 14(3), 364–366.

Russell D. W. (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annual review of biochemistry*, 72, 137–174.

Song Z, Cai Y, Lao X, et al. Taxonomic profiling and populational patterns of bacterial bile salt hydrolase (BSH) genes based on worldwide human gut microbiome. *Microbiome*. 2019;7(1):9. Published 2019 Jan 23. doi:10.1186/s40168-019-0628-3

Sridevi, N., Vishwe, P., & Prabhune, A. (2009). Hypocholesteremic effect of bile salt hydrolase from *Lactobacillus buchneri* ATCC 4005. *Food Research International*, 42(4), 516-520.

Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr, Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D., & Wissler, R. W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 92(5), 1355–1374

Tang WH, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res*. 2017 Mar 31;120(7):1183-1196.

Tomaro-Duchesneau, C., Jones, M. L., Shah, D., Jain, P., Saha, S., & Prakash, S. (2014). Cholesterol assimilation by *Lactobacillus* probiotic bacteria: an in vitro investigation. *BioMed research international*, 2014, 380316.

Wadhera, R. K., Steen, D. L., Khan, I., Giugliano, R. P., & Foody, J. M. (2016). A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality. *Journal of clinical lipidology*, 10(3), 472–489.

Wang D. Q. (2007). Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annual review of physiology*, 69, 221–248.

Chapitre 7 : Discussion générale et perspectives

L'un des principaux objectifs de ce projet de thèse est de comprendre l'impact du microbiote intestinal sur le métabolisme du cholestérol. En effet, bien qu'il ait été établi que le microbiote intestinal module la cholestérolémie, l'impact des différentes activités métaboliques vis-à-vis du cholestérol et des sels biliaires reste encore à élucider. Ces activités métaboliques cibles sont principalement le piégeage du cholestérol, la production de coprostanol et les activités hydrolases des sels biliaires. L'objectif de ce projet est de comprendre comment le microbiote intestinal contribue à gérer la cholestérolémie au moyen de ces activités métaboliques.

Dans ce projet, nous avons commencé par rassembler l'ensemble des connaissances disponibles dans la littérature scientifique, associées aux activités métaboliques du microbiote intestinal et au métabolisme du cholestérol de l'hôte. Ainsi, l'interaction complexe entre le microbiote intestinal, ses métabolites, a été mise en évidence dans la revue « *Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism : current status and future prospects* ». Cette analyse nous permet d'acquérir une meilleure connaissance de ces interactions complexes. Nous avons également mis l'accent sur les voies microbiennes impliquées et leur interaction avec l'hôte pour renforcer notre conception sur l'interaction « cholestérol-hôte-microbiote ».

En lien avec cette caractérisation conceptuelle des voies métaboliques bactériennes, nous avons exploré globalement les effets de l'impact du microbiote intestinal sur le métabolisme du cholestérol par la mise en place d'un modèle mathématique du cholestérol, incluant le microbiote intestinal, comme nouvel acteur modulant le métabolisme du cholestérol. Par la suite, en utilisant une collection de bactéries commensales, nous avons étudié et sélectionné les meilleures bactéries candidates, qui présentent une efficacité métabolique la plus importante pour moduler la cholestérolémie, et ce, pour la voie de fixation, de conversion en coprostanol et des BSH. Puis, ces bactéries ont été administrées à des souris, présentant un microbiote humain neutre vis-à-vis de ces activités microbiennes envers les stérols. Ceci a permis d'établir la voie métabolique la plus efficace sur la cholestérolémie de l'hôte. Pour terminer, nous avons évalué le potentiel thérapeutique de cette voie métabolique dans un contexte pathologique, à partir d'un modèle animal lapin présentant une hypercholestérolémie et associée aux premiers stades de développement de l'athérosclérose et d'une atteinte hépatique. Nous discuterons ici des principaux

résultats que nous avons obtenus, des limites de nos approches et comment certains biais pourraient être corrigés lors d'expériences futures.

① Explorer plus globalement les effets de l'impact du microbiote intestinal sur le métabolisme du cholestérol.

Des dispositifs expérimentaux imitant l'environnement du microbiote intestinal fournissent des informations très précieuses pour étudier le fonctionnement du microbiote intestinal sur le métabolisme de l'hôte (**Donaldson et al., 2016 ; Welsh et al., 2017**). Cependant, elles n'imitent que partiellement la réponse de l'hôte ou les fonctions de l'écosystème. Il est difficile d'évaluer l'importance relative des facteurs qui déterminent la distribution spatiale du microbiote. C'est pourquoi les approches de modélisation mathématique constituent un complément utile aux expériences visant à mieux comprendre les principaux paramètres qui influencent la structure spatiale des bactéries dans le côlon. La mise en place d'un modèle du métabolisme du cholestérol a permis de prédire l'impact du microbiote intestinal sur la cholestérolémie, avec une analyse de deux mécanismes microbiens impliqués, la formation de coprostanol et la voie BSH.

Certains modèles mathématiques du métabolisme du cholestérol ont été décrit, sans prendre en compte l'impact du microbiote intestinal sur le métabolisme de l'hôte (**Mc Auley et al., 2010 ; Morgan et al., 2016 ; Van del Pas et al., 2010**). Ainsi, nous avons caractérisé ces activités métaboliques au sein du microbiote intestinal de l'hôte. L'augmentation de la population bactérienne, responsable de la conversion du cholestérol en coprostanol, entraîne une perte importante de cholestérol intestinal, partiellement compensée par une synthèse importante de cholestérol intestinal. Pour approfondir davantage notre analyse, nous avons observé que l'ampleur du flux impliqué dans la régulation du cholestérol par les sels biliaires était supérieure à la perte directe de cholestérol induite par la bioconversion du cholestérol en coprostanol. L'impact sur les niveaux de cholestérol plasmatique était également important. Une analyse approfondie de notre modèle, nous a permis d'inclure une description de l'impact du métabolisme du microbiote intestinal comparativement à celui de l'hôte. Ainsi, notre modèle confirme que le principal moteur des niveaux plasmatiques des LDL et des HDL est le transport entre le plasma et le foie. La biosynthèse du cholestérol par différents organes et le transport du foie vers le plasma, arrivant en deuxième et en troisième position. La contribution bactérienne cumulée est faible par rapport à celle liée aux mécanismes de l'hôte, occupant la quatrième place. Cependant, l'activité BSH

constitue la majeure partie de la contribution bactérienne au niveau du cholestérol plasmatique. Cet impact s'est traduit par une réduction de 27 % du cholestérol lié aux LDL et d'une réduction de 49 % du cholestérol hépatique. Ceci indique que l'activité BSH bactérienne peut avoir un impact significatif dans le cycle du cholestérol devenant un élément potentiellement efficace dans la régulation des niveaux de cholestérol de l'hôte.

Il est important de garder à l'esprit que notre modèle a été construit sur des données issues d'expérimentation sur souris. Les connaissances sur les mécanismes de régulation obtenues au cours de cette étude sont valables pour les souris, et la transposition à l'homme nécessiterait des études supplémentaires. Une autre limite est à prendre en considération, puisque notre modèle implique une réduction drastique de la complexité du microbiote et de la physiologie de l'hôte. Dans notre étude, l'activité individuelle de deux souches bactériennes sélectionnées a été supposée représentative de l'activité globale d'un microbiote complexe. Pour répondre à cette limite, d'autres approches de modélisation mathématique ont été récemment appliquées, à différents niveaux de résolution, par exemple, les populations, leurs interactions et les réactions biochimiques incluant des mécanismes spatio-temporels intégrés à ce système complexe. Les travaux de Labarthe *et al.* présentent ces nouvelles approches par le biais de modèles métaboliques incluant les voies métaboliques pertinentes, comme cela a été fait pour la dégradation des fibres (**Labarthe *et al.*, 2019**). Ces questions ont également été abordées en fusionnant à ces modèles mathématiques, des données expérimentales issues des analyses du microbiome et de leurs activités métaboliques associées. C'est le cas de la méthode MICOM prenant en compte un ensemble de données liées au microbiome, issues d'une cohorte d'individus sains et d'individus présentant des troubles métaboliques (**Diener *et al.*, 2020**). Les auteurs de cette étude ont pris en compte les données multi-omiques, indiquant le potentiel métabolique de la communauté microbienne, les échanges entre le microbiote intestinal et la lumière intestinale, et l'effet de la composition du microbiote sur la production d'acides gras à chaîne courte (SCFA) dans des échantillons provenant de ces individus.

Globalement, la gestion du niveau de cholestérol par le microbiote intestinal, en particulier la conversion des sels biliaires dans l'intestin, est un outil prometteur pour servir de levier afin de contrôler le cholestérol hépatique et, dans une moindre mesure, le cholestérol plasmatique. En plus des stratégies habituelles, cette nouvelle cible semble prometteuse pour contrôler la synthèse du

cholestérol et son transport entre les compartiments pour réduire l'hypercholestérolémie et ses troubles associés. Nous soulignons que ces approches fondées sur la modélisation sont nécessaires pour comprendre les écosystèmes microbiens humains. Ces travaux suggèrent l'intérêt des approches de modélisation holistique, en complément des études réductionnistes basées sur l'expérimentation, pour comprendre l'impact du microbiote intestinal à l'échelle de l'écosystème bactérien et l'échelle de l'hôte.

② Sélectionner la voie métabolique microbienne la plus efficace pour moduler la cholestérolémie.

Dans la deuxième partie de ce projet, nous avons étudié les voies métaboliques du microbiote intestinal et sélectionné la voie la plus efficace pour moduler la cholestérolémie. Afin de mieux comprendre ces voies métaboliques distinctes, la voie de conversion du cholestérol en coprostanol et celle du piégeage du cholestérol ont été mises en évidence dans la revue « *Microbial Reduction of Cholesterol to Coprostanol : An Old Concept and New Insights* », et par une synthèse bibliographique « *Lights on the contribution of cholesterol entrapment by the intestinal bacteria* ». Ces efforts nous ont permis d'approfondir et de renforcer notre conception sur ces voies métaboliques associées au cholestérol.

Identifier des bactéries candidates ayant la meilleure activité de dégradation des stérols

Pour compléter notre compréhension limitée par ces approches, nous avons mené ces travaux avec la sélection de bactéries issues du microbiote intestinal humain. Ces bactéries présentent les meilleures activités métaboliques lors du piégeage du cholestérol, de la conversion du cholestérol en coprostanol et l'activité BSH. Nous avons choisi d'évaluer ces trois activités métaboliques vis-à-vis du cholestérol, en se basant sur une activité de référence connue pour établir le potentiel métabolique de nos bactéries, à savoir de la souche *Bacteroides* sp. D8., pour la voie de production de coprostanol, *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 pour la voie BSH, et *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 pour celle de la fixation du cholestérol (Jones *et al.*, 2012 ; Gérard *et al.*, 2007 ; Potiron, 2017 ; Tomaro-Duchesneau *et al.*, 2014). Concernant le choix de ces bactéries, des critères de sélections ont été définis sur la base de l'efficacité métabolique la plus importante vis-à-vis du cholestérol et de ses dérivés, et ceci pour chacune des trois activités du microbiote intestinal (fixation, conversion en coprostanol, BSH). Ici, nous avons détecté un groupe de bactéries capables de fixer le cholestérol avec AS113, de biotransformer le cholestérol en coprostanol avec AS147 et d'avoir des activités de BSH avec AS99. Ces bactéries ont

sélectivement la plus grande efficacité uniquement pour l'une des voies des stérols microbiens. Ces résultats permettent d'enrichir le nombre de bactéries commensales humaines, en charge de la gestion des stérols (Gérard *et al.*, 2007 ; Begley *et al.*, 2006).

La première voie microbienne du métabolisme du cholestérol est la voie de conversion du cholestérol en coprostanol. Nos précédents travaux de criblages des activités métaboliques ont permis d'identifier les meilleures bactéries commensales en fonction de leur capacité à convertir le cholestérol en coprostanol. C'est le cas des bactéries du microbiote intestinal, *Eubacterium coprostanoligenes*, *Bacteroides sp.* D8., *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium leptum* et *Ruminococcus bromii*, qui sont reconnues pour leur production de coprostanol (Freier *et al.*, 1994 ; Gérard *et al.*, 2007 ; Kenny *et al.*, 2020). Cependant, il est rapporté que seules quelques bactéries coprostanoligènes n'ont pas été isolées et que celles isolées, présentent une sensibilité importante à l'oxygène et une difficulté à la culture bactérienne (Gérard *et al.*, 2007 ; Kenny *et al.*, 2020). Ces approches de criblage ont permis d'enrichir le nombre de bactéries présentant cette activité métabolique. Ici, les trois meilleures bactéries sélectionnées sont *Bacteroides vulgatus* AS147, *Bacteroides uniformis* AS133 et *Bacteroides caccae* AS127. Des différences de concentration de coprostanol nouvellement formé, ont été détectées dans le milieu de culture. Ces variations peuvent provenir de la capacité de la bactérie à métaboliser le cholestérol, puisque cette activité serait potentiellement une adaptation spécifique à la souche et non une fonction essentielle chez les bactéries (Freier *et al.*, 1994 ; Gérard *et al.*, 2007 ; Vatanen *et al.*, 2019). Par ailleurs, une biodisponibilité du cholestérol peut expliquer cette différence de capacité de production du coprostanol. En effet, des études *in vitro* réalisées sur les premières souches isolées, montrent une différence de production de coprostanol en fonction de la composition du milieu de culture testé (Sadzikowski *et al.*, 1977 ; Gérard *et al.*, 2007 ; Brinkley *et al.*, 1982). Il a été démontré que la conversion de cholestérol en coprostanol est plus importante en présence de différents de sels biliaires (Lye et Liong, 2010). Cependant, bien que cette approche augmente la biodisponibilité de cholestérol dans le milieu de culture, elle présente également une limite puisque l'activité BSH est également liée à la présence de sels biliaires et serait également associée à la production de coprostanol (Tsai *et al.*, 2014). En effet, il est établi que l'activité BSH faciliterait l'incorporation du cholestérol des sels biliaires dans la membrane des cellules bactériennes (Begley *et al.*, 2006). En lien avec ces évidences et nos objectifs scientifiques, nos critères de sélection ont permis de

choisir les bactéries candidates qui présentaient une forte activité métabolique vis-à-vis du cholestérol mais également une activité vis-à-vis des autres stérols, minimisée pour observer chacune des voies métaboliques d'intérêt. C'est pour cette raison, que nous avons sélectionné *Bacteroides vulgatus* AS147, qui présente la meilleure activité, avec une concentration de coprostanol nouvellement formé la plus importante. Par ailleurs, elle présentait une activité vis-à-vis des autres activités des stérols assez faibles. Afin d'argumenter notre connaissance sur cette propriété de la bactérie, il serait également intéressant de se diriger vers les métabolites bactériens issus de la voie indirecte de production du coprostanol, tels que le coprostanone (**Kenny et al., 2020**).

Pour la voie métabolique des BSH, cette dernière est beaucoup plus étudiée, grâce à une diversité et un nombre considérable de bactéries lactiques probiotiques, dotées de BSH (**Begley et al., 2006 ; Tsai et al., 2014**). Il a été également proposé que la concentration différentielle du substrat de l'intestin de ces souches de *Bacteroidetes* dans l'intestin puissent être responsables de ces différences d'efficacité catalytique (**Begley et al., 2006**). Ici, nous avons caractérisé les activités BSH de plusieurs bactéries commensales, issues de l'écosystème du tractus gastro-intestinal. Ces résultats, nous permettent d'enrichir nos connaissances sur ces bactéries du microbiote intestinal qui présentent une activité BSH, certaines ayant déjà été examinées comme *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus* et *Bacteroides thetaiotaomicron*. Étant donné que la majorité de ces activités métaboliques caractérisées à ce jour, proviennent essentiellement des bactéries lactiques, il est possible que ces activités nouvellement identifiées, présentent une efficacité métabolique, caractéristique du microbiote intestinal humain (**Begley et al., 2006 ; Gérard et al., 2007 ; Yao et al., 2018**). Une analyse fonctionnelle approfondie couplant des études microbiologiques, biochimiques et structurales supplémentaires seront nécessaires pour répondre à ces questions.

La dernière voie sélectionnée est celle de la fixation du cholestérol. Notre travail s'est orienté sur la compréhension du piégeage microbien du cholestérol dans l'écosystème du microbiote intestinal, à partir des bactéries issues du microbiote intestinal. Il est important de noter que les micro-organismes identifiés dans ce mécanisme sont majoritairement des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Enterococcus sp.* et *Streptococcus sp.* mais également des bactéries commensales appartenant au genre *Bacillus sp.*, *Bacteroides sp.* et

Alistipes sp. (Pereira et Gibson, 2002 ; Lion et Sha, 2005 ; Shobharani et Halami, 2016 ; Lynch *et al.*, 2017 ; Majeed *et al.*, 2019). À ce jour, notre travail a permis de contribuer à améliorer nos connaissances sur ces bactéries fixatrices de cholestérol de l'écosystème microbien intestinal, dans des conditions reproduisant l'environnement intestinal, avec la présence de cholestérol soluble et les autres sels biliaires. En effet, nous avons étudié la capacité des bactéries, à assimiler le cholestérol dans ces conditions pour optimiser la détection de cette capacité (Galliland *et al.*, 1985 ; Pereira et Gibson, 2002 ; Lim *et al.*, 2004 ; Tomaro-Duchesneau *et al.*, 2014). Cette incorporation de cholestérol correspond à la concentration résiduelle de cholestérol détectée dans le milieu de culture (Tomaro-Duchesneau *et al.*, 2014). Cette méthode nous a permis d'identifier trois nouvelles bactéries commensales, efficaces dans la fixation de cholestérol, incluant AS96, AS127 et AS113. Ici, notre sélection porte sur AS113 car ses activités vis-à-vis des autres stérols, sont plus faibles et la niche écologique de cette dernière semblerait bien provenir de l'intestin (Kim *et al.*, 2010). Cependant, notre travail présente une limite. Contre toute attente, ces approches ont permis d'identifier de nouvelles bactéries commensales, qui présentent des activités importantes par rapport à notre témoin. Cette activité de fixation de cholestérol est présente de façon prédominante chez l'ensemble des bactéries sélectionnées, y compris chez celles qui présentent des activités BSH et une capacité à produire du coprostanol. Ces résultats amènent à considérer l'hypothèse selon laquelle cette activité de fixation du cholestérol détectée *in vitro* serait interdépendante des autres fonctionnalités métaboliques étudiées dans ce travail (Kundu *et al.*, 2019). Ainsi, nous avons choisi de calculer l'interdépendance métabolique de ces micro-organismes, en calculant le coefficient de corrélation de Spearman. Cette approche permet d'évaluer la dépendance statistique non paramétrique entre deux variables, à savoir si l'une des deux activités métaboliques (l'activité BSH et celle de production de coprostanol) est corrélée avec la capacité de fixation de cholestérol. Les résultats de ce test statistique montrent que la capacité de fixation semble positivement corrélée avec celle présentant une activité BSH ($r = 0,276$; valeur $p = 0,2025$; $n = 23$). De la même façon, le score montre une corrélation positive non significative ($r = 0,3414$; valeur $p = 0,1109$; $n = 23$) entre les bactéries capables de fixer le cholestérol et celles présentant une habileté à produire du coprostanol. En outre, les résultats ci-dessus semblent indiquer que l'activité métabolique de fixation du cholestérol semble être dépendante des autres activités métaboliques des voies microbiennes du métabolisme du cholestérol. Les bactéries fixatrices de cholestérol, peuvent fixer du cholestérol pour produire du coprostanol (Li, 2012). Ce

mécanisme bactérien peut être utilisé pour faciliter l'accès au cholestérol et aux sels biliaires pour exercer *in fine* la production du coprostanol et l'activité BSH. Ceci justifierait le phénomène de dépendance métabolique de cette voie de fixation sur l'ensemble des micro-organismes issus du microbiote intestinal. Des études supplémentaires devraient être réalisées afin de démontrer cette hypothèse, en intégrant notamment les concentrations de cholestérol et de sels biliaires.

En conclusion, une compréhension détaillée des activités métaboliques de divers micro-organismes issus du microbiote intestinal a permis d'identifier les meilleures bactéries pour leurs activités de dégradation du cholestérol et des sels biliaires. L'étude *in vitro* de ces trois activités métaboliques dans ce travail, à savoir la capacité à fixer le cholestérol, à produire du coprostanol et l'activité BSH, est considérée comme une étape vers l'identification de la voie du microbiote intestinal qui régule le mieux la cholestérolémie.

Déterminer la voie du microbiote qui régule la cholestérolémie

L'hypercholestérolémie entraîne le développement de MCV, souvent asymptomatiques et associées à des troubles métaboliques tels que l'athérosclérose ou aux maladies NASH (**Goldstein et Brown, 2015 ; Stary et al., 1995 ; Libby et al., 2019 ; Malhotra et al., 2020**). Les stratégies hypocholestérolémiques conventionnelles ont partiellement réduit les facteurs de risque de MCV, grâce à la gestion de l'excès de cholestérol, en ciblant directement sa synthèse, son absorption et son transport (**CTT et coll, 2015 ; NCD-RisC, 2020 ; Wadhera et al., 2016**). Cependant, ils présentent certaines limites telles que leur tolérance et leur efficacité thérapeutique et leurs effets secondaires potentiels. Pour pallier à ces limites, une expertise clinique soutient l'importance d'identifier de nouvelles approches de réduction du cholestérol pour renforcer le champ thérapeutique préexistant (**Grundy et al., 2019 ; Mach et al., 2020**). Récemment, le microbiote intestinal a été reconnu comme une nouvelle source d'innovation thérapeutique pour la santé (**Langella et al., 2019 ; Zendeboodi et al., 2020 ; Charbonneau et al., 2020**).

Ainsi, il est clairement établi que le microbiote intestinal est l'un des acteurs essentiels impliqués dans l'homéostasie du cholestérol chez l'hôte et est actuellement considéré comme un nouveau facteur de gestion de la cholestérolémie (**Roy et al., 2019 ; Heinken et al., 2019 ; Molinero et al., 2019**). Après avoir identifié de nouvelles bactéries intestinales métabolisant les stérols, nous avons

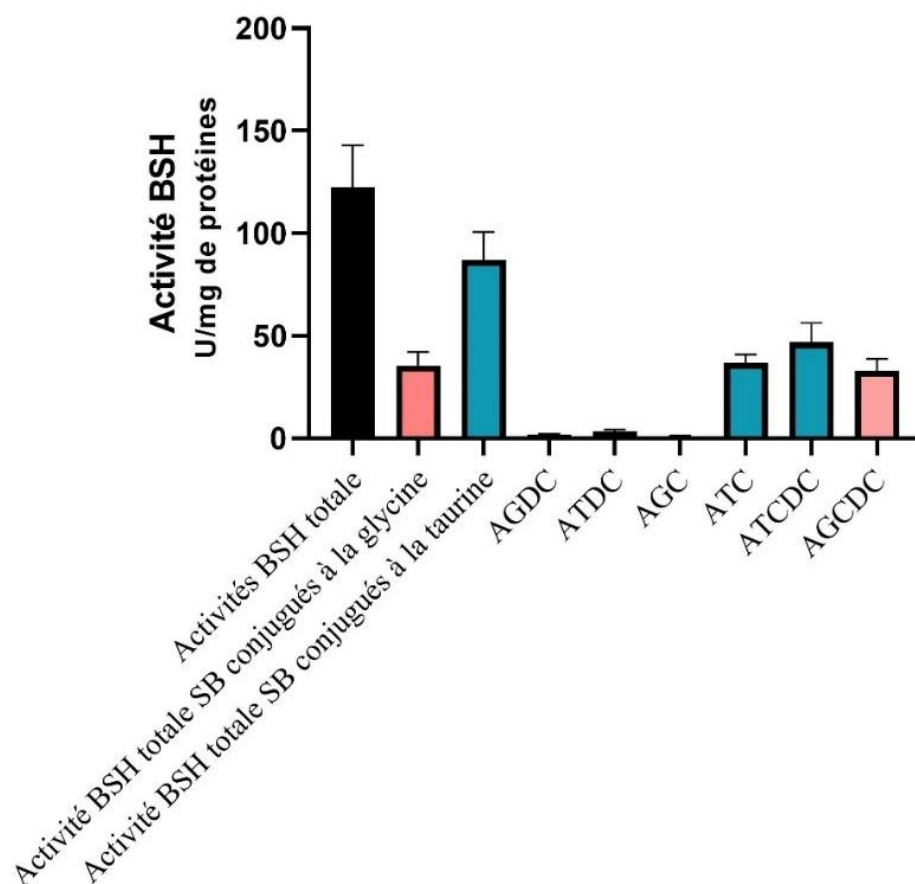


Figure 17: Profil d'activité BSH d'AS99

Activité de déconjugaison de la bactérie AS 99 issue de l'intestin humain. L'activité BSH a été mesurée à partir des cultures bactériennes d'AS99. Ainsi, un groupe d'acides biliaires glyco- ou tauro-conjugués présents dans les voies gastro-intestinales humaines ont été testés. G (glyco-), T (tauro-), CA (acide cholique), CDCA (acide chénodésoxycholique), DCA (acide désoxycholique). Les essais ont été réalisés en triplicats biologiques.

étudié l'impact de ces fonctions métaboliques dans un modèle murin hypercholestérolémiant. Nous avons pu observer l'impact de la voie BSH avec une réduction d'environ 20 % du niveau de cholestérol total circulant identique à celui du groupe traité aux statines, et une réduction du taux de LDL-Chol de 35 % par rapport au groupe contrôle. De plus, la nouvelle bactérie AS99 a un effet similaire à celui des statines et réduit efficacement le taux de TG. Plusieurs espèces de bactéries commensales, dont *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus* et *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis* ont été signalées comme ayant une activité BSH, et exercent *in vivo* un effet hypocholestérolémiant (Song *et al.*, 2015 ; Yao *et al.*, 2018 ; Song *et al.*, 2019). Dans toutes ces études, les niveaux de réduction du cholestérol se situaient entre 10 et 30 %, ce qui suggère que AS 99 est l'une des souches les plus efficaces. Nos données indiquent que la voie des BSH bactériennes semble être la meilleure voie thérapeutique pour traiter l'hypercholestérolémie. L'ensemble de ces résultats suggère que la voie métabolique BSH peut moduler la cholestérolémie de l'hôte par l'intermédiaire du microbiote intestinal. Pour mieux interpréter le mécanisme de cette voie métabolique, nos précédents travaux confirment que l'activité BSH constitue la majeure partie de la contribution bactérienne au niveau de cholestérol plasmatique et suggèrent une réduction du cholestérol hépatique. Une analyse du profil des stérols hépatiques (incluant le cholestérol, ceux des sels biliaires) permettrait de compléter l'impact de la voie BSH au niveau hépatique.

De façon intéressante, il est important de savoir si la voie BSH peut être utilisée pour influencer la physiologie de l'hôte à travers le métabolisme des stérols, en particulier celui des sels biliaires. Pour répondre à cette question, de récents travaux soulignent l'importance de prendre en compte les préférences enzymatiques des BSH et leur efficacité à convertir les SB conjugués en SB déconjugués (Foley *et al.*, 2021). Ainsi, l'analyse de la spécificité de(s) activité(s) BSH codée(s) par la bactérie AS99 a été réalisée sur un ensemble de 6 sels biliaires les plus représentés dans le système digestif chez l'homme (Fuchs et Dressman, 2014). Les résultats de cette analyse montrent le profil d'activité BSH d'AS 99 (Figure 17). Nous avons observé que la bactérie AS99 clive préférentiellement les sels biliaires conjugués à la taurine, tels que l'ATCDC et l'ATC et AGCDC.

Étant donné que des acides biliaires spécifiques conjugués et non conjugués se lient à différents récepteurs de l'hôte et peuvent exercer différents effets, l'étude de la sélectivité peut avoir des conséquences physiologiques importantes. Ici, la BSH d'AS99 semble favoriser la formation de sels biliaires secondaires, majoritairement l'ACDC puis l'AC. Pour aller plus loin, le profil de cette BSH pourrait être assimilé à un phylotype et son profil pourrait être plus connu à l'aide d'expériences complémentaires basées sur des approches de modélisation moléculaire (**Song et al., 2019**). L'ensemble de ces éléments nous permet d'approfondir plus en amont notre compréhension sur l'axe des interactions entre les bactéries du microbiote et les stérols de l'hôte.

③ *Évaluer si la bactérie commensale candidate peut être considérée comme une alternative biothérapeutique efficace pour diminuer la cholestérolémie dans un modèle plus proche de l'homme.*

La majorité des études s'intéresse à l'effet hypocholestérolémiant des BSH de bactéries probiotiques et seulement peu d'entre elles s'intéressent à l'impact des BSH du microbiote intestinal sur la physiologie de l'hôte. C'est pourquoi nous avons entrepris une analyse bibliographique pour enrichir notre connaissance sur ce sujet. En effet, nos résultats obtenus chez la souris et certains indices de la littérature, nous ont amené à étudier plus en détail la voie métabolique des BSH du microbiote intestinal. Cette revue nommée « *Bile Salt Hydrolases : At the Crossroads of Microbiota and Human Health* », montre ainsi que les BSH du microbiote intestinal jouent un rôle important dans de nombreux processus métaboliques de l'hôte, notamment dans la régulation du métabolisme du cholestérol. De nombreuses études, nous confortent dans le choix de cette voie métabolique microbienne comme stratégie prometteuse pour contrôler les maladies métaboliques chez l'homme.

Précédemment, nous avons révélé le potentiel de la voie de signalisation des BSH microbiens à travers la cholestérolémie de l'hôte dans un modèle souris. Le dernier objectif de ce travail propose d'estimer le potentiel biothérapeutique de cette voie BSH dans un contexte pathologique plus proche de l'homme. Pour cela, nous avons choisi un modèle lapin nourri avec un régime enrichi en cholestérol et présentant une hypercholestérolémie (**Fan et al., 2015**). L'administration de la bactérie AS 99 chez le lapin a permis d'obtenir des résultats cohérents avec ceux obtenus chez le modèle murin. En effet, une réduction de 15,07 % du cholestérol total circulant et de 15,7 % du

niveau de LDL-Chol est obtenue après 8 semaines d'administration orale de la bactérie AS99 présentant la voie BSH. De façon intéressante, nous avons également pu mettre en évidence un nouveau mécanisme de régulation dans le métabolisme des lipoprotéines, une légère réduction du taux de HDL-Chol est observé uniquement chez le modèle lapin. Les HDL-chol sont une des catégories de lipoprotéines plasmatiques prédominantes chez le lapin et chez l'homme et contribuent essentiellement au transport inverse du cholestérol, des tissus extra-hépatiques vers le foie (**Choy et al., 2004 ; Fan et al., 2015**). Cette étude a évalué les effets de réduction significative des TG diminués de 33,7 %, suite à la consommation de la bactérie AS99. Les concentrations plasmatiques de TG sont le résultat de l'équilibre entre la sécrétion de lipoprotéines riches en TG par l'intestin et le foie et leur absorption par les tissus extra-hépatiques (**Kersten et al., 2014**). En particulier, il a été démontré que les acides biliaires déconjugués régule non seulement la lipogenèse et la synthèse des triglycérides (**Joyce et al., 2014**). L'ensemble de ces propos semblent indiquer que la voie BSH pourrait avoir un rôle direct dans l'homéostasie des triglycérides.

Dans cette étude, nous avons également constaté que la stimulation de la voie BSH, améliore les troubles associés à l'hypercholestérolémie, notamment celui des NASH, définie par la présence de lésions hépatiques, y compris la stéatose, l'inflammation et le gonflement des hépatocytes (**Nassir et al., 2015**). Les aspects liés au passage de la stéatose hépatique, la forme progressive de la maladie, sont des questions clés dans l'étude de la NASH. Sur la base de ces critères, nous avons déterminé le score d'activité de la NAS pour évaluer l'étendue de la stéatose et l'impact de la stimulation de la voie BSH. Conformément à l'analyse histologique du foie, l'administration d'AS99 a permis une atténuation des lésions au niveau des hépatocytes ainsi qu'une réduction de la congestion des veines centrales. De plus, l'administration d'AS99 pourrait limiter la stéatose hépatique causée par la supplémentation en cholestérol puisque l'on observe moins d'infiltration de cellules inflammatoires et une accumulation de gouttelettes de lipides réduite. Nos résultats doivent être complétés par une analyse biochimique avec un marqueur des lésions des fonctions hépatiques, comme l'aspartate aminotransférase, l'alkaline phosphatase et l'alanine aminotransférase (**Hall et al., 2017**). Des études antérieures ont montré que certaines espèces de bactéries intestinales améliorent ces pathologies associées à l'hypercholestérolémie, telles que *L. reuteri*, *L. johnsonii* et *Bacteroides uniformis*, *B. xylanisolvens* qui réduirait le développement de la stéatose hépatique (**Gauffin Cano et al., 2012 ; Hsieh et al., 2013 ; Xin et al., 2014 ; Qiao et**

al., 2020). A ce jour, certaines études ont potentiellement identifié le rôle du métabolisme des sels biliaires, médié par ces bactéries du microbiote dans l'intestin dans la modulation de la stéatose hépatique induites par le régime alimentaire (**Sun *et al.*, 2019**). Des analyses supplémentaires sont nécessaires afin d'identifier le ou les mécanisme(s) responsable(s) des effets bénéfiques observés pour limiter la stéatose hépatique de l'hôte induits par notre bactérie AS99.

Notre travail a examiné l'impact de la voie BSH dans un modèle expérimental d'athérosclérose induite par un régime enrichi en cholestérol. Tout d'abord, les résultats de la présente étude ont permis de confirmer que notre modèle présente une phase précoce de développement de l'athérosclérose, induite par le régime enrichi en cholestérol. Ceci est notamment visible par des dépôts de lipides, une infiltration de cellules spumeuses et la présence de plaques d'athéroscléroses (**Libby *et al.*, 2019**). Ces résultats soutiennent la constatation clinique selon laquelle l'hypercholestérolémie est un facteur de risque essentiel des MCV (**Lusis, 2000**). En outre, les résultats histopathologiques de la présente étude ont montré que le groupe AS99 présente une diminution statistiquement significative de l'épaisseur de l'intima et une réduction importante de l'infiltration des cellules spumeuses et de l'accumulation de lipides. Cependant, cette étude a ses limites. Tout d'abord, bien que nous ayons constaté l'impact la voie BSH pour atténuer les lésions d'athérosclérose au niveau de l'aorte, nous ne savons toujours pas évaluer les effets sur les marqueurs principaux de la formation de lésions athérosclérotiques tel que l'état du stress oxydatif du sérum. En effet, cet aspect permettra de mieux révéler le mécanisme inhibiteur, dans lequel la lipoprotéine oxydée joue un rôle important (**Gao et Liu, 2017**). De plus, la progression de la formation d'une lésion athérosclérotique a été liée à des agents immunogènes et pro-inflammatoires, tels que TNF- α et IL-1 β qui jouent un rôle dans la médiation des réactions inflammatoires dans la formation des lésions athérosclérotiques (**Fatkhullina *et al.*, 2016**). En conclusion, la voie BSH atténue de manière significative l'athérosclérose aortique chez les lapins hypercholestérolémiques. Ces résultats fournissent un nouvel effet protecteur associé à la voie BSH et conforte le potentiel thérapeutique de cette voie métabolique du microbiote intestinal.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats soulèvent l'importance de la voie microbienne des BSH dans le métabolisme de l'hôte. Cependant, la signalisation de cette voie métabolique et de son interaction avec l'hôte reste encore à comprendre. Plusieurs mécanismes par lesquels les BSH affectent

l'hypercholestérolémie ont été proposés : i) la diminution du cholestérol plasmatique par la réduction de la circulation entéro-hépatique des sels biliaires par l'activité hydrolase des sels biliaires ; ii) la réduction de la biodisponibilité du cholestérol dans l'alimentation ; iii) et une diminution des niveaux systémiques de lipides sanguins par l'inhibition de la synthèse hépatique du cholestérol (**Kriaa et al., 2019**). Afin d'identifier ces derniers, il serait intéressant d'évaluer le pool de sels biliaires primaires et secondaires au niveau hépatique et de l'intestin (duodénum et l'iléon). Il a été précédemment démontré que la voie métabolique des BSH, modifie de manière significative le profil des sels biliaires, en particulier dans l'iléon avec des niveaux plus élevés de sels biliaires secondaires et des niveaux plus faibles de sels biliaires primaires (**Joyce et al., 2013 ; Yao et al., 2018 ; Geng et al., 2020**). D'autres indicateurs également bien connus doivent être identifiés comme le profil et les niveaux de stérol hépatique (**Arguello et al., 2015 ; Bourgin et al., 2020**). Il est important de souligner que les sels biliaires jouent un rôle essentiel dans la régulation des métabolismes du glucose, des lipides et de l'énergie en activant la signalisation du récepteur nucléaire des acides biliaires, le récepteur FXR (**Joyce et al., 2013 ; Yao et al., 2018**). Ainsi, on pourrait proposer, par l'intermédiaire de l'action des BSH d'AS99, que la stimulation du FXR dans le foie et l'intestin expliquerait la régulation i) des niveaux de SB dans la circulation entéro-hépatique ii) de l'homéostasie des lipides, iii) des réponses inflammatoires (**Joyce et al., 2014 ; Geng et al., 2020**). Cette voie de régulation du FXR est basée sur une réponse physiologique importante, avec une ouverture sur la régulation métabolique claire des paramètres lipidémiques circulants, renforcée par des effecteurs intestinaux et hépatiques (**Geng et al., 2020**). C'est le cas du récepteur LXR notamment, réputé pour son rôle préventif dans le développement de l'athérosclérose, qui serait impliqué dans cette voie de signalisation FXR, mais dont la causalité n'est pas établie (**Zununi et al., 2018**). D'autres intermédiaires effecteurs de la voie du FXR, comme facteur de croissance des fibroblastes FGF19/FGF15, qui module la dépense énergétique, est réprimé dans les modèles causaux BSH, entraînant de la gluconéogenèse, de la lipogenèse et de la synthèse des protéines. Ceci devrait être vérifié dans notre hypothèse (**Ding et al., 2015 ; Yao et al., 2018 ; Geng et al., 2020**). Une image plus large de la régulation du FXR a dû être approfondie avec nos connaissances sur la signalisation du FXR dans le cæcum et le côlon (**Sayin et al., 2013 ; Dekaney et al., 2008 ; Voronova et al., 2020**). De ce fait, l'ensemble de ces connaissances, désigne la voie de signalisation FXR comme mécanisme central expliquant l'impact de l'activité BSH (**Sayin et al., 2013 ; Joyce et al., 2014 ; Yao et al., 2018 ; Geng et al.,**

2020). À l'heure actuelle, aucune preuve n'a été apportée sur cette interaction BSH-FXR, qui devrait être explorée. Par ailleurs, il serait également intéressant d'évaluer ce complexe partenarial FXR-BSH pour définir la voie du FXR agoniste/antagoniste suivant le profil d'activité des BSH (Wang *et al.*, 2012 ; Sayin *et al.*, 2013 ; Yao *et al.*, 2018 ; Geng *et al.*, 2020).

Par ailleurs, le récepteur-1 des acides biliaires couplé à la protéine G de la membrane (TGR5), est présenté comme un élément pertinent avec une rôle dans l'impact de la voie BSH sur la sécrétion de GLP-1 dans les cellules L entéroendocrines, afin de libérer de l'insuline pour modifier les niveaux de glucose sanguin (Stanimirov *et al.*, 2015, Yao *et al.*, 2018). Un autre acteur pourrait être suggéré avec un rôle substantiel et un impact sur la régulation des communautés de microbiote intestinal : le système immunitaire (Kakiyama *et al.*, 2013 ; Nie *et al.*, 2015). Le système immunitaire est intégré dans le réseau BSH, les effecteurs innés et adaptatifs sont exprimés par les récepteurs de type "toll-like receptor" (TLR), les protéines oligoadénylate synthase (OAS), les facteurs de nécrose tumorale (TNF- α), les biomarqueurs d'intégrité intestinale (Yao *et al.*, 2018 ; Geng *et al.*, 2020). Une dernière découverte dans le domaine de la régulation immunitaire des muqueuses commence à être appréciée avec le nouvel acteur, le Retinoid-related Orphan Receptor (RORC), impliqué dans les réponses de l'interface muqueuse-lumière dans la différenciation et la fonction des cellules lymphoïdes innées et des cellules T-helper 17 dans les tissus affectés par les MICI (Hernandez-Rocha *et al.*, 2020). Peu de travaux ont porté sur le rôle des partenaires spécifiques des sels biliaires dans l'axe intestin-cerveau avec la capacité des sels biliaires à franchir la barrière hémato-encéphalique à travers les bicouches de phospholipides pour interagir avec les récepteurs FXR et TGR5 dans le cerveau (Mertens *et al.*, 2017). Il serait intéressant de poursuivre ces pistes fonctionnelles puisque, récemment une publication au sein de notre équipe a démontré les propriétés *in vitro* d'immuno-modulation d'AS99. Cette étude a également confirmé l'implication significative d'AS99 dans le renforcement de la barrière épithéliale intestinal, et sa capacité à produire l'incrétine, GLP-1 (Cuffaro *et al.*, 2021).

Conclusion générale et perspectives

En conclusion, ce travail de thèse nous a permis d'identifier que le microbiote intestinal peut être considéré comme un levier pour réguler la cholestérolémie. De façon plus approfondie, il a également permis de démontrer que parmi les voies métaboliques du microbiote intestinal, la voie

de fixation du cholestérol, de la formation de coprostanol et d'activité BSH, cette dernière est la voie thérapeutique la plus efficace pour diminuer l'hypercholestérolémie. Nous avons également exploré l'impact de cette voie microbienne sur d'autres troubles métaboliques liés à l'hypercholestérolémie. L'administration orale d'AS99, dotée d'une BSH a montré de multiples avantages métaboliques, notamment le contrôle de la prise de poids, une diminution de l'hypercholestérolémie et de l'hyperlipidémie, et l'amélioration de la stéatose hépatique. Nous avons également confirmé la capacité de cette voie du microbiote dans la prévention du développement des lésions d'athérosclérose. Cette étude fournit des preuves importantes concernant les fonctions de régulation de la voie bactérienne des BSH produits par les bactéries commensales de l'intestin ainsi que des aperçus bénéfiques sur l'interaction entre le microbiote intestinal et l'hôte. Globalement, la voie métabolique des BSH peut effectivement agir en tant que signaux pléiotropiques. En guise de perspective, l'analyse causale de la relation entre le BSH et les profils de sels biliaires associés doit être enrichie avec des études fonctionnelles ultérieures dans ce projet. Les futurs efforts devraient être ainsi axés sur notre compréhension des principes de base qui sous-tendent cette interaction Cholestérol-microbiote BSH- hôte, notamment axés sur les SB, afin de tirer parti de leurs vertus médicales en tant que « candidats biothérapeutiques vivants » cibles pour les MCVs.

Chapitre 8 : Références bibliographiques

Adams D. D. (2011). The great cholesterol myth; unfortunate consequences of Brown and Goldstein's mistake. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*, 104(10), 867–870.

Albano, C., Morandi, S., Silvetti, T., Casiraghi, M. C., Manini, F., & Brasca, M. (2018). Lactic acid bacteria with cholesterol-lowering properties for dairy applications: In vitro and in situ activity. *Journal of dairy science*, 101(12), 10807–10818.

Allen, P. E., & Martinez, J. J. (2020). Modulation of Host Lipid Pathways by Pathogenic Intracellular Bacteria. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(8), 614.

Aloglu H, Oner Z. Assimilation of cholesterol in broth, cream, and butter by probiotic bacteria. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2006;108:709–713.

Altay, O., Nielsen, J., Uhlen, M., Boren, J., & Mardinoglu, A. (2019). Systems biology perspective for studying the gut microbiota in human physiology and liver diseases. *EBioMedicine*, 49, 364–373.

Altmann, S. W., Davis, H. R., Jr, Zhu, L. J., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N., & Graziano, M. P. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5661), 1201–1204.

An, D., Na, C., Bielawski, J., Hannun, Y. A., & Kasper, D. L. (2011). Membrane sphingolipids as essential molecular signals for *Bacteroides* survival in the intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1(Suppl 1), 4666–4671.

Athyros, V. G., Boutari, C., Stavropoulos, K., Anagnostis, P., Imprialos, K. P., Doumas, M., & Karagiannis, A. (2018). Statins: An Under-Appreciated Asset for the Prevention and the Treatment of NAFLD or NASH and the Related Cardiovascular Risk. *Current vascular pharmacology*, 16(3), 246–253.

Bäckhed, F., Fraser, C. M., Ringel, Y., Sanders, M. E., Sartor, R. B., Sherman, P. M., Versalovic, J., Young, V., & Finlay, B. B. (2012). Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell host & microbe*, 12(5), 611–622.

Barrientos, G., Sánchez-Aguilera, P., Jaimovich, E., Hidalgo, C., & Llanos, P. (2017). Membrane Cholesterol in Skeletal Muscle: A Novel Player in Excitation-Contraction Coupling and Insulin Resistance. *Journal of diabetes research*, 2017, 3941898.

- Barter, P. J., Brewer, H. B., Jr, Chapman, M. J., Hennekens, C. H., Rader, D. J., & Tall, A. R. (2003). Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(2), 160–167.
- Bays, H. E., Neff, D., Tomassini, J. E., & Tershakovec, A. M. (2008). Ezetimibe: cholesterol lowering and beyond. *Expert review of cardiovascular therapy*, 6(4), 447-470.
- Belch, J. J., Akbar, N., Alapati, V., Petrie, J., Arthur, S., & Khan, F. (2013). Longitudinal assessment of endothelial function in the microvasculature of mice in-vivo. *Microvascular research*, 85, 86-92.
- Berge, K. E., Tian, H., Graf, G. A., Yu, L., Grishin, N. V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., & Hobbs, H. H. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5497), 1771–1775.
- Bhat, B., & Bajaj, B. K. (2019). Hypocholesterolemic potential and bioactivity spectrum of an exopolysaccharide from a probiotic isolate *Lactobacillus paracasei* M7. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 19, 100191.
- Bhat, B., & Bajaj, B. K. (2020). Multifarious cholesterol lowering potential of lactic acid bacteria equipped with desired probiotic functional attributes. *3 Biotech*, 10, 1-16.
- Bianconi, V., Mannarino, M. R., Sahebkar, A., Cosentino, T., & Pirro, M. (2018). Cholesterol-Lowering Nutraceuticals Affecting Vascular Function and Cardiovascular Disease Risk. *Current cardiology reports*, 20(7), 53.
- Bietrix, F., Yan, D., Nauze, M., Rolland, C., Bertrand-Michel, J., Coméra, C., Schaak, S., Barbaras, R., Groen, A. K., Perret, B., Tercé, F., & Collet, X. (2006). Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *The Journal of biological chemistry*, 281(11), 7214–7219.
- Bircher, L., Geirnaert, A., Hammes, F., Lacroix, C., & Schwab, C. (2018). Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes. *Microbial biotechnology*, 11(4), 721–733.
- Bourgin M. (2016). Implication des hydrolases des sels biliaires dans le métabolisme du cholestérol. Université Paris Saclay, Master 2 Microbiologie fondamentale et appliquée.
- Bourgin Mélanie (2017). Vers une meilleure compréhension de l'effet du microbiote sur la cholestérolémie. Université Paris Saclay. Master 2 Génomique et Environnement.
- Brender, J. R., McHenry, A. J., & Ramamoorthy, A. (2012). Does cholesterol play a role in the bacterial selectivity of antimicrobial peptides?. *Frontiers in immunology*, 3, 195.
- Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1976). Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science (New York, N.Y.)*, 191(4223), 150–154.

- Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1980). Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *Journal of lipid research*, 21(5), 505–517.
- Brunt, E. M., Kleiner, D. E., Wilson, L. A., Belt, P., Neuschwander-Tetri, B. A., & NASH Clinical Research Network (CRN) (2011). Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 53(3), 810–820.
- Bry, L., Falk, P. G., Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (1996). A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science* (New York, N.Y.), 273(5280), 1380–1383.
- Buhman, K. K., Accad, M., Novak, S., Choi, R. S., Wong, J. S., Hamilton, R. L., Turley, S., & Farese, R. V., Jr (2000). Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nature medicine*, 6(12), 1341–1347.
- Buja, L. M., Kita, T., Goldstein, J. L., Watanabe, Y., & Brown, M. S. (1983). Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit. An animal model of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.*, 3(1), 87-101.
- Bukiya, A. N., & Dopico, A. M. (2017). Common structural features of cholesterol binding sites in crystallized soluble proteins. *Journal of lipid research*, 58(6), 1044–1054.
- Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: clinical and experimental*, 65(8), 1038–1048.
- Cammarota, G., Ianiro, G., Tilg, H., Rajilić-Stojanović, M., Kump, P., Satokari, R., Sokol, H., Arkkila, P., Pintus, C., Hart, A., Segal, J., Aloï, M., Masucci, L., Molinaro, A., Scaldaferri, F., Gasbarrini, G., Lopez-Sanroman, A., Link, A., de Groot, P., de Vos, W. M., ... European FMT Working Group (2017). European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*, 66(4), 569–580.
- Cani P. D. (2018). Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut*, 67(9), 1716–1725.
- Castorena-Alba, Martha Montserrat; Vázquez-Rodríguez, Jesús Alberto; López-Cabanillas Lomelí, Manuel; González-Martínez, Blanca Edelia (2017). Cholesterol assimilation, acid and bile survival of probiotic bacteria isolated from food and reference strains. *CyTA - Journal of Food*, (), 1–6.
- Castro Cabezas, M., Botham, K. M., Mamo, J. C., & Proctor, S. D. (2012). Novel Aspects of Nonfasting Lipemia in relation to Vascular Biology. *International journal of vascular medicine*, 2012, 419015.
- Cerqueira, N. M., Oliveira, E. F., Gesto, D. S., Santos-Martins, D., Moreira, C., Moorthy, H. N., Ramos, M. J., & Fernandes, P. A. (2016). Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry*, 55(39), 5483–5506.

- Charbonneau, M. R., Isabella, V. M., Li, N., & Kurtz, C. B. (2020). Developing a new class of engineered live bacterial therapeutics to treat human diseases. *Nature communications*, 11(1), 1-11.
- Chatrath, H., Vuppalanchi, R., & Chalasani, N. (2012). Dyslipidemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in liver disease*, 32(1), 22–29.
- Cheng, H. Y., Ning, M. X., Chen, D. K., & Ma, W. T. (2019). Interactions Between the Gut Microbiota and the Host Innate Immune Response Against Pathogens. *Frontiers in immunology*, 10, 607.
- Chiang J. Y. (2004). Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *Journal of hepatology*, 40(3), 539–551.
- Chiang J. Y. (2013). Bile acid metabolism and signaling. *Comprehensive Physiology*, 3(3), 1191–1212.
- Chiang J. Y. (2017). Recent advances in understanding bile acid homeostasis. *F1000Research*, 6, 2029.
- Cho, I., & Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature reviews. Genetics*, 13(4), 260–270.
- Choi, S. B., Lew, L. C., Yeo, S. K., Nair Parvathy, S., & Liong, M. T. (2015). Probiotics and the BSH-related cholesterol lowering mechanism: a Jekyll and Hyde scenario. *Critical reviews in biotechnology*, 35(3), 392–401.
- Choy, P. C., Siow, Y. L., Mymin, D., & O, K. (2004). Lipids and atherosclerosis. *Biochemistry and cell biology Biochimie et biologie cellulaire*, 82(1), 212–224.
- Chui, P. C., Guan, H. P., Lehrke, M., & Lazar, M. A. (2005). PPARgamma regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. *The Journal of clinical investigation*, 115(8), 2244–2256.
- Chung, S., Cuffe, H., Marshall, S. M., McDaniel, A. L., Ha, J. H., Kavanagh, K., Hong, C., Tontonoz, P., Temel, R. E., & Parks, J. S. (2014). Dietary cholesterol promotes adipocyte hypertrophy and adipose tissue inflammation in visceral, but not in subcutaneous, fat in monkeys. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 34(9), 1880–1887.
- Committee on Nutrition, American Heart Association (1968) Diet and Heart Disease. American Heart Association, Dallas, TX.
- Cordaillat-Simmons, M., Rouanet, A., & Pot, B. (2020). Live biotherapeutic products: the importance of a defined regulatory framework. *Experimental & molecular medicine*, 52(9), 1397–1406.
- Costabile, A., Buttarazzi, I., Kolida, S., Quercia, S., Baldini, J., Swann, J. R., Brigidi, P., & Gibson, G. R. (2017). An in vivo assessment of the cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus*

plantarum ECGC 13110402 in normal to mildly hypercholesterolaemic adults. *PloS one*, 12(12), e0187964.

Croft, D. N., & Cotton, P. B. (1973). Gastro-intestinal cell loss in man. Its measurement and significance. *Digestion*, 8(2), 144–160.

CTT, Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, Fulcher, J., O'Connell, R., Voysey, M., Emberson, J., Blackwell, L., Mihaylova, B., Simes, J., Collins, R., Kirby, A., Colhoun, H., Braunwald, E., La Rosa, J., Pedersen, T. R., Tonkin, A., Davis, B., Sleight, P., Franzosi, M. G., Baigent, C., & Keech, A. (2015). Efficacy and safety of LDL-lowering therapy among men and women: meta-analysis of individual data from 174,000 participants in 27 randomised trials. *Lancet* (London, England), 385(9976), 1397–1405.

Cuffaro, B., Assohoun, A. L., Boutillier, D., Peucelle, V., Desramaut, J., Boudebbouze, S., M Croyal M., Waligora-Dupriet A.J., Rhimi M., Grangette C., Maguin, E. (2021). Identification of New Potential Biotherapeutics from Human Gut Microbiota-Derived Bacteria. *Microorganisms*, 9(3), 565.

Cuffaro, B., Assohoun, A., Boutillier, D., Súkeníková, L., Desramaut, J., Boudebbouze, S., Salomé-Desnoulez, S., Hrdý, J., Waligora-Dupriet, A. J., Maguin, E., & Grangette, C. (2020). In Vitro Characterization of Gut Microbiota-Derived Commensal Strains: Selection of Parabacteroides distasonis Strains Alleviating TNBS-Induced Colitis in Mice. *Cells*, 9(9), 2104.

Dadhich, R., & Kapoor, S. (2020). Various Facets of Pathogenic Lipids in Infectious Diseases: Exploring Virulent Lipid-Host Interactome and Their Druggability. *The Journal of membrane biology*, 253(5), 399–423.

Davignon, J., Gregg, R. E., & Sing, C. F. (1988). Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* (Dallas, Tex.), 8(1), 1–21.

De Vos, W. M., & de Vos, E. A. (2012). Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutrition reviews*, 70(suppl_1), S45-S56.

Despres, J., Forano, E., Lepercq, P., Comtet-Marre, S., Jubelin, G., Chambon, C., Yeoman, C. J., Berg Miller, M. E., Fields, C. J., Martens, E., Terrapon, N., Henrissat, B., White, B. A., & Mosoni, P. (2016). Xylan degradation by the human gut Bacteroides xylanisolvens XB1A(T) involves two distinct gene clusters that are linked at the transcriptional level. *BMC genomics*, 17, 326.

Diener, C., Gibbons, S. M., & Resendis-Antonio, O. (2020). MICOM: metagenome-scale modeling to infer metabolic interactions in the gut microbiota. *MSystems*, 5(1).

Dietary guidelines for Americans U.S. (2015–2020). Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture. Available at: <https://health.gov/dietaryguidelines/2015/guidelines/>. Accessed September 2, 2019.

Dietschy, J. M., & Siperstein, M. D. (1967). Effect of cholesterol feeding and fasting on sterol synthesis in seventeen tissues of the rat. *Journal of lipid research*, 8(2), 97–104.

Dietschy, J. M., Turley, S. D., & Spady, D. K. (1993). Role of liver in the maintenance of cholesterol and low-density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *Journal of lipid research*, 34(10), 1637–1659.

Ding, L., Yang, L., Wang, Z., & Huang, W. (2015). Bile acid nuclear receptor FXR and digestive system diseases. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 5(2), 135–144. Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature reviews. Microbiology*, 14(1), 20–32.

Ding, R. X., Goh, W. R., Wu, R. N., Yue, X. Q., Luo, X., Khine, W., Wu, J. R., & Lee, Y. K. (2019). Revisit gut microbiota and its impact on human health and disease. *Journal of food and drug analysis*, 27(3), 623–631.

Dontas, I. A., Marinou, K. A., Iliopoulos, D., Tsantila, N., Agrogiannis, G., Papalois, A., & Karatzas, T. (2011). Changes of blood biochemistry in the rabbit animal model in atherosclerosis research; a time- or stress-effect. *Lipids in health and disease*, 10, 139.

Enright, E. F., Joyce, S. A., Gahan, C. G., & Griffin, B. T. (2017). Impact of Gut Microbiota- European Parliament (2006). Directive 2002/46/EC of the, transposed by Decree No 2006-352. <https://ec.europa.eu/transparency/regdoc/rep/3/2015/EN/3-2015-9156-EN-1-1.PDF>

Falony G., De Vuyst L. (2009) Ecological Interactions of Bacteria in the Human Gut. In: Charalampopoulos D., Rastall R.A. (eds) Prebiotics and Probiotics Science and Technology. Springer, New York, NY.

Falony, G., Joossens, M., Vieira-Silva, S., Wang, J., Darzi, Y., Faust, K., Kurilshikov, A., Bonder, M. J., Valles-Colomer, M., Vandeputte, D., Tito, R. Y., Chaffron, S., Rymenans, L., Verspecht, C., De Sutter, L., Lima-Mendez, G., D'hoel, K., Jonckheere, K., Homola, D., Garcia, R., ... Raes, J. (2016). Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6285), 560–564.

Fan, J., Kitajima, S., Watanabe, T., Xu, J., Zhang, J., Liu, E., & Chen, Y. E. (2015). Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacology & therapeutics*, 146, 104–119.

Farkas, J., Angel, A., & Avigan, M. I. (1973). Studies on the compartmentation of lipid in adipose cells. II. Cholesterol accumulation and distribution in adipose tissue components. *Journal of lipid research*, 14(3), 344–356.

Farrell, G., Schattenberg, J. M., Leclercq, I., Yeh, M. M., Goldin, R., Teoh, N., & Schuppan, D. (2019). Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Toward Optimization of Their Relevance to Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 69(5), 2241–2257.

Farzadfar, F., Finucane, M. M., Danaei, G., Pelizzari, P. M., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., Singh, G. M., Lin, J. K., Stevens, G. A., Riley, L. M., Ezzati, M., & Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Cholesterol) (2011). National, regional, and

global trends in serum total cholesterol since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 321 country-years and 3·0 million participants. *Lancet* (London, England), 377(9765), 578–586.

Fatkhullina, A. R., Peshkova, I. O., & Koltsova, E. K. (2016). The Role of Cytokines in the Development of Atherosclerosis. *Biochemistry. Biokhimiia*, 81(11), 1358–1370.

FDA U.S, Food and Drug Administration. (2020). Interactive Nutrition Facts Label – Cholesterol, 1-2.

Feingold KR. (2021). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Hofland J, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, McLachlan R, Morley JE, New M, Purnell J, Singer F, Stratakis CA, Trencle DL, Wilson DP, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000–. PMID: 26247089.

Férézou, J., Coste, T., & Chevallier, F. (1981). Origins of neutral sterols in human feces studied by stable isotope labeling (D and ¹³C). Existence of an external secretion of cholesterol. *Digestion*, 21(5), 232–243.

Fernandez M. L. (2006). Dietary cholesterol provided by eggs and plasma lipoproteins in healthy populations. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 9(1), 8–12.

Feingold S. M. (1993). A century of anaerobes: a look backward and a call to arms. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 16 Suppl 4, S453–S457.

Flora, G. D., & Nayak, M. K. (2019). A Brief Review of Cardiovascular Diseases, Associated Risk Factors and Current Treatment Regimes. *Current pharmaceutical design*, 25(38), 4063–4084.

Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*, 226(1), 497–509.

Foley, M. H., O’Flaherty, S., Allen, G., Rivera, A. J., Stewart, A. K., Barrangou, R., & Theriot, C. M. (2021). *Lactobacillus bile salt hydrolase substrate specificity governs bacterial fitness and host colonization*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(6).

Forman D. T. (1972). The bile acids and fecal sterols. *Annals of clinical laboratory science*, 2(2), 137–146.

Freier, T. A., Beitz, D. C., Li, L., & Hartman, P. A. (1994). Characterization of *Eubacterium coprostanoligenes* sp. nov., a cholesterol-reducing anaerobe. *International journal of systematic bacteriology*, 44(1), 137–142.

Friedewald, W. T., Levy, R. I., & Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry*, 18(6), 499–502.

- Fuchs, A., & Dressman, J. B. (2014). Composition and physicochemical properties of fasted-state human duodenal and jejunal fluid: a critical evaluation of the available data. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103(11), 3398–3411.
- Fuentes, M. C., Lajo, T., Carrión, J. M., & Cuñé, J. (2013). Cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529 in hypercholesterolaemic adults. *The British journal of nutrition*, 109(10), 1866–1872.
- Fujimura, K. E., Slusher, N. A., Cabana, M. D., & Lynch, S. V. (2010). Role of the gut microbiota in defining human health. *Expert review of anti-infective therapy*, 8(4), 435-454.
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373–376.
- Gagné C., Gaudet D., (2007). Les Dyslipoprotéïnémies : L'approche Clinique. Édition Claude Gagne, les lipoprotéines, 25-40.
- Galley, H. F., & Webster, N. R. (2004). Physiology of the endothelium. *British journal of anaesthesia*, 93(1), 105–113.
- Gao, S., & Liu, J. (2017). Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and atherosclerotic cardiovascular disease. *Chronic diseases and translational medicine*, 3(2), 89–94.
- Gargiulo, S., Gramanzini, M., & Mancini, M. (2016). Molecular Imaging of Vulnerable Atherosclerotic Plaques in Animal Models. *International journal of molecular sciences*, 17(9), 1511.
- Gaudio, E., Nobili, V., Franchitto, A., Onori, P., & Carpino, G. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. *Internal and emergency medicine*, 7 Suppl 3, S297–S305.
- Gauffin Cano, P., Santacruz, A., Moya, Á., & Sanz, Y. (2012). *Bacteroides uniformis* CECT 7771 ameliorates metabolic and immunological dysfunction in mice with high-fat-diet induced obesity. *PloS one*, 7(7), e41079.
- Geng, W., Long, S. L., Chang, Y. J., Saxton, A. M., Joyce, S. A., & Lin, J. (2020). Evaluation of bile salt hydrolase inhibitor efficacy for modulating host bile profile and physiology using a chicken model system. *Scientific reports*, 10(1), 4941.
- Gérard, P., Béguet, F., Lepercq, P., Rigottier-Gois, L., Rochet, V., Andrieux, C., & Juste, C. (2004). Gnotobiotic rats harboring human intestinal microbiota as a model for studying cholesterol-to-coprostanol conversion. *FEMS microbiology ecology*, 47(3), 337–343.
- Gérard, P., Lepercq, P., Leclerc, M., Gavini, F., Raibaud, P., & Juste, C. (2007). *Bacteroides* sp. strain D8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces. *Applied and environmental microbiology*, 73(18), 5742–5749.
- Gilbert, J. A., Blaser, M. J., Caporaso, J. G., Jansson, J. K., Lynch, S. V., & Knight, R. (2018). Current understanding of the human microbiome. *Nature medicine*, 24(4), 392-400.

- Gilbert, J. A., Quinn, R. A., Debelius, J., Xu, Z. Z., Morton, J., Garg, N., Jansson, J. K., Dorrestein, P. C., & Knight, R. (2016). Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease. *Nature*, 535(7610), 94–103.
- Gilk, S. D., Cockrell, D. C., Luterbach, C., Hansen, B., Knodler, L. A., Ibarra, J. A., Steele-Mortimer, O., & Heinzen, R. A. (2013). Bacterial colonization of host cells in the absence of cholesterol. *PLoS pathogens*, 9(1), e1003107.
- Gilliland, S. E., Nelson, C. R., & Maxwell, C. (1985). Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and environmental microbiology*, 49(2), 377–381.
- Golledge, J., Greenhalgh, R. M., & Davies, A. H. (2000). The symptomatic carotid plaque. *Stroke*, 31(3), 774–781.
- Goodman, D. S., Smith, F. R., Sepowitz, A. H., Ramakrishnan, R., & Dell, R. B. (1980). Prediction of the parameters of whole-body cholesterol metabolism in humans. *Journal of lipid research*, 21(6), 699–713.
- Grover, M., & Kashyap, P. C. (2014). Germ-free mice as a model to study effect of gut microbiota on host physiology. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 26(6), 745–748.
- Grundy, S. M. (1983). Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Annual review of nutrition*, 3(1), 71-96.
- Grundy, S. M., Stone, N. J., Bailey, A. L., Beam, C., Birtcher, K. K., Blumenthal, R. S., Braun, L. T., de Ferranti, S., Faiella-Tommasino, J., Forman, D. E., Goldberg, R., Heidenreich, P. A., Hlatky, M. A., Jones, D. W., Lloyd-Jones, D., Lopez-Pajares, N., Ndumele, C. E., Orringer, C. E., Peralta, C. A., Saseen, J. J., ... Yeboah, J. (2019). 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, 73(24), 3168–3209.
- Gu, Y., Wang, X., Li, J., Zhang, Y., Zhong, H., Liu, R., Zhang, D., Feng, Q., Xie, X., Hong, J., Ren, H., Liu, W., Ma, J., Su, Q., Zhang, H., Yang, J., Wang, X., Zhao, X., Gu, W., Bi, Y., ... Wang, W. (2017). Analyses of gut microbiota and plasma bile acids enable stratification of patients for antidiabetic treatment. *Nature communications*, 8(1), 1785.
- Gylling, H., & Miettinen, T. A. (1992). Cholesterol absorption and synthesis related to low density lipoprotein metabolism during varying cholesterol intake in men with different apoE phenotypes. *Journal of lipid research*, 33(9), 1361–1371.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G. (2007); In appreciation of Theodor Escherich. *Nat Rev Microbiol* 5, 902.

- Hall, A., Covelli, C., Manuguerra, R., Luong, T. V., Buzzetti, E., Tsochatzis, E., Pinzani, M., & Dhillon, A. P. (2017). Transaminase abnormalities and adaptations of the liver lobule manifest at specific cut-offs of steatosis. *Scientific reports*, 7, 40977.
- Hardison, W. G., & Wood, C. A. (1978). Importance of bicarbonate in bile salt independent fraction of bile flow. *The American journal of physiology*, 235(2), E158–E164.
- Hassan, A., Din, A. U., Zhu, Y., Zhang, K., Li, T., Wang, Y., Luo, Y., & Wang, G. (2019). Updates in understanding the hypocholesterolemia effect of probiotics on atherosclerosis. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(15), 5993–6006.
- Havel R.J. (1975) Lipoproteins and Lipid Transport. In: Kritchevsky D., Paoletti R., Holmes W.L. (eds) *Lipids, Lipoproteins, and Drugs. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 63. Springer, Boston, MA.
- Hernandez-Rocha, C., Borowski, K., Turpin, W., Smith, M., Stempak, J., & Silverberg, M. S. (2020). A9 bacterial bile salt hydrolase gene abundance is associated with *rosc* gene expression in intestinal mucosa of inflammatory disease patients. *Journal of the Canadian Association of Gastroenterology*, 3(Suppl 1), 11–12.
- Hiippala, K., Jouhten, H., Ronkainen, A., Hartikainen, A., Kainulainen, V., Jalanka, J., & Satokari, R. (2018). The Potential of Gut Commensals in Reinforcing Intestinal Barrier Function and Alleviating Inflammation. *Nutrients*, 10(8), 988.
- Hintze, K. J., Cox, J. E., Rompato, G., Benninghoff, A. D., Ward, R. E., Broadbent, J., & Lefevre, M. (2014). Broad scope method for creating humanized animal models for animal health and disease research through antibiotic treatment and human fecal transfer. *Gut microbes*, 5(2), 183–191.
- Hollister, E. B., Gao, C., & Versalovic, J. (2014). Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology*, 146(6), 1449–1458.
- Hsieh, F. C., Lee, C. L., Chai, C. Y., Chen, W. T., Lu, Y. C., & Wu, C. S. (2013). Oral administration of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats. *Nutrition & metabolism*, 10(1), 35.
- Huang, Z., & London, E. (2016). Cholesterol lipids and cholesterol-containing lipid rafts in bacteria. *Chemistry and physics of lipids*, 199, 11–16.
- Human Microbiome Project Consortium (2012). A framework for human microbiome research. *Nature*, 486(7402), 215–221.
- Ikonen E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(2), 125–138.
- Ioannou, G. N., Landis, C. S., Jin, G. Y., Haigh, W. G., Farrell, G. C., Kuver, R., Lee, S. P., & Savard, C. (2019). Cholesterol Crystals in Hepatocyte Lipid Droplets Are Strongly Associated With Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology communications*, 3(6), 776–791.

- Iqbal, J., & Hussain, M. M. (2009). Intestinal lipid absorption. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 296(6), E1183–E1194.
- Jacobson, K., Mouritsen, O. G., & Anderson, R. G. (2007). Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nature cell biology*, 9(1), 7–14.
- Jakulj, L., van Dijk, T. H., de Boer, J. F., Kootte, R. S., Schonewille, M., Paalvast, Y., Boer, T., Bloks, V. W., Boverhof, R., Nieuwdorp, M., Beuers, U. H., Strokes, E. S., & Groen, A. K. (2016). Transintestinal Cholesterol Transport Is Active in Mice and Humans and Controls Ezetimibe-Induced Fecal Neutral Sterol Excretion. *Cell metabolism*, 24(6), 783–794.
- Jia, L., Betters, J. L., & Yu, L. (2011). Niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1) protein in intestinal and hepatic cholesterol transport. *Annual review of physiology*, 73, 239–259.
- Jones, M. L., Martoni, C. J., & Prakash, S. (2012). Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial. *European journal of clinical nutrition*, 66(11), 1234–1241.
- Joyce, S. A., & Gahan, C. G. (2016). Bile Acid Modifications at the Microbe-Host Interface: Potential for Nutraceutical and Pharmaceutical Interventions in Host Health. *Annual review of food science and technology*, 7, 313–333.
- Kanshana, J. S., Khanna, V., Singh, V., Jain, M., Misra, A., Kumar, S., Farooqui, M., Barthwal, M. K., & Dikshit, M. (2017). Progression and Characterization of the Accelerated Atherosclerosis in Iliac Artery of New Zealand White Rabbits: Effect of Simvastatin. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 69(5), 314–325.
- Kapourchali, F. R., Surendiran, G., Goulet, A., & Moghadasian, M. H. (2016). The Role of Dietary Cholesterol in Lipoprotein Metabolism and Related Metabolic Abnormalities: A Mini-review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(14), 2408–2415.
- Karunathilake, S. P., & Ganegoda, G. U. (2018). Secondary Prevention of Cardiovascular Diseases and Application of Technology for Early Diagnosis. *BioMed research international*, 2018, 5767864.
- Kennedy, E. A., King, K. Y., & Baldrige, M. T. (2018). Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria. *Frontiers in physiology*, 9, 1534.
- Kenny, D. J., Plichta, D. R., Shungin, D., Koppel, N., Hall, A. B., Fu, B., Vasan, R. S., Shaw, S. Y., Vlamakis, H., Balskus, E. P., & Xavier, R. J. (2020). Cholesterol Metabolism by Uncultured Human Gut Bacteria Influences Host Cholesterol Level. *Cell host & microbe*, 28(2), 245–257.e6.
- Kern F., Jr (1991). Normal plasma cholesterol in an 88-year-old man who eats 25 eggs a day. Mechanisms of adaptation. *The New England journal of medicine*, 324(13), 896–899.
- Kersten S. (2014). Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochimica et biophysica acta*, 1841(7), 919–933.

- Khare, A., Gaur, S. (2020). Cholesterol-Lowering Effects of *Lactobacillus* Species. *Curr Microbiol* 77, 638–644.
- Kim, J. S., Lee, S. G., Oh, J., Park, S., Park, S. I., Hong, S. Y., Kim, S., Lee, S. H., Ko, Y. G., Choi, D., Hong, M. K., & Jang, Y. (2016). Development of Advanced Atherosclerotic Plaque by Injection of Inflammatory Proteins in a Rabbit Iliac Artery Model. *Yonsei medical journal*, 57(5), 1095–1105.
- Kim, M. S., Roh, S. W., & Bae, J. W. (2010). *Bacteroides faecis* sp. nov., isolated from human faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(Pt 11), 2572–2576.
- Kimoto, H., Ohmomo, S., & Okamoto, T. (2002). Cholesterol removal from media by lactococci. *Journal of dairy science*, 85(12), 3182-3188.
- Kimsé M., Bayourthe C., Monteils V., Fortun-Lamothe L., Cauquil L., Combes S., Gidenne T. (2012). Live yeast stability in rabbit digestive tract: Consequences on the caecal ecosystem, digestion, growth and digestive health., 173(3-4), 0–243.
- Klaver, F. A., & van der Meer, R. (1993). The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Applied and environmental microbiology*, 59(4), 1120–1124.
- Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., Ferrell, L. D., Liu, Y. C., Torbenson, M. S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A. J., Sanyal, A. J., & Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 41(6), 1313–1321.
- Klop, B., Elte, J. W., & Cabezas, M. C. (2013). Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*, 5(4), 1218–1240.
- Kobayashi, T., Ito, T., & Shiomi, M. (2011). Roles of the WHHL rabbit in translational research on hypercholesterolemia and cardiovascular diseases. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 406473.
- Koren, O., Knights, D., Gonzalez, A., Waldron, L., Segata, N., Knight, R., Huttenhower, C., & Ley, R. E. (2013). A guide to enterotypes across the human body: meta-analysis of microbial community structures in human microbiome datasets. *PLoS computational biology*, 9(1), e1002863.
- Kosoglou, T., Statkevich, P., Johnson-Levonas, A. O., Paolini, J. F., Bergman, A. J., & Alton, K. B. (2005). Ezetimibe: a review of its metabolism, pharmacokinetics and drug interactions. *Clinical pharmacokinetics*, 44(5), 467–494.
- Kovanen, P. T., Nikkilä, E. A., & Miettinen, T. A. (1975). Regulation of cholesterol synthesis and storage in fat cells. *Journal of lipid research*, 16(3), 211–223.

- Krause, B. R., & Hartman, A. D. (1984). Adipose tissue and cholesterol metabolism. *Journal of lipid research*, 25(2), 97–110.
- Kriaa, A., Bourgin, M., Potiron, A., Mkaouar, H., Jablaoui, A., Gérard, P., Maguin, E., & Rhimi, M. (2019). Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism: current status and future prospects. *Journal of lipid research*, 60(2), 323–332.
- Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R. P., & Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4411.
- Kundu, P., Manna, B., Majumder, S., & Ghosh, A. (2019). Species-wide metabolic interaction network for understanding natural lignocellulose digestion in termite gut microbiota. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- Labarthe, S., Polizzi, B., Phan, T., Goudon, T., Ribot, M., & Laroche, B. (2019). A mathematical model to investigate the key drivers of the biogeography of the colon microbiota. *Journal of theoretical biology*, 462, 552-581.
- Lambert, G., Ancellin, N., Charlton, F., Comas, D., Pilot, J., Keech, A., Patel, S., Sullivan, D. R., Cohn, J. S., Rye, K. A., & Barter, P. J. (2008). Plasma PCSK9 concentrations correlate with LDL and total cholesterol in diabetic patients and are decreased by fenofibrate treatment. *Clinical chemistry*, 54(6), 1038–1045.
- Lansberg, P., Lee, A., Lee, Z. V., Subramaniam, K., & Setia, S. (2018). Nonadherence to statins: individualized intervention strategies outside the pill box. *Vascular health and risk management*, 14, 91–102.
- Laparra, J. M., & Sanz, Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological research*, 61(3), 219–225.
- Lapointe, A. (2016). L'étude in vivo de l'impact de la pression pulsée sur les capillaires cérébraux de souris.
- Lepage, P., Leclerc, M. C., Joossens, M., Mondot, S., Blottière, H. M., Raes, J., Ehrlich, D., & Doré, J. (2013). A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut*, 62(1), 146–158.
- Levy, E., Spahis, S., Sinnett, D., Peretti, N., Maupas-Schwalm, F., Delvin, E., Lambert, M., & Lavoie, M. A. (2007). Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Current opinion in lipidology*, 18(3), 310–318.
- Li Guijie (2012). Intestinal Probiotics: Interactions with Bile Salts and Reduction of Cholesterol., 12 (part-PB), 1180–1186.
- Li, M., Qian, M., Kyler, K., & Xu, J. (2018). Endothelial-Vascular Smooth Muscle Cells Interactions in Atherosclerosis. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 5, 151.
- Liang, J. Q., Teoh, N., Xu, L., Pok, S., Li, X., Chu, E., Chiu, J., Dong, L., Arfianti, E., Haigh, W. G., Yeh, M. M., Ioannou, G. N., Sung, J., Farrell, G., & Yu, J. (2018). Dietary cholesterol promotes steatohepatitis related hepatocellular carcinoma through dysregulated metabolism and calcium signaling. *Nature communications*, 9(1), 4490.

- Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., ... Lewis, E. F. (2019). Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1).
- Lim, P. S., Loke, C. F., Ho, Y. W., & Tan, H. Y. (2020). Cholesterol homeostasis associated with probiotic
- Lin, P. Y., Lee, F. Y., Wallace, C. G., Chen, K. H., Kao, G. S., Sung, P. H., Chua, S., Ko, S. F., Chen, Y. L., Wu, S. C., Chang, H. W., Yip, H. K., & Shao, P. L. (2017). The therapeutic effect of rosuvastatin and propylthiouracil on ameliorating high-cholesterol diet-induced rabbit aortic atherosclerosis and stiffness. *International journal of cardiology*, 227, 938–949.
- Lindgren, F. T., Elliott, H. A., & Gofman, J. W. (1951). The ultracentrifugal characterization and isolation of human blood lipids and lipoproteins, with applications to the study of atherosclerosis. *The Journal of physical and colloid chemistry*, 55(1), 80–93.
- Liong MT, Shah NP. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *J Dairy Sci*. 2005;88(1):55-66.
- Locey, K. J., & Lennon, J. T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(21), 5970–5975.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), D490–D495.
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J., Gonzalez, A., Ackermann, G., Wendel, D., Vázquez-Baeza, Y., Jansson, J. K., Gordon, J. I., & Knight, R. (2013). Meta-analyses of studies of the human microbiota. *Genome research*, 23(10), 1704–1714.
- Lusis, A. (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407, 233–241.
- Lye, H. S., Rahmat-Ali, G. R., & Liong, M. T. (2010). Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 20(3), 169-175.
- Lye, H. S., Rusul, G., & Liong, M. T. (2010). Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *Journal of dairy science*, 93(4), 1383–1392.
- Lynch, A., Crowley, E., Casey, E., Cano, R., Shanahan, R., McGlacken, G., Marchesi, J. R., & Clarke, D. J. (2017). The Bacteroidales produce an N-acylated derivative of glycine with both cholesterol-solubilising and hemolytic activity. *Scientific reports*, 7(1), 13270.
- Mach, F., Baigent, C., Catapano, A. L., Koskinas, K. C., Casula, M., Badimon, L., Chapman, M. J., De Backer, G. G., Delgado, V., Ference, B. A., Graham, I. M., Halliday, A., Landmesser, U., Mihaylova, B., Pedersen, T. R., Riccardi, G., Richter, D. J., Sabatine, M. S., Taskinen, M. R., Tokgozoglu, L., ESC Scientific Document Group (2020). 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *European heart journal*, 41(1), 111–188.

- Majeed, M., Majeed, S., Nagabhushanam, K., Arumugam, S., Beede, K., & Ali, F. (2019). Evaluation of the in vitro cholesterol-lowering activity of the probiotic strain *Bacillus coagulans* MTCC 5856. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(1), 212–220.
- Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F., Hermes, G. D., Hirschfield, G. M., Hold, G., Quraishi, M. N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K. M., Thomas, L. V., Zoetendal, E. G., & Hart, A. (2016). The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 65(2), 330–339.
- Marchesini, G., & Marzocchi, R. (2007). Metabolic syndrome and NASH. *Clinics in liver disease*, 11(1), 105–ix.
- Mardones, P., Quiñones, V., Amigo, L., Moreno, M., Miquel, J. F., Schwarz, M., Miettinen, H. E., Trigatti, B., Krieger, M., VanPatten, S., Cohen, D. E., & Rigotti, A. (2001). Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *Journal of lipid research*, 42(2), 170–180.
- Marinetti, G. V. (1990). Dietary management of elevated blood lipids. In *Disorders of Lipid Metabolism* (pp. 135–168). Springer, Boston, MA.
- Mark Welch, J. L., Hasegawa, Y., McNulty, N. P., Gordon, J. I., & Borisy, G. G. (2017). Spatial organization of a model 15-member human gut microbiota established in gnotobiotic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(43), E9105–E9114.
- Martínez, I., Perdicaro, D. J., Brown, A. W., Hammons, S., Carden, T. J., Carr, T. P., Eskridge, K. M., & Walter, J. (2013). Diet-induced alterations of host cholesterol metabolism are likely to affect the gut microbiota composition in hamsters. *Applied and environmental microbiology*, 79(2), 516–524.
- Matsuzawa, N., Takamura, T., Kurita, S., Misu, H., Ota, T., Ando, H., Yokoyama, M., Honda, M., Zen, Y., Nakanuma, Y., Miyamoto, K., & Kaneko, S. (2007). Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 46(5), 1392–1403.
- Mattson, F. H., Erickson, B. A., & Kligman, A. M. (1972). Effect of dietary cholesterol on serum cholesterol in man. *The American journal of clinical nutrition*, 25(6), 589–594.
- Maxfield, F. R., & Tabas, I. (2005). Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*, 438(7068), 612–621.
- Mc Auley, M. T., Wilkinson, D. J., Jones, J. J., & Kirkwood, T. B. (2012). A whole-body mathematical model of cholesterol metabolism and its age-associated dysregulation. *BMC systems biology*, 6, 130.
- Mediated Bile Acid Metabolism on the Solubilization Capacity of Bile Salt Micelles and Drug Solubility. *Molecular pharmaceutics*, 14(4), 1251–1263.

- Mertens, K. L., Kalsbeek, A., Soeters, M. R., & Eggink, H. M. (2017). Bile Acid Signaling Pathways from the Enterohepatic Circulation to the Central Nervous System. *Frontiers in neuroscience*, 11, 617.
- Min, H. K., Kapoor, A., Fuchs, M., Mirshahi, F., Zhou, H., Maher, J., ... & Sanyal, A. J. (2012). Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell metabolism*, 15(5), 665-674.
- Mok, H. Y., von Bergmann, K., & Grundy, S. M. (1979). Effects of continuous and intermittent feeding on biliary lipid outputs in man: application for measurements of intestinal absorption of cholesterol and bile acids. *Journal of lipid research*, 20(3), 389-398.
- Moon, J. Y., Choi, M. H., & Kim, J. (2016). Metabolic profiling of cholesterol and sex steroid hormones to monitor urological diseases. *Endocrine-related cancer*, 23(10), R455-R467.
- Moore, R. E., & Townsend, S. D. (2019). Temporal development of the infant gut microbiome. *Open biology*, 9(9), 190128.
- Morgan, A. E., Mooney, K. M., Wilkinson, S. J., Pickles, N. A., & Mc Auley, M. T. (2016). Mathematically modelling the dynamics of cholesterol metabolism and ageing. *Bio Systems*, 145, 19-32.
- Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut microbes*, 7(3), 189-200.
- Moss, J., Williams, J. O., & Ramji, D. P. (2018). Nutraceuticals as therapeutic agents for atherosclerosis. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1864(5 Pt A), 1562-1572.
- Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L., & Ross, R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology*, 14(1), 133-140.
- Nassir, F., Rector, R. S., Hammoud, G. M., & Ibdah, J. A. (2015). Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. *Gastroenterology & hepatology*, 11(3), 167-175.
- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) (2020). Repositioning of the global epicentre of non-optimal cholesterol. *Nature*, 582(7810), 73-77.
- Neuschwander-Tetri, B. A., & Caldwell, S. H. (2003). Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 37(5), 1202-1219.
- NHANES, National Health and Nutrition Examination Survey. (2005-2006). Top Food Sources of Cholesterol among U.S Population. [(accessed on 10 May2018)]; Available online: <https://epi.grants.cancer.gov/diet/foodsources/cholesterol/table1.html>.
- Ni, M., Chen, W. Q., & Zhang, Y. (2009). Animal models and potential mechanisms of plaque destabilisation and disruption. *Heart (British Cardiac Society)*, 95(17), 1393-1398.

- Nie, Y. F., Hu, J., & Yan, X. H. (2015). Cross-talk between bile acids and intestinal microbiota in host metabolism and health. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 16(6), 436–446.
- Oncley, J. L., & Harvie, N. R. (1969). Lipoproteins--a current perspective of methods and concepts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 64(3), 1107–1118.
- Oppi, S., Lüscher, T. F., & Stein, S. (2019). Mouse Models for Atherosclerosis Research-Which Is My Line?. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 6, 46.
- O'Toole, P. W., Marchesi, J. R., & Hill, C. (2017). Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nature microbiology*, 2, 17057.
- Pang, J., Chan, D. C., & Watts, G. F. (2020). The Knowns and Unknowns of Contemporary Statin Therapy for Familial Hypercholesterolemia. *Current atherosclerosis reports*, 22(11), 64.
- Pariente, N. (2019). A field is born. *Nature Milestones. Human Microbiota Research. Nature Microbiology*, S3-S4.
- Park, S., Kang, J., Choi, S., Park, H., Hwang, E., Kang, Y. G., Kim, A. R., Holzapfel, W., & Ji, Y. (2018). Cholesterol-lowering effect of *Lactobacillus rhamnosus* BFE5264 and its influence on the gut microbiome and propionate level in a murine model. *PloS one*, 13(8), e0203150.
- Pereira, D. I., & Gibson, G. R. (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and environmental microbiology*, 68(9), 4689–4693.
- Pereira, F. C., & Berry, D. (2017). Microbial nutrient niches in the gut. *Environmental microbiology*, 19(4), 1366-1378.
- Perez de la Cruz Moreno, M., Oth, M., Deferme, S., Lammert, F., Tack, J., Dressman, J., & Augustijns, P. (2006). Characterization of fasted-state human intestinal fluids collected from duodenum and jejunum. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 58(8), 1079–1089.
- Phinikaridou, A., Ruberg, F. L., Hallock, K. J., Qiao, Y., Hua, N., Viereck, J., & Hamilton, J. A. (2010). In vivo detection of vulnerable atherosclerotic plaque by MRI in a rabbit model. *Circulation. Cardiovascular imaging*, 3(3), 323–332.
- Podolsky, S. H. (2012). Metchnikoff and the microbiome. *The Lancet*, 380(9856), 1810-1811.
- Potiron Aline. Conversion du cholestérol en coprostanol par les bactéries du microbiote intestinal humain et impact sur la cholestérolémie. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. ffNNT : 2017SACLA036ff. Fftel-01812929
- Qin, C., Lv, J., Guo, Y., Bian, Z., Si, J., Yang, L., Chen, Y., Zhou, Y., Zhang, H., Liu, J., Chen, J., Chen, Z., Yu, C., Li, L., & China Kadoorie Biobank Collaborative Group (2018). Associations of

egg consumption with cardiovascular disease in a cohort study of 0.5 million Chinese adults. *Heart* (British Cardiac Society), 104(21), 1756–1763.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., ... Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65.

Qureshi AI, Suri FK, Ahmed S, Nasar A, Divani AA, Kirmani JF. Regular egg consumption does not increase the risk of stroke and cardiovascular diseases. *Med Sci Monit*. 2007 Jan;13(1):CR1-8. Epub 2006 Dec 18.

Rabot, S., Membrez, M., Bruneau, A., Gérard, P., Harach, T., Moser, M., Raymond, F., Mansourian, R., & Chou, C. J. (2010). Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(12), 4948–4959.

Rašić, J. L., Vujičić, I. F., Škrinjar, M., & Vulić, M. (1992). Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Biotechnology letters*, 14(1), 39-44.

Razin S. Cholesterol incorporation into bacterial membranes. *J Bacteriol*. 1975;124(1):570-572.

Razin, S., & Tully, J. G. (1970). Cholesterol requirement of mycoplasmas. *Journal of bacteriology*, 102(2), 306–310.

Reeskamp, L. F., Meessen, E., & Groen, A. K. (2018). Transintestinal cholesterol excretion in humans. *Current opinion in lipidology*, 29(1), 10–17.

Remagni, M. C., Paladino, M., Locci, F., Romeo, F. V., Zago, M., Povo, M., Contarini, G., & Carminati, D. (2013). Cholesterol removal capability of lactic acid bacteria and related cell membrane fatty acid modifications. *Folia microbiologica*, 58(6), 443–449.

Ridlon, J. M., Harris, S. C., Bhowmik, S., Kang, D. J., & Hylemon, P. B. (2016). Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut microbes*, 7(1), 22–39.

Robinson, C. J., Bohannon, B. J., & Young, V. B. (2010). From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 74(3), 453–476.

Ros E. (2000). Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*, 151(2), 357–379.

Ross R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*, 340(2), 115–126.

- Round, J. L., & Palm, N. W. (2018). Causal effects of the microbiota on immune-mediated diseases. *Science immunology*, 3(20), eaao1603.
- Ruan, Wenly; Engevik, Melinda A.; Spinler, Jennifer K.; Versalovic, James (2020). Healthy Human Gastrointestinal Microbiome: Composition and Function After a Decade of Exploration. *Digestive Diseases and Sciences*.
- Rudel LL, Morris MD (1973) Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *J Lipid Res* 14:364–366.
- Russell D. W. (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annual review of biochemistry*, 72, 137–174.
- Saam, T., Cai, J., Ma, L., Cai, Y. Q., Ferguson, M. S., Polissar, N. L., Hatsukami, T. S., & Yuan, C. (2006). Comparison of symptomatic and asymptomatic atherosclerotic carotid plaque features with in vivo MR imaging. *Radiology*, 240(2), 464–472.
- Sadzikowski, M. R., Sperry, J. F., & Wilkins, T. D. (1977). Cholesterol-reducing bacterium from human feces. *Applied and environmental microbiology*, 34(4), 355–362.
- Safari, Z., Bruneau, A., Monnoye, M., Mariadassou, M., Philippe, C., Zatloukal, K., & Gérard, P. (2020). Murine Genetic Background Overcomes Gut Microbiota Changes to Explain Metabolic Response to High-Fat Diet. *Nutrients*, 12(2), 287.
- Saito, K., Suzuki, R., Koyanagi, Y., Isogai, H., Yoneyama, H., & Isogai, E. (2019). Inhibition of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in a gnotobiotic mouse model with pre-colonization by *Bacteroides* strains. *Biomedical reports*, 10(3), 175–182.
- Samanta, D., Mulye, M., Clemente, T. M., Justis, A. V., & Gilk, S. D. (2017). Manipulation of Host Cholesterol by Obligate Intracellular Bacteria. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 165.
- Sanna, S., van Zuydam, N. R., Mahajan, A., Kurilshikov, A., Vich Vila, A., Vösa, U., Mujagic, Z., Masclee, A., Jonkers, D., Oosting, M., Joosten, L., Netea, M. G., Franke, L., Zhernakova, A., Fu, J., Wijmenga, C., & McCarthy, M. I. (2019). Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *Nature genetics*, 51(4), 600–605.
- Sanna, S., van Zuydam, N. R., Mahajan, A., Kurilshikov, A., Vich Vila, A., Vösa, U., Mujagic, Z., Masclee, A., Jonkers, D., Oosting, M., Joosten, L., Netea, M. G., Franke, L., Zhernakova, A., Fu, J., Wijmenga, C., & McCarthy, M. I. (2019). Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *Nature genetics*, 51(4), 600–605.
- Sayin, S. I., Wahlström, A., Felin, J., Jäntti, S., Marschall, H. U., Bamberg, K., Angelin, B., Hyötyläinen, T., Orešič, M., & Bäckhed, F. (2013). Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell metabolism*, 17(2), 225–235.
- Schauer D. B. (1997). Paving the way for pathogens? *Current biology: CB*, 7(2), R75–R77.

- Schuck, R. N., Zha, W., Edin, M. L., Gruzdev, A., Vendrov, K. C., Miller, T. M., ... & Jones, H. M. (2014). The cytochrome P450 epoxygenase pathway regulates the hepatic inflammatory response in fatty liver disease. *PloS one*, 9(10), e110162.
- Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature reviews. Microbiology*, 13(10), 605–619.
- Schwenke, D. C., & Carew, T. E. (1989). Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*, 9(6), 908–918.
- Sehayek, E., Nath, C., Heinemann, T., McGee, M., Seidman, C. E., Samuel, P., & Breslow, J. L. (1998). U-shape relationship between change in dietary cholesterol absorption and plasma lipoprotein responsiveness and evidence for extreme interindividual variation in dietary cholesterol absorption in humans. *Journal of lipid research*, 39(12), 2415–2422.
- Seyidoglu, N., & Peker, S. (2015). Effects of different doses of probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* on the duodenal mucosa in rabbits. *Indian Journal of Animal Research*, 49(5), 602–606.
- Shaffer M, Armstrong AJS, Phelan VV, Reisdorph N, Lozupone CA. Microbiome and metabolome data integration provides insight into health and disease. *Transl Res*. 2017; 189:51-64.
- Shaffer M, Armstrong AJS, Phelan VV, Reisdorph N, Lozupone CA. Microbiome and metabolome data integration provides insight into health and disease. *Transl Res*. 2017; 189:51-64.
- Shapiro, H., Kolodziejczyk, A. A., Halstuch, D., & Elinav, E. (2018). Bile acids in glucose metabolism in health and disease. *The Journal of experimental medicine*, 215(2), 383–396.
- Shehata, M. G., El-Sahn, M. A., El Sohaimy, S. A., & Youssef, M. M. (2019). In vitro assessment of hypocholesterolemic activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 60.
- Sheka, A. C., Adeyi, O., Thompson, J., Hameed, B., Crawford, P. A., & Ikramuddin, S. (2020). Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *JAMA*, 323(12), 1175–1183.
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, 26(10), 1135–1145.
- Sheridan C. (2019). PCSK9-gene-silencing, cholesterol-lowering drug impresses. *Nature biotechnology*, 37(12), 1385–1387.
- Shetty, S. A., Hugenholtz, F., Lahti, L., Smidt, H., & de Vos, W. M. (2017). Intestinal microbiome landscaping: insight in community assemblage and implications for microbial modulation strategies. *FEMS microbiology reviews*, 41(2), 182–199.
- Shimizu M, Hashiguchi M, Shiga T, Tamura HO, Mochizuki M. Meta-Analysis: Effects of Probiotic Supplementation on Lipid Profiles in Normal to Mildly Hypercholesterolemic Individuals. *PLoS One*. 2015 Oct 16;10(10): e0139795.

- Shiomi, M., Koike, T., & Ito, T. (2013). Contribution of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia, to elucidation of the anti-atherosclerotic effects of statins. *Atherosclerosis*, 231(1), 39–47.
- Shobharani, P., & Halami, P. M. (2016). In vitro evaluation of the cholesterol-reducing ability of a potential probiotic *Bacillus* spp. *Annals of Microbiology*, 66(2), 643–651.
- Sivamaruthi, B. S., Kesika, P., & Chaiyasut, C. (2019). Effect of Probiotics Supplementations on Health Status of Athletes. *International journal of environmental research and public health*, 16(22), 4469.
- Slezak, K., Krupova, Z., Rabot, S., Loh, G., Levenez, F., Descamps, A., Lepage, P., Doré, J., Bellier, S., & Blaut, M. (2014). Association of germ-free mice with a simplified human intestinal microbiota result in a shortened intestine. *Gut microbes*, 5(2), 176–182.
- Sommer, F., & Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nature reviews. Microbiology*, 11(4), 227–238.
- Song, M., Park, S., Lee, H., Min, B., Jung, S., Kim, E., & Oh, S. (2015). Effect of *Lactobacillus acidophilus* NS1 on plasma cholesterol levels in diet-induced obese mice. *Journal of dairy science*, 98(3), 1492–1501.
- Song, M., Yun, B., Moon, J. H., Park, D. J., Lim, K., & Oh, S. (2015). Characterization of Selected *Lactobacillus* Strains for Use as Probiotics. *Korean journal for food science of animal resources*, 35(4), 551–556.
- Soundharrajan, I., Kuppusamy, P., Srisesharam, S., Lee, J. C., Sivanesan, R., Kim, D., & Choi, K. C. (2020). Positive metabolic effects of selected probiotic bacteria on diet-induced obesity in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(9), 12289–12307.
- Sourianarayanan, A., O'Shea, R. S., Barnes, D. S., & McCullough, A. J. (2013). High prevalence of normal serum albumin in NASH patients with ascites: a retrospective analysis. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, 37(3), 246–253.
- Spady, D. K., & Dietschy, J. M. (1983). Sterol synthesis in vivo in 18 tissues of the squirrel monkey, guinea pig, rabbit, hamster, and rat. *Journal of lipid research*, 24(3), 303–315.
- Sprong, H., van der Sluijs, P., & van Meer, G. (2001). How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(7), 504–513.
- Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr, Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D., & Wissler, R. W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 92(5), 1355–1374.

- Steinway, S. N., Saleh, J., Koo, B. K., Delacour, D., & Kim, D. H. (2020). Human Microphysiological Models of Intestinal Tissue and Gut Microbiome. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 725.
- Stellaard, F., & Lütjohann, D. (2017). The Interpretation of Cholesterol Balance Derived Synthesis Data and Surrogate Noncholesterol Plasma Markers for Cholesterol Synthesis under Lipid Lowering Therapies. *Cholesterol*, 2017, 5046294.
- Sudhop, T., Lütjohann, D., Kodal, A., Igel, M., Tribble, D. L., Shah, S., Perevozskaya, I., & von Bergmann, K. (2002). Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. *Circulation*, 106(15), 1943–1948.
- Sun, L., Pang, Y., Wang, X., Wu, Q., Liu, H., Liu, B., Liu, G., Ye, M., Kong, W., & Jiang, C. (2019). Ablation of gut microbiota alleviates obesity-induced hepatic steatosis and glucose intolerance by modulating bile acid metabolism in hamsters. *Acta pharmaceutica Sinica*. B, 9(4), 702–710.
- Sunagawa, S., Mende, D. R., Zeller, G., Izquierdo-Carrasco, F., Berger, S. A., Kultima, J. R., Coelho, L. P., Arumugam, M., Tap, J., Nielsen, H. B., Rasmussen, S., Brunak, S., Pedersen, O., Guarner, F., de Vos, W. M., Wang, J., Li, J., Doré, J., Ehrlich, S. D., Stamatakis, A., Bork, P. (2013). Metagenomic species profiling using universal phylogenetic marker genes. *Nature methods*, 10(12), 1196–1199.
- Swanson, K.S., Gibson, G.R., Hutkins, R. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **17**, 687–701 (2020).
- Tahri, K., Grille, J. P., & Schneider, F. (1996). Bifidobacteria strain behavior toward cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilation. *Current Microbiology*, 33(3), 187-193.
- Takahashi, Y., & Fukusato, T. (2014). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology*, 20(42), 15539–15548.
- Tan, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2019). Investigations of Bacteroides spp. towards next-generation probiotics. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 116, 637–644.
- Tana, C., Ballestri, S., Ricci, F., Di Vincenzo, A., Ticinesi, A., Gallina, S., Giamberardino, M. A., Cipollone, F., Sutton, R., Vettor, R., Fedorowski, A., & Meschi, T. (2019). Cardiovascular Risk in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *International journal of environmental research and public health*, 16(17), 3104.
- Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T., & Mierau, I. (1999). Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *Journal of dairy science*, 82(12), 2530–2535.
- Tasse, L., Bercovici, J., Pizzut-Serin, S., Robe, P., Tap, J., Klopp, C., Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Leclerc, M., Doré, J., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., & Potocki-Veronese, G. (2010). Functional metagenomics to mine the human gut microbiome for dietary fiber catabolic enzymes. *Genome research*, 20(11), 1605–1612.

- Taylor, F., Huffman, M. D., Macedo, A. F., Moore, T. H., Burke, M., Davey Smith, G., Ward, K., & Ebrahim, S. (2013). Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. The Cochrane database of systematic reviews, 2013(1), CD004816.
- Temel, R. E., Sawyer, J. K., Yu, L., Lord, C., Degirolamo, C., McDaniel, A., Marshall, S., Wang, N., Shah, R., Rudel, L. L., & Brown, J. M. (2010). Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport. *Cell metabolism*, 12(1), 96–102.
- Tok, E., & Aslim, B. (2010). Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic. *Microbiology and immunology*, 54(5), 257–264.
- Toledo, A., & Benach, J. L. (2015). Hijacking and Use of Host Lipids by Intracellular Pathogens. *Microbiology spectrum*, 3(6), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0001-2014.
- Tomaro-Duchesneau, C., Jones, M. L., Shah, D., Jain, P., Saha, S., & Prakash, S. (2014). Cholesterol assimilation by *Lactobacillus* probiotic bacteria: an in vitro investigation. *BioMed research international*, 2014, 380316.
- Trautwein, E. A., Vermeer, M. A., Hiemstra, H., & Ras, R. T. (2018). LDL-Cholesterol Lowering of Plant Sterols and Stanols-Which Factors Influence Their Efficacy? *Nutrients*, 10(9), 1262.
- Trimarco, V., Izzo, R., Stabile, E., Rozza, F., Santoro, M., Manzi, M. V., Serino, F., Schiattarella, G. G., Esposito, G., & Trimarco, B. (2015). Effects of a new combination of nutraceuticals with *Morus alba* on lipid profile, insulin sensitivity and endothelial function in dyslipidemic subjects. A cross-over, randomized, double-blind trial. *High blood pressure & cardiovascular prevention: the official journal of the Italian Society of Hypertension*, 22(2), 149–154.
- Tripathi, A., Debelius, J., Brenner, D. A., Karin, M., Loomba, R., Schnabl, B., & Knight, R. (2018). The gut-liver axis and the intersection with the microbiome. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 15(7), 397–411.
- Trompet, S., Postmus, I., Slagboom, P. E., Heijmans, B. T., Smit, R. A., Maier, A. B., Buckley, B. M., Sattar, N., Stott, D. J., Ford, I., Westendorp, R. G., de Craen, A. J., & Jukema, J. W. (2016). Non-response to (statin) therapy: the importance of distinguishing non-responders from non-adherers in pharmacogenetic studies. *European journal of clinical pharmacology*, 72(4), 431–437.
- Tsai, C. C., Lin, P. P., Hsieh, Y. M., Zhang, Z. Y., Wu, H. C., & Huang, C. C. (2014). Cholesterol-lowering potentials of lactic acid bacteria based on bile-salt hydrolase activity and effect of potent strains on cholesterol metabolism in vitro and in vivo. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 690752.
- Tsuchiya, K., Tanaka, J., Shuiqing, Y., Welch, C. L., DePinho, R. A., Tabas, I., ... & Accili, D. (2012). FoxOs integrate pleiotropic actions of insulin in vascular endothelium to protect mice from atherosclerosis. *Cell metabolism*, 15(3), 372–381.
- Turley, S. D., & Dietschy, J. M. (2003). Sterol absorption by the small intestine. *Current opinion in lipidology*, 14(3), 233–240.

- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *nature*, 444(7122), 1027.
- Usman, & Hosono, A. (1999). Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *Journal of dairy science*, 82(2), 243–248.
- Van de Pas, N. C., Woutersen, R. A., van Ommen, B., Rietjens, I. M., & de Graaf, A. A. (2012). A physiologically based in silico kinetic model predicting plasma cholesterol concentrations in humans. *Journal of lipid research*, 53(12), 2734–2746.
- Van der Velde, A. E., Vriens, C. L., van den Oever, K., Kunne, C., Oude Elferink, R. P., Kuipers, F., & Groen, A. K. (2007). Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology*, 133(3), 967–975.
- Van Rooyen, D. M., Larter, C. Z., Haigh, W. G., Yeh, M. M., Ioannou, G., Kuver, R., Lee, S. P., Teoh, N. C., & Farrell, G. C. (2011). Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 141(4), 1393–1403.e14035.
- Vasapolli, R., Schütte, K., Schulz, C., Vital, M., Schomburg, D., Pieper, D. H., Vilchez-Vargas, R., & Malfertheiner, P. (2019). Analysis of Transcriptionally Active Bacteria Throughout the Gastrointestinal Tract of Healthy Individuals. *Gastroenterology*, 157(4), 1081–1092.e3.
- Vatanen, T., Plichta, D. R., Somani, J., Münch, P. C., Arthur, T. D., Hall, A. B., Rudolf, S., Oakeley, E. J., Ke, X., Young, R. A., Haiser, H. J., Kolde, R., Yassour, M., Luopajarvi, K., Siljander, H., Virtanen, S. M., Ilonen, J., Uibo, R., Tillmann, V., Mokurov, S., ... Xavier, R. J. (2019). Genomic variation and strain-specific functional adaptation in the human gut microbiome during early life. *Nature microbiology*, 4(3), 470–479.
- Vella, C. A., Nelson, M. C., Unkart, J. T., Miljkovic, I., & Allison, M. A. (2020). Skeletal muscle area and density are associated with lipid and lipoprotein cholesterol levels: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Journal of clinical lipidology*, 14(1), 143–153.
- Verbeuren, T. J., Jordaens, F. H., Zonnekeyn, L. L., Van Hove, C. E., Coene, M. C., & Herman, A. G. (1986). Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circulation research*, 58(4), 552–564.
- Vessey D. A. (1978). The biochemical basis for the conjugation of bile acids with either glycine or taurine. *The Biochemical journal*, 174(2), 621–626.
- Vieira-Silva, S., Falony, G., Belda, E., Nielsen, T., Aron-Wisnewskey, J., Chakaroun, R., Forslund, S. K., Assmann, K., Valles-Colomer, M., Nguyen, T., Proost, S., Prifti, E., Tremaroli, V., Pons, N., Le Chatelier, E., Andreelli, F., Bastard, J. P., Coelho, L. P., Galleron, N., Hansen, T. H., ... Raes, J. (2020). Statin therapy is associated with lower prevalence of gut microbiota dysbiosis. *Nature*, 581(7808), 310–315.

- Vrins C. L. (2010). From blood to gut: direct secretion of cholesterol via transintestinal cholesterol efflux. *World journal of gastroenterology*, 16(47), 5953–5957.
- Wadhera, R. K., Steen, D. L., Khan, I., Giugliano, R. P., & Foody, J. M. (2016). A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality. *Journal of clinical lipidology*, 10(3), 472–489.
- Wahlström, A., Sayin, S. I., Marschall, H. U., & Bäckhed, F. (2016). Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. *Cell metabolism*, 24(1), 41-50.
- Wang D. Q. (2007). Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annual review of physiology*, 69, 221–248.
- Wang, K., Liao, M., Zhou, N., Bao, L., Ma, K., Zheng, Z., Wang, Y., Liu, C., Wang, W., Wang, J., Liu, S. J., & Liu, H. (2019). Parabacteroides distasonis Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids. *Cell reports*, 26(1), 222–235.e5.
- Wang, W. L., Xu, S. Y., Ren, Z. G., Tao, L., Jiang, J. W., & Zheng, S. S. (2015). Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World journal of gastroenterology*, 21(3), 803–814.
- Wang, X., Magkos, F., & Mittendorfer, B. (2011). Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism: it's not just about sex hormones. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 96(4), 885–893.
- Ward, N., Sahebkar, A., Banach, M., & Watts, G. (2017). Recent perspectives on the role of nutraceuticals as cholesterol-lowering agents. *Current opinion in lipidology*, 28(6), 495–501.
- Wheelis, M. (2008). *Principles of modern microbiology*. Jones & Bartlett Publishers. 2, 11-24.
- WHO, World Health Organization, Fact Sheet. (2018) Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>
- WHO, World Health Organization, Fact Sheet. (2020) Available at: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- Wójcik C. (2020). Emerging lipid lowering agents targeting LDL cholesterol. *Postgraduate medicine*, 10.1080/00325481.2020.1751422. Advance online publication.
- Woollett, L. A., Buckley, D. D., Yao, L., Jones, P. J., Granholm, N. A., Tolley, E. A., Tso, P., & Heubi, J. E. (2004). Cholic acid supplementation enhances cholesterol absorption in humans. *Gastroenterology*, 126(3), 724–731.
- Xia, P. F., Pan, X. F., Chen, C., Wang, Y., Ye, Y., & Pan, A. (2020). Dietary Intakes of Eggs and Cholesterol in Relation to All-Cause and Heart Disease Mortality: A Prospective Cohort Study. *Journal of the American Heart Association*, 9(10), e015743.
- Xin, J., Zeng, D., Wang, H., Ni, X., Yi, D., Pan, K., & Jing, B. (2014). Preventing non-alcoholic fatty liver disease through *Lactobacillus johnsonii* BS15 by attenuating inflammation and

mitochondrial injury and improving gut environment in obese mice. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(15), 6817–6829.

Yao, L., Seaton, S. C., Ndousse-Fetter, S., Adhikari, A. A., DiBenedetto, N., Mina, A. I., Banks, A. S., Bry, L., & Devlin, A. S. (2018). A selective gut bacterial bile salt hydrolase alters host metabolism. *eLife*, 7, e37182.

Yılmaz, T., & Şimşek, Ö. (2020). Potential health benefits of ropy exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*. *Molecules*, 25(14), 3293.

Yin, W., Carballo-Jane, E., McLaren, D. G., Mendoza, V. H., Gagen, K., Geoghagen, N. S., McNamara, L. A., Gorski, J. N., Eiermann, G. J., Petrov, A., Wolff, M., Tong, X., Wilsie, L. C., Akiyama, T. E., Chen, J., Thankappan, A., Xue, J., Ping, X., Andrews, G., Wickham, L. A., ... Strack, A. M. (2012). Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia. *Journal of lipid research*, 53(1), 51–65.

Yoshida, N., Emoto, T., Yamashita, T., Watanabe, H., Hayashi, T., Tabata, T., Hoshi, N., Hatano, N., Ozawa, G., Sasaki, N., Mizoguchi, T., Amin, H. Z., Hirota, Y., Ogawa, W., Yamada, T., & Hirata, K. I. (2018). *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* Reduce Gut Microbial Lipopolysaccharide Production and Inhibit Atherosclerosis. *Circulation*, 138(22), 2486–2498.

Zanotti, I., Turroni, F., Piemontese, A., Mancabelli, L., Milani, C., Viappiani, A., Prevedini, G., Sanchez, B., Margolles, A., Elviri, L., Franco, B., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2015). Evidence for cholesterol-lowering activity by *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 through gut microbiota modulation. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(16), 6813–6829.

Zeevi, D., Korem, T., Zmora, N., Israeli, D., Rothschild, D., Weinberger, A., Ben-Yacov, O., Lador, D., Avnit-Sagi, T., Lotan-Pompan, M., Suez, J., Mahdi, J. A., Matot, E., Malka, G., Kosower, N., Rein, M., Zilberman-Schapira, G., Dohnalová, L., Pevsner-Fischer, M., Bikovsky, R., Segal, E. (2015). Personalized Nutrition by Prediction of Glycemic Responses. *Cell*, 163(5), 1079–1094.

Zeihner, A. M., Drexler, H., Wollschläger, H., & Just, H. (1991). Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation*, 83(2), 391–401.

Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M., & da Cruz, A. G. (2020). Probiotic: Conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*.

Zeng XQ, Pan DD, Zhou PD. Functional characteristics of *Lactobacillus fermentum* F1. *Curr Microbiol*. 2011;62(1):27-31.

Zhang, D., Yang, Y., Li, Y., Zhang, G., & Cheng, Z. (2020). Inhibitory Effect of Curcumin on Artery Restenosis Following Carotid Endarterectomy and Its Associated Mechanism in vitro and in vivo. *Drug design, development and therapy*, 14, 855–866.

Zhou, Y. Y., Zhou, X. D., Wu, S. J., Fan, D. H., Van Poucke, S., Chen, Y. P., Fu, S. W., & Zheng, M. H. (2018). Nonalcoholic fatty liver disease contributes to subclinical atherosclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Hepatology communications*, 2(4), 376–392.

Zununi Vahed, S., Barzegari, A., Zuluaga, M., Letourneur, D., & Pavon-Djavid, G. (2018). Myocardial infarction and gut microbiota: An incidental connection. *Pharmacological research*, 129, 308–317.

Titre : Impact du microbiome intestinal sur la cholestérolémie : Concepts et applications

Mots clés : Cholestérol ; coprostanol ; piégeage de cholestérol ; hydrolases des sels biliaires ; microbiome humain ; holobionte.

Résumé : Le microbiote intestinal est associé à plusieurs troubles métaboliques de l'hôte, comme la cholestérolémie. Dans ce contexte, le microbiote intestinal pourrait également avoir un impact bénéfique par le biais de différentes voies microbiennes, notamment : le piégeage du cholestérol, la production de coprostanol et les activités hydrolases des sels biliaires. Cependant, de nombreux éléments restent à élucider pour comprendre les mécanismes de l'influence du microbiote intestinal sur le métabolisme du cholestérol de l'hôte. Ce travail de thèse a permis d'enrichir nos connaissances conceptuelles à travers des travaux de recherche basés sur ces trois mécanismes microbiens impliqués dans le métabolisme du cholestérol. Par la suite, nous avons choisi d'étendre cette approche conceptuelle à la modélisation mathématique, pour comprendre la dynamique et les interactions de systèmes complexes. Nous avons développé pour la première fois, un modèle humain du métabolisme du cholestérol incluant le microbiote intestinal pour étudier l'impact relatif des voies de l'hôte et celle microbiote. Ce modèle montre que ces voies bac-

-tériennes apparaissent comme un moteur important de la régulation du cholestérol. Pour renforcer ces observations, nous avons identifié trois nouvelles bactéries intestinales présentant chacune de ces 3 voies métaboliques microbiennes et tester l'impact de ces trois voies métaboliques microbiennes dans un modèle animal, la souris. Cette application montre que les hydrolases des sels biliaires (BSH) constituent le levier le plus important pour réguler la cholestérolémie. Pour consolider ces données expérimentales, nous avons confirmé le potentiel hypocholestérolémique attractif des bactéries dotées de BSH en utilisant un modèle plus proche de l'homme, le lapin. L'administration de la bactérie présentant une BSH, a permis une diminution de l'hypercholestérolémie et de ses troubles associés (lésions hépatiques et développement de l'athérosclérose). L'ensemble de ces travaux mettent en évidence l'utilisation de bactéries intestinales ayant une activité BSH comme stratégie probiotique pour faire face à l'hypercholestérolémie.

Title: Impact of the gut microbiome on cholesterolemia: concepts and applications

Keywords : Cholesterol ; coprostanol ; cholesterol entrapment ; bile salt hydrolases ; human microbiome ; holobiont.

Abstract: The gut microbiota is associated with several host metabolic disorders, such as cholesterolemia. In this context, the gut microbiota could also have beneficial impact through different microbial pathways, including: coprostanol formation, cholesterol entrapment and bile salt hydrolases (BSH). However, many elements remain to be elucidated to mechanistic understanding of the gut microbiota influences host cholesterol metabolism. This PhD project has enriched our conceptual knowledge through research based on the three cholesterol microbial metabolisms. To enhance our insight into the microbiome and its host, we have extended this conceptual approach to mathematical models, which is proving to be an effective approach for studying the dynamics and interactions of complex systems. For the first time, we have developed, a human model of cholesterol metabolism including the gut microbiota to investigate the relative impact of host and microbiota pathways. This model demonstrates that these microbial pathways are an impor-

-tant driver of cholesterol regulation. To strengthen these observations, we have identified three new intestinal bacteria with each of these three microbial metabolic pathways and tested their impact in an animal model, the mouse. This application highlights that BSH constitute the most significant lever to regulate cholesterol levels. To further support these experimental data, we established the attractive hypocholesterolemic potential of BSH active-bacteria in a rabbit model, more similar to humans. Oral administration of the bacteria with BSH led to a reduction in hypercholesterolemia and also, its associated disorders (hepatic lesions and development of atherosclerosis). Taken together, this work provides evidence of the potential intervention of the gut bacteria with BSH activity as a probiotic strategy to counteract hypercholesterolemia.