



HAL
open science

**La teneur en lipides du régime affecte les
capacités d'absorption intestinale et la triglycéridémie
postprandiale: contribution du récepteur nucléaire
PPAR β ?**

Valérie Petit

► **To cite this version:**

Valérie Petit. La teneur en lipides du régime affecte les capacités d'absorption intestinale et la triglycéridémie postprandiale: contribution du récepteur nucléaire PPAR β ?. domain_other. Université de Bourgogne, 2007. Français. NNT: . tel-00141891

HAL Id: tel-00141891

<https://theses.hal.science/tel-00141891>

Submitted on 16 Apr 2007

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

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



UNIVERSITE DE BOURGOGNE

**ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DE BIOLOGIE
APPLIQUEE A LA NUTRITION ET A L'ALIMENTATION**

THESE

*Sciences de l'Alimentation
Spécialité Nutrition*

**La teneur en lipides du régime affecte les capacités
d'absorption intestinale et la triglycéridémie post-
prandiale :
contribution du récepteur nucléaire PPAR β ?**

présentée par

Valérie PETIT

en vue d'obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne

*Soutenue publiquement le 24 Janvier 2007
devant le jury composé de :*

M P.BESNARD	Professeur, ENSBANA, Université de Bourgogne, Dijon	<i>Directeur de Thèse</i>
Melle I.NIOT	Maître de Conférences, ENSBANA, Université de Bourgogne, Dijon	<i>Co-directeur de thèse</i>
M P.GRIMALDI	Directeur de Recherche, INSERM U636, Université de Nice-Sophia Antipolis	<i>Rapporteur</i>
Mme A.KALOPISSIS	Directeur de Recherche, INSERM U505, Paris	<i>Rapporteur</i>
Mme S.ROBINE	Directeur de Recherche, UMR144, Institut Curie, Paris	<i>Examineur</i>
Mr L.LAGROST	Directeur de Recherche, INSERM U498, Université de Bourgogne, Dijon	<i>Examineur</i>

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Monsieur le Professeur Philippe Besnard, directeur du Laboratoire de Physiologie de la Nutrition, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je vous remercie pour votre rigueur, votre esprit critique et pour votre encadrement.

Je tiens à exprimer ma gratitude et mon respect aux membres du jury.

A Monsieur Paul Grimaldi, directeur de recherche à l'INSERM U636, et à Madame Athina-Despina Kalopissis, directeur de recherche à l'INSERM U505 pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

A Madame Sylvie Robine, directeur de recherche à l'Institut Curie, Monsieur Laurent Lagrost, directeur de recherche à l'INSERM U498 qui ont accepté d'examiner ce travail.

Je remercie tout particulièrement Mademoiselle Isabelle Niot, Maître de Conférences à l'Université de Bourgogne et co-directrice de cette thèse pour son encadrement, son dévouement, sa présence, sa gentillesse, son enthousiasme, ses conseils et son implication dans ce travail.

Je suis très reconnaissante à la Région Bourgogne et à GlaxoSmithKline pour m'avoir accordé une bourse de thèse pendant trois ans.

Mes remerciements s'adressent également à l'Alfediam, Sanofi Aventis et Pfizer d'avoir financé bien que tardivement ma dernière année de thèse.

Mes remerciements vont aussi à Mademoiselle Hélène Poirier, Maître de Conférences à l'Université de Bourgogne qui m'a encadré lorsque j'étais en DEA. Je la remercie pour ses conseils, son encadrement, son dévouement et sa gentillesse.

Tout ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans l'aide de Madame Marie-Claude Monnot, Technicienne du Laboratoire. Je la remercie pour sa gentillesse, son dévouement, sa bonne humeur et son aide précieuse pour la gestion des souris, les expériences et surtout les régimes !!!!

Tous mes remerciements s'adressent également aux membres du Laboratoire de Physiologie de la Nutrition :

A Monsieur André Bernard, Professeur à l'Université de Bourgogne, à Madame Patricia Degrace et à Monsieur Jacques Grober, Maîtres de Conférences à l'Université de Bourgogne. Merci pour vos conseils, votre aide, votre sympathie et votre bonne humeur.

Je remercie les membres de l'unité INSERM U498, Monsieur Laurent Lagrost et Monsieur Jean-Paul Païs de Barros pour m'avoir permis de réaliser les profils lipoprotéiques et les mesures d'apoB48 présentés dans la troisième partie de ce travail de thèse.

Un grand merci au Docteur Laurent Arnould ainsi qu'au personnel du service d'anatomo-pathologie du Centre GF.Leclerc de Dijon pour l'obtention des nombreuses coupes histologiques d'intestin.

Je remercie chaleureusement tous les étudiants avec qui j'ai partagé mon bureau durant ces années de thèse : Lionel Clément, Jean-François Landrier, Charles Thomas, Fabienne Laugerette, Ségolène Arnould, Marianne Latournerie, Dany Gaillard et Amaia Zabala. Merci aux garçons, à Marianne et à Amaia pour votre soutien, votre enthousiasme, vos conseils et pour m'avoir supporté lors de mes grandes réflexions (surtout toi Dany !). Merci également pour vos cours en informatique !!

Je remercie également mes amis : Nicolas, Adeline, Alice, Isabelle, David, Aurélie, Fabienne et Laurent pour votre soutien, vos encouragements et pour tous les moments passés ensemble, les bons comme les mauvais.

Enfin, je remercie de tout cœur ma maman, mon frère Philippe, Patricia et mes deux petits bouts, Léon et Maud. Merci d'être là chaque jour à mes côtés pour me soutenir, m'encourager, m'écouter et m'aider. Sans vous, jamais je n'aurais pu accomplir ce travail.

ABBREVIATIONS

13-HODE : acide 13-S-hydroxyoctadénoïque
15-PGJ2 : 15-prostaglandine J2
ABC : ATP-binding cassette transporter
ACAT : AcylCoA cholestérol acyl-transférase
ACBP : Acyl-CoA-binding protein
ACOTH : Acyl-CoA thioesterase
ACS : Acyl-CoA synthetases
ADISP : adipocyte specific mRNA
AF : Activation factor
AG : Acides gras
AGLC : Acides gras à longue chaîne
AGNE : Acides gras non estérifiés
ALBP : Adipocyte lipid-binding protein
ALDH1 : aldehyde déhydrogénase 1
Apo : Apolipoprotéine
ATP : Adénosine triphosphate
BrdU : Bromo-désoxyuridine
CBP : cAMP response element binding protein
CRBP II : Cellular retinal-binding protein II
CS : Cholestérol
DBD : DNA binding domain
DESIR : Données épidémiologiques sur le syndrome d'insulino-résistance
DG : Diglycérides
DGAT : Diacylglycérol-acyltransférase
DR1 : Direct repeat 1
EC : Ester de cholestérol
EGF : Epidermal growth factor
FABP : Fatty acid-binding protein
FABPpm : Fatty acid-binding protein plasma membrane
FAT/CD36 : Fatty acid transporter
FATP : Fatty acid transport protein
FPLC : Fast performance liquid chromatography
GAPDH : Glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase
GLP-2 : Glucagon like-peptide 2
GLUT2 : Glucose transporter 2
HDL : High-density lipoprotein
HETE : Hydroxy-eicosatétraénoïque acid
Hygro : Hygromycine
I-FABP : Intestinal fatty acid-binding protein
IMC : indice de masse corporelle
Ki : constante d'inhibition
LBD : Ligand binding domain
LBPs : Lipid-binding proteins
LDL : Low density lipoprotein
LDLr : LDL receptor
L-FABP : Liver fatty acid-binding protein
LPL : Lipoprotéine lipase

LRP : Low-density lipoprotein receptor-related protein
mAspAT : mitochondrial aspartate aminotransferase
MG : Monoglycérides
MGAT : Monoacylglycérol-acyltransférase
mHMGCoAS : mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase
MTP : Microsomal triglyceride transfer protein
NCEP ATP III : National cholesterol education program adult treatment Panel III
NcoR : Nuclear receptor co-repressor
NPC1L1 : Niemann-pick C1 like 1
OMS : Organisation mondiale de la Santé
PBP : PPAR-binding protein
PCR : Polymerase Chain Reaction
PGC : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator
PGI2 : Prostaglandine I2
PL : Phospholipides
PMDCI : Peroxisomal/mitochondrial dienoyl-CoA isomerase
PMP70 : Peroxisomal membrane protein
PNNS : Programme National Nutrition Santé
PPARs : Peroxisome proliferator-activated receptors
PPRE : Peroxisome proliferator-responsive element
RE : Réticulum endoplasmique
REL : Réticulum endoplasmique lisse
RER : Réticulum endoplasmique rugueux
RXR : Retinoic X receptor
SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel
SMRT : Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor
SRC-1 : Steroid receptor co-activator-1
SU.VI.MAX : Supplémentation en vitamines et en minéraux anti-oxydants
TBP : Tata binding protein
TG : Triglycérides
TNF α : Tumor necrosis factor α
Tpa : mitochondrial Trifunctional protein alpha-subunit
VAMP7 : vesicle-associated membrane protein 7
VLDL : Very low density lipoprotein
v-SNARE : vesicle-associated soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein

Sommaire

INTRODUCTION.....	3
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	7
1 <i>L'intestin grêle : un organe complexe au service d'une absorption efficace</i>	8
1.1 <i>Organisation selon l'axe gastro-colique et crypto-villositaire</i>	8
1.2 <i>Un renouvellement cellulaire intense.....</i>	12
1.3 <i>Les entérocytes : cellules hautement polarisées</i>	13
2 <i>Digestion et absorption des triglycérides alimentaires.....</i>	13
2.1 <i>Etape luminale.....</i>	13
2.2 <i>Captage entérocytaire des acides gras à longue chaîne.....</i>	15
2.2.1 FABPpm : l'homologue de la mitochondrial aspartate aminotransférase (mAspAT)	17
2.2.2 FATP-4 : un transporteur des acides gras ou une acyl-CoA synthétase (ACS) ?	18
2.2.3 FAT/CD36 : une protéine à la recherche de ses fonctions.....	19
2.2.4 Cavéoline-1 : une lipid-binding protein et un marqueur de cavéole	21
2.3 <i>Métabolisme intracellulaire</i>	22
2.3.1 Trafic intra-entérocytaire.....	22
2.3.2 Formation des acyl-CoA	24
2.3.3 Ré-estérification des acyl-CoA	25
2.4 <i>Synthèse et sécrétion des lipoprotéines intestinales.....</i>	28
PROBLEMATIQUE	36
RESULTATS	39
<i>L'INTESTIN EST-IL CAPABLE D'ADAPTER SES CAPACITES D'ABSORPTION A LA TENEUR EN LIPIDES DU REGIME CHEZ LA SOURIS ?</i>	40
1 <i>La consommation d'un régime hyperlipidique améliore l'absorption des lipides chez la souris.</i>	41
2 <i>Le régime hyperlipidique augmente les capacités d'absorption de l'intestin chez les souris soumises au régime hyperlipidique.</i>	43
3 <i>Le régime hyperlipidique induit une augmentation de l'index mitotique au niveau du jéjunum chez la souris.</i>	45
4 <i>Le régime hyperlipidique induit une augmentation du niveau d'expression des gènes impliqués dans l'absorption intestinale des AGLC.....</i>	47
5 <i>Le régime hyperlipidique affecte la triglycéridémie post-prandiale.....</i>	50
5.1 <i>L'expression intestinale des apoC-II et C-III est modulée par le régime hyperlipidique.....</i>	50
5.2 <i>La clairance des triglycérides est plus efficace après un régime hyperlipidique</i>	51
5.3 <i>Le nombre et la taille des chylomicrons sécrétés sont-ils modifiés après un régime hyperlipidique ?</i>	52
<i>IDENTIFICATION DU MECANISME MOLECULAIRE A L'ORIGINE DE L'ADAPTATION INTESTINALE : ROLE DE PPARβ?</i>	56
1 <i>Structure des PPARs.</i>	57
2 <i>Les ligands des PPARs.....</i>	59
3 <i>Les fonctions des PPARs.....</i>	60
4 <i>PPARβ : l'élément clef de l'adaptation intestinale ?.....</i>	61
4.1 <i>PPARβ et la régulation de l'activité proliférative.</i>	61
4.2 <i>PPARβ et régulation de l'expression coordonnée des gènes impliqués dans le processus d'absorption intestinale.....</i>	63

<i>EFFET DE LA SUR-EXPRESSION INTESTINALE DE PPARβ SUR LES CAPACITES D'ABSORPTION DE L'INTESTIN CHEZ DES SOURIS SOUMISES A UN REGIME NORMOLIPIDIQUE.</i>	68
1 <i>La sur-expression intestinale de PPARβ augmente les pertes fécales en lipides chez la souris en régime normolipidique.</i>	69
2 <i>La sur-expression intestinale de PPARβ ne modifie pas la capacité de captage des AGLC au niveau du jéjunum.</i>	71
3 <i>La sur-expression intestinale de PPARβ augmente l'activité proliférative du jéjunum.</i> 71	
4 <i>La sur-expression intestinale de PPARβ affecte uniquement le niveau d'expression jéjunale de la L-FABP.</i>	72
<i>LA SUR-EXPRESSION INTESTINALE DE PPARβ AFFECTE-T-ELLE LES CAPACITES D'ABSORPTION DE L'INTESTIN CHEZ LES SOURIS SOUMISES A UN REGIME HYPERLIPIDIQUE ?</i>	74
1 <i>Les souris sur-exprimant PPARβ s'adaptent de manière moins efficace</i>	75
2 <i>La sur-expression intestinale de PPARβ ne modifie pas l'activité proliférative du jéjunum chez les souris soumises à un régime hyperlipidique.</i>	76
3 <i>La sur-expression intestinale de PPARβ diminue l'expression des gènes impliqués dans l'absorption des AGLC chez les souris soumises à un régime hyperlipidique.</i>	77
PPARβ ET LIPEMIE POST-PRANDIALE	79
1 <i>Effet de la sur-expression intestinale de PPARβ sur la triglycémie post-prandiale chez des souris soumises au régime normolipidique.</i>	80
1.1 <i>La sur-expression intestinale de PPARβ diminue la clairance des TG des chylomicrons.</i>	80
1.2 <i>La sur-expression intestinale de PPARβ augmente l'expression intestinale de l'apoC-II.</i>	83
1.3 <i>La sur-expression intestinale de PPARβ ne modifie pas le nombre de chylomicrons sécrétés.</i>	84
2 <i>Effet de la sur-expression intestinale de PPARβ sur la triglycémie post-prandiale chez des souris soumises au régime hyperlipidique.</i>	84
2.1 <i>La sur-expression intestinale de PPARβ semble induire une rétention des TG dans la muqueuse.</i>	85
2.2 <i>La sur-expression intestinale de PPARβ ne modifie pas l'expression des apoC-II et C-III au niveau du jéjunum.</i>	87
3 <i>Effet de la sur-expression intestinale de PPARβ sur la cholestérolémie post-prandiale chez des souris soumises au régime normolipidique.</i>	88
DISCUSSION	94
PERSPECTIVES	94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	110
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	130

Introduction

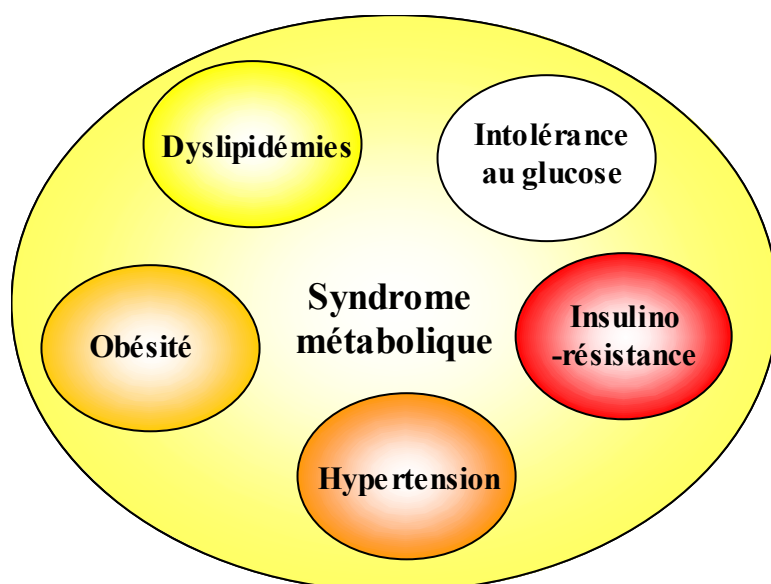


Fig. 1 : Le syndrome métabolique : un ensemble de dysfonctionnements métaboliques.

Tableau 1. Critères et seuils de diagnostic du syndrome métabolique (selon l'Organisation Mondiale de la Santé et le National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III).

OMS (1999)		NCEP ATP III (2001)	
Facteurs de risque	Anomalies de la régulation du glucose (glycémie à jeun, intolérance au glucose ou diabète) et/ou insulino-résistance associée à au moins deux des facteurs de risque suivants	Adultes	Adolescents
Hypertension	$\geq 140/90$ mmHg ou traitement anti-hypertenseur	$\geq 130/85$ mmHg ou traitement anti-hypertenseur	≥ 90 percentile (âge, sexe et taille)
Dyslipidémie	TG $\geq 1,5$ g/l et/ou HDL-C $\leq 0,35$ g/l (H), $\leq 0,39$ g/l (F)	TG $\geq 1,5$ g/l HDL-C $< 0,4$ g/l (H), $< 0,5$ g/l (F)	TG $\geq 1,1$ g/l HDL-C $\leq 0,4$ g/l (H et F)
Obésité viscérale ou centrale	rapport tour de taille/tour de hanche $\geq 0,9$ (H), $\geq 0,85$ (F) et/ou IMC ≥ 30 kg/m ²	Tour de taille > 102 cm (H), > 88 cm (F)	≥ 90 percentile (âge et sexe)
Autres	Vitesse d'excrétion albumine urinaire ≥ 20 µg/min ou rapport albumine/créatinine ≥ 30 mg/g	Glycémie à jeun $\geq 1,1$ g/l	Glycémie à jeun $\geq 1,1$ g/l

F : femme; H : homme; HDL-C : HDL cholestérol; IMC : indice de masse corporelle; TG : triglycérides.

Le syndrome métabolique est un ensemble de dysfonctionnements métaboliques tels que l'intolérance au glucose, l'insulino-résistance, l'obésité, les dyslipidémies et l'hypertension (Fig.1). Ces troubles agissent en synergie et prédisposent les sujets atteints aux maladies cardiovasculaires, principale cause de mortalité en France (Murray *et al.*, 1997).

Aujourd'hui, ce désordre métabolique représente 6 à 7% des causes de mortalité mondiale. Aux Etats-Unis, il affecte 30% de la population alors qu'en France, la prévalence est estimée à 16% chez les hommes et 11% chez les femmes selon l'étude DESIR (Données Epidémiologiques sur le Syndrome d'Insulino-Résistance) (Balkau *et al.*, 2003).

Actuellement, les critères établis par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) et le National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) présentés dans le tableau 1 servent de références pour diagnostiquer le syndrome métabolique (Kolovou, 2005). Selon l'OMS, on considère qu'il y a syndrome métabolique lorsque l'anomalie de la régulation de la glycémie est associée à deux autres facteurs de risques comme les dyslipidémies et l'obésité. Ce dernier paramètre est déterminant dans le syndrome métabolique puisque sa définition n'a cessé d'évoluer en raison de l'augmentation de la prévalence de l'obésité dans les populations. Pour estimer le surpoids et l'obésité chez les populations et les individus adultes, l'indice de masse corporelle (IMC) qui est une mesure simple du poids corporel par rapport à la taille est couramment utilisée. Il correspond au poids divisé par le carré de la taille, exprimé en kg/m^2 . L'OMS définit le surpoids comme un IMC égal ou supérieur à 25 et l'obésité comme un IMC égal ou supérieur à 30. De récentes études épidémiologiques indiquent une augmentation alarmante du surpoids dans les pays industrialisés. Si aux Etats-Unis, l'obésité concernait en 1960 21% de la population, elle s'élevait à 33% à la fin des années 1990 (Kuczmarski *et al.*, 1994) ce qui représente 50% d'augmentation en 30 ans. En France, les données de l'enquête ObEpi-Roche 2006 confirme ce phénomène puisque entre 1997 et 2006, la prévalence de l'obésité est passée de 8,2% à 12,4% chez les adultes. Selon l'OMS, plus d'un milliard d'adultes sont en surpoids et 300 millions sont obèses. C'est pourquoi, depuis 1998, l'obésité est considérée comme une épidémie. De nombreuses études ont été réalisées afin de comprendre l'origine de ce désordre métabolique. Les auteurs s'accordent à dire qu'il s'agit d'un phénomène complexe dont les origines sont multiples : génétiques et comportementales (mauvaises habitudes alimentaires et manque d'activité physique). L'origine génétique a été mise en évidence par des études réalisées chez la souris où le défaut de synthèse de la leptine ou de son récepteur conduit à

l'obésité chez l'Homme (Zhang *et al.*, 1994; Phillips *et al.*, 1996). Cependant l'existence de ces défauts mono-génétiques n'explique qu'une très faible proportion de l'obésité (Montague *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 1998; Strobel *et al.*, 1998). Ces constats indiquent que l'obésité est un phénomène plus complexe, d'origine multi-génique et que d'autres facteurs comme un excès de calories sont certainement responsables de l'augmentation de sa prévalence.

Chez l'animal, il est clairement établi que la consommation d'un régime alimentaire riche en lipides conduit à l'augmentation de la masse grasse (West *et al.*, 1998). Ces données suggèrent que chez l'Homme, les lipides alimentaires pourraient être aussi à l'origine de ces désordres métaboliques. En effet, les lipides alimentaires, qui possèdent la plus forte densité énergétique (9kcal/g), représentent environ 40% de l'apport énergétique journalier alors que les apports nutritionnels conseillés sont inférieurs de 10% (Martin, 2001). Cet excès est associé à un déséquilibre qualitatif : trop de graisses saturées, de cholestérol et un rapport d'acides gras insaturés n-6/n-3 élevé comme l'indique clairement l'étude Supplémentation en vitamines et en minéraux anti-oxydants (SU.VI.MAX) (Vazquez Martinez *et al.*, 1998).

L'ensemble de ces constats explique pourquoi l'OMS au niveau mondial et le Programme National Nutrition Santé (PNNS) en France ont mis en place une stratégie pour diminuer les maladies souvent associées à l'obésité comme les maladies cardiovasculaires, le diabète de type II, l'hypertension artérielle et certains cancers. Cette stratégie vise à augmenter les dépenses énergétiques par la pratique d'une activité physique régulière et à diminuer les apports énergétiques provenant de la consommation de lipides en particulier d'acides gras saturés et de cholestérol (circulaire de l'OMS 17 Avril 2004) (PNNS).

En plus de ces mesures hygiéno-diététiques souvent difficiles à faire respecter, des stratégies thérapeutiques ont également été élaborées notamment pour corriger les dyslipidémies. En ce qui concerne ce paramètre, il est bien connu que des désordres de la lipémie post-prandiale participent à la mise en place de ces dyslipidémies qui sont considérées comme les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires (Genest, 2000) (Karpe, 1999; Cabezas *et al.*, 2000). Jusqu'à présent, les investigations thérapeutiques ont été axées sur le métabolisme du foie. Paradoxalement, l'intestin qui conditionne la biodisponibilité en lipides à l'organisme a jusqu'à présent été négligé. Or, des études ont mis en évidence que les lipoprotéines riches en triglycérides (TG) sécrétées par l'intestin grêle peuvent contribuer à l'apparition de ces pathologies (Zilversmit, 1995; Cabezas *et al.*, 2000). L'ensemble de ces constats suggère que l'intestin grêle pourrait jouer un rôle primordial dans l'étiologie du

syndrome métabolique puisqu'il conditionne la biodisponibilité en lipides à l'organisme et qu'il participe à la régulation de la triglycéridémie. Pourtant, son importance a jusqu'à présent été négligée dans l'apparition de ces pathologies. Le fait que cet organe ait longtemps été considéré comme une simple barrière passive douée d'une grande capacité d'absorption explique en partie ce paradoxe. En effet, théoriquement, les acides gras à longue chaîne (AGLC), qui exercent des fonctions primordiales au sein de l'organisme, doivent être absorbés de manière efficace. En plus d'être des sources d'énergie, des composants des membranes biologiques (Sardesai, 1992), les AGLC sont des sources d'acides gras indispensables, précurseurs de médiateurs lipidiques (thromboxanes, prostaglandines, leucotriènes, prostacylines) (Sumida *et al.*, 1993). Ce sont aussi des agents perméabilisants des canaux ioniques et des régulateurs de l'expression de gènes (Amri *et al.*, 1991; Niot *et al.*, 1997). En effet, des études ont montré que les AGLC sont capables d'activer ou d'inhiber des récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation de gènes clefs du métabolisme énergétique. Ces régulations médiées par les lipides permettraient aux cellules de s'adapter aux teneurs variables en AGLC environnant les tissus cibles. Parmi les gènes régulés, certains sont impliqués dans les différentes étapes du processus d'absorption des AGLC au niveau de l'intestin grêle (Niot.I, 2003). Si ces régulations existent au niveau intestinal, alors ceci laisse supposer que la teneur en AGLC du régime est susceptible de moduler le métabolisme entérocytaire des lipides et par conséquent la triglycéridémie post-prandiale. Ces changements pourraient modifier l'utilisation des lipides par l'organisme et participer à la mise en place des désordres métaboliques associés au syndrome métabolique. Cette hypothèse est étayée par les données récentes qui ont montré que dans le cas d'insulino-résistance, les lipoprotéines sécrétées par l'intestin étaient responsables de l'hypertriglycéridémie (Haidari *et al.*, 2002; Duez *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces constats laisse supposer que l'intestin pourrait devenir une nouvelle cible d'action pour la mise en place de nouvelles stratégies nutritionnelles et/ou thérapeutiques pour corriger les pathologies liées à la sur-consommation de lipides.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse qui vise à connaître si la teneur en lipides du régime affecte la physiologie de l'intestin et quels sont les mécanismes moléculaires à l'origine de ces modifications.

Synthèse bibliographique

1 L'intestin grêle : un organe complexe au service d'une absorption efficace

L'intestin grêle est un organe hétérogène présentant des caractéristiques morphologiques et génotypiques variables à l'origine d'une spécialisation fonctionnelle. L'intestin grêle est caractérisé par :

- une surface d'échange importante : des valvules conniventes présentes chez l'Homme mais pas chez les rongeurs, des villosités et des micro-villosités qui augmentent chez l'Homme, la surface d'échange d'un facteur 600.
- une orientation selon deux axes : horizontal (gastro-colique) et vertical (crypto-villositaire)
- un renouvellement cellulaire rapide
- une polarisation des entérocytes : présence de micro-villosités au pôle apical des entérocytes
- la présence d'une couche d'eau non agitée au niveau apical

1.1 Organisation selon l'axe gastro-colique et crypto-villositaire

Le long de l'axe gastro-colique, l'intestin grêle possède une expression génotypique variable à l'origine d'une spécialisation fonctionnelle. C'est pourquoi, on distingue de l'estomac au colon, trois segments intestinaux : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le duodénum le plus court segment de l'intestin, reçoit les sels biliaires et les enzymes du pancréas. C'est dans cette partie de l'intestin que se déroule l'étape la plus importante de la digestion et de l'hydrolyse des lipides alimentaires. Le jéjunum où l'expression de nombreuses protéines impliquées dans l'absorption des lipides est la plus élevée, est le site préférentiel de l'absorption des lipides (Vahouny *et al.*, 1968). En revanche, l'iléon est le site majeur de réabsorption des sels biliaires.

Tout le long de cet axe, la muqueuse intestinale est constituée d'un épithélium simple qui s'organise en deux compartiments morphologiquement distincts :

- des invaginations ou cryptes de Lieberkühn localisées dans le mésenchyme qui constituent une zone de prolifération intense
- des évaginations ou villosités orientées dans la lumière intestinale formant une zone de différenciation (Fig. 2)

Chaque villosité est entourée par plusieurs cryptes (6-10 cryptes) et l'ensemble forme l'unité fonctionnelle de l'intestin grêle (Fig. 2). Chez le rat, la taille des villosités décroît du duodénum à l'iléon. En effet, une villosité du duodénum a une taille 2 fois plus élevée qu'une villosité iléale (Altmann *et al.*, 1967). De plus, le nombre de cryptes par villosité diminue également le long de l'axe gastro-colique (au nombre de 7 dans le duodénum et de 4 dans l'iléon) (Wright *et al.*, 1982).

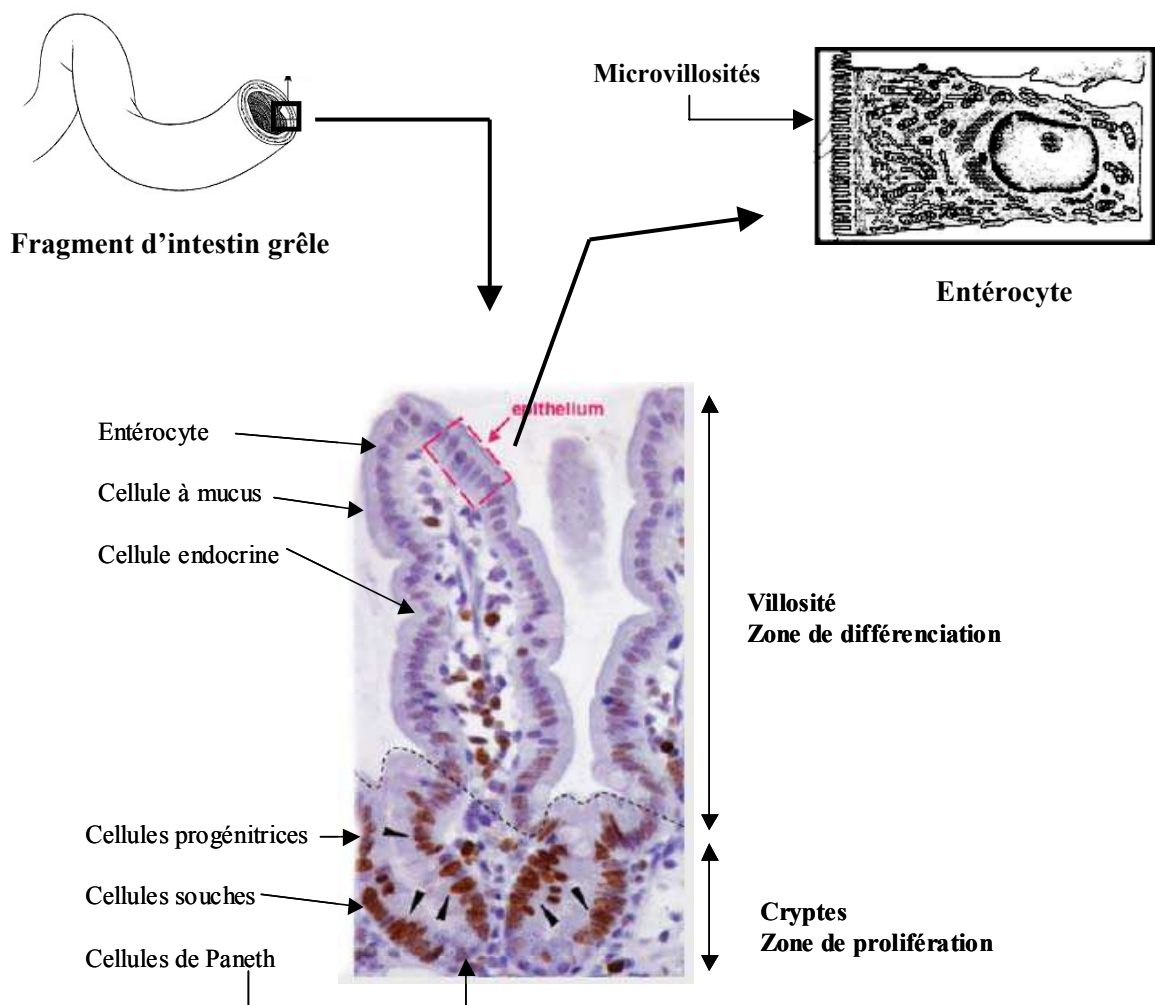


Fig. 2 : Schéma d'une unité fonctionnelle de l'intestin grêle

L'épithélium intestinal est constitué de 4 grands types cellulaires (Fig. 3). En effet, au niveau de la villosité, on trouve les cellules absorbantes : les entérocytes, représentant environ 90% des cellules totales ; les cellules caliciformes (environ 9% des cellules totales) sécrétant

le mucus dont les fonctions sont de protéger l'épithélium intestinal et de faciliter le passage des aliments le long de l'intestin; et les cellules endocrines qui synthétisent des hormones par exemple la cholécystokinine-pancréozymine et la sécrétine.

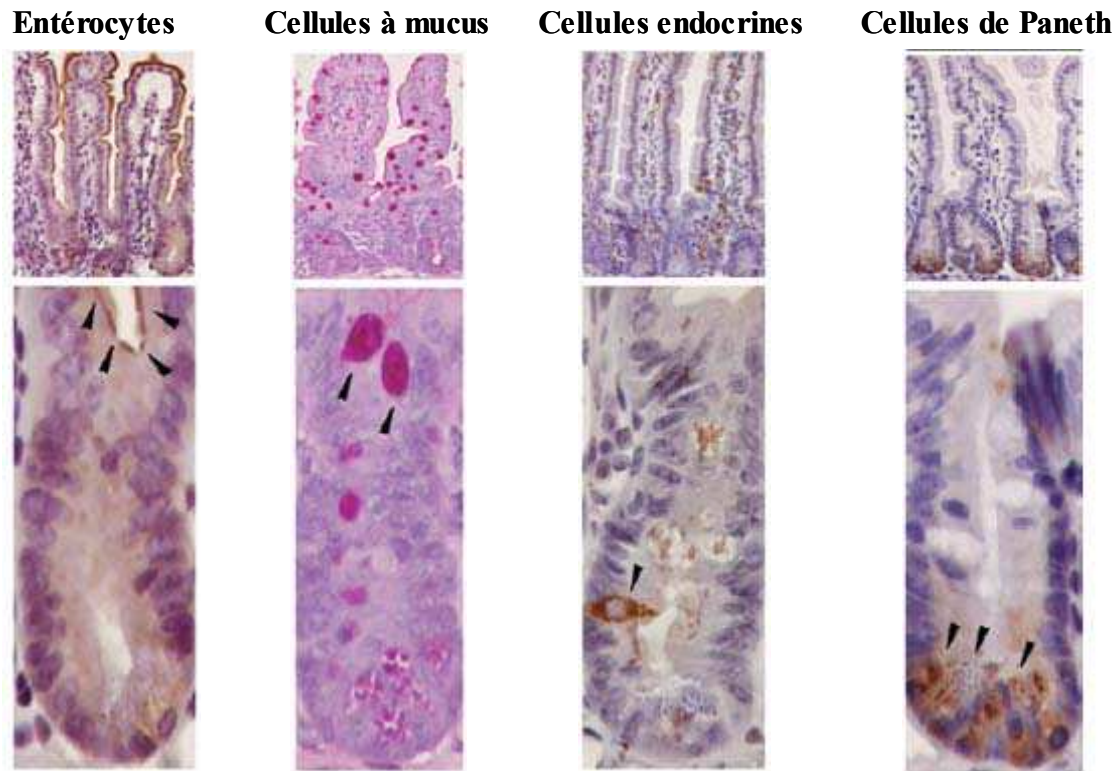


Fig. 3 : Localisation des 4 principaux types de cellules de l'épithélium intestinal le long de l'axe crypto-villositaire (d'après (Pinto *et al.*, 2005).

Dans la crypte, se trouvent les cellules de Paneth qui sécrètent le lysozyme (enzyme anti-bactérienne), le tumor necrosis facteur- α (TNF- α) (réponses inflammatoires) et des cryptidines (défensine). Ce compartiment est également composé de cellules souches qui en se divisant vont donner naissance aux 4 types cellulaires retrouvés dans l'épithélium intestinal.

Situées à la base des cryptes, les cellules souches, multipotentes sont au nombre de 4 à 6. Comme le montre la figure 4, elles se divisent de façon asymétrique pour donner des cellules souches filles progénitrices qui vont soit régénérer les cellules souches soit proliférer rapidement pour donner des cellules dites de « transit ». Ces dernières donneront en se différenciant les 4 types cellulaires décrits précédemment. Ce modèle d'organisation décrit

par Potten et collaborateurs (Potten, 1998) permet ainsi de réguler à la fois le nombre de cellules souches, la taille des cryptes et par conséquent d'assurer le maintien de l'intégrité du tissu. Au fur et à mesure du processus de prolifération, les cellules progénitrices perdent petit à petit leurs propriétés de cellules souches et acquièrent les caractéristiques de cellules différenciées. Ainsi, les cryptes sont composées de 3 compartiments :

- un premier situé à la base de la crypte regroupant les cellules souches qui se divisent lentement (une fois par jour).
- un deuxième constitué des cellules filles descendantes des cellules souches, les cellules progénitrices, qui se divisent très rapidement.
- un troisième comprenant les cellules qui ne se divisent plus mais se différencient en 4 sous-populations et migrent soit vers l'apex de la villosité soit vers la base la crypte (Wong *et al.*, 1998) (Fig. 3).

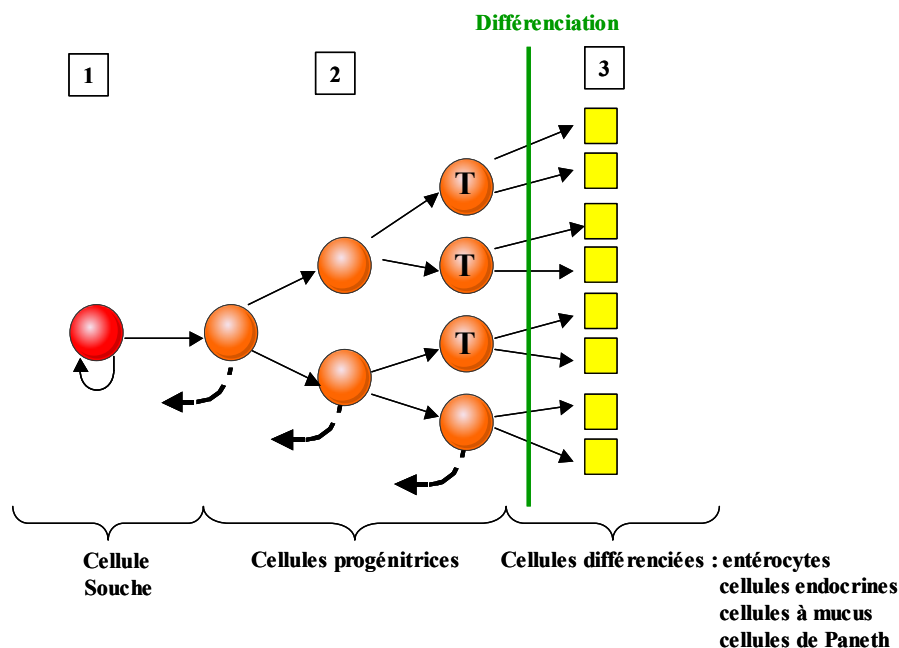


Fig. 4 : Modèle d'organisation des cellules souches dans la crypte (Potten, 1998).

T : cellule de transit

La différenciation des cellules de « transit » se fait de façon bidirectionnelle. Les cellules à l'origine des entérocytes, des cellules à mucus et des cellules endocrines acquièrent leurs caractéristiques de cellules différenciées au fur et à mesure de leur migration vers le haut de la villosité. C'est pourquoi, les entérocytes hautement différenciés impliqués dans l'absorption

des lipides se situent au niveau des 2/3 supérieurs des villosités. Au niveau de l'apex des villosités, les cellules entrent en apoptose et sont exfoliées dans la lumière intestinale. Les cellules donnant les cellules de Paneth vont quant à elle se différencier au fur et à mesure de leur migration vers le fond de la crypte (Potten *et al.*, 1997).

1.2 Un renouvellement cellulaire intense

L'épithélium intestinal est un tissu qui se renouvelle très rapidement. En effet, chez l'Homme sain, la muqueuse intestinale se renouvelle tous les 5 jours (soit environ 17 milliards de cellules renouvelées par jour) et tous les 3 jours chez la souris (Marshman *et al.*, 2002). Cette extraordinaire capacité à se renouveler permet ainsi à l'intestin de s'adapter rapidement aux changements de son environnement.

Parmi les facteurs régulant l'homéostasie de la muqueuse intestinale, on distingue les nutriments. En effet, des études réalisées chez le rat (Dunel-Erb *et al.*, 2001) et la souris (Goodlad *et al.*, 1984) ont montré qu'un jeûne prolongé (24 ou 48h) entraîne une diminution de l'activité proliférative de l'intestin conduisant à une atrophie de la muqueuse jéjunale (diminution de la hauteur des cryptes et des villosités). Cette altération est restaurée par la présence de nutriments dans la lumière intestinale. Parmi ceux-ci, les lipides de l'alimentation sont de puissants stimulateurs de la prolifération cellulaire. En effet, chez les rats, suite à un jeûne prolongé (96h), une réalimentation par les lipides alimentaires pendant 48h conduit à une restauration de la masse de la muqueuse jéjunale de 36%. En revanche, une réalimentation par des protéines et des glucides n'engendre qu'une restauration respectivement de 26% et 20% de la masse de la muqueuse jéjunale (Buts *et al.*, 1990). De plus, suite à une résection intestinale, il a été montré chez le rat que les lipides alimentaires stimulent la réponse adaptative de l'intestin qui se traduit par une augmentation de la hauteur des villosités et une restauration des fonctions d'absorption (Thiesen *et al.*, 2003). Selon certains auteurs, ce mécanisme ferait intervenir une hormone, le glucagon like-peptide 2 (GLP-2) dont la sécrétion est stimulée par la présence de lipides et de glucides dans la lumière intestinale (Drucker, 2001).

Ainsi, la teneur en lipides du régime est susceptible de modifier la prolifération cellulaire et donc la surface d'absorption intestinale.

1.3 Les entérocytes : cellules hautement polarisées

Une autre caractéristique de l'intestin est qu'il est constitué d'un épithélium simple prismatique dont les cellules sont liées entre elles par des jonctions serrées. Un tel système imperméable empêche les molécules de s'infiltrer entre les cellules absorbantes adjacentes et oblige ainsi les nutriments à passer à travers les cellules.

De plus, les entérocytes possèdent un pôle apical en contact avec le milieu extérieur où les quantités en AGLC sont très variables et intermittentes. Au contraire, le pôle basal est en contact avec le milieu intérieur où les quantités d'AGLC sont plus faibles et plus contrôlées. La présence d'une bordure en brosse composée de microvillosités denses et ordonnées augmente la surface d'échange au pôle apical avec le milieu extérieur. De plus, ce pôle apical est en contact avec un micro-environnement particulier constitué d'un réseau de glycoprotéines (le mucus et le glycocalyx) : la couche d'eau non agitée. Comme nous le verrons par la suite, cet environnement spécifique conditionne le mode de captage des AGLC.

En résumé, l'intestin possède un micro-environnement particulier ainsi qu'une grande surface d'absorption (villosités et microvillosités) qui peut-être modulée par les nutriments. Ces caractéristiques qui n'existent pas dans les autres cellules ayant une capacité importante de captage des lipides permettent à l'intestin de s'adapter à des quantités élevées et très variables de lipides au cours de la journée.

Par conséquent, toutes ces caractéristiques morphologiques sont primordiales et doivent être prises en compte dans l'étude du métabolisme lipidique intestinal.

2 Digestion et absorption des triglycérides alimentaires

2.1 Etape luminale

Environ 95% des lipides alimentaires ingérés sont des triglycérides (TG), 4,5% des phospholipides (PL) et 0,5% des stérols d'origine animale et végétale. Comme les TG sont les principaux lipides consommés, nous avons focalisés notre travail sur l'absorption de ces molécules.

Après ingestion, les TG alimentaires, qui sont constitués principalement d'AGLC, ne peuvent traverser les membranes cellulaires de part leur hydrophobicité. Ils devront être émulsifiés, hydrolysés puis incorporés dans des micelles mixtes.

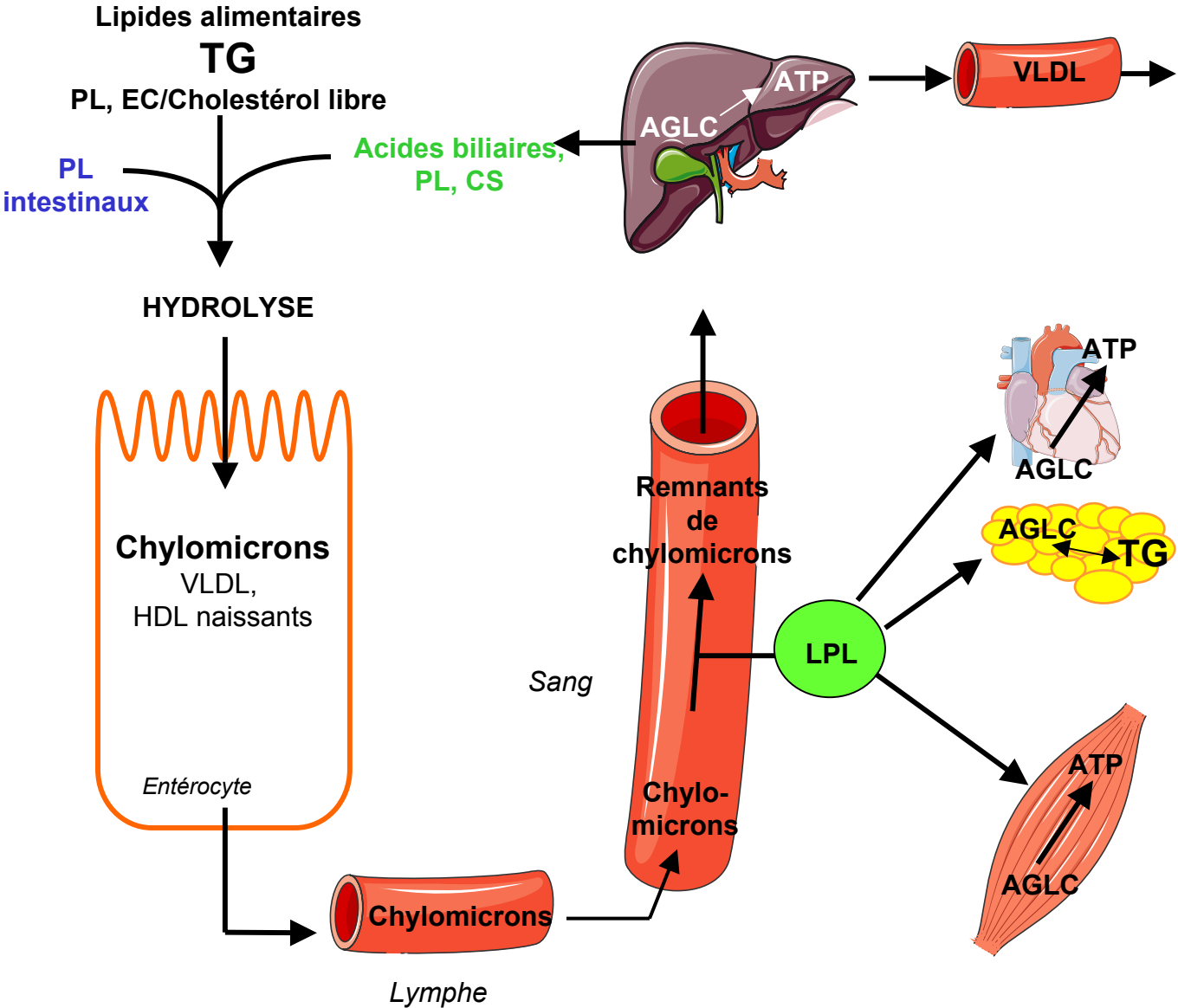


Fig. 5 : Devenir des lipides alimentaires dans l'organisme.
 AGLC : acides gras à longue chaîne, ATP : adénosine triphosphate, CS : cholestérol, EC : esters de cholestérol, HDL : high-density lipoprotein, LPL : lipoprotéine lipase, PL : phospholipides, TG : triglycérides, VLDL : very low-density lipoprotein.

L'émulsification des TG commence dans l'estomac par le brassage et est facilitée par l'action de la lipase pré-duodénale qui est activée en milieu acide et en absence de sels biliaires (Moreau *et al.*, 1988). Chez l'Homme sain, l'activité de cette enzyme n'est pas négligeable puisqu'elle hydrolyse 40% des lipides (Armand *et al.*, 1994). L'arrivée du chyme stomacal acide contenant les lipides et les produits de digestion partielle des TG, essentiellement des 1,2 diglycérides et des acides gras libres au niveau du duodénum déclenche, par un mécanisme neuro-hormonal, les sécrétions biliaires et pancréatiques. Celles-ci vont respectivement émulsifier et hydrolyser les lipides. L'émulsification conduit à la formation de micelles mixtes de petit diamètre qui favorisent l'action de la lipase pancréatique. En période post-prandiale, l'activité de cette enzyme est stimulée par la présence de bicarbonates contenus dans le suc pancréatique et nécessite la présence d'une colipase. La formation du complexe sels biliaires-colipase va permettre l'accrochage de la lipase pancréatique à l'interface des gouttelettes lipidiques et ainsi l'hydrolyse des TG en position 1 et 3 pour donner des 2-monoglycérides et des acides gras libres. Ces produits d'hydrolyse sont associés aux sels biliaires, aux PL et aux stérols pour former des micelles mixtes. La solubilité des AGLC et des 2-MG est extrêmement faible en milieu aqueux mais sous cette forme micellaire, de grandes quantités de lipides seront capables de franchir la couche d'eau non agitée bordant les villosités, pour entrer en contact de la muqueuse intestinale. Les acides gras à chaîne courte et à chaîne moyenne sont quant à eux plus hydrosolubles que les AGLC et donc ne nécessitent pas la présence de sels biliaires pour être absorbés.

Une fois dans l'entérocyte, les AGLC sont ré-estérifiés en TG et en PL puis vont s'associer aux esters de cholestérol (EC) et aux apolipoprotéines pour former des lipoprotéines intestinales telles que les chylomicrons et very low-density lipoproteins (VLDL). En période post-prandiale, les triglycérides alimentaires sont principalement incorporés dans des chylomicrons (Fig. 5). Sécrétées dans la lymphe, ces lipoprotéines rejoignent la circulation sanguine *via* la veine sous-clavière gauche. Les triglycérides contenus dans les chylomicrons sont progressivement hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL) au niveau de l'endothélium vasculaire libérant ainsi des AGLC au niveau des tissus périphériques comme par exemple le tissu adipeux, le cœur et le muscle squelettique. Au niveau du foie, la lipase hépatique permet également d'hydrolyser les triglycérides des lipoprotéines intestinales en AGLC. Ceux-ci sont alors utilisés à des fins énergétiques ou pour la synthèse de VLDL hépatiques principalement en période inter-prandiale (Fig. 5).

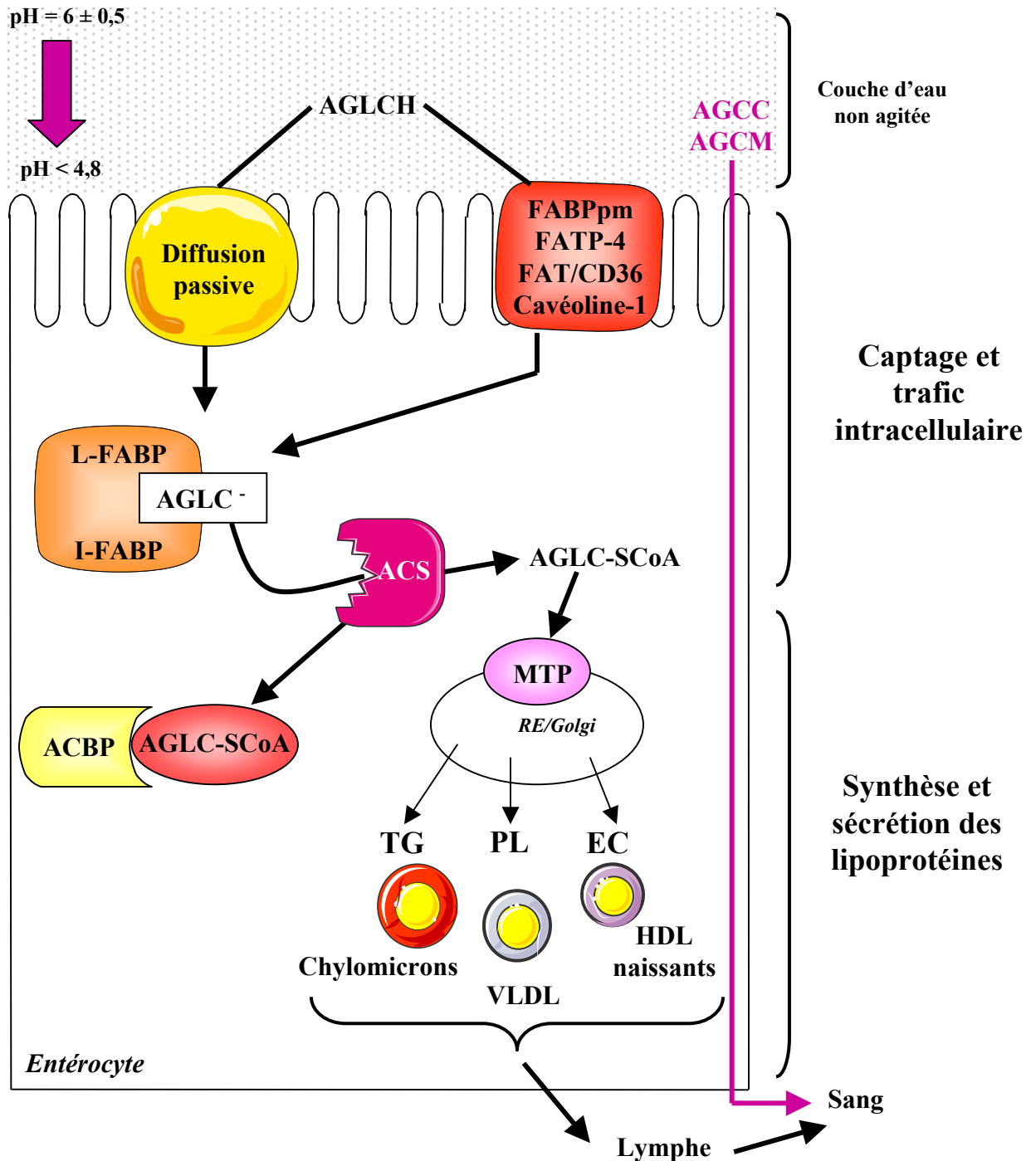


Fig. 6 : Principales étapes de l'absorption intestinale des acides gras à longue chaîne.

ACBP : acylCoA binding protein, ACS : acylCoA synthétase, AGCC : acides gras à chaîne courte, AGCM : acides gras à chaîne moyenne, AGLC⁻ : acides gras à longue chaîne ionisés, AGLCH : acides gras à longue chaîne protonés, AGLC-SCoA : acylCoA, EC : esters de cholestérol, FABPpm : plasma membrane fatty acid-binding protein, FAT/CD36 : fatty acid transporter, FATP-4 : fatty acid transport protein 4, HDL : high density lipoprotein, I-FABP : intestinal fatty acid-binding protein, L-FABP : liver fatty acid-binding protein, MTP : microsomal triglycerides transfer protein, PL : phospholipides, RE : réticulum endoplasmique, TG : triglycérides, VLDL : very low density lipoprotein.

Pour des raisons didactiques, l'absorption des AGLC sera décomposée en trois étapes (Fig. 6) :

- Le captage entérocytaire
- Le métabolisme intracellulaire
- La synthèse et la sécrétion des lipoprotéines

2.2 Captage entérocytaire des acides gras à longue chaîne

Le captage entérocytaire correspond au passage des AGLC et de 2-MG de la lumière intestinale vers le cytoplasme des entérocytes. Différents concepts ont été proposés pour expliquer le mode de captage des AGLC au travers de la membrane des entérocytes (Hamilton, 1998). Du fait du caractère lipophile des AGLC, l'hypothèse d'une diffusion passive unique a longtemps été soutenue (Strauss, 1966). Des études réalisées sur des vésicules artificielles de phospholipides ont montré que l'absorption des acides gras était dépendante de l'état de ionisation des molécules. Si les AGLC protonés traversent très rapidement (<20 ms) la bicouche lipidique par simple diffusion, les AGLC ionisés sont caractérisés par un transfert beaucoup plus lent (1 à 20 s) (Kamp *et al.*, 1993; Kamp *et al.*, 1995).

Au niveau de l'intestin, la présence d'un pH acide au pôle apical rendrait la diffusion passive plus efficace. Comme signalé précédemment, l'intestin a la caractéristique de posséder au pôle apical, une couche d'eau non agitée dont l'importance est considérable puisque son épaisseur est comprise entre 50 et 500 μm . De plus, ce micro-environnement est caractérisé par une vitesse de renouvellement lente par rapport au reste de la lumière. Au niveau de cette zone, règne un gradient de pH qui est la conséquence de la présence de pompes à protons localisées au niveau de la membrane apicale des entérocytes (Shiau *et al.*, 1985; Schoeller *et al.*, 1995) (Fig. 7). Cet environnement acide favorise la protonation des AGLC contenus dans les micelles mixtes lorsque le pH environnant devient inférieur au pKa de la molécule. Ce phénomène conduit à la dissociation des micelles et à la libération des AGLC protonés à proximité de la surface de la bordure en brosse des entérocytes (Shiau, 1981). D'après les travaux de Kamp et collaborateurs, cette protonation faciliterait le captage des AGLC par simple diffusion (Kamp *et al.*, 1993). Le fait que l'inhibition des pompes à protons par l'amiloride conduit à une diminution dose dépendante du transfert des AGLC à

travers les membranes de la bordure en brosse confirme l'importance de ce micro-environnement acide dans l'absorption intestinale des lipides (Schoeller *et al.*, 1995).

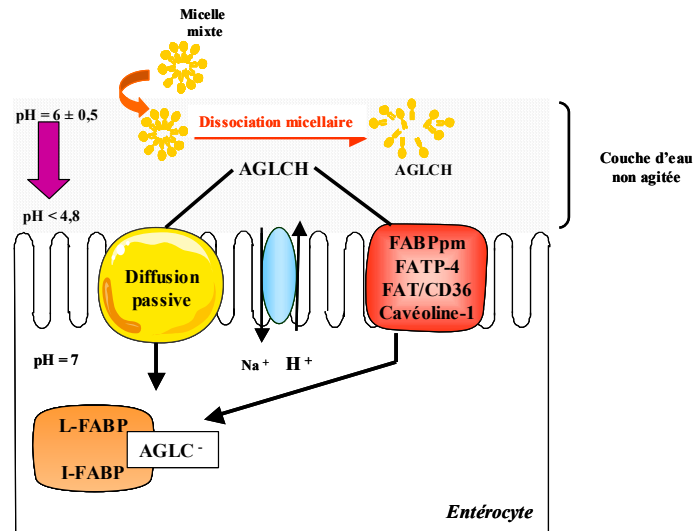


Fig. 7 : Captage entérocytaire des acides gras à longue chaîne.

AGLCH : acides gras à longue chaîne protonés, AGLC⁻ : acides gras à longue chaîne ionisés, FABPpm : plasma membrane fatty acid-binding protein, FATP-4 : fatty acid transport protein 4, FAT/CD36 : fatty acid transporter, L-FABP : liver fatty acid-binding protein, I-FABP : intestinal fatty acid-binding protein.

Cependant, ce concept de diffusion est sujet à controverse suite à des expériences réalisées à la fois *in vitro*, sur le modèle de cellules Caco-2, issu d'un adénocarcinome colique humain (Trotter *et al.*, 1996) et *in vivo*, au niveau du jéjunum perfusé de rat (Stremmel, 1988). Dans ces deux cas, les auteurs ont démontré l'existence d'un transport saturable des AGLC ainsi que des inhibitions compétitives entre les AGLC (Stremmel, 1988). Ces données suggèrent qu'il existerait en plus de la diffusion passive, un système de transport facilité des AGLC au niveau de la membrane apicale des entérocytes.

L'identification de protéines membranaires présentant une forte affinité pour les AGLC au niveau de l'intestin conforte ce mode de transport des AGLC. Ces protéines appartiennent à la famille des Lipid-Binding Protein (LBPs) et sont au nombre de 4. Il s'agit de la plasma membrane fatty acid-binding protein (FABPpm) (Stremmel *et al.*, 1985), de la fatty acid transfer protein 4 (FATP-4) (Schaffer *et al.*, 1994), du fatty acid transporter (FAT/CD36) (Abumrad *et al.*, 1993) et de la cavéoline-1 (Trigatti *et al.*, 1991) (Fig. 7).

Actuellement, la contribution de la diffusion passive par rapport au transport facilité au niveau intestinal n'est pas encore connue. Néanmoins, plusieurs auteurs indiquent que ces deux mécanismes co-existeraient au niveau de l'entérocyte (Chow *et al.*, 1979; Stremmel, 1988). Lors de fortes charges en lipides, la diffusion passive, à forte capacité et faible affinité, serait le système de transport prépondérant. Un tel système de transport éviterait que le captage des AGLC ne devienne une étape limitante en période post-prandiale. En revanche, en période inter-prandiale, lorsque de faible quantité de lipides sont présentes, le transport facilité caractérisé par une plus forte affinité serait plus efficace (Niot.I, 2003).

Pour tenter de comprendre la réelle contribution de la diffusion passive par rapport à la diffusion facilitée, nous avons recherché dans la littérature les données concernant les fonctions des LBPs.

2.2.1 FABPpm : l'homologue de la mitochondrial aspartate aminotransférase (mAspAT)

La plasma membrane fatty acid-binding protein est une protéine de 43 kDa localisée principalement au niveau du cœur, du foie et de l'intestin grêle. Des études d'immunofluorescence ont montré qu'elle est exprimée au niveau de la membrane des microvillosités et également dans les membranes latérales des entérocytes du jéjunum et en moindre quantité dans l'iléon de rat (Stremmel *et al.*, 1985). Elle est trouvée aussi bien dans les entérocytes des cryptes que des villosités (Stremmel *et al.*, 1985). Elle présente une forte affinité de liaison pour les AGLC mais lie également le cholestérol, les lysophospholipides et les 2-MG (Stremmel, 1988). La FABPpm est l'homologue de la mitochondrial aspartate aminotransférase (mAspAT), une enzyme située dans le cytoplasme et la matrice des mitochondries dans lesquels elle catalyse la réaction de transamination reliant le cycle de l'urée et de Krebs (Stump *et al.*, 1993). Des expériences de sur-expression du vecteur de la mAspAT dans des fibroblastes 3T3 ont entraîné l'apparition de la protéine au niveau de la membrane plasmique ainsi qu'une augmentation du captage des AGLC (Isola *et al.*, 1995). Ces données corrélées à l'inhibition partielle du captage des AGLC dans des explants de jéjunum pré-incubés avec un anticorps anti-FABPpm (Stremmel, 1988) pouvait suggérer un rôle de cette protéine dans l'absorption intestinale des AGLC. Cependant, l'inhibition de ce captage n'existe que dans le cas de fortes de concentration en anticorps. De plus, des

transfections de FABPpm au niveau d'ovocytes de xénopes n'altèrent pas le transfert des AG (Zhou *et al.*, 1995). Par conséquent ces données remettent en cause le rôle de cette protéine dans le captage des AGLC.

2.2.2 FATP-4 : un transporteur des acides gras ou une acyl-CoA synthétase (ACS) ?

Identifiées dans les pré-adipocytes 3T3-L1, les fatty acid transport proteins (FATPs) sont des protéines de 63 kDa impliquées dans le captage des AGLC (Schaffer *et al.*, 1994). Aujourd'hui, cinq FATPs ont été identifiées chez la souris et six chez l'Homme (Stahl *et al.*, 2001). FATP-1 est majoritairement exprimée dans le cerveau, FATP-2 dans le foie et les reins et FATP-4 dans différents organes comme le cœur, le cerveau, les poumons, le foie, les reins et l'intestin grêle.

Au niveau intestinal, FATP-4 est localisée au pôle apical des entérocytes du jéjunum et de l'iléon et plus particulièrement au niveau des microvillosités de la bordure en brosse (Stahl *et al.*, 1999). Des expériences de sur-expression de cette protéine dans les cellules rénales 293 ont montré une augmentation du captage des AGLC tels que l'oléate et le palmitate (Stahl *et al.*, 1999). De plus, l'utilisation d'oligonucléotides antisens de FATP-4 induit une diminution du captage de l'oléate dans des entérocytes isolés (Stahl *et al.*, 1999). Ces données *in vitro* sont corroborées par des études *in vivo* chez la souris. En effet, une délétion de FATP-4 sur un allèle conduit à une diminution de 48% de la protéine ainsi qu'à une réduction de 40% du captage des AG au niveau des entérocytes isolés (Gimeno *et al.*, 2003). Ainsi, l'ensemble de ces données montre que FATP-4 est impliquée dans le captage des AGLC au niveau des entérocytes.

De part la structure prédictive de FATP-1 qui indique que la protéine est essentiellement cytosolique, il est difficile d'envisager un rôle des FATPs en tant que transporteur membranaire (Fig. 8).

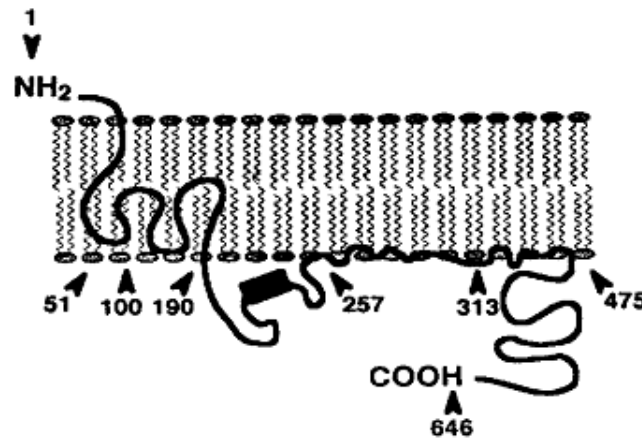


Fig. 8 : Structure prédictive de la fatty acid-binding protein 1 (FATP-1) (Stahl *et al.*, 2001)

De plus, de part leurs homologies de séquences avec les ACS (Coe *et al.*, 1999), les FATPs pourraient être des ACS spécifiques de la membrane plasmique. Actuellement, il est admis que la FATP-4 est une ACS. En accord avec cette hypothèse, la transfection de FATP-4 dans des cellules Cos-1 a montré que l'activité ACS est augmentée et préférentiellement en présence d'acides gras à très longue chaîne (Herrmann *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces données suggère que FATP-4 pourrait activer les AGLC en acyl-CoA dès leur passage au travers de la membrane plasmique. Comme la membrane plasmique est imperméable aux acyl-CoA, ces derniers resteraient dans la cellule. Par conséquent, cette transformation biochimique favoriserait l'influx des AGLC en maintenant un gradient de concentration entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule, en favorisant leur entrée. Ainsi, FATP-4 ne serait pas un véritable transporteur mais jouerait plutôt le rôle d'une ACS.

2.2.3 FAT/CD36 : une protéine à la recherche de ses fonctions

Le fatty acid transporter (FAT/CD36) est une protéine transmembranaire de 88 kDa identifiée au niveau de l'adipocyte de rat (Abumrad *et al.*, 1993) (Fig. 9). Il est exprimé dans les tissus caractérisés par un métabolisme lipidique important tels que le tissu adipeux (Abumrad *et al.*, 1993), le muscle squelettique, le cœur (Van Nieuwenhoven *et al.*, 1995) et l'intestin grêle (Poirier *et al.*, 1996). Le FAT exprimé chez le rat est l'homologue de la protéine CD36 trouvée chez l'Homme (Abumrad *et al.*, 1993).

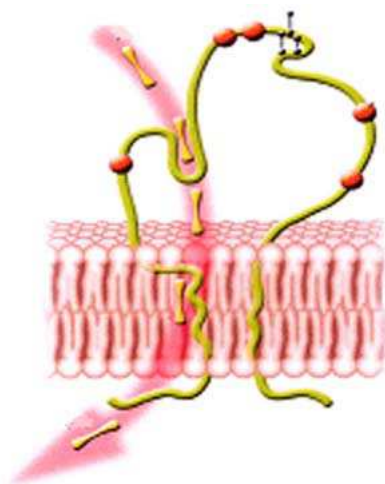


Fig. 9 : Structure du fatty acid transporter (FAT/CD36) (Abumrad, 2005).

Le FAT/CD36 est une protéine qui lie avec une forte affinité de l'ordre du nanomolaire les AGLC. Le FAT/CD36 est impliqué dans le captage des AGLC dans les adipocytes et le muscle. En effet, l'induction de l'expression du FAT/CD36 dans des fibroblastes Ob17PY ne possédant pas cette protéine s'accompagne d'une augmentation du captage des acides gras (AG) (Ibrahimi *et al.*, 1996). En accord avec ces données, l'inactivation du gène FAT/CD36 chez la souris conduit à une diminution du captage des acides gras au niveau du muscle squelettique, du tissu adipeux et même du cœur (Abumrad *et al.*, 1993; Coburn *et al.*, 2000).

Au niveau intestinal, la localisation de FAT/CD36 et sa régulation suggère un rôle de cette protéine dans le mécanisme d'absorption. En effet, il est localisé au niveau de la bordure en brosse des entérocytes situés dans les 2/3 supérieurs des villosités duodéno-jéjunales (Poirier *et al.*, 1996) et son expression est corrélée à la teneur en lipides du régime (Poirier *et al.*, 1996; Sukhotnik *et al.*, 2001).

Cependant, des données du Laboratoire obtenues *in vivo* sur des anses isolées d'animaux ayant une inactivation de FAT/CD36 ont montré que cette protéine n'est pas directement impliqué dans le captage des AGLC (données non publiées). Ces données ont été confirmées *in vitro* sur des entérocytes isolés de ces animaux (Drover *et al.*, 2005). Par ailleurs, la délétion de FAT/CD36 entraîne des modifications du métabolisme entérocytaire puisque des altérations du transfert des AGLC vers les sites de ré-estérification (réticulum endoplasmique) ont été observées ainsi qu'une accumulation de TG au niveau du cytoplasme

des souris invalidée pour le gène CD36 soumises à une charge en lipides (Drover *et al.*, 2005). Ces effets peuvent expliquer le ralentissement de la vitesse de sécrétion des TG dans la lymphe et également le fait que les chylomicrons sont de plus petite taille (Nauli *et al.*, 2006). Ces données indiquent que le FAT/CD36 participe au phénomène d'absorption mais probablement pas en tant que transporteur membranaire efficace comme dans le tissu adipeux et le muscle.

2.2.4 Cavéoline-1 : une lipid-binding protein et un marqueur de cavéole

Les cavéolines sont des protéines de 21-24 kDa localisées au niveau d'invaginations non recouvertes de clathrine de la membrane plasmique, les cavéoles. La cavéoline-1 appartient à cette famille qui est composée de trois isotypes. La cavéoline-1 est une protéine de 22 kDa associée à la cavéoline-2 sous forme d'hétéro-oligomères. Elle est considérée comme une LBP puisqu'elle a été montrée comme possédant une affinité de liaison pour les AGLC de l'ordre du nanomolaire dans les pré-adipocytes (Trigatti *et al.*, 1999). Cette donnée est confortée par sa localisation au niveau du pôle apical des cellules Caco-2 différenciées (Field *et al.*, 1998). Même si les fonctions de la cavéoline-1 sont multiples du fait de son rôle primordial dans la biogénèse des cavéoles, son implication dans le ciblage de molécules telles que le cholestérol vers le site de ré-estérification a également été rapportée (Conrad *et al.*, 1995). Cette fonction de transport vésiculaire est également retrouvée pour les AGLC au sein des cellules HepG2, issues d'un hépatocarcinome humain (Pohl *et al.*, 2002). De plus, un rôle de la cavéoline-1 dans le stockage des TG est envisageable puisque cette protéine est présente au niveau de la membrane des gouttelettes lipidiques (Pol *et al.*, 2001). Pour finir, un rôle de cette protéine dans le processus d'absorption est suggéré chez les souris dont le gène de la cavéoline-1 a été invalidé. En effet, ces animaux présentent une triglycéridémie élevée en période post-prandiale (Razani *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces données de la littérature montre que de part leurs structures et leurs fonctions, les LBPs ne possèdent pas les caractéristiques de transporteurs membranaires efficaces. En revanche, leurs caractéristiques suggèrent que ces LBPs favoriseraient la diffusion passive des AGLC.

FABP	I-FABP	L-FABP
Caractéristiques		
Localisation	Intestin grêle	Foie et intestin grêle
Distribution intestinale des ARNm		
Nombre de sites de liaison	1	2 haute affinité faible affinité
Spécificité de liaison	AGLC	AGLC, hème, acides biliaires, acyl-CoA, éicosanoïdes, carcinogènes, xénobiotiques
Régulateurs principaux	Fibrates	AGLC, fibrates, acide rétinoïque

Fig. 10 : Caractéristiques et propriétés de liaison de la I- et de la L-FABP.

I-FABP : intestinal fatty acid-binding protein; L-FABP : liver fatty acid binding protein; AGLC : acides gras à longue chaîne.

2.3 Métabolisme intracellulaire

2.3.1 Trafic intra-entérocytaire

Après leur entrée dans l'entérocyte, les AGLC sont pris en charge par des protéines cytosoliques appartenant à la famille des Fatty Acid-Binding Proteins (FABPs) comprenant 16 membres (Veerkamp *et al.*, 1995; Bernlohr *et al.*, 1997). Au niveau de l'entérocyte, deux FABPs sont exprimées: l'intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) (Alpers *et al.*, 1984) strictement exprimée dans l'intestin et la liver fatty acid-binding protein (L-FABP) (Gordon *et al.*, 1983) exprimée également dans le foie et les reins. Ces deux FABPs ont la particularité de s'exprimer tout le long de l'intestin grêle selon un gradient horizontal (du duodénum à l'iléon) et vertical (haut de la villosité au bas de la crypte) (Fig.10). Chez la souris, l'expression de la L-FABP est majoritaire dans la partie proximale de l'intestin puis diminue jusqu'à devenir indétectable dans l'iléon. Quand à la I-FABP, son expression augmente progressivement du duodénum à l'iléon où elle est maximale (Poirier *et al.*, 1997).

Ces deux protéines sont capables de lier avec une haute affinité les AGLC saturés ou non et de manière non covalente et réversible. Cependant, la I-FABP ne lie qu'un AGLC à la différence de la L-FABP qui est capable de lier deux AGLC ainsi que des molécules hydrophobes endogènes tels que les MG (Fig. 10, 11). De plus, la L-FABP a cinq fois plus d'affinité pour les acides gras insaturés que la I-FABP (Richieri *et al.*, 1994).

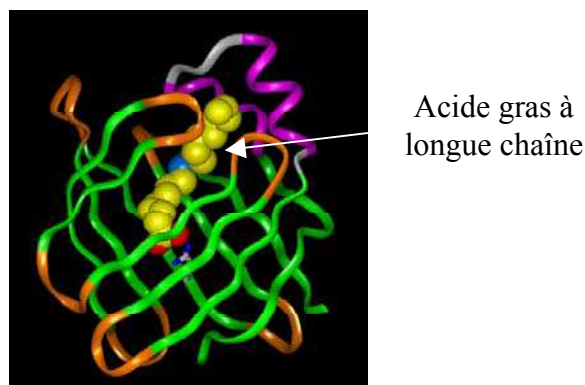


Fig. 11 : Structure tridimensionnelle de l'intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP)

d'après (Hodsdon *et al.*, 1996)

Contrairement à la I-FABP, l'expression de la L-FABP est transcriptionnellement induite par les AGLC au niveau intestinal (Poirier *et al.*, 1997) *via* un mécanisme impliquant le peroxisome proliferator-activated receptor β (PPAR β) (Poirier *et al.*, 2001).

En plus d'être régulées de façon différente, ces deux FABPs transfèrent différemment les acides gras vers les organites cellulaires. En effet, les travaux réalisés *in vitro* de Hsu et collaborateurs (Hsu *et al.*, 1996) ont mis en évidence que la I-FABP transfère les AGLC vers la bicouche phospholipidique par un mécanisme collisionnel alors que la L-FABP utilise un processus de diffusion aqueuse. Ces données suggèrent que ces deux protéines pourraient avoir des fonctions distinctes au niveau cytoplasmique.

L'étude du polymorphisme humain du gène codant pour la I-FABP chez les indiens Pima a mis en évidence que les individus porteurs d'une substitution d'une base au niveau du codon 54 de l'alanine (Ala-I-FABP) par une thréonine (Thr-I-FABP) sont hypertriglycéridémiques et insulino-résistants (Baier *et al.*, 1996). Le fait que la Thr-I-FABP ait deux fois plus d'affinité pour les AGLC que l'Ala-I-FABP pourrait expliquer ces modifications (Baier *et al.*, 1996). En effet, l'expression de la Thr-I-FABP induirait une augmentation du captage des AG et de la sécrétion des lipoprotéines. La transfection de la Thr-I-FABP dans des cellules Caco-2 conforte cette hypothèse puisqu'elle conduit à une augmentation du transport des AG et de la sécrétion des TG contrairement aux cellules transfectées avec la forme Ala-I-FABP (Baier *et al.*, 1996). Paradoxalement, l'augmentation de l'expression de la I-FABP par l'epidermal growth factor (EGF) dans les Caco-2 provoque une diminution de l'incorporation des AG dans les TG (Darimont *et al.*, 1999).

De plus, cette protéine semble avoir une influence sur le routage cellulaire des AGLC. En effet, la I-FABP serait impliquée dans le ciblage des AGLC vers le réticulum endoplasmique (RE) (Prows *et al.*, 1995; Baier *et al.*, 1996; Darimont *et al.*, 1999; Alpers *et al.*, 2000). Cette hypothèse est supportée par les travaux de Alpers *et al.*, qui ont montré que lorsque les AGLC sont présentés au pôle apical des entérocytes, ils sont préférentiellement liés à la I-FABP (Alpers *et al.*, 2000).

En revanche, en absence de contact avec les lipides, les AGLC cytoplasmiques sont liés majoritairement à la L-FABP (Alpers *et al.*, 2000). Ce constat indique qu'au contraire de la I-FABP, la L-FABP jouerait plutôt un rôle de réservoir cytoplasmique d'AGLC et protégerait les entérocytes des effets détergents d'un excès intracellulaire d'AG libres. Le fait que l'expression de la L-FABP soit régulée par le contenu en lipides du régime sous-tend cette hypothèse. De plus, la L-FABP contrairement à la I-FABP, serait plutôt impliquée dans la formation des phospholipides en dehors des périodes post-prandiales (Prows *et al.*, 1995).

Actuellement, les fonctions de ces deux FABPs ne sont pas clairement définies puisque des études de transgénèse ont montré que l'inactivation de la I- et de la L-FABP ne conduit pas à des modifications drastiques de l'efficacité de l'absorption des AGLC (Vassileva *et al.*, 2000; Newberry *et al.*, 2003; Newberry *et al.*, 2006). Toutefois, la sécrétion des lipoprotéines semble être altérée par ces invalidations (Vassileva *et al.*, 2000; Newberry *et al.*, 2006). Contrairement à ce que l'on pouvait attendre suite à la mutation du gène codant pour la I-FABP, l'inactivation de la I-FABP engendre également une hypertriglycémie chez la souris (Vassileva *et al.*, 2000).

2.3.2 Formation des acyl-CoA

Dans l'entérocyte, les AGLC sont rapidement activés en acyl-CoA par les long chain acyl-CoA synthetases (ACS) (Tanaka *et al.*, 1979) localisées au niveau des membranes des péroxysomes, des mitochondries et du RE. Les acyl-CoA ainsi synthétisés sont soit directement métabolisés soit pris en charge par une protéine de la famille des LBPs, l'acyl-CoA binding protein (ACBP) pour former un pool d'attente au niveau du cytosol.

L'ACBP est une protéine ubiquitaire de 10kDa exprimée dans les tissus ayant un métabolisme lipidique important (foie, tissu adipeux, intestin grêle...) (Fig. 12). Elle possède un seul site de liaison et lie les acyl-CoA à longue chaîne carbonée avec une forte affinité (Frolov *et al.*, 1998; Knudsen *et al.*, 2000).

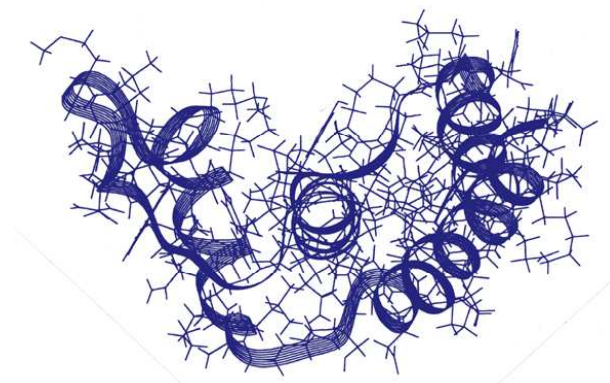
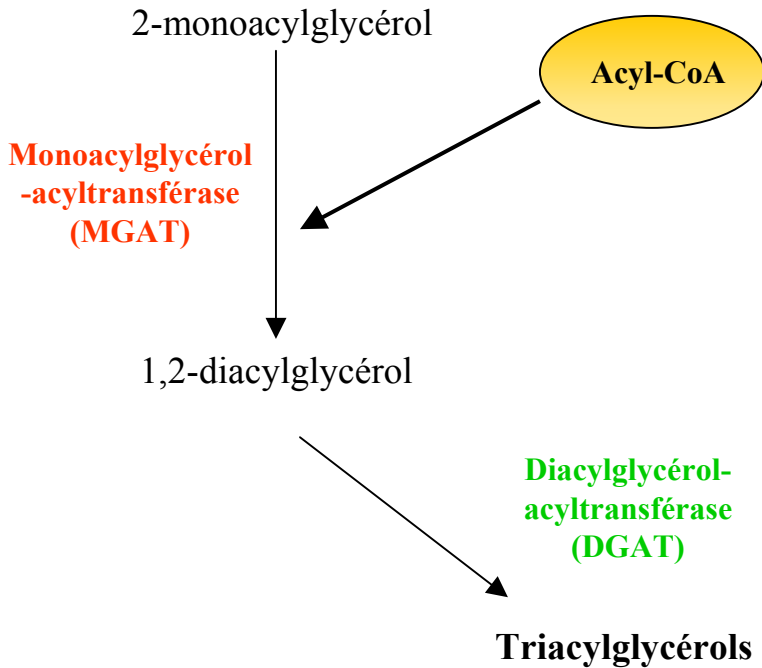
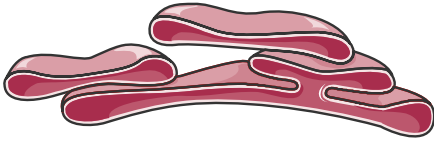


Fig. 12 : Structure de l'acyl-CoA-binding protein (Knudsen *et al.*, 1993).

De nombreuses expériences *in vitro* suggèrent que l'ACBP agirait comme un transporteur d'acyl-CoA et formerait un pool intracellulaire (Kragelund *et al.*, 1999). Bien que son rôle dans l'intestin soit mal connu, l'ACBP participerait, indirectement, au maintien

Voie des 2-monoglycérides

Post-prandial



Voie de l'α-glycérophosphate

Inter-prandial

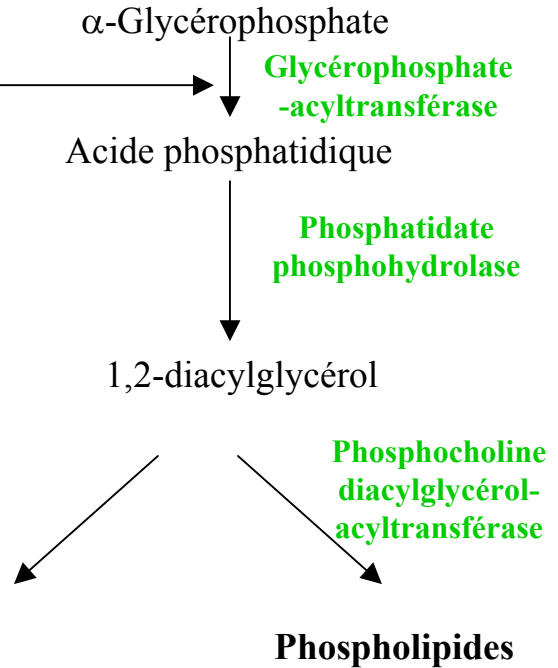
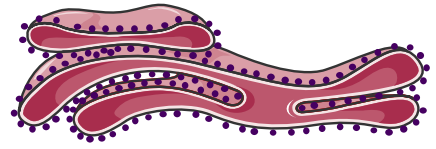


Fig. 13 : Voies de ré-estérification des AGLC au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique.

d'un gradient de concentration d'AGLC en faveur d'un influx ainsi qu'à la synthèse de TG et PL à partir d'acyl-CoA (Knudsen *et al.*, 1999). La transfection d'ARN anti-sens de l'ACBP dans des adipocytes 3T3-L1 conforte cette hypothèse. En effet, ces cellules transfectées accumulent moins de lipides que les cellules transfectées avec le vecteur contrôle (Mandrup *et al.*, 1998).

L'ensemble de ces données montre que le rôle exact des différentes LBPs n'est pas clairement défini au niveau de l'intestin. Comme décrit précédemment, les cellules intestinales sont polarisées et possèdent au pôle apical un micro-environnement favorisant la diffusion passive en protonant les AGLC. Les données qui viennent d'être exposées indiquent que certaines LBPs membranaires et cytosoliques peuvent faciliter ce type de transport. En effet, ce dernier sera d'autant plus efficace que le gradient de concentration des AGLC du milieu extérieur vers le milieu intérieur sera maintenu. La présence de la FATP-4, du FAT/CD36 et des LBPs solubles (la I, la L-FABP et l'ACBP) qui respectivement transforme les acides gras en acyl-CoA, lie les acides gras et stimule leur métabolisme entérocytaire maintiennent ce gradient d'AGLC.

2.3.3 Ré-estérification des acyl-CoA

Les acyl-CoA peuvent suivre deux voies métaboliques différentes dans l'entérocyte :

- l'estérification dans le RE
- l'oxydation dans les mitochondries

En période post-prandiale, les acyl-CoA sont préférentiellement orientés vers la voie d'estérification permettant la synthèse des TG et des phospholipides. Dans l'entérocyte, il existe deux voies pour la synthèse des TG : celle des 2-MG et celle de l' α -glycérophosphate (Fig. 13).

Pendant la période post-prandiale, la voie des 2-MG qui est spécifique à l'intestin est prépondérante alors que durant les périodes inter-prandiales et de jeûne, la voie de l' α -glycérophosphate qui est également trouvée dans le foie est majoritaire. Les enzymes de la voie des 2-MG seraient localisées sur la face externe du réticulum endoplasmique lisse (REL) alors que celles impliquées dans la voie de l' α -glycérophosphate seraient situées sur la surface externe du réticulum endoplasmique rugueux (RER) (Bell *et al.*, 1981).

La voie des 2-MG conduit à la ré-estérification des MG en présence d'acyl-CoA sous l'action de deux enzymes : la monoacylglycérol-acyltransférase (MGAT) (Cao *et al.*, 2003) puis la diacylglycérol-acyltransférase (DGAT) qui forment respectivement des 1,2-diglycérides et des TG (Fig. 13).

A ce jour, trois MGAT ont été identifiées chez les mammifères : MGAT1, MGAT2 et MGAT3 (Cao *et al.*, 2003). Chez l'Homme, la MGAT1 est exprimée dans le foie et les reins alors que chez la souris elle est en plus localisée au niveau de l'estomac et du tissu adipeux (Yen *et al.*, 2002). L'expression de la MGAT2 est quant à elle, abondante dans le foie, l'intestin, le côlon, l'estomac et les reins chez l'Homme alors que chez la souris, elle est exprimée majoritairement au niveau de l'intestin, des reins et faiblement dans les autres organes (Cao *et al.*, 2003; Yen *et al.*, 2003). Au niveau intestinal, la MGAT2 s'exprime selon un gradient gastro-colique identique à celui de l'activité MGAT. En effet, son expression est majoritaire dans le jéjunum puis diminue pour atteindre de faibles taux dans l'iléon et devenir indétectable dans le côlon. La MGAT2 est trouvée au niveau des villosités et dans les cryptes (Cao *et al.*, 2004). Chez la souris, les deux MGAT possèdent une faible activité DGAT, conséquence de leur 47,5% d'homologie de séquence avec la DGAT2.

Des études ont reporté que ces enzymes sont plus actives quand le MG contient des AGLC insaturés que lorsqu'ils sont saturés (Yen *et al.*, 2003). Ainsi, les MGAT faciliteraient la biodisponibilité des AG insaturés et donc les AG essentiels en les incorporant préférentiellement dans les TG. Par ailleurs, il a été montré qu'un régime enrichi en lipides induit une augmentation de l'expression intestinale de la MGAT2 ainsi que son activité (Cao *et al.*, 2004).

La DGAT catalyse la dernière étape de la synthèse des TG par la voie des 2-MG et de la voie de l' α -glycérophosphate. En effet, comme le montre la figure 13, la DGAT permet la liaison d'un acyl-CoA avec un diacylglycérol en position *sn*-1,2 formant ainsi un TG à la surface du RE. Actuellement, deux gènes codant pour cette enzyme ont été identifiés au niveau de l'intestin : la DGAT1 et la DGAT2. Ces deux gènes n'ont pas d'homologies de séquence et appartiennent à deux familles distinctes. La DGAT1 possède des homologies de séquence avec les acylCoA : cholestérol acyltransférases 1 et 2 (ACAT1 et ACAT2), enzymes impliquées dans la biosynthèse des esters de cholestérol. La DGAT2 quant à elle, appartient à

la famille comprenant les MGAT1 et 2. Les DGAT1 et 2 sont exprimées en plus de l'intestin dans le foie et le tissu adipeux (Cases *et al.*, 1998; Oelkers *et al.*, 1998; Farese *et al.*, 2000).

Au niveau intestinal, les DGAT1 et 2 sont exprimées tout le long de l'axe gastro-colique avec une expression majoritaire dans la partie proximale de l'intestin. C'est au sein des villosités duodéno-jéjunales que l'on trouve ces deux DGAT (Cases *et al.*, 2001; Buhman *et al.*, 2002a). L'absence d'effet de l'inactivation du gène codant pour la DGAT1 (DGAT1^{-/-}) sur l'absorption des TG et la synthèse des chylomicrons a permis de mettre en évidence l'existence d'autres activités DGAT compensatoires comme celle de la DGAT2 et de la diacylglycérol transacylase qui forme un MG et un TG à partir de 2 MG. Cependant, suite à une charge en lipides, les animaux DGAT1^{-/-} présentent une accumulation de gouttelettes lipidiques au niveau du cytoplasme des entérocytes ainsi qu'une diminution de la sécrétion de chylomicrons (Buhman *et al.*, 2002b).

Le rôle de la DGAT2 n'est pas totalement élucidé puisque l'inactivation de cette protéine est létale. Toutefois, on a pu observer chez les fœtus une sévère diminution du contenu en TG et en AG dans les tissus (Stone *et al.*, 2004).

Plusieurs données indiquent que la DGAT1 et la DGAT2 auraient des fonctions différentes au sein des cellules. Cette hypothèse est supportée par des travaux récents indiquant des distributions cellulaires différentes de ces enzymes. La DGAT1 serait en plus localisée au niveau de la membrane plasmique alors que la DGAT2 serait présente uniquement au niveau du RE (Suzuki *et al.*, 2005). De plus, des expériences de sur-expression de ces deux enzymes dans les cellules McA-RH7777 issues d'un hépatome de rat ont montré que la sur-expression de la DGAT1 conduit à la formation de petites gouttelettes lipidiques alors que la sur-expression de la DGAT2 conduit à la formation de grosses gouttelettes caractéristiques des gouttelettes de stockage dans le cytoplasme (Stone *et al.*, 2004). Ces données suggèrent que la DGAT1 et la DGAT2 seraient orientées différemment au niveau du RE. La DGAT2 plutôt impliquée dans la synthèse des TG stockés dans le cytoplasme serait localisée au niveau du RE mais orientée du côté cytoplasmique alors que la DGAT1, impliquée dans la synthèse des TG immédiatement destinés à la synthèse des lipoprotéines serait orientée vers la lumière du RE (Washington *et al.*, 2003). Ces localisations différentes expliqueraient alors la présence des deux pools lipidiques dans le RE et le cytoplasme après contact des lipides alimentaires avec le pôle apical des entérocytes (Cartwright *et al.*, 1999a, 1999b).

L'autre voie impliquée dans la synthèse des TG est la voie de l' α -glycérophosphate qui utilise l' α -glycérophosphate comme accepteur d'acyl-CoA pour former de l'acide phosphatidique *via* la glycérophosphate acyltransférase. Sous l'action de la phosphatidate phosphohydrolase, il y a formation de 1,2-diacylglycérol qui est ensuite estérifié soit par la DGAT en TG soit par la phosphocholine diacylglycérol-acyltransférase en phospholipides (Fig. 13).

2.4 Synthèse et sécrétion des lipoprotéines intestinales

Les TG, les PL et les EC une fois synthétisés, entrent dans les citernes du RE grâce à la microsomal triglyceride transfer protein (MTP) présente au niveau du RE (Lin *et al.*, 1994). La MTP est un hétérodimère comprenant deux sous-unités à l'origine de l'activité catalytique :

- une grosse sous-unité de 97 kDa appartenant à la famille des vitellogénines et jouant un rôle actif dans le transfert des lipides (PL, cholestérol, EC) et l'assemblage des lipoprotéines.
- une petite sous-unité de 58 kDa possédant une activité disulfide isomérase (Lin *et al.*, 1994; Wetterau *et al.*, 1997) qui permet le maintien de l'hétérodimère dans un état soluble.

L'expression de la MTP est majoritaire dans le foie et l'intestin. La MTP joue un rôle primordial dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines riches en TG (chylomicrons et VLDL). Ce rôle a été mis en évidence chez les patients atteints d'abeta lipoprotéïnémie, maladie héréditaire résultant de mutations du gène codant pour la grosse sous-unité de la MTP. En effet, ces patients présentent une incapacité à produire des lipoprotéines riches en triglycérides et une malabsorption lipidique sévère (Berriot-Varoqueaux *et al.*, 2000). La contribution de la MTP au niveau de l'intestin, dans ce phénomène a récemment été démontrée chez des souris où le gène de la MTP a été spécifiquement invalidé au niveau de cet organe. En effet, ces animaux sont caractérisés par une stéatorrhée due à une accumulation de grosses gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme et une réduction dramatique de la sécrétion de chylomicrons (Xie *et al.*, 2006). Au niveau de l'intestin, la MTP est exprimée majoritairement dans les villosités duodéno-jéjunales et en moindre quantité dans l'iléon (Lin *et al.*, 1994; Swift *et al.*, 2005). Des travaux ont montré que l'expression de cette protéine est

augmentée chez le hamster et la souris soumis à un régime hyperlipidique (Lin *et al.*, 1994; Swift *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces travaux indique pourquoi la MTP est considérée comme limitante dans l'absorption intestinale des AGLC.

L'intestin synthétise et sécrète trois types de lipoprotéines en fonction de l'état nutritionnel : les chylomicrons, les very low-density lipoprotein (VLDL) et les high-density lipoprotein (HDL). Ces lipoprotéines sont classées selon leur densité, leur taille et leur composition lipidique et protéique (tableau 2).

Tableau. 2 : Caractéristiques physiques et chimiques des lipoprotéines intestinales.

Lipoprotéine	Densité (g/ml)	Taille (microns)	Composition				Principales apolipoprotéines
			TG	CS	PL	Protéines	
Chylomicron	0,93	750 à 10000	90%	3%	5%	2%	A-I, A-IV, B48, E, C
VLDL	0,93-1,006	300 à 800	60%	20%	15%	5 à 10%	B100, E, C
HDL	1,063-1,210	70 à 95	5%	20%	25%	45 à 50%	A-I, A-II, A-IV

VLDL : very low density lipoprotein, HDL : high density lipoprotein, TG : triglycérides, CS : cholestérol, PL : phospholipides (Chapman, 1980)

Les chylomicrons sont sécrétés en période post-prandiale à partir des lipides alimentaires alors que les VLDL sont sécrétés à l'état de jeûne à partir des lipides endogènes (Tso *et al.*, 1984). Parmi ces lipoprotéines, les chylomicrons qui véhiculent les lipides alimentaires, sont les plus grosses particules dont le cœur hydrophobe est constitué principalement d'EC et de TG. A la périphérie, ces lipoprotéines sont composées de lipides polaires (PL, cholestérol libre) et d'apolipoprotéines dont la principale est l'apolipoprotéine B48 (apoB48), forme tronquée de l'apoB100 laquelle est trouvée majoritairement dans le foie (Fig. 14). Ces apolipoprotéines B jouent un rôle non négligeable dans le métabolisme lipidique puisque des mutations du gène codant pour l'apoB sont associées par exemple à l'hypobetalipoprotéïnémie familiale, désordre autosomal caractérisé par une diminution ou

une absence de lipoprotéines riches en apoB, une malabsorption des lipides et une hypocholestérolémie (Whitfield *et al.*, 2004).

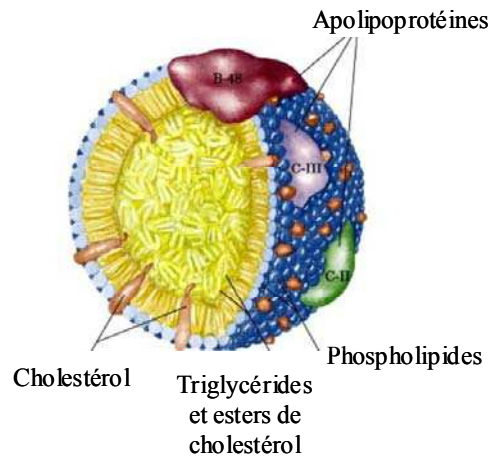


Fig. 14 : Structure d'un chylomicron

B48 : apolipoprotéine B48; CII : apolipoprotéine CII ; CIII : apolipoprotéine CIII

C'est à partir des études réalisées au niveau hépatique qu'a été élaboré le mécanisme d'assemblage des chylomicrons au niveau de l'intestin. Ce processus se décompose en 3 étapes indépendantes (Hussain *et al.*, 2005):

- formation d'une lipoprotéine intermédiaire
- fusion de la lipoprotéine intermédiaire avec des gouttelettes riches en TG
- maturation des lipoprotéines

L'assemblage de lipoprotéines intermédiaires nécessite la présence de la MTP qui comme on l'a vu, catalyse le transfert de lipides (essentiellement des PL, des EC et des TG) de la membrane du REL vers l'apoB48 en cours de traduction. Comme schématisé dans la figure 15, l'addition des lipides à l'apoB48 permet la libération de l'apolipoprotéine de la membrane. Cette étape MTP-dépendante est indispensable à la stabilisation de l'apoB48 puisqu'elle prévient la dégradation de cette protéine (Hussain *et al.*, 2005). La lipoprotéine intermédiaire va ensuite fusionner dans la lumière du RE avec des gouttelettes de TG dépourvu d'apolipoprotéines formées indépendamment dans le REL à partir de TG issus soit de la synthèse *de novo* d'AG ou soit d'AG cytoplasmiques (Cartwright *et al.*, 2000; Hussain *et al.*, 2005).

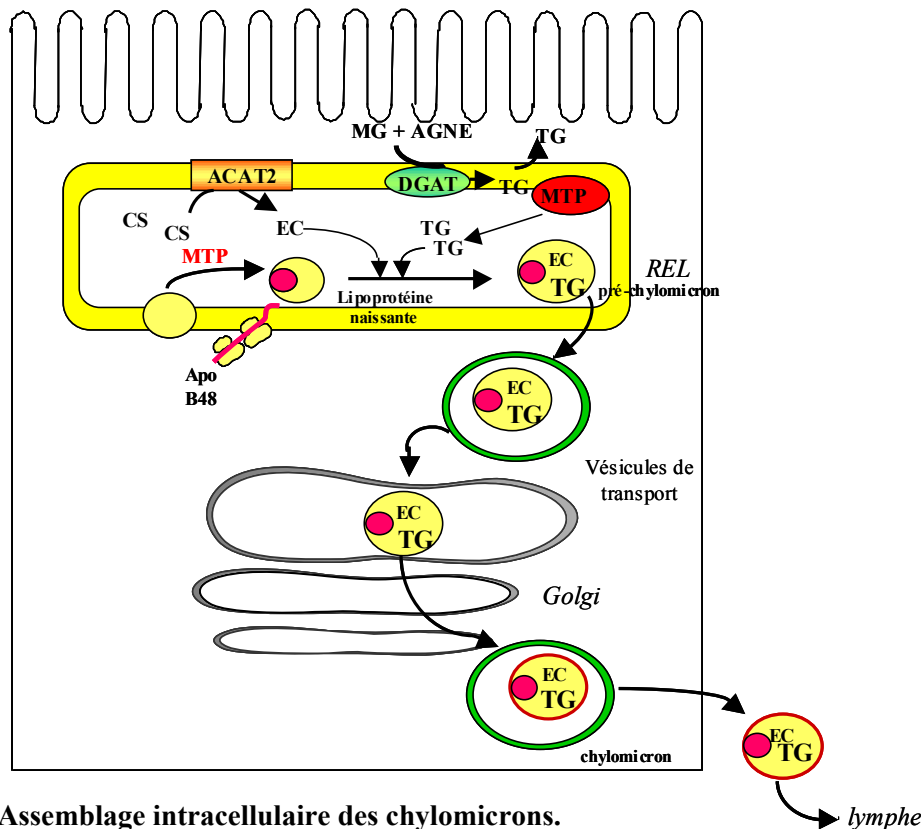


Fig. 15 : Assemblage intracellulaire des chylomicrons.

ACAT2 : acylCoA:cholestérol-acyltransférase; AGNE : acides gras non estérifiés; CS : cholestérol; DGAT : diacylglycérol-acyltransférase 2; EC : esters de cholestérol; MG : monoglycérides; MTP : microsomal triglycerides transfer protein; PL : phospholipides; REL : réticulum endoplasmique lisse; RER : réticulum endoplasmique rugueux; TG : triglycérides.

Cette étape donne naissance à une pré-lipoprotéine qui est transféré vers l'appareil de Golgi par des vésicules spécifiques, les vésicules de transport des pré-chylomicrons. Le passage du RE vers le Golgi est une étape limitante de l'absorption des lipides puisque la mutation de Sar1b, protéine impliquée dans la formation des vésicules de transport est à l'origine de la maladie d'Anderson qui se caractérise par une accumulation de chylomicrons dans les entérocytes (Shoulders *et al.*, 2004).

Ces vésicules de transport possèdent à leur surface une protéine appelée vesicle-associated soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (v-SNARE) qui permet la fusion des vésicules issues du RE avec le Golgi. Récemment, une protéine appelée vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP7) a été identifiée comme un marqueur spécifique de v-SNARE au niveau du RE d'intestin de rat (Siddiqi *et al.*, 2006). Ces vésicules contenant VAMP7 sont plus larges (250 nm de diamètre) que les vésicules transportant les protéines naissantes dans le foie (60 à 80 nm de diamètre) et donc pourraient transporter les

chylomicrons (Siddiqi *et al.*, 2006). De récents travaux ont montré que l'utilisation d'anticorps anti-VAMP7 diminue de 85% le transfert des TG du RE vers le Golgi. Ainsi, de part ces données, VAMP7 joue un rôle primordial dans le transfert des pré-chylomicrons du RE vers le Golgi qui constitue actuellement l'étape limitante de la synthèse et de la sécrétion des chylomicrons (Mansbach *et al.*, 2000).

Après transfert dans le Golgi, les vésicules de transport des pré-chylomicrons achèvent leur structuration par des phénomènes de glycosylation (Fig.15) (Hussain *et al.*, 1996; Hussain *et al.*, 2003; Hussain *et al.*, 2005). Les vésicules golgiennes transportant les lipoprotéines fusionnent avec la membrane plasmique latérale des entérocytes permettant ainsi l'exocytose des lipoprotéines dans la lymphe.

Au niveau de la lymphe, les chylomicrons naissants sont composés d'apoB48, d'apoA-I et d'apoA-IV. Ils rejoignent la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière gauche où ils acquièrent l'apoE et les apolipoprotéines C-II et C-III par transfert à partir des HDL (Goldberg *et al.*, 1990). L'apoA-IV est impliquée dans la stabilisation des lipoprotéines, c'est pourquoi c'est la seule apolipoprotéine dont la synthèse est stimulée par l'absorption des lipides (Tso *et al.*, 2001). En effet, des études *in vitro* ont montré que la sur-expression de cette protéine dans des cellules intestinales de porc (IPEC-1) augmente à la fois la sécrétion des chylomicrons et la taille des lipoprotéines sécrétées (Lu *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2006).

Les apoC-II et C-III contrôlent quant à elles l'efficacité de la dégradation des TG. En effet, l'apoC-II est un co-activateur de la lipoprotéine lipase (LPL) (Jong *et al.*, 1999) (Fig. 16) qui est une enzyme lipolytique localisée à la surface de l'endothélium vasculaire de nombreux tissus périphériques tels que le tissu adipeux, le muscle squelettique, le cerveau et le cœur.

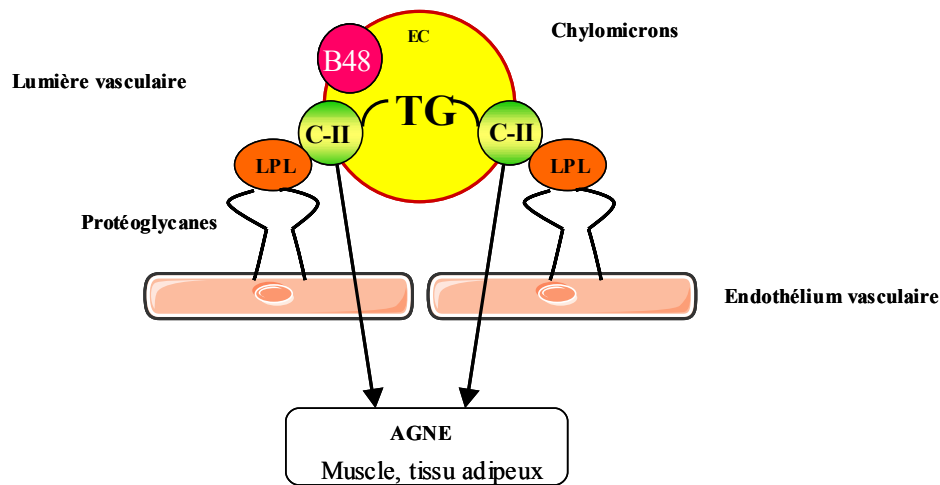


Fig. 16 : Contribution de l'apoC-II à l'hydrolyse des TG des chylomicrons par la LPL.

AGNE : acide gras non estérifiés, B48 : apolipoprotéine B48, C-II : apolipoprotéine C-II, LPL : lipoprotéine lipase, TG : triglycérides

La LPL joue un rôle majeur dans la lipolyse des TG des chylomicrons. Ceci a été illustré chez les patients atteints d'une déficience en LPL qui présentent une accumulation massive de chylomicrons. Cette pathologie est appelée hyperlipoprotéïnémie de type I (Murase, 1994).

L'importance de l'apoC-II dans l'hydrolyse des TG a été illustrée chez l'Homme où sa déficience conduit comme la déficience en LPL à une augmentation des taux circulants de TG (Fojo *et al.*, 1992). De même, son rôle dans l'activation de la LPL a également été montré chez des patients déficients en apoC-II. En effet, chez ces individus, la faible activité LPL est augmentée d'un facteur 100 après addition d'apoC-II (Olivecrona *et al.*, 1997).

Le mécanisme par lequel l'apoC-II active la LPL n'est pas clairement élucidé. Actuellement, plusieurs hypothèses sont émises. Certains auteurs s'accordent à dire que l'apoC-II activerait la LPL après liaison de l'enzyme aux phospholipides situés à la surface des lipoprotéines alors que d'autres envisageraient une interaction directe de l'apoC-II avec la LPL (Jong *et al.*, 1999).

En plus d'être régulée par l'apoC-II, l'activité de la LPL est également modulée par la présence d'apoC-III. Cette apolipoprotéine synthétisée principalement dans le foie et en moindre quantité dans l'intestin inhibe l'hydrolyse des TG en agissant de façon directe sur la LPL (Wang *et al.*, 1985; Shachter, 2001). Ainsi, de part ces données, le rapport apoC-II/apoC-III joue un rôle déterminant dans l'efficacité de la dégradation des TG.

En plus de ces deux apolipoprotéines et de l'activité stricte de la LPL, il a été également rapporté que la taille et le nombre de lipoprotéines riches en TG conditionnent l'efficacité de leur dégradation. En effet, les gros chylomicrons sont plus rapidement dégradés que les petits. D'après les travaux de Xiang et collaborateurs, il existe une relation inverse entre la taille des chylomicrons et la constante d'inhibition (K_i) de la LPL. Les petits chylomicrons aurait moins d'affinité que les gros chylomicrons pour la LPL ($K_i = 2,34 \pm 0,85$ mM vs. $0,27 \pm 0,02$ mM) (Xiang *et al.*, 1999). De plus, d'après les travaux de Martins et collaborateurs, le nombre de chylomicrons serait plus important que la taille des particules dans l'efficacité de leur clairance (Martins *et al.*, 1996). Selon ces données, un grand nombre de chylomicrons serait moins efficacement dégradés par la LPL qu'un petit nombre de particules.

L'hydrolyse des TG des chylomicrons libère des acides gras non estérifiés (AGNE) qui, captés au niveau du tissu adipeux, serviront à la mise en place de réserves d'énergie après ré-estérification tandis qu'au niveau des muscles squelettiques et cardiaque, ils seront utilisés à des fins énergétiques (Fig. 5).

Dans des situations où les AGNE sont produits plus rapidement par la LPL qu'utilisés par les tissus périphériques (muscle et tissu adipeux), leur accumulation au niveau vasculaire provoque la dissociation de la LPL de l'endothélium et par conséquent inhibe la lipolyse des TG des chylomicrons (Peterson *et al.*, 1990; Goudriaan *et al.*, 2005). De plus, cet excès induit également une inhibition de l'activité LPL par liaison des AGNE au niveau du site actif de l'enzyme. En effet, des études *in vitro* ont montré que la vitesse à laquelle la LPL hydrolyse les TG des lipoprotéines diminue fortement avec la quantité d'AGNE formés en absence d'albumine. La présence d'albumine peut empêcher cette inhibition puisqu'elle a plus d'affinité pour les AGNE que la LPL (Bengtsson *et al.*, 1980; Goudriaan *et al.*, 2005).

Suite à cette hydrolyse, les constituants de surface comme le cholestérol libre, les PL et les apolipoprotéines A-I et C peuvent contribuer au recyclage de nouvelles HDL. La réaction d'hydrolyse des TG conduit donc à la formation de deux types de particules :

- les remnants de chylomicrons qui, ayant perdu une grande partie de leurs TG, sont majoritairement reconnus grâce à leur apoE par le récepteur aux low density lipoprotein (LDL) (LDLr) et le low-density lipoprotein receptor related protein (LRP) au niveau du foie où ils sont catabolisés (Hussain *et al.*, 1996)

- les HDL naissants sous forme de particules discoïdales pauvres en lipides et riches en apoA-I qui constituent une autre voie de transport des lipides des tissus périphériques vers le foie (Havel *et al.*, 1988).

La vitesse d'élimination des remnants de chylomicrons est importante puisqu'un retard d'élimination de ces particules est associé au développement de l'athérosclérose et aux maladies cardiovasculaires (Zilversmit, 1995; Lopez-Miranda *et al.*, 2006).

En résumé, la taille et la composition en apolipoprotéines des chylomicrons affectent la vitesse d'hydrolyse de leur contenu en TG par la LPL. Puisque les chylomicrons et plus particulièrement les remnants sont des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires, alors la contribution de l'intestin doit être prise en considération dans l'apparition de ces pathologies. En effet, l'augmentation des TG plasmatiques en période post-prandiale associée à un retard d'élimination des remnants de chylomicrons contribuent à l'apparition de ces maladies chez des patients sains (Karpe *et al.*, 1998) et sujets aux maladies coronariennes (Groot *et al.*, 1991; Karpe *et al.*, 1998). De plus, les lipoprotéines intestinales sont responsables de l'hypertriglycéridémie à jeun et post-prandiale chez le hamster et l'Homme dans le cas de l'insulino-résistance (Haidari *et al.*, 2002; Duez *et al.*, 2006). Ainsi, l'intestin pourrait devenir une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de ces maladies de pléthores.

Problématique

L'augmentation alarmante de la prévalence de l'obésité et des maladies associées (diabète de type II, hypertension, athérosclérose) au cours de ces dernières années dans les pays industrialisés et en développement est devenue, de par son ampleur et son coût social, un vrai problème de Santé publique. Le phénomène est complexe et multi-factoriel. Certains facteurs comme par exemple l'excès de calories sont certainement responsables de l'augmentation de sa prévalence. Pour tenter d'endiguer ce phénomène, des stratégies thérapeutiques ont été élaborées. Jusqu'à présent, une grande partie de ces investigations ont été axées sur le métabolisme du foie et du tissu adipeux.

Paradoxalement, le rôle de l'intestin dans l'étiologie de ces pathologies a souvent été négligé jusqu'à aujourd'hui. Pourtant, l'intestin est l'organe conditionnant la biodisponibilité en lipides à l'organisme. Le fait que cet organe ait longtemps été considéré comme une simple barrière passive douée d'une grande capacité d'absorption explique en partie ce paradoxe.

Or, l'identification de plusieurs LBP membranaires et cytosoliques indique que le mécanisme d'absorption des AGLC est un phénomène complexe. Même si les fonctions ne sont pas toutes clairement établies, le fait que certaines de ces LBP soient régulées par les AGLC suppose que le métabolisme intestinal pourrait être modulé par la teneur en AGLC du régime. De telles régulations pourraient retentir sur les capacités d'absorption lors de fortes teneurs en lipides. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'absorption des lipides reste efficace quelle que soit la teneur en lipides du régime alimentaire. En effet, chez l'Homme sain, les pertes fécales en lipides ne dépassent pas 5% de la quantité de lipides ingérés. Si une telle capacité a permis la survie des espèces soumises à des restrictions d'apports énergétiques, en revanche, elle peut favoriser le développement des maladies liées à une consommation excessive de lipides.

De plus, ces modifications médiées par les lipides pourraient également retentir sur la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines intestinales et par conséquent sur la triglycéridémie post-prandiale. Cette hypothèse est étayée par les récentes études de transgénèse qui montrent que les délétions de plusieurs de ces LBP (FAT/CD36, I-FABP, L-FABP, MTP) conduisent à des modifications de la triglycéridémie.

Il est connu que les caractéristiques des lipoprotéines intestinales et hépatiques (taille, nombre et composition en apoC-II et C-III) conditionne la vitesse d'élimination de ces particules du compartiment sanguin. Puisque ce paramètre constitue un facteur de risque des maladies cardiovasculaires, alors l'intestin pourrait participer à l'étiologie de ces maladies.

Afin d'appréhender la contribution de cet organe dans le développement des pathologies liées à un excès de lipides, nous avons étudié l'impact des lipides alimentaires sur la physiologie intestinale. Les questions posées étaient :

- 1- Est-ce que la forte capacité d'absorption intestinale des lipides résulte d'une capacité innée ou acquise ?
- 2- Est-ce que la teneur en lipides du régime alimentaire modifie la triglycémie post-prandiale ?

Résultats

L'intestin est-il capable d'adapter ses capacités d'absorption à la teneur en lipides du régime chez la souris ?

Pour connaître l'impact de la teneur en lipides du régime sur la physiologie intestinale, des souris B6D2F1 mâles ont été soumises pendant 3 semaines à un régime hyperlipidique (40% en masse) comprenant :

- 10% d'acides gras saturés
- 60% d'acides gras mono-insaturés (18 : 1 (n-6) essentiellement)
- 30% d'acides gras poly-insaturés (28,1% de 18 : 2 (n-6); 1,9% de 18 : 3 (n-3))

Les animaux témoins ont reçu un régime normolipidique de même composition que le régime précédent mais comprenant uniquement 3% de lipides en masse (Tableau 3).

Tableau 3 : Composition des régimes expérimentaux

Composants (g/100g de poudre alipidique)	Régime normolipidique	Régime hyperlipidique
Caséine	21.8	13.5
Glucose + Fibres	61.6	38.1
Cellulose	5.8	3.6
Minéraux	6.8	4.2
Vitamines	1	0.6
Lipides	3	40
Acides gras saturés	0.3	4
Acides gras mono-insaturés	1.8	24
Acides poly-insaturés	0.9	12

1 La consommation d'un régime hyperlipidique améliore l'absorption des lipides chez la souris.

Pour connaître précisément la prise de poids, la consommation de nourriture et l'excrétion fécale, les souris ont été placées dans des cages métaboliques. Après une semaine d'adaptation à la texture du régime et aux cages métaboliques, nous avons mesuré ces différents paramètres pendant toute la durée de l'expérimentation. Comme le montre le tableau 4, le régime hyperlipidique n'a pas d'effets sur la prise de poids chez les souris B6D2F1. Le fait que les souris en régime hyperlipidique consomment la même quantité de

calories que les animaux témoins explique ce résultat. Par ailleurs, malgré une consommation 8 fois plus importante de lipides chez les souris en régime hyperlipidique, la quantité de lipides excrétés n'est pas significativement différente entre les 2 lots d'animaux (Tableau 4). Ce phénomène peut s'expliquer par une meilleure absorption des lipides chez les souris soumises au régime hyperlipidique puisque l'efficacité d'absorption mesurée par le rapport lipides excrétés/lipides ingérés est 10 fois inférieure à celle des animaux témoins. Cependant, la mesure des pertes fécales traduit à la fois la contribution de l'intestin grêle et du côlon.

Tableau 4 : Prise de poids, consommation et excrétion des lipides chez les souris soumises à un régime hyperlipidique et normolipidique.

Paramètres		Régime normolipidique (3% lipides, m/m)	Régime hyperlipidique (40% lipides, m/m)
Masse corporelle (g)	Avant	19,97 ± 0,6	19,97 ± 0,70
	Après	22,96 ± 0,78	22,60 ± 0,92
Calories ingérées (Kcal/g de souris/J)		0,39 ± 0,04	0,35 ± 0,02
Quantité de lipides ingérés (mg/g de souris/J)		4,06 ± 0,25	32,17 ± 1,99 ***
Teneur en lipides dans les fécès (mg/g de souris/J)		1,01 ± 0,17	0,78 ± 0,11
% lipides excrétés/ lipides ingérés		24,45 ± 3,42	2,15 ± 0,47 ***

Moyenne ± SEM, n = 5 souris par lot. *** p < 0,001. m : masse, J : jour

Pour connaître la contribution de l'intestin grêle, nous avons étudié les capacités d'absorption des AGLC directement au niveau d'un segment jéjunal isolé *in situ*.

2 Le régime hyperlipidique augmente les capacités d'absorption de l'intestin chez les souris soumises au régime hyperlipidique.

Comme l'intestin possède un micro-environnement particulier (couche d'eau non agitée et pH acide) et que le processus d'absorption est un phénomène dynamique, il nous a fallu mettre au point un modèle *in vivo* permettant de maintenir l'intégrité de cet organe (connexions nerveuses, circulations sanguine et lymphatique) afin d'étudier l'absorption dans son contexte physiologique. Notre choix s'est orienté sur la technique de l'anse jéjunale isolée *in situ* qui consiste à isoler, après le ligament de Treitz, un segment jéjunale de 10 cm entre deux ligatures et d'y infuser une émulsion lipidique contenant 2,19 mM d'acide linoléique (dont 10% de [$1-^{14}\text{C}$] acide linoléique) émulsifié par de l'acide taurocholique à 10 mM (Fig.17). Cette méthode a été réalisée chez des souris à jeun depuis 16 h pour s'assurer que le contenu intestinal était dépourvu de lipides avant l'expérience.

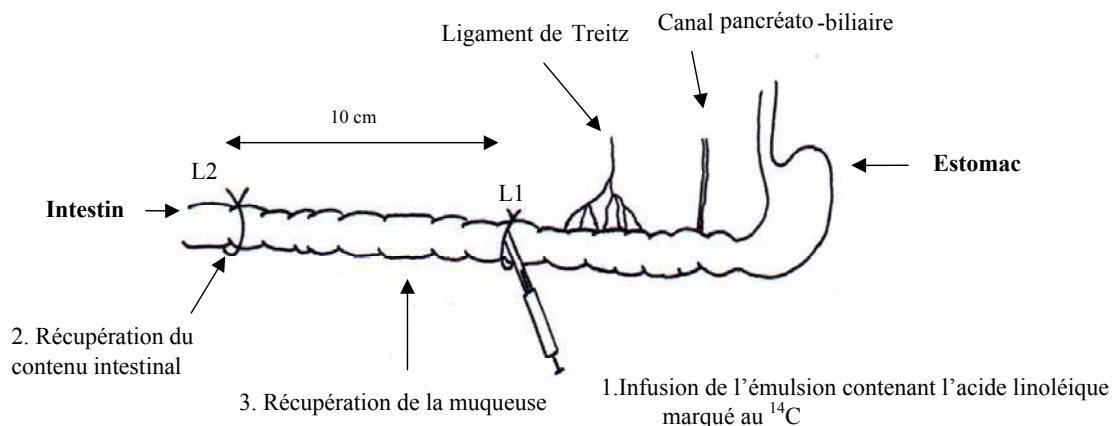


Fig. 17 : Représentation schématique du modèle de l'anse intestinale isolée.

L : ligature

5 minutes après l'infusion, l'anse jéjunale isolée est récupérée et les lipides contenus dans la lumière intestinale et dans la muqueuse sont extraits par la technique de Delsal (Delsal, 1954). Ce modèle nous a également permis d'étudier en plus du captage, le devenir entérocytaire de l'AGLC infusé. En effet, il est possible de mesurer la radioactivité incorporée dans les différents classes de lipides de la muqueuse (TG, diglycérides [DG]/MG, acides gras

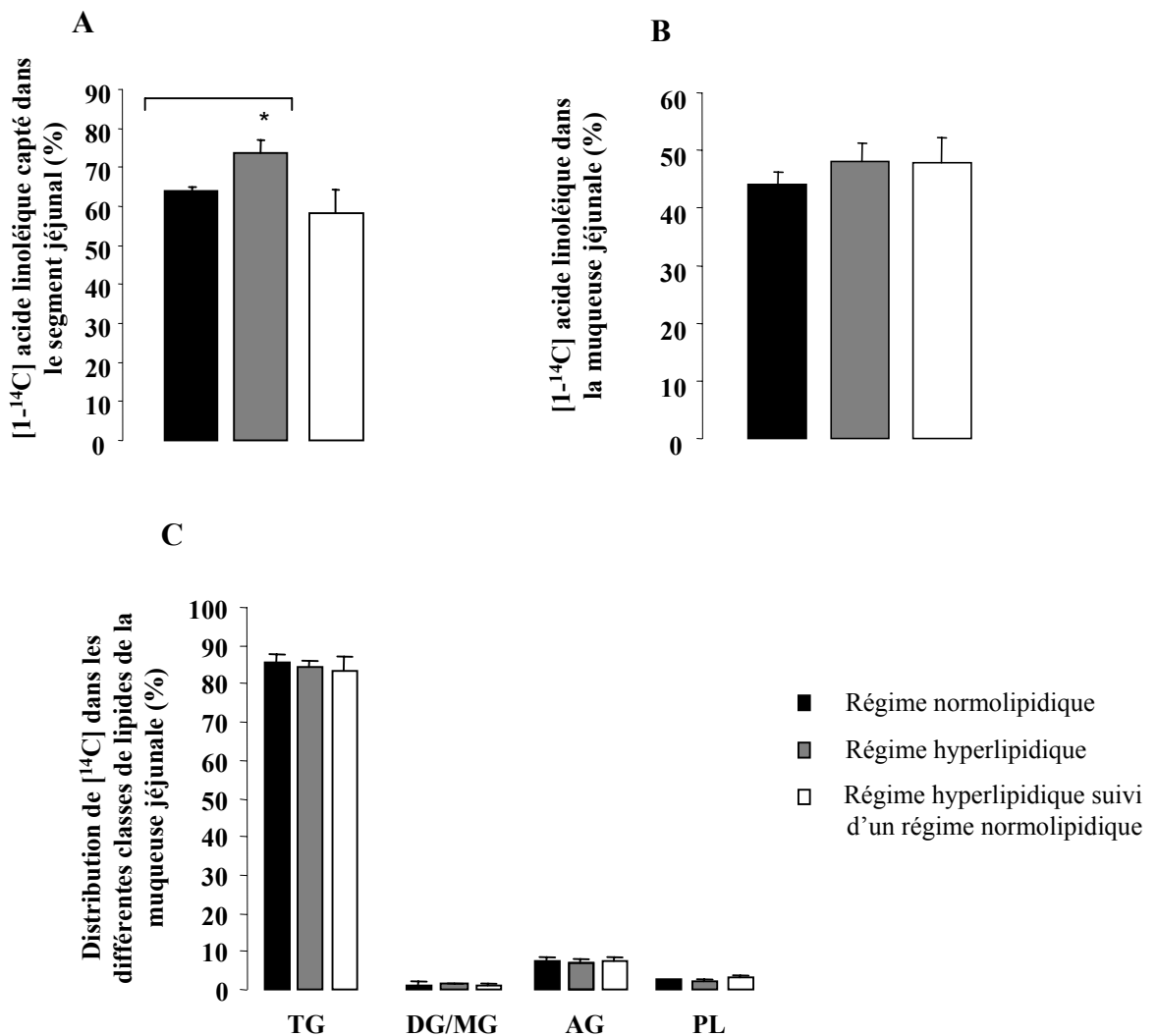


Fig. 18 : Impact du régime hyperlipidique sur les capacités de captage (A) et le devenir métabolique (B-C) de [1-¹⁴C] acide linoléique au niveau de l'anse jéjunale isolée *in situ*.

A : La quantité captée de [1-¹⁴C] acide linoléique a été déterminée en soustrayant à la quantité de [1-¹⁴C] acide linoléique infusée, la quantité de [1-¹⁴C] acide linoléique restant dans la lumière intestinale à la fin de l'expérience. B : Quantité de [1-¹⁴C] acide linoléique trouvé dans la muqueuse jéjunale 5 minutes après l'infusion. C : Distribution de ¹⁴C dans les différentes classes de lipides de la muqueuse. TG : triglycérides, DG/MG : diglycérides/monoglycérides, AG : acides gras, PL : phospholipides. Moyenne ± SEM, n = 4, * p < 0,05.

[AG] libres, PL) par chromatographie sur couche mince de gel de silice dans un mélange de solvant comprenant de l'hexane, de l'éther éthylique et de l'acide acétique glacial (v/v/v : 140/60/2).

Pour cette étude, nous avons infusé de l'acide linoléique à la concentration de 2,19 mM afin de mimer la situation physiologique en période post-prandiale. Ce choix fait suite à de nombreuses mises au point réalisées chez la souris au Laboratoire à partir des travaux de Chow et Hollander (Chow *et al.*, 1979) puisque ces auteurs ont montré chez le rat qu'au delà de 1,26 mM, l'absorption se faisait majoritairement par diffusion passive comme en période post-prandiale.

Pour s'assurer que les modifications observées résultaient d'une adaptation de l'intestin au contenu en AGLC du régime, un lot de souris soumises à un régime normolipidique après 3 semaines de régime hyperlipidique a été également étudié.

Comme indiqué en figure 18A, les souris soumises au régime hyperlipidique pendant 21 jours ont une capacité plus importante à capter le [1-¹⁴C] acide linoléique que les souris en régime normolipidique. Ce phénomène est corrélé à la teneur en AGLC du régime puisque la quantité de [1-¹⁴C] acide linoléique capté revient à une valeur équivalente à celle trouvée chez les souris témoins (Fig.18A). L'induction de la capacité de captage n'engendre pas d'accumulation de [1-¹⁴C] acide linoléique au niveau de la muqueuse (Fig. 18B). Ce résultat est confirmé par l'analyse de la distribution de ¹⁴C dans les différentes classes de lipides de la muqueuse (TG, DG/MG, AG, PL) qui ne montre aucune différence significative entre les trois lots (Fig.18C). Par ailleurs, le fait que plus de 80% de la radioactivité soit incorporé dans les TG démontre la rapidité du captage et de la ré-estérification des AGLC confirmant ainsi la pertinence physiologique de ce modèle.

En résumé, ces données *in vivo* indiquent qu'il existe une adaptation des capacités d'absorption intestinale en fonction de la teneur en lipides du régime. Ce phénomène adaptatif explique l'absence de stéatorrhée chez les souris en régime hyperlipidique.

Deux explications sont envisageables. Il existerait soit :

- une augmentation de la surface d'absorption de l'intestin et/ou

- une augmentation de l'expression jéjunale des gènes impliqués dans le captage, le trafic entérocytaire et la sécrétion des lipoprotéines.

3 Le régime hyperlipidique induit une augmentation de l'index mitotique au niveau du jéjunum chez la souris.

Comme nous l'avons décrit dans la synthèse bibliographique de ce manuscrit, l'intestin possède un taux de renouvellement cellulaire très rapide modulé par l'état nutritionnel.

Afin d'étudier si le régime hyperlipidique est capable de moduler la surface d'absorption, l'index mitotique cryptique du jéjunum a été évalué chez les différents lots de souris après 21 jours de traitement. Pour cela, nous avons mesuré par immunohistochimie, la protéine Ki-67 qui est exprimée dans les cellules en division (phases G1, G2, S et M du cycle cellulaire). Les résultats présentés en figure 19 A montrent que l'index mitotique jéjunale est augmenté de manière significative par le régime hyperlipidique comparé au régime normolipidique. Le fait que la valeur de cet index retourne au niveau du témoin lorsque les souris soumises à un régime hyperlipidique sont re-nourries avec un régime normolipidique souligne l'étroite corrélation qui existe entre la teneur en lipides du régime et l'activité proliférative du jéjunum chez la souris.

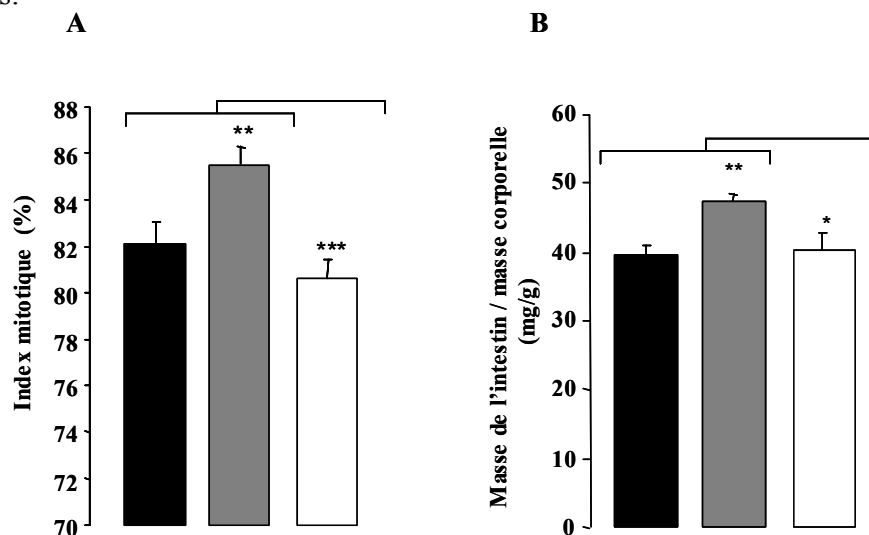


Fig. 19 : Effet de la teneur en AGLC du régime sur l'index mitotique jéjunale (A) et la masse relative de l'intestin (B).

A- L'index mitotique correspond au rapport nombre de cellules positive au Ki-67 / nombre de cellules totales dans la crypte. Moyenne \pm SEM, 30 cryptes comptées/animal, n = 3 souris par condition.

B- Après sacrifice, l'intestin grêle a été prélevé, rincé au sérum physiologique. La masse relative de l'intestin correspond à la masse de l'intestin rapporté à la masse corporelle de la souris. Moyenne \pm SEM, n = 4. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Régime : normolipidique (■), hyperlipidique (■), hyperlipidique suivi d'un régime normolipidique (□)

L'induction de la prolifération cellulaire se traduit par une augmentation de la hauteur des villosités puisque la masse relative de l'intestin est corrélée à l'index mitotique (Fig.19B). La figure 20 présente des photos représentatives de l'ensemble de nos résultats.

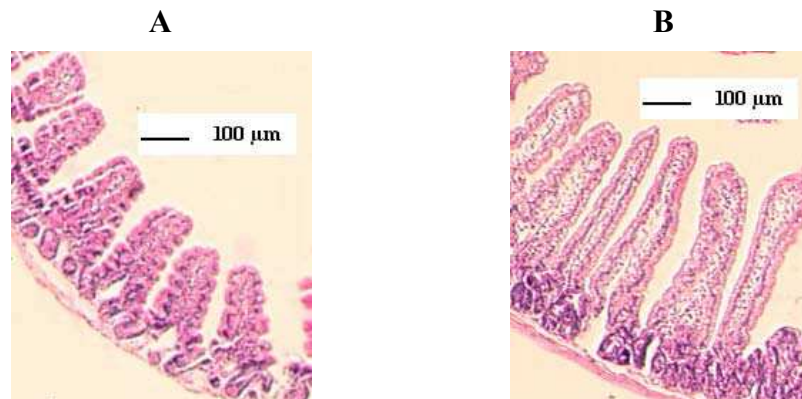


Fig. 20 : Coupes histologiques de jéjunum de souris mâles soumises à un régime normolipidique (A) et hyperlipidique (B) pendant 21 jours.

1 cm de jéjunum de souris soumise au régime normolipidique et hyperlipidique a été prélevé, fixé avec du formaldéhyde 4 %, et congelé à -42°C dans l'isopentane. Des coupes de paraffine de 7 μm d'épaisseur ont été réalisées, déparaffinées et colorées à l'hématoxyline. Les coupes ont ensuite été observées au microscope photonique à l'objectif x4.

Ces données obtenues chez la souris complètent des études menées chez le rat où une augmentation de la hauteur des villosités, du taux de migration entérocytaire a été constatée lors d'un régime hyperlipidique (Thomson *et al.*, 1994).

Si la modulation de la surface d'absorption peut participer à l'adaptation de l'intestin, les gènes impliqués dans le captage, le trafic entérocytaire et la sécrétion des lipoprotéines peuvent également contribuer à ce phénomène adaptatif.

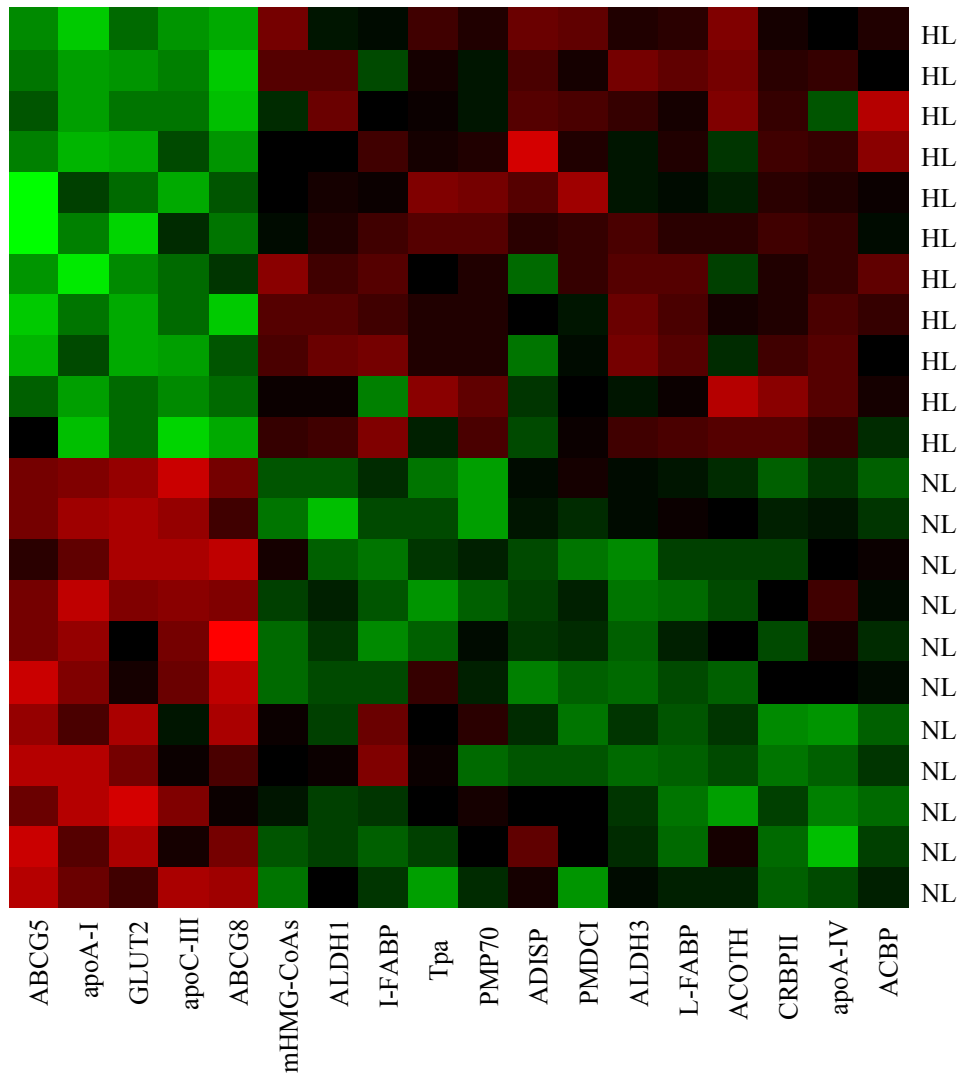


Fig. 21 : Criblage de l'expression de gènes au niveau du jéjunum de souris soumises au régime normolipidique (NL) et hyperlipidique (HL) par l'utilisation de biopuces INRAArray 01.4 dédiées au métabolisme lipidique.

ABCG, ATP-binding cassette transporter G; ACBP, acyl-CoA binding protein; ACOTH, cytosolic acyl-CoA thioesterase; ADISP, adipocyte specific mRNA; ALDH1, aldehyde dehydrogenase 1; apoA-I : apolipoprotéine A-I; CRBP II, cellular retinal binding protein II; GLUT2, glucose transporter 2; mHMGCoAS, mitochondrial 3-hydroxy 3-methylglutaryl-CoA synthase; I-FABP : intestinal fatty acid-binding protein; L-FABP, liver fatty acid-binding protein; PMDCI, peroxisomal/mitochondrial dienoyl-CoA isomerase; PMP70, peroxisomal membrane protein; Tpa, mitochondrial trifunctional protein alpha-subunit.

4 Le régime hyperlipidique induit une augmentation du niveau d'expression des gènes impliqués dans l'absorption intestinale des AGLC.

Il est bien établi que les AGLC sont des régulateurs de l'expression de gènes (Niot *et al.*, 1997). De plus, certains de ces gènes sont impliqués dans le métabolisme entérocytaire des lipides comme la L-FABP (Poirier *et al.*, 1997).

Il était donc logique d'envisager que l'ensemble de ces gènes au niveau de l'entérocyte soit régulé de manière coordonnée par les lipides alimentaires. Afin d'éprouver cette hypothèse, l'évaluation globale de l'impact du régime hyperlipidique sur un grand nombre de gènes impliqués majoritairement dans le métabolisme des lipides a été analysée par l'utilisation de biopuces (INRAArray 01.4) (Martin *et al.*, 2005) chez des souris nourries *ad libitum* après 21 jours de régime hyperlipidique et normolipidique. Les résultats présentés en figure 21 révèlent la présence de deux groupes de gènes distincts :

- un premier groupe de gènes dont l'expression est réprimée par le régime hyperlipidique (couleur verte). Parmi ces gènes, on trouve l'apoA-I et l'apoC-III, impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines.
- un deuxième groupe de gènes qui à l'inverse du premier ont leur expression qui est augmentée par le régime hyperlipidique (couleur rouge). Dans ce groupe, on distingue 13 gènes dont la L-FABP, la I-FABP et l'apoA-IV.

Cependant, l'ensemble des gènes impliqués dans le métabolisme entérocytaire des lipides n'ayant pas été analysé, nous avons alors approfondi cette étude par Northern Blotting et PCR en temps réel. Pour connaître la cinétique des modifications observées, nous avons suivi l'évolution des taux d'ARNm codant pour différentes protéines jouant un rôle dans le devenir entérocytaire des lipides alimentaires. L'analyse a été réalisée du 3^{ème} jour au 21^{ème} jour du régime.

Comme le montre la figure 22, le régime hyperlipidique augmente dès 3 jours et de manière significative le niveau d'expression des LBPs membranaires et cytosoliques. En effet, FATP-4 qui favorise le captage des AGLC en les activant en acyl-CoA a son taux d'ARNm augmenté d'un facteur 1,8. La I- et la L-FABP ont quant à elles leur niveau d'expression respectivement multiplié par 2 et 2,7. Ces inductions renforceraient l'efficacité de la diffusion passive en maintenant un gradient de concentration favorable à l'influx

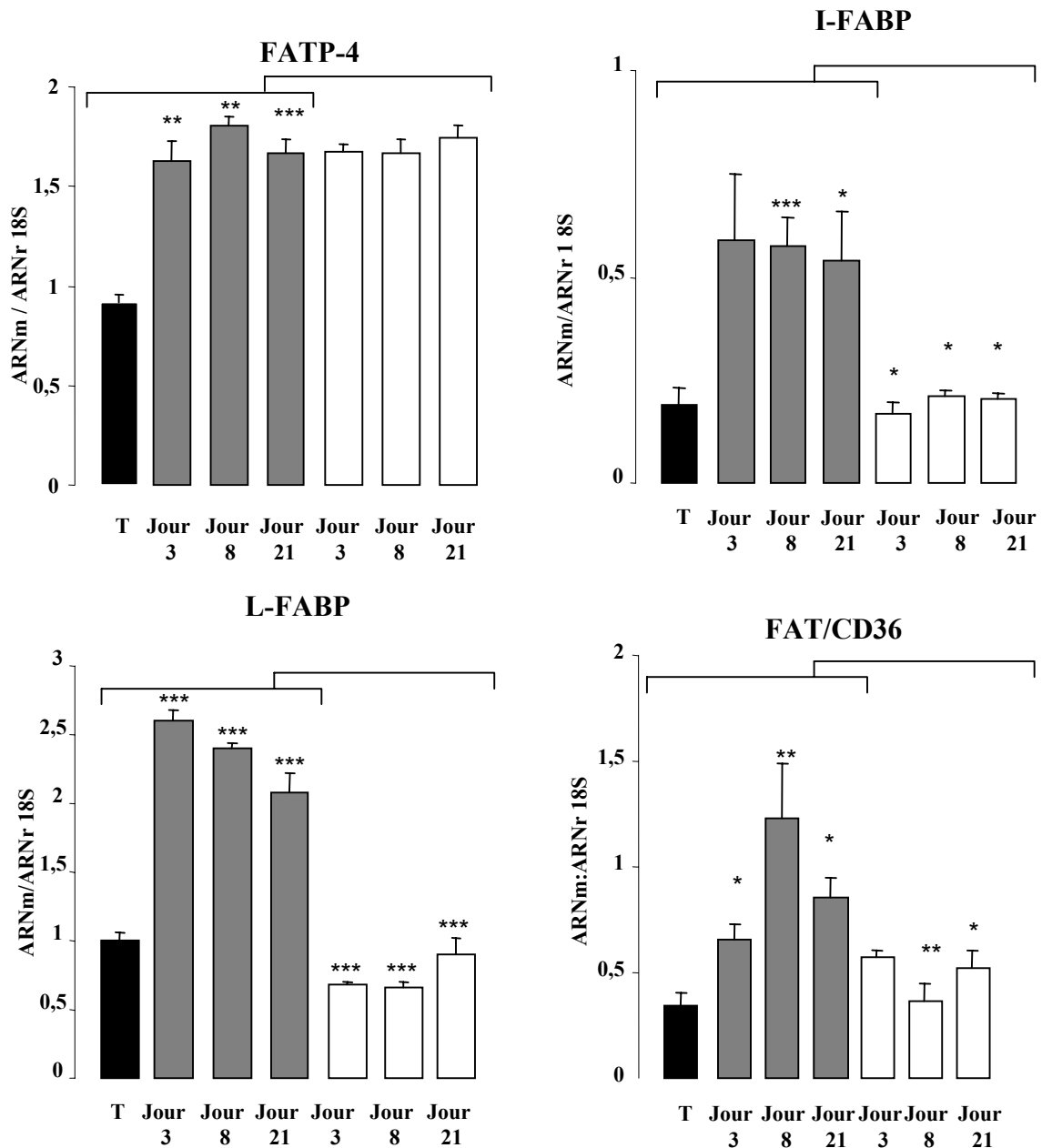


Fig. 22: Impact du régime hyperlipidique sur l'expression jéjunale des LBP impliquées dans l'absorption des lipides chez la souris.

L'expression des différents gènes a été évaluée par Northern Blotting. Le taux d'ARNm est normalisé sur celui de l'ARNr 18S. Moyenne \pm SEM, n = 5. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Régime : normolipidique (■), hyperlipidique (■), hyperlipidique suivi d'un régime normolipidique (□)

FATP-4 : fatty acid transport protein 4; FAT/CD36 : fatty acid transporter; L-FABP : liver fatty acid-binding protein; I-FABP : intestinal fatty acid-binding protein.

d'AGLC et en activant leur trafic intracellulaire. Pour finir, le FAT/CD36 a également son taux d'ARNm augmenté d'un facteur 2,4 par le régime hyperlipidique. D'après les données de la littérature, cette induction pourrait favoriser le transfert des AGLC vers le site de ré-estérification tout comme la I-FABP (Prows *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 1996; Drover *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces résultats montre que l'induction du niveau d'expression des gènes étudiés est maintenue pendant toute la durée du régime. En revanche, lorsque les souris en régime hyperlipidique sont renourries par un régime normolipidique, l'expression des gènes retourne à un niveau identique à celui des témoins excepté pour FATP-4. Actuellement, nous ne pouvons expliquer la régulation de ce gène. Ainsi, ces résultats montrent l'existence d'une régulation coordonnée des gènes impliqués dans le captage des AGLC et le trafic entérocytaire.

En ce qui concerne, l'expression des enzymes impliquées dans les voies de ré-estérification, le régime hyperlipidique induit une augmentation non significative de l'expression de la MGAT2 (Fig. 23) après 21 jours de régime.

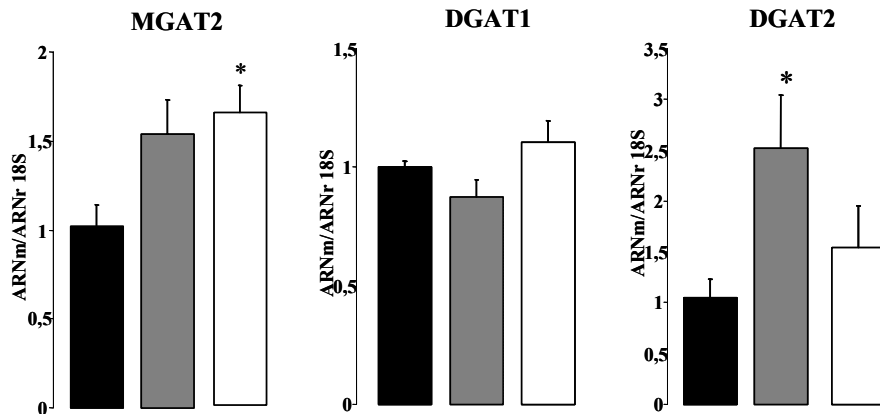


Fig. 23 : Impact du régime hyperlipidique sur l'expression des enzymes impliquées dans les voies de ré-estérification des AGLC.

Le niveau d'expression des gènes a été évalué par PCR quantitative en temps réel. Le taux d'ARNm est standardisé sur l'ARNr 18S. Moyenne ± SEM, n = 5. * p < 0,05. Régime : normolipidique (■), hyperlipidique (▒), hyperlipidique suivi d'un régime normolipidique (□)

DGAT 1 et 2 : diacylglycérol-acyltransférase 1 et 2 ; MGAT2 : monoacylglycérol-acyltransférase 2.

Bien que l'activité de cette enzyme n'ait pas été mesurée, il est vraisemblable que celle-ci soit également augmentée puisque d'après les travaux de Cao *et al.*, un régime hyperlipidique contenant 40% de lipides (en calories, majoritairement des acides gras mono-insaturés) induit

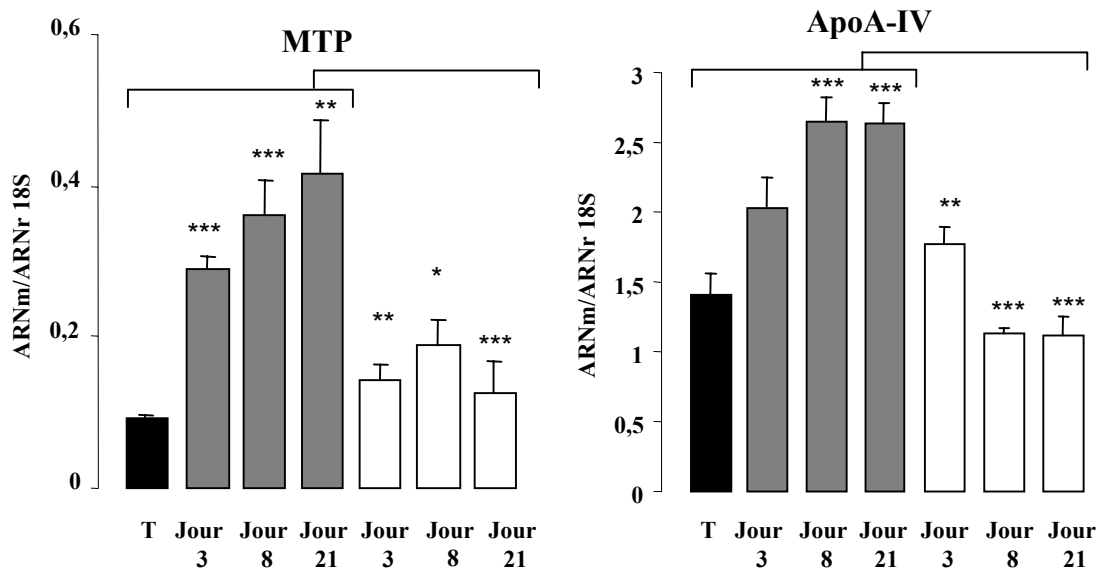


Fig. 24 : L'expression jéjunale de la MTP et de l'apoA-IV est induite chez les souris soumises au régime hyperlipidique.

L'expression des différents gènes a été évaluée par Northern Blotting. Le taux d'ARNm est normalisé sur celui de l'ARNr 18S. Moyenne \pm SEM. n = 5. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Régime : normolipidique (■), hyperlipidique (▣), hyperlipidique suivi d'un régime normolipidique (□).

Apo : apolipoprotéine; MTP : microsomal triglyceride transfer protein.

une augmentation à la fois de l'expression intestinale de MGAT2 ainsi que de son activité chez la souris C57BL6/J après 4 semaines de régime (Cao *et al.*, 2004). Cette régulation est associée à une augmentation du taux d'ARNm de la DGAT2 d'un facteur 2,5. En revanche, l'expression de la DGAT1 n'est quant à elle pas modifiée par le régime hyperlipidique (Fig. 23). Ces données suggèrent fortement que la capacité de ré-estérification intestinale est augmentée.

La synthèse et la sécrétion des lipoprotéines est également stimulée par le régime hyperlipidique puisque l'on observe une induction d'un facteur 4 du taux d'ARN de la MTP (Fig. 24) après 21 jours de régime. Cette régulation pourrait expliquer l'absence d'accumulation de TG au niveau de la muqueuse des souris soumises pendant 3 semaines au régime hyperlipidique comme le montre la figure 25.

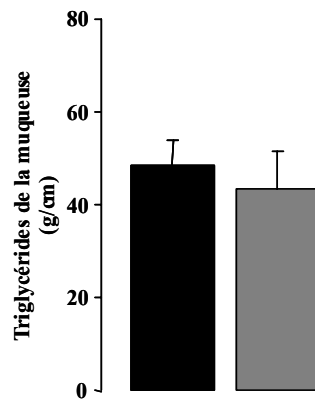


Fig. 25 : Taux de triglycérides dans la muqueuse jéjunale de souris en régime normolipidique ou hyperlipidique.

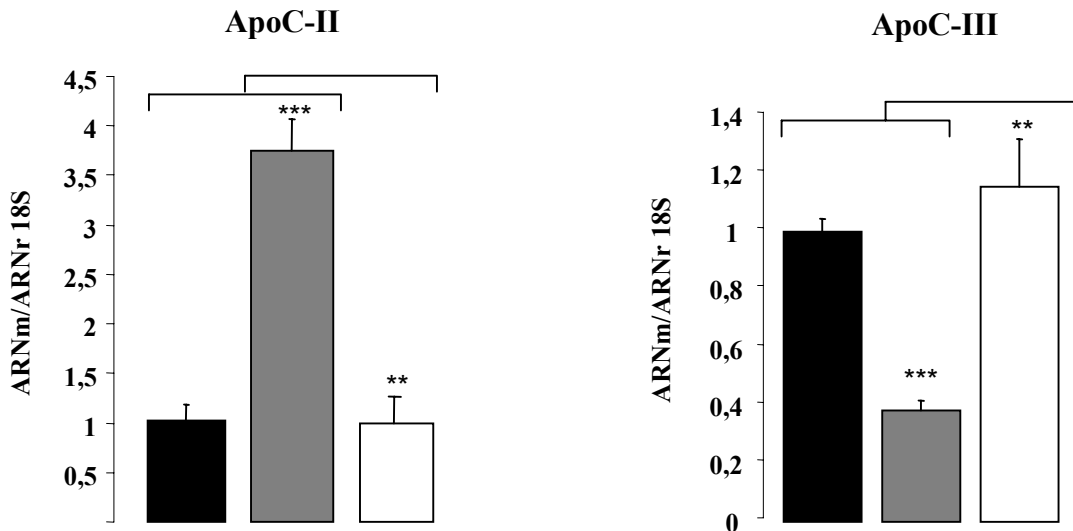
La quantité de TG dans le jéjunum a été mesurée par une méthode enzymatique suite à l'extraction des lipides de la muqueuse par la technique de Delsal. Moyenne \pm SEM, n = 4. Régime : normolipidique (■), hyperlipidique (▣).

En effet, il est connu que l'inactivation intestinale de la MTP engendre une accumulation de lipides dans le cytoplasme des entérocytes se traduisant par une réduction dramatique de la sécrétion des chylomicrons (Xie *et al.*, 2006).

Pour finir, en accord avec la littérature, les souris en régime hyperlipidique présentent une augmentation de l'expression de l'apoA-IV (Fig. 24) (Tso *et al.*, 2001).

Ensemble, ces résultats montrent que le régime hyperlipidique augmente de manière coordonnée le taux d'ARNm des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'absorption intestinale. Ces régulations sont corrélées à la teneur en AGLC du régime puisqu'elles retournent à la valeur des témoins quand les souris sont re-nourries avec un

Jéjunum



Foie

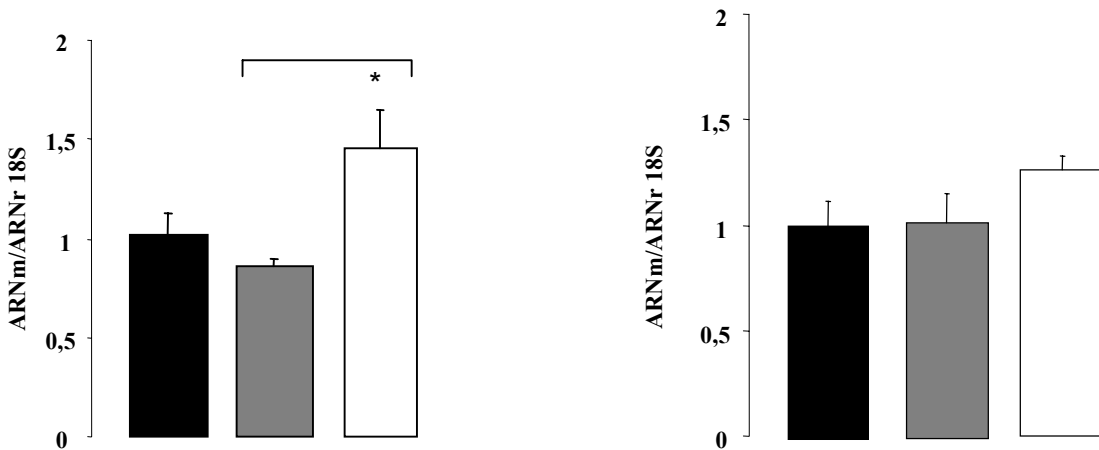


Fig. 26 : Impact du régime hyperlipidique sur le niveau d'expression de l'apoC-II, activateur de la LPL et de l'apoC-III, inhibiteur de la LPL dans le jéjunum et le foie.

Le niveau d'expression des gènes a été évalué par PCR quantitative en temps réel. Le taux d'ARNm est standardisé sur le taux d'ARNr 18S. Moyenne \pm SEM, n = 4. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Régime normolipidique (■), régime hyperlipidique (■), régime hyperlipidique suivi d'un régime normolipidique (□).

régime normolipidique. Un tel système coopératif contribuerait à une meilleure efficacité d'absorption de l'intestin lorsque les animaux sont soumis à un régime hyperlipidique drastique tel que celui utilisé dans nos expériences.

5 Le régime hyperlipidique affecte la triglycéridémie post-prandiale.

5.1 L'expression intestinale des apoC-II et C-III est modulée par le régime hyperlipidique

Il est connu que l'inactivation du FAT/CD36, de la I-FABP, de la L-FABP et de la MTP affecte la sécrétion et/ou la clairance des chylomicrons (Vassileva *et al.*, 2000; Drover *et al.*, 2005; Nauli *et al.*, 2006; Newberry *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2006). Ce constat laisse supposer qu'il existe un retentissement de la régulation de ces gènes sur la triglycéridémie. De plus, la diminution de l'expression intestinale de l'apoC-III, inhibiteur de l'activité LPL chez les souris en régime hyperlipidique (Jong *et al.*, 1999) observée par les puces à ADN conforte l'hypothèse d'une possible modification de la triglycéridémie par le régime hyperlipidique. En effet, si la diminution de l'apoC-III favorise la clairance des TG, une augmentation concomitante de l'apoC-II, co-facteur de la LPL pourrait renforcer cet effet. C'est pourquoi, l'expression jéjunale de ces deux gènes a été mesurée par PCR quantitative.

Comme le montre la figure 26, le taux d'ARNm de l'apoC-III est divisé par 2 alors que celui de l'apoC-II est multiplié par 3,7 chez les souris soumises au régime hyperlipidique pendant 3 semaines. Comme pour les gènes précédemment étudiés, ces régulations sont corrélées à la teneur en AGLC du régime puisqu'elles retournent à la valeur des témoins quand les souris sont renourries avec un régime normolipidique. Comme il a été rapporté l'existence d'une corrélation entre le taux d'ARNm de l'apoC-II et la quantité de cette protéine, il est probable que les chylomicrons sécrétés par l'intestin des souris en régime hyperlipidique soient plus riches en apoC-II (Black *et al.*, 1996).

Puisque les chylomicrons peuvent recruter dans le sang ces deux apolipoprotéines également sécrétées par le foie, nous avons vérifié que les apolipoprotéines C-II et C-III d'origine hépatique ne modifient pas la composition des chylomicrons sécrétés par l'intestin. Pour cela, nous avons également mesuré leur expression au niveau hépatique après 21 jours de régime. Comme indiqué en figure 26, le niveau d'expression hépatique de ces apolipoprotéines reste inchangé chez les souris soumises aux régimes normolipidique et hyperlipidique. Ainsi, l'ensemble de ces données indique que seule la régulation des

apolipoprotéines intestinales pourrait contribuer à une meilleure efficacité de clairance des TG des chylomicrons.

5.2 La clairance des triglycérides est plus efficace après un régime hyperlipidique

Pour évaluer l'efficacité de la clairance des chylomicrons, des souris mâles soumises au régime normolipidique et hyperlipidique pendant 3 semaines ont été préalablement mises à jeun 16h puis ont reçu une charge en lipides (0,5 ml d'huile iso-4). Des mesures de triglycéridémie post-prandiale ont été réalisées 0,5-1-2-3 et 4h après la charge en huile. La figure 27 montre que les souris préalablement soumises au régime hyperlipidique présentent un taux de TG plasmatiques significativement plus faible que celui des animaux en régime normolipidique. Ce résultat paradoxal peut traduire soit une diminution de la vitesse de sécrétion des TG par l'intestin et/ou soit une meilleure efficacité de leur clairance.

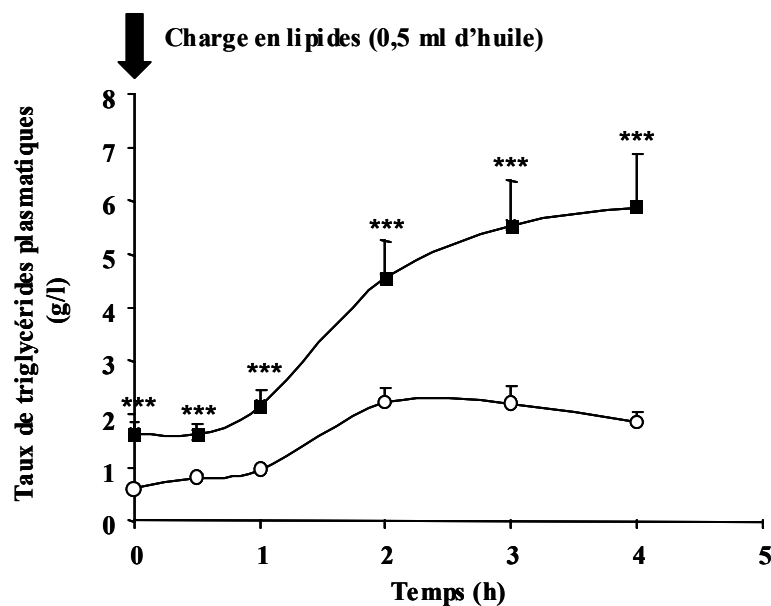


Fig. 27 : Impact du régime hyperlipidique sur la triglycéridémie chez la souris.

Suite à un jeûne de 16h, les souris en régime normolipidique et hyperlipidique ont subi une charge en lipides (0,5 ml). La triglycéridémie post-prandiale a été mesurée à différents temps après le gavage par prélèvement de sang au bout de la queue. Moyenne \pm SEM, n = 11. *** p < 0,001. Régime normolipidique (■), hyperlipidique (○).

Afin de vérifier cette hypothèse, la même expérience a été réalisée en présence de Tyloxapol (500 mg/kg) (Triton WR1339) qui est un inhibiteur de l'activité LPL. Lorsque ce détergent non ionique est administré 30 minutes avant le gavage, on constate une absence de différence de triglycéridémie entre les deux lots de souris (Fig. 28). Ceci indique que la plus faible triglycéridémie observée chez des souris soumises au régime hyperlipidique est due à

Coontenu en triglycérides de la muqueuse
(mg/g protein)

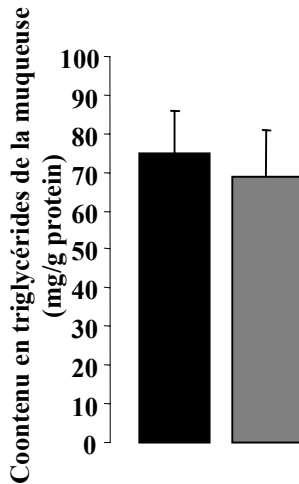


Fig. 29 : Quantité de triglycérides contenus dans la muqueuse jéjunale, 4h après une charge en lipides chez des souris en régime normolipidique et hyperlipidique traitées au Tyloxapol.

Des souris préalablement mises à jeun 16h ont été traitées au Tyloxapol, inhibiteur de la LPL, 30 min avant de recevoir une charge en lipides (0,5 ml d'huile isio-4). A la fin de l'expérience, les souris ont été sacrifiées et les lipides de la muqueuse jéjunale de ces animaux ont été extraits par la méthode de Delsal. Les triglycérides contenus dans la muqueuse ont été mesurés par une méthode enzymatique (Boimérieux). Moyenne \pm SEM, n = 5. Régime normolipidique (■), hyperlipidique (■).

une clairance plasmatique plus efficace. Bien que les taux de TG aient été mesurés dans le sang et non dans la lymphe, ces données suggèrent que la vitesse de sécrétion des TG n'est pas différente dans les deux lots de souris. Cette hypothèse est étayée par le fait qu'il n'existe pas de stockage de TG plus importante dans la muqueuse des souris en régime hyperlipidique que dans celle des animaux témoins 4h après la charge en lipides (Fig. 29).

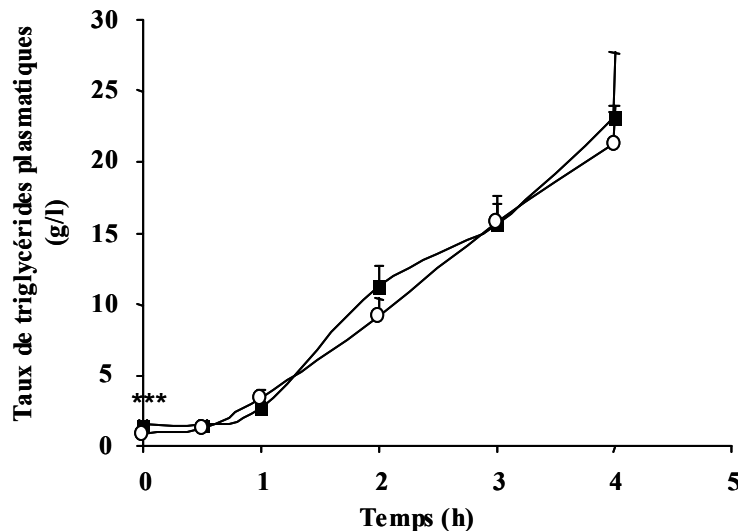


Fig. 28 : Impact du régime hyperlipidique sur la sécrétion des TG.

Suite à un jeûne de 16h, les souris en régime normolipidique et hyperlipidique ont été préalablement traitées au Tyloxapol, inhibiteur de l'activité lipoprotéine lipase, avant de subir une charge en lipides (0,5 ml). La triglycéridémie post-prandiale a été mesurée à différents temps après le gavage par prélèvement de sang au bout de la queue. Moyenne \pm SEM, n = 11. *** p < 0,001. Régime normolipidique (■), hyperlipidique (○).

En conclusion, le régime hyperlipidique choisi conduit à une élimination plus efficace par la LPL des TG des lipoprotéines (qui suite à une charge en lipides sont majoritairement des chylomicrons).

5.3 Le nombre et la taille des chylomicrons sécrétés sont-ils modifiés après un régime hyperlipidique ?

Outre leur teneur en apoC-II et C-III, la taille des chylomicrons peut également conditionner l'efficacité de clairance des TG. En effet, les chylomicrons de grosse taille ont plus d'affinité pour la LPL que ceux de petite taille (Xiang *et al.*, 1999). Comme nous l'avons vu précédemment, l'augmentation du niveau d'expression de l'apoA-IV et probablement du FAT/CD36 augmente la taille des chylomicrons (Lu *et al.*, 2006) (Nauli *et al.*, 2006). En effet, les travaux de Nauli *et al.* ont montré que l'absence de FAT/CD36 conduit à la sécrétion intestinale de chylomicrons de petite taille.

L'ensemble de ces données suggère que l'intestin des souris soumises au régime hyperlipidique pourraient produire et sécréter des chylomicrons de grosse taille et donc probablement en moindre nombre.

Pour connaître l'impact du régime hyperlipidique sur le nombre de chylomicrons, nous avons mesuré la quantité d'apoB48 au niveau du plasma recueilli 4h après la charge chez des souris soumises au régime hyperlipidique pendant 21 jours et traitées au Tyloxapol afin de s'affranchir de la dégradation des chylomicrons par la LPL. Cette expérience nous a permis de déterminer le nombre de chylomicrons puisqu'il existe une seule molécule d'apoB48 par particule. Après délipidation du plasma, les protéines ont été analysées par gel SDS-PAGE. Après migration électrophorétique, le gel a été coloré au Bleu de Coomassie puis scanné à l'aide d'un densitomètre (Biorad GS800). Comme indiqué en figure 30, le niveau d'apoB48 est identique entre les deux lots ce qui indique que le nombre de chylomicrons sécrétés 4h après la charge en lipides est identique chez les souris témoins et soumises au régime hyperlipidique. Ainsi, la faible triglycéridémie des souris soumises au régime hyperlipidique ne peut s'expliquer par une modification du nombre de chylomicrons sécrétés.

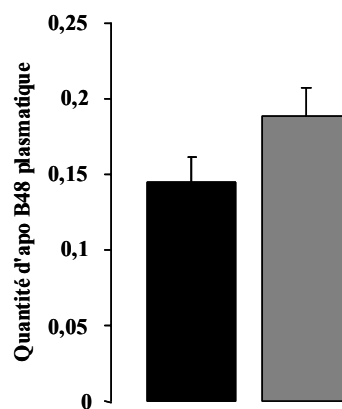


Fig. 30 : Quantité d'apoB48 plasmatique 4h après une charge en lipides.

Un prélèvement de sang a été réalisé avant et 4h après la charge en lipides chez des souris traitées au Tyloxapol. Le plasma obtenu a été déposé sur gel SDS-PAGE. Après coloration au Bleu de Coomassie, le gel a été analysé par un densitomètre (Biorad GS800). Moyenne \pm SEM, n = 5. Régime : normolipidique (■), hyperlipidique (■)

Ce résultat reste néanmoins à confirmer sachant que le foie sécrète également de l'apoB48. C'est pourquoi, il serait intéressant de compléter ce travail par l'isolement des chylomicrons après ultracentrifugation du plasma recueilli 4h après la charge en lipides et de mesurer ensuite la quantité d'apoB48 au sein de cette fraction lipoprotéique.

Par ailleurs, pour vérifier si le régime hyperlipidique conduit à la sécrétion de chylomicrons de grande taille comme le suggère l'induction du gène de l'apoA-IV et de FAT/CD36, des expériences complémentaires seront nécessaires comme par exemple l'évaluation par microscopie électronique de la taille des chylomicrons au niveau lymphatique. La mesure du rapport apoB48/TG des chylomicrons isolés pourra également nous renseigner sur l'impact de la teneur en lipides du régime sur la taille de ces lipoprotéines.

L'augmentation du rapport ARNm apoC-II/ARNm apoC-III et probablement la grande taille des chylomicrons pourrait favoriser leur clairance par la LPL et pourraient donc expliquer la plus faible triglycéridémie observée dès 3 jours de régime chez des souris en état post-prandial (9h du matin) (Fig. 31). Cette régulation de la triglycéridémie est étroitement liée à la teneur en lipides du régime puisque la triglycéridémie ré-augmente dès que les souris sont re-nourries avec un régime normolipidique. Ces résultats sont en accord avec certaines données de la littérature puisqu'il est connu que la consommation d'un régime riche en acides gras mono-insaturés, induit une diminution de la triglycéridémie chez l'Homme et le rat (Grundy *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2006).

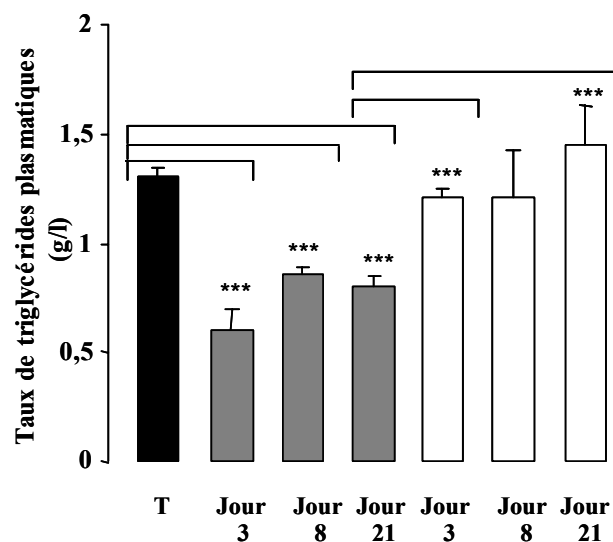


Fig. 31 : Impact du régime hyperlipidique sur le taux de triglycérides plasmatiques.

Des souris nourries *ad libitum* par un régime normolipidique et un régime hyperlipidique suivi ou non d'un régime normolipidique ont été sacrifiées à 9h du matin après 3, 8 et 21 jours de régime. Les triglycérides plasmatiques ont été mesurés par une méthode enzymatique (Biomérieux). Moyenne \pm SEM, n = 5. ** p < 0,01; *** p < 0,001. Régime normolipidique (■), hyperlipidique (■), hyperlipidique suivi d'un régime normolipidique (□).

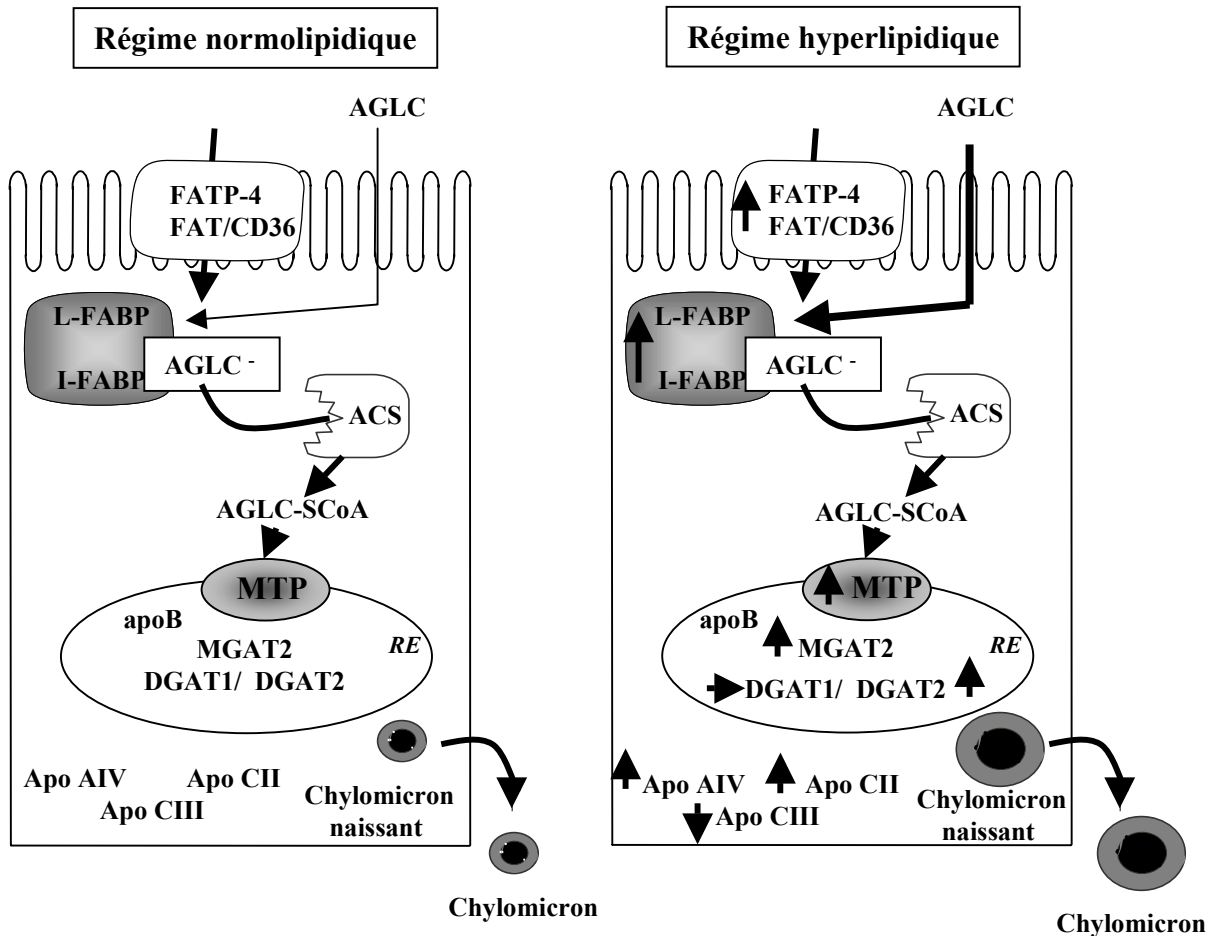


Fig. 32 : Résumé de l'impact du régime hyperlipidique sur le taux d'ARNm des gènes impliqués dans l'absorption intestinale des AGLC.

ACS : acylCoA synthétase; AGLC/AGLCH : acides gras à longue chaîne ionisé/protoné; AGLC-SCoA : acylCoA; Apo : apolipoprotéine; DGAT : diacylglycérol-acyltransférase; FATP-4 : fatty acid transport protein 4; FAT/CD36 : fatty acid transporter; I-FABP : intestinal fatty acid-binding protein; L-FABP : liver fatty acid-binding protein; MGAT2 : monoacylglycérol-acyltransférase 2; MTP : microsomal triglycerides transfer protein; RE : réticulum endoplasmique

En conclusion, comme résumé en figure 32, le régime hyperlipidique choisi conduit à une augmentation de la surface d'absorption du jéjunum secondaire à une induction de la prolifération cellulaire. Cette modification est associée à une induction coordonnée du taux d'ARNm des gènes codant pour les LBPs et des protéines impliquées dans le captage des AGLC, leur métabolisme intracellulaire et la synthèse et la sécrétion des chylomicrons. L'ensemble de ces modifications pourrait conduire à la formation de chylomicrons plus riches en apoC-II et probablement de plus grande taille dont la clairance des TG par la LPL serait augmentée.

L'ensemble de ces données indique que l'intestin n'est pas seulement un organe d'absorption mais c'est aussi un facteur incontournable dans la régulation de la lipémie post-prandiale et par conséquent dans l'homéostasie lipidique. Sachant que l'efficacité de l'adaptation du métabolisme lipidique au niveau de l'intestin est étroitement associée au développement de l'obésité (Kondo *et al.*, 2006) et que la triglycéridémie post-prandiale est un facteur prédictif des maladies cardiovasculaires et de l'athérosclérose (Zilvermit, 1995; Lopez-Miranda *et al.*, 2006), il devient nécessaire de prendre en compte l'intestin dans la mise en place de ces pathologies. De plus, il est crucial d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine de ce phénomène adaptatif pour envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques au niveau de l'intestin dans le traitement de maladies liées à une consommation excessive de lipides.

*Identification du mécanisme
moléculaire à l'origine de
l'adaptation intestinale : rôle de
PPAR β ?*

Au cours de ces quinze dernières années, des études ont mis en évidence la capacité des AGLC à réguler l'expression de gènes dans des tissus à fort métabolisme lipidique tels le foie, le tissu adipeux, le muscle strié et l'intestin (Niot *et al.*, 1997; Duplus *et al.*, 2000; Sampath *et al.*, 2005). Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces régulations sont actuellement connus. Ils font intervenir entre autres des récepteurs nucléaires spécifiques, les peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) (Issemann *et al.*, 1990). De nombreuses données de la littérature laissent à penser que ces récepteurs nucléaires pourraient être les éléments clefs de l'adaptation intestinale au contenu en lipides du régime. Il existe trois isoformes de PPARs et parmi celles-ci, l'isoforme β pourrait être à l'origine de ce phénomène adaptatif.

Les PPARs sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires qui comprend jusqu'à ce jour, 48 membres chez l'Homme (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Ces récepteurs ont été identifiés en 1990 pour la première fois chez les rongeurs (Issemann *et al.*, 1990). Actuellement, trois isoformes de PPAR, codés par des gènes différents, ont été identifiés chez les Vertébrés : PPAR α , PPAR β et PPAR γ (Desvergne *et al.*, 1999). Le gène codant pour PPAR γ a la particularité de donner naissance à trois protéines différentes : $\gamma 1$ dont l'expression est ubiquitaire, $\gamma 2$ exprimé dans le tissu adipeux et $\gamma 3$ abondant dans les macrophages, le tissu adipeux blanc et le côlon (Braissant *et al.*, 1996; Kota *et al.*, 2005). Les trois isoformes α , β et γ ont la caractéristique de posséder une organisation structurale identique (Desvergne *et al.*, 1999).

1 Structure des PPARs.

Les PPARs sont organisés en plusieurs domaines (Fig. 33) (Schoonjans *et al.*, 1996) :

- le domaine A/B en position N-terminal est une région très peu conservée entre les différents isotypes. Elle comporte une séquence AF-1 (activation function) indépendante du ligand, responsable de la transactivation du récepteur.
- le domaine C ou domaine de liaison à l'ADN (DNA binding domain : DBD) est la région la plus conservée. Elle permet la liaison du récepteur à une séquence d'ADN spécifique, le peroxisome proliferator responsive element (PPRE) localisée

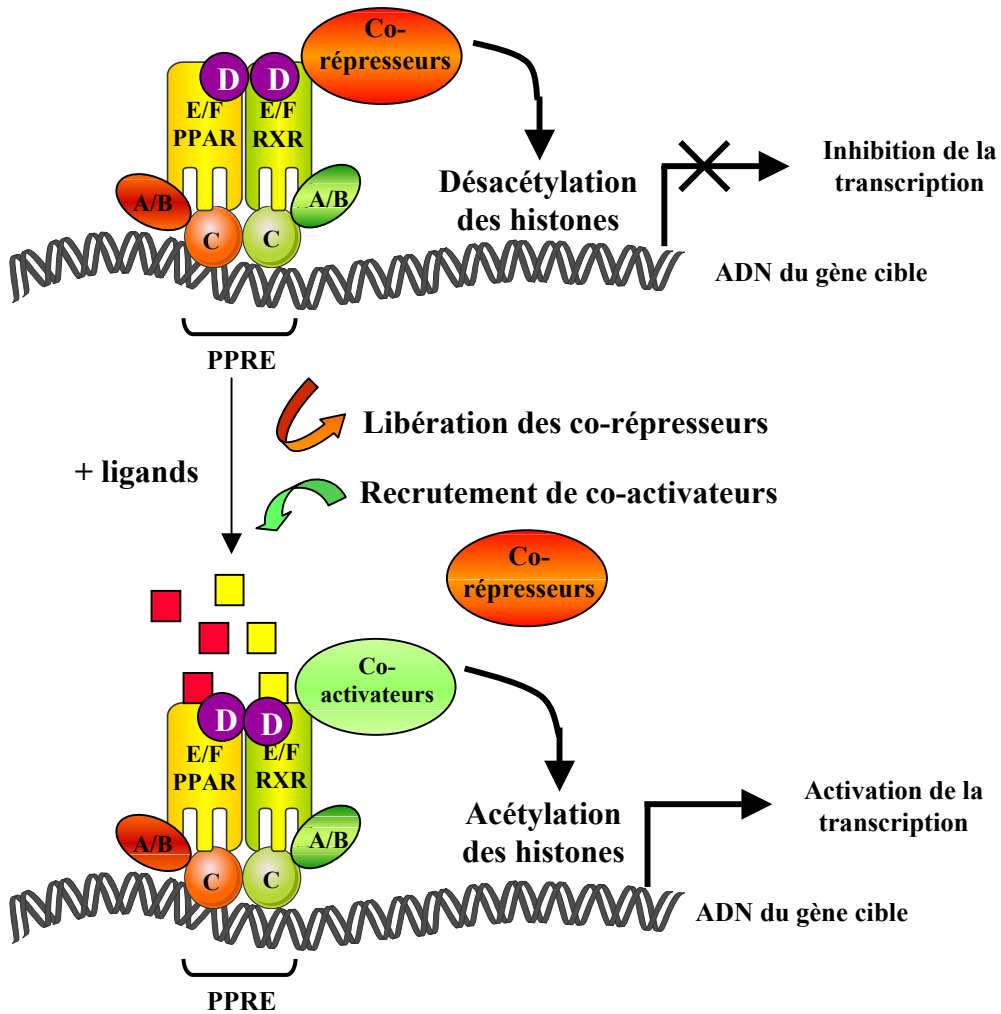


Fig. 34 : Mécanisme de transcription des gènes par les peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs).

En absence de ligand, PPAR interagit avec un complexe de co-répresseurs qui inhibe la transcription du gène par leur activité déacétylase. Suite à la liaison de ligands naturels ou synthétiques, le complexe de co-répresseurs est éliminé et PPAR s'hétérodimérise avec le rétinoïd-X-receptor (RXR). Ce phénomène entraîne le recrutement de co-activateurs contenant une activité acétylase qui induit la transcription du gène cible.

au niveau du promoteur de gènes cibles. Ce domaine est constitué de deux motifs en doigts de zinc qui permettent la liaison du récepteur au PPRE.

- le domaine D est une région non conservée qui permet le repliement de la protéine, sa dimérisation.
- le domaine multifonctionnel E/F ou domaine de liaison du ligand (LBD) est plus large que les autres domaines. Il possède une grande cavité hydrophobe où se loge le ligand. De plus, ce domaine possède une fonction AF-2 de transactivation dépendante du ligand en position C-terminal ainsi que des domaines de dimérisation. Ce domaine est également impliqué dans le recrutement de co-activateurs et de co-represseurs.

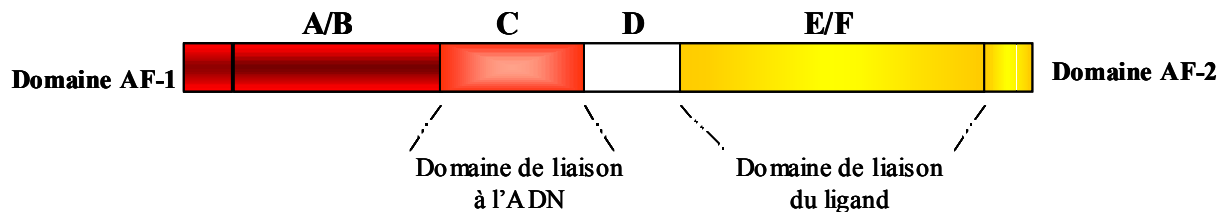


Fig. 33 : Représentation schématique de la structure générale des peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs).

Les PPARs sont composés de 4 domaines distincts. Le domaine A/B : situé au niveau N-terminal avec une séquence AF-1 de transactivation indépendant du ligand, un domaine C : impliqué dans la liaison à l'ADN, un domaine D : interagissant avec les co-facteurs et un domaine E/F : comprenant le site de liaison au ligand et un domaine AF-2 de transactivation ligand dépendant.

Le PPRE est un motif répété direct de 6 nucléotides AGGTCA séparé par un nucléotide appelée direct repeat 1 (DR1). C'est au niveau de cette séquence que les PPARs se lient sous forme d'un hétérodimère avec le récepteur de l'acide 9-cis-rétinoïque (RXR). La structure du PPRE impose une polarité de liaison de l'hétérodimère. Le PPAR se lie en amont de la séquence DR1 tandis que le RXR se positionne en aval. La régulation transcriptionnelle de gènes par l'hétérodimère PPAR/RXR semble se dérouler en deux étapes (Fig. 34). En absence de ligand, l'hétérodimère lié au PPRE est associé à des co-represseurs tels que le nuclear receptor co-repressor (NcoR) ou le silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor (SMRT) qui inhibent la transactivation du gène. En présence de ligands, des modifications conformationnelles vont se produire et vont induire la libération des co-

Tableau. 5 : Ligands naturels et synthétiques des PPARs.

Ligands naturels	PPARα	PPARβ	PPARγ
<u>Acides gras insaturés</u>			
acide linoléique	+	+	+
acide linoléique	+	+	+
acide eicosapentaénoïque	+	+	+
acide arachidonique	+	+	+
acide palmitoléique	+	+	+
<u>Acides gras saturés</u>			
acide palmitique	+	+	-
acide stéarique	+	+	-
<u>Eicosanoïdes</u>			
13-HODE			+
9-HODE			+
8S-HETE	+	-	
leucotriène B4	+	+/-	-
15-déoxy- Δ 12,14-PGJ2	-	-	+
PGI2		+	
Ligands synthétiques			
Wy-14,643	+		
Clofibrate	+	-	
Bezafibrate	+	+	
Fénofibrate	+		
L-165041		+	
GW 501516		+	
Thiazolinediones			+
Rosiglitazone			+
Troglitazone			+
Pioglitazone			+
GW-7845			+
RS5444			+

HODE : acide hydroxyoctadénoïque; HETE : acide hydroxyeicosapentaénoïque, 15-déoxy- Δ 12,14-PGJ2 : 15-déoxy- Δ 12,14-prostaglandine J2 ; PGI2 : prostaglandine I2.

répresseurs. Ce phénomène va ainsi permettre le recrutement de co-activateurs tels que le steroid receptor co-activator (SRC)-1, cAMP response element binding protein (CBP)/p300, peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-repressor 1 et 2 (PGC-1, PGC-2) ou le PPAR binding protein (PBP) (Berger *et al.*, 2002; Kota *et al.*, 2005). Contrairement aux co-répresseurs qui possèdent une activité histone déacétylase, les co-activateurs, de part leur activité histone acétylase, vont initier la transcription du gène cible par la mise en place de la machinerie transcriptionnelle.

2 Les ligands des PPARs.

Les PPARs ont la particularité de lier un grand nombre de molécules mais avec une faible affinité (micromolaire). C'est pourquoi, on les considère souvent comme des « senseurs » des lipides (Desvergne *et al.*, 2004).

Les PPARs sont activés par la liaison de ligands physiologiques et/ou synthétiques (tableau 5). Parmi les ligands naturels, on trouve les AGLC, en particulier les acides gras polyinsaturés tels l'acide linoléique, l'acide arachidonique, l'acide linoléique, l'acide docosohéxanoïque et l'acide eicosapentaénoïque. Tous ces AGLC lient les trois isotypes mais avec une plus grande affinité pour PPAR α , suivi de PPAR β et PPAR γ (Desvergne *et al.*, 1999) (Forman *et al.*, 1997; Kliewer *et al.*, 1997). Comparé aux acides gras insaturés, les acides gras saturés sont de faibles ligands des PPARs sauf pour PPAR α . Par ailleurs, des études ont montré que les eicosanoïdes, dérivés de l'acide arachidonique, sont aussi des ligands des PPARs. C'est le cas de la 15-déoxy- Δ 12,14 prostaglandine J2 (15-PGJ2), de l'acide 13-S-hydroxyoctadénoïque (13-HODE) qui sont des ligands spécifiques de PPAR γ , de l'acide 8(S)-hydroxy-eicosatétraénoïque (HETE), du leucotriène B4, ligands de PPAR α et de la prostacycline PGI2, ligand de PPAR β/δ .

Parmi les ligands synthétiques, des agents hypolipémiant tels que les fibrates (clofibrate et le Wy-14643) lient préférentiellement PPAR α . Les thiazolinediones tels que la troglitazone, pioglitazone, rosiglitazone qui forment une classe de médicaments anti-diabétiques lient sélectivement PPAR γ . Récemment, un agoniste spécifique de ce récepteur nucléaire, le RS5444 a été identifié (Chen *et al.*, 2006). Concernant PPAR β , ce n'est que très

récemment que des ligands ont été synthétisés comme le GW 501516 (Oliver *et al.*, 2001) et le L-165041 (Leibowitz *et al.*, 2000) (tableau 5).

3 Les fonctions des PPARs.

Les PPARs sont connus pour être impliqués dans différentes voies métaboliques telles que l'adipogénèse, les fonctions immunitaires, la prolifération cellulaire, l'apoptose et la carcinogénèse (Berger *et al.*, 2002). Cependant, le fait que les trois isoformes de PPARs aient des spécificités de liaison différente et une distribution tissulaire spécifique sous-tend des fonctions physiologiques différentes.

PPAR α est principalement exprimé dans les tissus ayant un fort catabolisme des acides gras tels le foie, les muscles mais il est également trouvé dans l'intestin (Escher *et al.*, 2001). Sa fonction principale est de contrôler les gènes impliqués dans la β -oxydation mitochondriale et péroxysomale des acides gras ainsi que de l' ω -oxydation péroxysomale. Il régule également les enzymes de la néoglucogénèse et de la cétogénèse (Desvergne *et al.*, 2004).

PPAR γ est, quant à lui, majoritairement exprimé dans les tissus adipeux brun et blanc où il est responsable de la différenciation des adipocytes et du stockage des lipides. Il est également présent dans les macrophages où il est impliqué dans les processus inflammatoires (Berger *et al.*, 2002). PPAR γ est également exprimé au niveau de l'intestin où il serait impliqué dans la différenciation de l'épithélium intestinal (Drori *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006).

Contrairement aux PPAR α et γ , l'expression de PPAR β est ubiquitaire. On le trouve de façon abondante dans le cerveau, le tissu adipeux, le muscle squelettique, la peau et l'intestin (Braissant *et al.*, 1996; Escher *et al.*, 2001; Berger *et al.*, 2002). Les rôles physiologiques de PPAR β sont multiples. En effet, des travaux ont montré qu'il est impliqué dans les étapes précoces de la différenciation adipocytaire, la régulation des capacités oxydatives du muscle, la prolifération cellulaire et le métabolisme des lipoprotéines (Bastie *et al.*, 1999; Jehl-Pietri *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2001; Hellemans *et al.*, 2003; Luquet *et al.*, 2003). Comme nous allons le développer dans le paragraphe suivant, PPAR β pourrait jouer

un rôle dans l'adaptation des capacités d'absorption de l'intestin en fonction de la teneur en lipides du régime en régulant :

- la surface d'absorption
- l'expression coordonnée des LBP et des protéines impliquées dans l'absorption des AGLC
- la lipémie

4 PPAR β : l'élément clef de l'adaptation intestinale ?

4.1 PPAR β et la régulation de l'activité proliférative.

De nombreuses études ont mis en évidence l'implication de PPAR β dans les processus de prolifération cellulaire dans différents tissus. C'est au niveau du tissu adipeux que cette fonction a été identifiée pour la première fois (Jehl-Pietri *et al.*, 2000). Activé par les AGLC, le PPAR β induit l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes tels que PPAR γ , l'adipocyte lipid-binding protein (ALBP) et FAT/CD36 (Amri *et al.*, 1995; Bastie *et al.*, 1999). Par conséquent, l'activation de PPAR β contribuerait au développement du tissu adipeux. En accord avec cette hypothèse, des souris dont le gène codant pour PPAR β a été invalidé présentent une diminution de la masse des tissus adipeux blanc et brun (Peters *et al.*, 2000; Barak *et al.*, 2002).

Plus récemment, il a été montré un rôle de ce récepteur dans la prolifération des cellules stellaires du foie (Hellemans *et al.*, 2003). Ces cellules situées dans l'espace de Disse joue un rôle dans le stockage hépatique de la vitamine A mais aussi dans la fibrogénèse. En revanche, contrairement au tissu adipeux et aux cellules stellées, PPAR β inhibe la prolifération cellulaire mais induit la différenciation terminale des kératinocytes (Burdick *et al.*, 2006). Des travaux ont également illustré le rôle de ce récepteur nucléaire dans le processus de tumorigénèse colique. En effet, l'expression du gène de PPAR β est particulièrement élevée dans les adénomes issus de polyposes familiales (Gupta *et al.*, 2004). Cependant, son implication dans le développement de tumeurs coliques est sujet à controverse puisque l'inactivation du gène de PPAR β montrent à la fois une augmentation de la tumorigénicité au niveau cellulaire et une diminution de la formation de polypes chez la souris (Park *et al.*, 2001; Harman *et al.*, 2004).

Ces données suggèrent un rôle de ce récepteur nucléaire dans la régulation de la prolifération cellulaire de l'épithélium intestinal sain. Une telle hypothèse suppose une localisation de PPAR β dans les cryptes.

C'est pourquoi, nous avons étudié dans un premier temps la localisation crypto-villositaire de ce récepteur nucléaire en adaptant la technique de Voisin *et al* (Voisin *et al.*, 1990). Cette technique consiste à isoler progressivement les fractions villositaires et cryptiques à partir d'un segment jéjunal par l'action combinée d'une solution contenant de l'EDTA et d'une agitation. Ces travaux ont été réalisés chez le rat Wistar.

Pour chacune des fractions obtenues, nous avons dosé l'activité enzymatique de la saccharase, marqueur des cellules différenciées qui s'exprime selon un gradient décroissant du haut de la villosité vers le fond de la crypte (Traber, 1990). Les fractions possédant l'activité saccharase la plus élevée ont été considérées comme des fractions villositaires alors que celles ayant l'activité la plus faible comme cryptiques. Comme indiqué sur la figure 35, les trois isoformes de PPARs sont exprimés dans les villosités. Cependant, contrairement aux PPAR α et γ , le taux d'ARNm de PPAR β est identique dans les compartiments cryptique et villositaire. Ces données préliminaires ont été confirmées récemment chez la souris par les travaux de Varnat *et al.* (Varnat *et al.*, 2006).

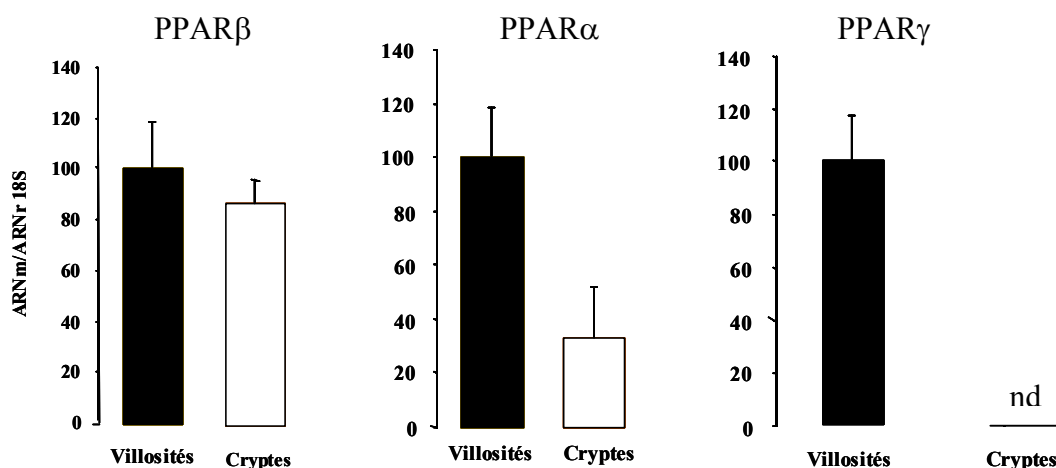


Fig. 35 : Niveau d'expression des PPARs selon l'axe crypto-villositaire chez le rat.

Les fractions villositaires et cryptiques ont été obtenues chez des rats nourris *ad libitum* en adaptant la technique décrite par Voisin *et al.* Les villosités sont considérées comme les témoins et sont affectées de la valeur 100. Le taux d'ARNm est standardisé sur le taux d'ARNr 18S. Moyenne \pm SEM, n = 5.

*, p < 0,05. nd : non détectable

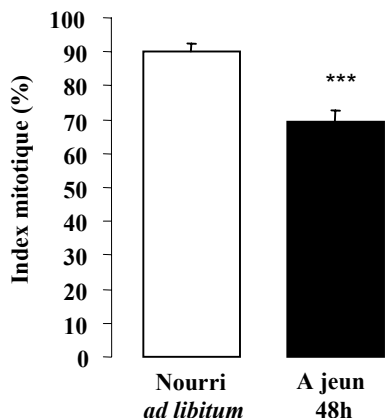


Fig. 36 : Effet du jeûne sur l'activité proliférative du jéjunum de rat.

L'index mitotique correspond au rapport nombre de cellules positive au Ki-67 / nombre de cellules totales dans la crypte. Moyenne \pm SEM; n = 30 cryptes par animal; 4 animaux au total. ***, p < 0,001.

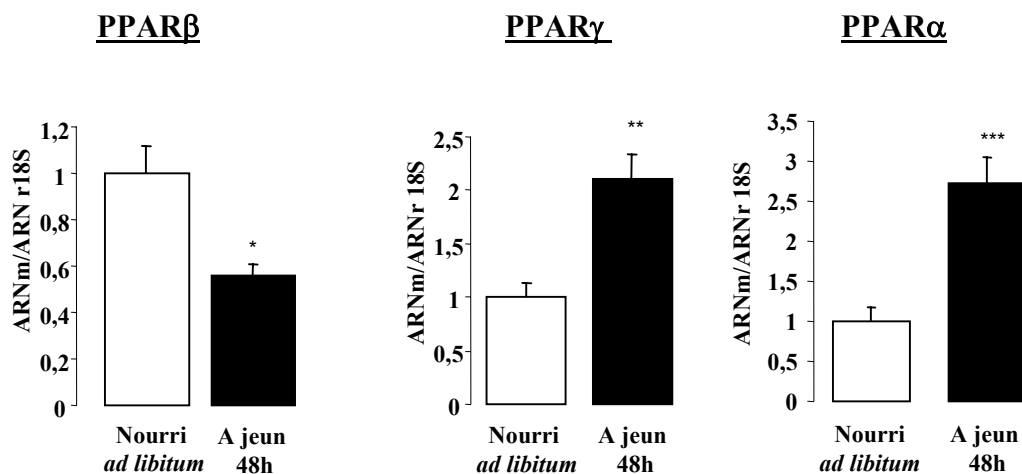


Fig. 37 : Effet du jeûne sur l'expression des PPARs chez le rat.

Le niveau d'expression du taux d'ARNm des PPARs a été mesuré par Northern Blotting. Le taux d'ARNm a été standardisé sur le taux d'ARNr 18S. Moyenne \pm SEM, n = 5. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001

Si le PPAR β est impliqué dans la prolifération intestinale, le niveau de son expression pourrait être corrélé à l'activité proliférative. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré le taux d'ARNm des 3 PPARs dans deux états nutritionnels opposés, le jeûne et l'état nourri, qui sont connus pour moduler l'activité mitotique de l'intestin. En effet, des études ont montré qu'un jeûne prolongé conduit à une diminution de l'activité mitotique uniquement localisée dans les cryptes, qui se traduit par une diminution de la hauteur des villosités (Dunel-Erb *et al.*, 2001). Cette faible activité mitotique est restaurée par la prise alimentaire et en particulier par les lipides de l'alimentation (Buts *et al.*, 1990). Comme attendu, l'activité mitotique diminue suite à un jeûne prolongé (-20%) (Fig.36). Cet effet est corrélé à une diminution de l'expression de PPAR β au contraire des deux autres isoformes dont le taux d'ARNm est augmenté (Fig. 37). Les données de la littérature et nos résultats confortent l'hypothèse selon laquelle PPAR β pourrait participer à la prolifération intestinale.

4.2 PPAR β et régulation de l'expression coordonnée des gènes impliqués dans le processus d'absorption intestinale.

Certaines LBP comme le FAT/CD36 (Bastie *et al.*, 1999), la L-FABP (Poirier *et al.*, 2001) et l'ACS (Basu-Modak *et al.*, 1999) sont connues comme étant des gènes cibles de PPAR β chez le rat et la souris. Puisque le PPAR β est l'isoforme majoritaire dans l'intestin (Escher *et al.*, 2001) et qu'il est préférentiellement localisé dans le jéjunum au niveau des villosités qui constituent une zone de différenciation impliquée dans l'absorption des lipides (Fig. 38), il pourrait réguler de façon coordonnée l'expression des gènes clefs impliqués dans l'absorption des lipides alimentaires.

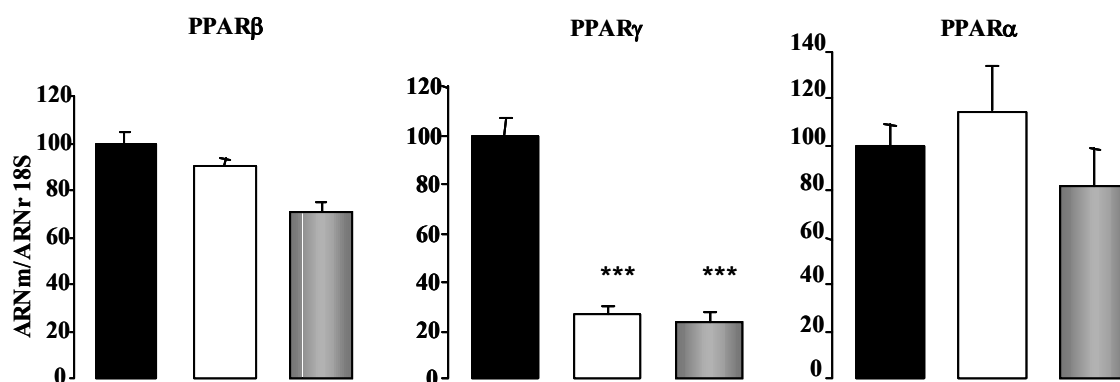


Fig. 38 : Localisation céphalo-caudale de l'expression des PPARs au niveau de l'intestin grêle de souris en condition normolipidique.

Le niveau d'expression des gènes a été étudié par Northern Blotting. Le taux d'ARNm est standardisé sur l'ARNr 18S. Moyenne \pm SEM; n = 4. ***, p < 0,001. Duodénum (■), jéjunum (□), iléon (▣)
PPARs : peroxisome proliferator activated-receptors.

En effet, le promoteur de la FATP-4 (Martin *et al.*, 1997; Schaiff *et al.*, 2005), du FAT/CD36 (Bastie *et al.*, 1999), de la I-FABP (Alpers *et al.*, 1984), de la L-FABP (Poirier *et al.*, 2001) et de la MTP (Ameen *et al.*, 2005) contiennent un PPRE. Parmi tous ces gènes, seul le PPRE de la I-FABP n'est pas fonctionnel (Alpers *et al.*, 1984; Mochizuki *et al.*, 2001). Concernant l'apoA-IV et l'apoC-III (Peters *et al.*, 1997), elles sont connues pour être régulées de façon indirecte par les PPARs.

Puisque l'inactivation du gène de FAT/CD36 et de la L-FABP provoque une altération de la synthèse et/ou sécrétion des chylomicrons (Nauli *et al.*, 2006; Newberry *et al.*, 2006), le PPAR β pourrait être également à l'origine de modifications de la lipémie post-prandiale. Cette dernière hypothèse est confortée par la mise en évidence qu'une augmentation de la sécrétion hépatique des lipoprotéines riches en TG est observée chez les souris dont le gène de PPAR β a été invalidé (Akiyama *et al.*, 2004). De plus, le traitement de singes obèses et de souris obèses et diabétiques (db/db) par un agoniste spécifique de PPAR β engendre une augmentation du cholestérol dans les HDL (anti-athérogènes), une diminution du nombre de petits LDL (pro-athérogènes) et également de la triglycéridémie (Oliver *et al.*, 2001) (Leibowitz *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2001).

Le deuxième objectif de cette thèse a donc été d'évaluer si le PPAR β est l'élément clef à l'origine de l'adaptation intestinale au contenu en lipides du régime.

Pour répondre à cette question, nous avons décidé de sur-exprimer spécifiquement au niveau intestinal le PPAR β . En effet, selon nos hypothèses, une meilleure capacité d'absorption pouvait être observée dans cette situation. Compte tenu des spécificités morphologiques et fonctionnelles de l'intestin décrites dans la synthèse bibliographique, la méthode la plus pertinente pour étudier le rôle physiologique de PPAR β au niveau de cet organe est d'utiliser un modèle *in vivo*. Comme le PPAR β est exprimé de façon ubiquitaire, une sur-expression spécifiquement au niveau intestinal de ce gène est le seul moyen pour déterminer la contribution du PPAR β intestinal dans l'homéostasie lipidique. Pour ce faire, des souris sur-exprimant PPAR β spécifiquement au niveau intestinal ont été générées selon la stratégie Cre-Lox.

Modèle de sur-expression de PPAR β spécifiquement au niveau de l'intestin

Le principe de la stratégie Cre-Lox est de placer un gène à éliminer, entre deux sites d'excision appelés LoxP. Ces sites LoxP sont des séquences de 34 nucléotides provenant du phage bactérien P1. Ces séquences se recombinent très efficacement et très spécifiquement en présence de la recombinase Cre qui est le produit du gène cre (cyclization recombination) issu du bactériophage P1. Cre reconnaît les sites LoxP et catalyse la recombinaison de la séquence d'ADN située entre les deux sites d'excision. Si ces derniers sont orientés dans le même sens alors la séquence d'ADN sera excisée. En revanche, s'ils sont orientés en sens inverse, alors la séquence d'ADN sera inversée entre ces deux sites.

Cette stratégie appliquée à la souris a nécessité la génération de deux lignées silencieuses de souris transgéniques (fig. 39):

- une lignée C57BL/6J possédant le gène de la recombinase Cre placée sous le contrôle du promoteur murin de la villine (el Marjou *et al.*, 2004). La villine est une protéine de 95 kDa du cytosquelette des microvillosités intestinales exprimée dans les cellules différenciées et non différenciées de la muqueuse intestinale selon un gradient croissant de la base de la crypte vers le haut de la villosité (Robine *et al.*, 1985). Ainsi, la recombinaison ne sera effective que dans cet organe.
- une lignée B6D2 possédant la construction suivante : le gène PPAR β d'origine murine (transgène PPAR β) placée en aval d'une séquence STOP flanquée de deux sites LoxP, sous le contrôle d'un promoteur fort, le pCAG (Luquet *et al.*, 2003). Pour distinguer, le transgène PPAR β du PPAR β endogène, le gène codant l'hygromycine a été placé en aval du transgène. Cette lignée de souris a été générée par l'équipe du Docteur P.Grimaldi (INSERM U636, Parc Valrose, Université de Nice-Sophia Antipolis).

Après le croisement de ces deux lignées, seules les souris doubles transgéniques c'est à dire possédant la recombinase Cre et la construction PPAR β -hygromycine (soit un quart de la descendance), pourront uniquement au niveau de l'intestin, exciser la cassette STOP et exprimer le transgène PPAR β (Fig. 39).

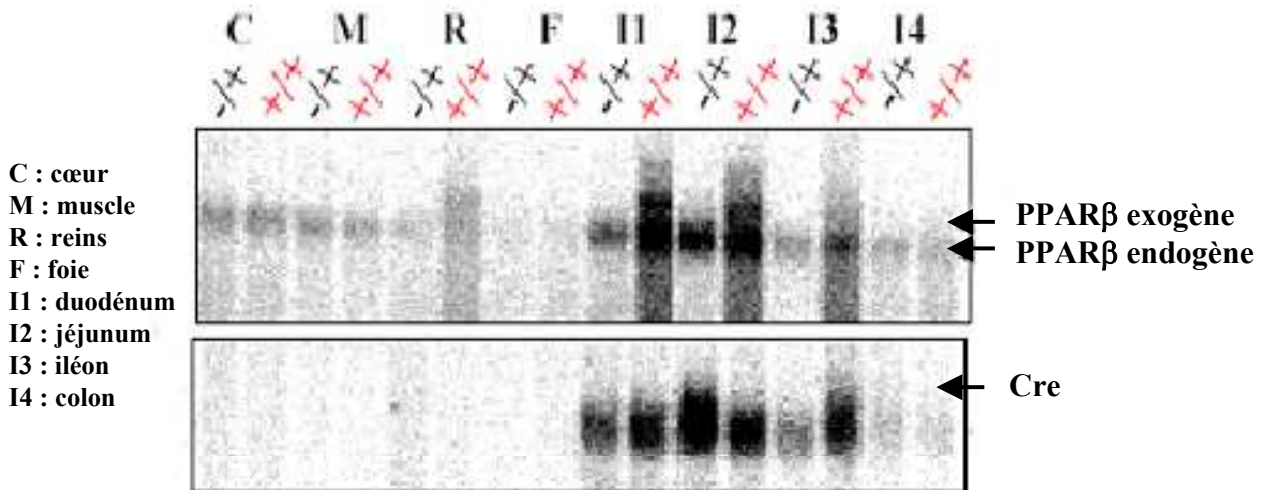


Fig. 40 : Expression tissulaire de PPARβ chez les souris Cre-villine (-/+) et les souris double transgéniques (+/+). (résultats obtenus par l'équipe du Docteur P.Grimaldi)

Chez les souris doubles transgéniques, on détecte au niveau de l'intestin un taux élevé d'ARNm de PPARβ exogène (transgène) de taille supérieure à l'ARNm de PPARβ endogène. Chez les animaux Cre-villine, on n'identifie pas d'ARNm correspondant au transgène PPARβ. La GAPDH est utilisée comme standard.

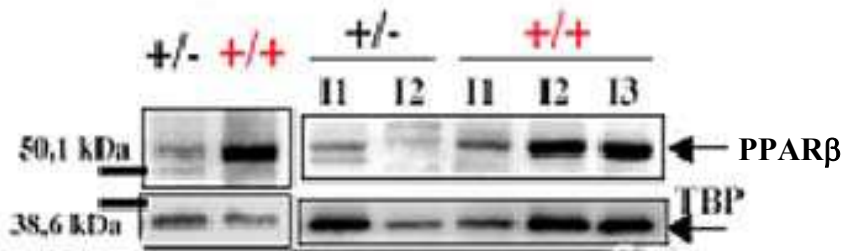


Fig. 41 : Expression intestinale de la protéine PPARβ chez les souris Cre-villine (-/+) et les souris double transgéniques (+/+). (résultats obtenus par l'équipe du Docteur P.Grimaldi).

L'analyse par Western Blotting montre une expression plus élevée de PPARβ au niveau du jéjunum et de l'iléon de souris doubles transgéniques comparé aux souris Cre-villine.

I1 : duodénum, I2 : Jéjunum, I3 : Iléon. La Tata binding protein (TBP) est utilisé comme standard.

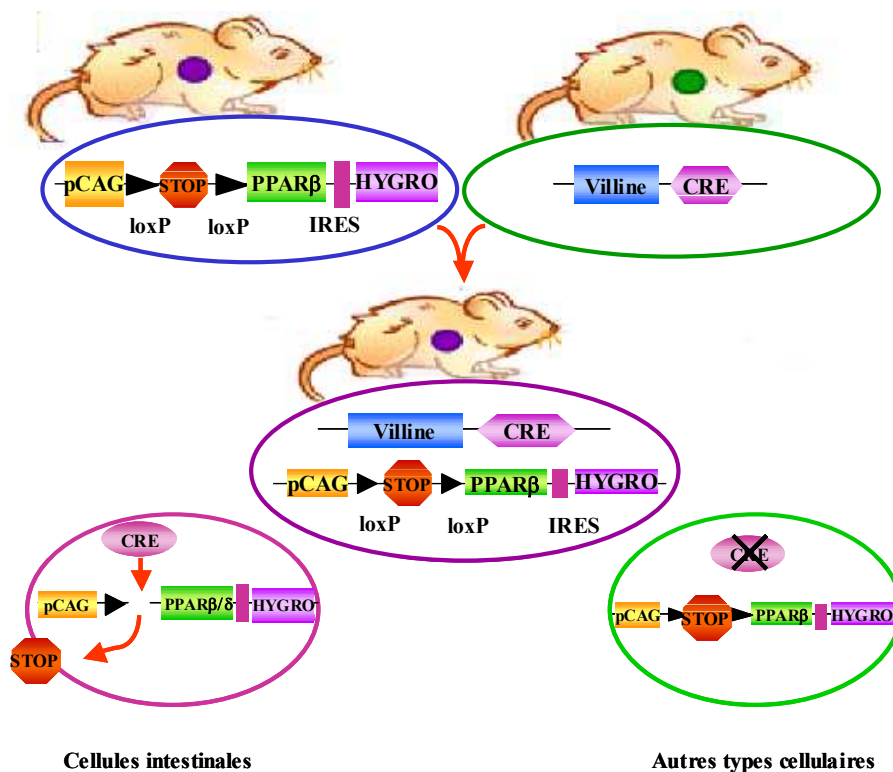


Fig. 39 : Stratégie de surexpression intestinale de PPARβ chez la souris.

Des souris surexprimant spécifiquement PPARβ dans l'intestin ont été générées par la stratégie recombinante Cre-Lox. Pour cela, deux lignées de souris C57BL/6 DBA/2 ont été nécessaires. D'une part, la lignée possédant le transgène PPARβ d'origine murine avec en amont une cassette STOP entourée de deux séquences LoxP orientées dans le même sens et d'autre part, la lignée comportant le gène de la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur de la villine, gène fortement exprimé dans l'intestin. Suite au croisement des deux lignées, seules les souris possédant les deux constructions c'est à dire les souris doubles transgéniques pourront exciser uniquement dans l'intestin la cassette STOP et exprimer le transgène.

Comme indiqué en figure 39, les animaux doubles transgéniques possèdent un ARNm de taille supérieure (le transgène) à celle du PPARβ endogène dû à la présence du gène de l'hygromycine (Fig.40). L'ARNm du transgène ne s'exprime que dans l'intestin grêle, plus particulièrement dans le duodénum et le jéjunum (Fig. 40) tout comme la protéine (Fig. 41).

La sélection des animaux doubles transgéniques a été réalisée à partir de l'ADN issu des queues de souris par Polymerase Chain Reaction (PCR) en utilisant des amorces spécifiques du gène hygromycine (5'-GTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATG-3'; 5'-CGCGACGGACGCACTGACGGT-3') et du gène Cre (5'-CAGCCACCAGCTTGATGA-3'; 5'-TGATGGACATGTTTCAGGGATC-3'). Après digestion des queues de souris par le kit

REDExtract-N-AmpTM Tissue PCR Kit (SIGMA), l'ADN obtenu est amplifié par PCR. Les produits issus de la réaction d'amplification sont ensuite analysés sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium. Après migration électrophétique, nous détectons deux bandes : l'une de 867 paires de base correspondant au gène Cre et l'autre de 307 paires de base correspondant au gène hygromycine. Ainsi, pour les souris doubles transgéniques, ces deux bandes seront présentes.

Grâce à l'obtention de ce modèle bien adapté, nous avons tenté de comprendre le rôle physiologique de PPAR β au niveau de l'intestin grêle. Pour ce faire, nous avons étudié chez ces animaux, l'efficacité de l'absorption des lipides et la lipémie post-prandiale en situation normo- et hyperlipidique. Tout au long de notre étude, les souris Cre-villine ont été considérées comme animaux témoins puisque ces animaux ont un phénotype comparable à celui d'une souris sauvage.

*Effet de la sur-expression intestinale
de PPAR β sur les capacités
d'absorption de l'intestin chez des
souris soumises à un régime
normolipidique.*

1 La sur-expression intestinale de PPAR β augmente les pertes fécales en lipides chez la souris en régime normolipidique.

Les souris mâles témoins et sur-exprimant PPAR β âgés de 7 mois ont été placées dans des cages métaboliques et soumises pendant trois jours à un régime normolipidique contenant 3% lipides (m/m). Après 4 jours d'adaptation à leur environnement, les mesures de prise de poids, de consommation de nourriture et d'excrétion fécale ont pu être réalisées. Comme le montre la figure 42, les souris doubles transgéniques ont un taux d'ARNm PPAR β 3 fois supérieur à celui des animaux témoins. De la même façon, ces souris présentent une augmentation d'un facteur 4 de l'expression de la protéine codant pour PPAR β .

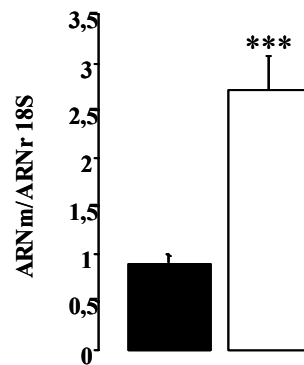


Fig. 42 : Niveau d'expression de PPAR β au niveau du jéjunum de souris à l'état post-prandial.

Le niveau d'expression de PPAR β a été déterminé par PCR en temps réel. Le taux d'ARNm de PPAR β a été standardisé sur l'ARNr 18S. Moyenne \pm SEM, n = 6. *** p < 0,001.

Souris témoins (■), souris sur-exprimant PPAR β (□)

Le tableau 6 montre que les souris mâles sur-exprimant PPAR β ont une masse corporelle plus faible que les animaux témoins malgré une consommation calorique supérieure de 30%. Ce résultat apparemment paradoxal pourrait être la conséquence de l'augmentation de 33% de l'excrétion fécale des lipides chez les souris sur-exprimant PPAR β .

Ces données sont retrouvées chez les souris femelles sur-exprimant PPAR β puisque l'excrétion fécale est supérieure de 22% à celle des témoins ($0,97 \pm 0,05$ vs $0,79 \pm 0,05$ mg/g de souris/J).

Tableau. 6 : Effet de la sur-expression intestinale de PPAR β sur l'absorption intestinale chez les souris soumises à un régime normolipidique.

Paramètres	Mâles témoins	Mâles sur-exprimant PPAR β
Masse corporelle (g)	34,83 \pm 1,55	31,23 \pm 0,63 *
Calories ingérées (Kcal/g de souris/J)	0,38 \pm 0,02	0,48 \pm 0,03 *
Quantité de lipides ingérés (mg/g de souris/J)	3,93 \pm 0,16	4,22 \pm 0,23
Teneur en lipides dans les fécès (mg/g de souris/J)	0,95 \pm 0,11	1,27 \pm 0,08 *
% lipides excrétés/lipides ingérés	23,94 \pm 2,31	29,06 \pm 1,56

Moyenne \pm SEM, n = 8 pour les souris mâles témoins, n = 12 pour les souris mâles sur-exprimant PPAR β .
* p < 0,05 . J = jour

L'ensemble de ces résultats obtenus indique que la sur-expression intestinale de PPAR β conduit à une moins bonne efficacité d'absorption des lipides. En effet, le rapport lipides excrétés/lipides ingérés qui traduit l'efficacité d'absorption est augmenté d'un facteur 1,2 (soit + 21%) chez les souris sur-exprimant PPAR β comparé aux animaux témoins.

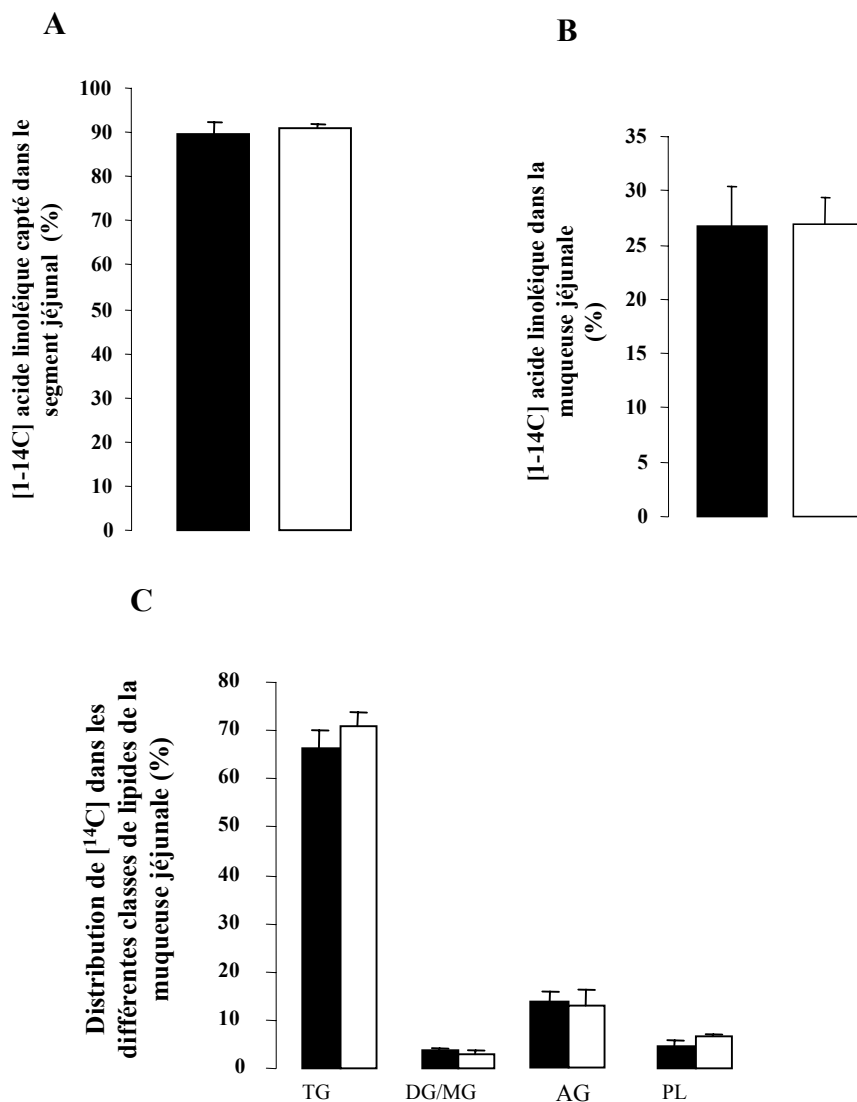


Fig. 43 : Impact de la sur-expression intestinale de PPAR β sur les capacités de captage (A) et le devenir métabolique (B-C) de [1- 14 C] acide linoléique au niveau de l'anse jéjunale isolée *in situ*.

A : La quantité captée de [1- 14 C] acide linoléique a été déterminée en soustrayant la quantité de [1- 14 C] acide linoléique infusée de la quantité de [1- 14 C] acide linoléique restant dans la lumière intestinale à la fin de l'expérience. B : Quantité de [1- 14 C] acide linoléique trouvé dans la muqueuse jéjunale 5 minutes après l'infusion. C : Distribution de 14 C dans les différentes classes de lipides de la muqueuse. TG : triglycérides, DG/MG : diglycérides/monoglycérides, AG : acides gras, PL : phospholipides. Moyenne \pm SEM, n = 4. Souris témoins (■), souris sur-exprimant PPAR β (□)

2 La sur-expression intestinale de PPAR β ne modifie pas la capacité de captage des AGLC au niveau du jéjunum.

Le modèle de l'anse jéjunale isolée a été utilisé pour connaître l'impact de la sur-expression intestinale de PPAR β sur la capacité de captage de [1- 14 C] acide linoléique et sur son devenir métabolique. Les résultats présentés en figure 43 montrent que la sur-expression intestinale de PPAR β n'affecte pas le captage de [1- 14 C] acide linoléique puisque 5 minutes après l'infusion, la même proportion d'AG radioactif est retrouvée dans la lumière du segment jéjunal isolé chez les souris sur-exprimant PPAR β et chez les témoins (Fig. 43A). De plus, cette sur-expression intestinale ne modifie pas le devenir entérocytaire de [1- 14 C] acide linoléique puisque l'on retrouve autant de [1- 14 C] acide linoléique dans la muqueuse chez les souris témoins que chez les animaux sur-exprimant PPAR β (Fig. 43B). De même, l'activité métabolique des voies d'estérification n'est pas affectée par la sur-expression intestinale de PPAR β puisque la distribution de 14 C dans les différentes classes de lipides de la muqueuse (TG, DG/MG, AG, PL) est identique entre les deux lots d'animaux (Fig. 43C).

Ce résultat paraît paradoxal compte tenu des données précédentes. L'absence d'effet au niveau de l'anse intestinale isolée pourrait s'expliquer par le jeûne infligé aux souris avant l'expérience. Si ce protocole permet d'éliminer les lipides de la lumière intestinale, il peut, en revanche, masquer l'effet du transgène sur l'absorption surtout si celui-ci est de faible amplitude. En effet, comme le montre la figure 37, le jeûne de 16 h semble diminuer le taux d'ARNm de PPAR β . De plus, comme nous l'avons vu lors de l'étude de l'impact du régime hyperlipidique chez les souris sauvages, une augmentation d'un facteur 10 de l'efficacité d'absorption déterminée par le rapport lipides excrétés/lipides ingérés était détectable par cette méthode (tableau 4) alors qu'une diminution d'un facteur 1,2 par la sur-expression intestinale de PPAR β ne semble pas détectable.

3 La sur-expression intestinale de PPAR β augmente l'activité proliférative du jéjunum.

L'impact de la sur-expression intestinale de PPAR β sur l'activité proliférative de l'intestin a été mesuré par la technique au Bromo-désoxyuridine (BrdU) par l'équipe du

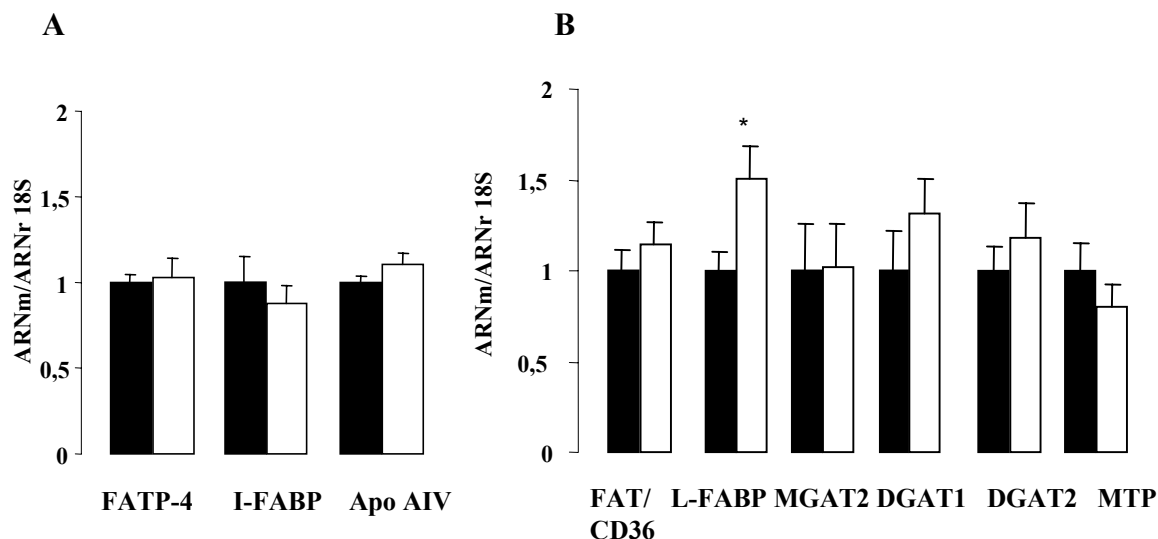


Fig. 45 : Impact de la sur-expression de PPAR β sur le niveau d'expression des LBP et gènes impliqués dans l'absorption intestinale des AGLC.

Le niveau d'expression des différents a été étudié par Northern Blotting (A) et par PCR en temps réel (B). Le taux d'ARNm a été standardisé sur l'ARNr 18S. Moyenne \pm SEM; n = 6. *, p < 0,05.

Souris témoins (■), souris sur-exprimant PPAR β (□)

Apo : apolipoprotéine; DGAT 1 et 2 : diacylglycérol-acyltransférase 1 et 2; FAT/CD36 : fatty acid transporter; FATP-4 : fatty acid transport protein 4; I-FABP : intestinal fatty acid-binding protein; L-FABP : liver fatty acid-binding protein; MGAT2 : monoacylglycérol-acyltransférase 2; MTP : microsomal triglyceride transfer protein.

Docteur P.Grimaldi (INSERM U636, Parc Valrose, Université de Nice-Sophia Antipolis). Le BrdU est un agent s'incorporant dans les noyaux durant la phase S du cycle cellulaire contrairement au Ki-67 qui marque les noyaux des cellules en phase G1, S, G2 et M.

Comme le montre la figure 44, la sur-expression intestinale de PPAR β engendre une augmentation de l'activité proliférative de 37% du jéjunum chez les souris mâles soumises au régime normolipidique. Ce résultat confirme le rôle de PPAR β dans la prolifération intestinale.

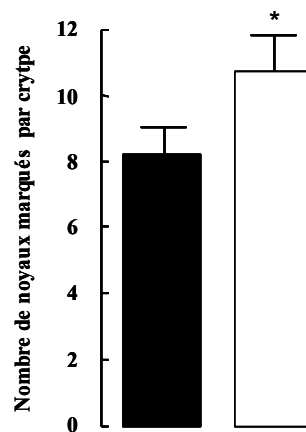


Fig. 44 : Effet de la sur-expression intestinale de PPAR β sur l'activité mitotique de l'intestin (résultat obtenu par l'équipe du Docteur P.Grimaldi)

Les souris témoins et sur-exprimant PPAR β maintenus sous un régime normolipidique ont reçu 1h avant le sacrifice de la bromodéoxyuridine par injection intra-péritonéale (50 μ g/kg, dans 0,9% NaCl). Après le sacrifice, l'intestin est prélevé, lavé au PBS puis coupés en segments de 5 mm de longueur. Après inclusion du jéjunum, des cryosections sont réalisées. L'index de prolifération est déterminé par l'utilisation du kit BrdU FLUOS (Roche). L'index de prolifération correspond au nombre de noyaux marqués par heure et par crypte. Moyenne \pm SEM, n = 40 cryptes par souris. Au total, 6 animaux sont utilisés pour chacune des conditions. * p < 0,05. Souris témoins (■), souris sur-exprimant PPAR β (□).

4 La sur-expression intestinale de PPAR β affecte uniquement le niveau d'expression jéjunale de la L-FABP.

Les résultats obtenus par Northern Blotting et PCR en temps réel montrent que la sur-expression intestinale de PPAR β n'affecte pas le taux d'ARNm jéjunale de la plupart des gènes impliqués dans le captage, le trafic entérocytaire et la sécrétion des lipoprotéines (Fig. 45). Il en est de même pour le taux d'ARNm des enzymes impliquées dans les voies de ré-estérification des acyl-CoA en TG (Fig.45). En revanche, le niveau d'expression de la L-FABP est augmenté d'un facteur 1,5 au niveau du jéjunum de souris sur-exprimant PPAR β

(Fig. 45B). Cette induction est en accord avec les données obtenues précédemment au Laboratoire montrant que la L-FABP est un gène cible de PPAR β au niveau de l'intestin de souris (Poirier *et al.*, 2001). Cependant, cette régulation ne semble pas favoriser à elle seule les capacités d'absorption de l'intestin puisque les souris doubles transgéniques excrètent plus de lipides que les témoins.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats montre qu'en condition normolipidique, la sur-expression intestinale de PPAR β engendre une diminution de l'efficacité d'absorption traduit par un rapport lipides excrétés/lipides ingérés supérieur à celui des souris témoins. Paradoxalement, les souris sur-exprimant PPAR β ont une augmentation de l'activité proliférative. Comme cet effet ne s'accompagne pas de modifications du taux d'ARNm des gènes impliqués dans l'absorption (hormis l'induction de l'expression de la L-FABP), on peut se demander si les entérocytes sont bien fonctionnels chez les souris sur-exprimant spécifiquement au niveau intestinal PPAR β .

Puisque selon notre hypothèse PPAR β serait impliqué dans l'adaptation des capacités d'absorption de l'intestin en fonction de la teneur en AGLC du régime, l'impact physiologique de la sur-expression intestinale de ce récepteur devrait être plus marqué dans des conditions de régime hyperlipidique où la disponibilité de ligands est plus importante.

C'est pourquoi, des souris sur-exprimant PPAR β ont été soumises à un régime hyperlipidique (40%, m/m).




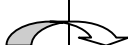

*La sur-expression intestinale de
PPAR β affecte-t-elle les capacités
d'absorption de l'intestin chez les
souris soumises à un régime
hyperlipidique ?*

Pour étudier le rôle de PPAR β dans l'adaptation des capacités d'absorption de l'intestin, des souris mâles témoins et sur-exprimant PPAR β âgés de 7 mois ont été placées en cages métaboliques et soumises au même régime que les souris B6D2F1 (partie expérimentale 1) c'est à dire un régime contenant 40% de lipides en masse pendant 21 jours.

1 Les souris sur-exprimant PPAR β s'adaptent de manière moins efficace que les souris témoins au régime hyperlipidique

Après trois semaines de régime hyperlipidique, les souris sur-exprimant PPAR β présentent une diminution de 12 % de la masse corporelle contrairement aux animaux témoins. Comme dans le cas du régime normolipidique, les souris sur-exprimant consomment pourtant plus de calories (+ 36 %) que les témoins (tableaux 6 et 8).

Tableau. 8 : Effet de la sur-expression intestinale de PPAR β sur l'absorption intestinale chez les souris soumises à un régime hyperlipidique.

Paramètres	Souris témoin		Souris sur-exprimant PPAR β	
Masse corporelle avant (g) après	31,89 \pm 0,97		29,89 \pm 0,69	***
	30,32 \pm 0,99		- 12 %	
Calories ingérées (Kcal/g de souris/J)	0,33 \pm 0,02		0,45 \pm 0,02 ***	
Quantité de lipides ingérés (mg/g de souris/J)	30,91 \pm 1,44		38,90 \pm 2,16 ***	
Teneur en lipides dans les fécès (mg/g de souris/J)	0,78 \pm 0,07		1,43 \pm 0,30	
% lipides excrétés/lipides ingérés	2,54 \pm 0,24		3,64 \pm 0,68	

Moyenne \pm SEM, n = 8 pour les souris témoins et n = 12 pour les souris sur-exprimant PPAR β . *** p < 0,001.

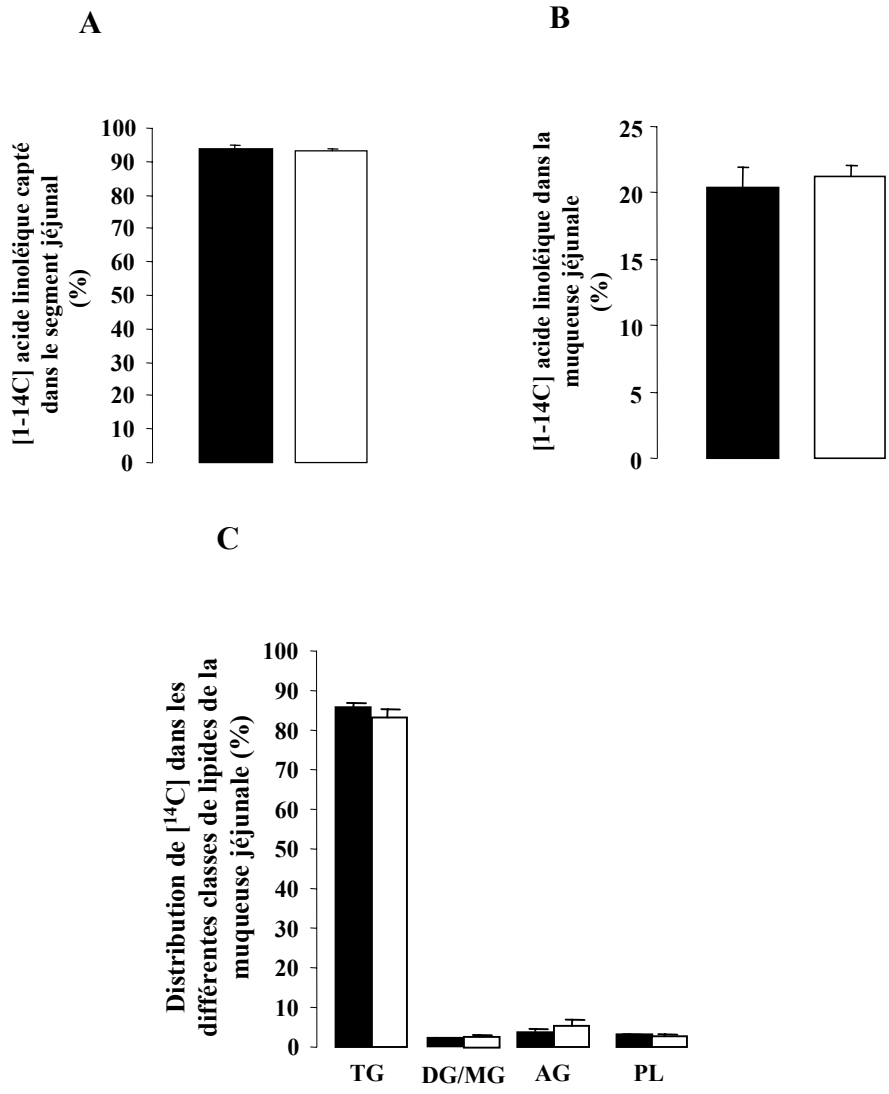


Fig. 46 : Impact de la sur-expression de PPARβ sur les capacités de captage (A) et le devenir métabolique (B-C) de [1-¹⁴C] acide linoléique au niveau de l'anse jéjunale isolée *in situ*.

A : La quantité captée de [1-¹⁴C] acide linoléique a été déterminée en soustrayant la quantité de [1-¹⁴C] acide linoléique infusée de la quantité de [1-¹⁴C] acide linoléique restant dans la lumière intestinale à la fin de l'expérience. B : Quantité de [1-¹⁴C] acide linoléique trouvé dans la muqueuse jéjunale 5 minutes après l'infusion. C : Distribution de ¹⁴C dans les différentes classes de lipides de la muqueuse. TG : triglycérides, DG/MG : diglycérider/monoglycérider, AG : acides gras, PL : phospholipider. Moyenne ± SEM, n = 6 pour les contrôler; n = 5 pour les sur-exprimant PPARβ.

Souris témoins (■), souris sur-exprimant PPARβ (□)

Ce résultat s'accompagne d'une augmentation de 26% de la consommation de lipides mais également d'une augmentation de l'excrétion fécale des lipides de 83%. Ces données bien que non significatives semblent indiquer que la sur-expression intestinale de PPAR β altère l'efficacité d'absorption des lipides en condition hyperlipidique qui pourrait être à l'origine de la perte de la masse corporelle de ces animaux.

On note cependant que les souris doubles transgéniques sont de tout même capables d'adapter leurs capacités d'absorption intestinale en régime hyperlipidique puisque le pourcentage de lipides excrétés/ lipides ingérés est amélioré de 7,9 fois par rapport au régime normolipidique chez ces animaux (tableaux 6 et 8). Cependant, cette adaptation est moins efficace que celle des animaux témoins qui présentent une augmentation de ce paramètre de 9,4 fois (tableaux 6 et 8).

Comme l'indique la figure 46, le modèle de l'anse intestinale isolée ne met pas en évidence un effet de la sur-expression intestinale de PPAR β sur le captage et le devenir entérocytaire des AGLC en condition de régime hyperlipidique. Bien que les souris doubles transgéniques aient une efficacité d'absorption intestinale moins efficace que les animaux témoins lors du régime hyperlipidique, l'utilisation de ce modèle de l'anse jéjunale isolée ne semble pas suffisamment sensible pour détecter de faibles modifications. Comme décrit précédemment, la mise à jeun pendant 16 h des souris doubles transgéniques pourrait masquer l'effet du transgène sur l'absorption surtout si celui-ci est de faible ampleur.

2 La sur-expression intestinale de PPAR β ne modifie pas l'activité proliférative du jéjunum chez les souris soumises à un régime hyperlipidique.

Comme indiqué en figure 47, l'activité proliférative de l'intestin n'est pas plus induite chez les souris doubles transgéniques que chez les témoins puisque ni l'index mitotique mesuré par le Ki-67 ni la masse relative de l'intestin ne sont modifiés (Fig. 47A et B). Ces données corrélées aux résultats de l'activité proliférative des souris doubles transgéniques soumises au régime normolipidique (Fig. 44) semblent indiquer que ces animaux sont au maximum de leur capacité de prolifération.

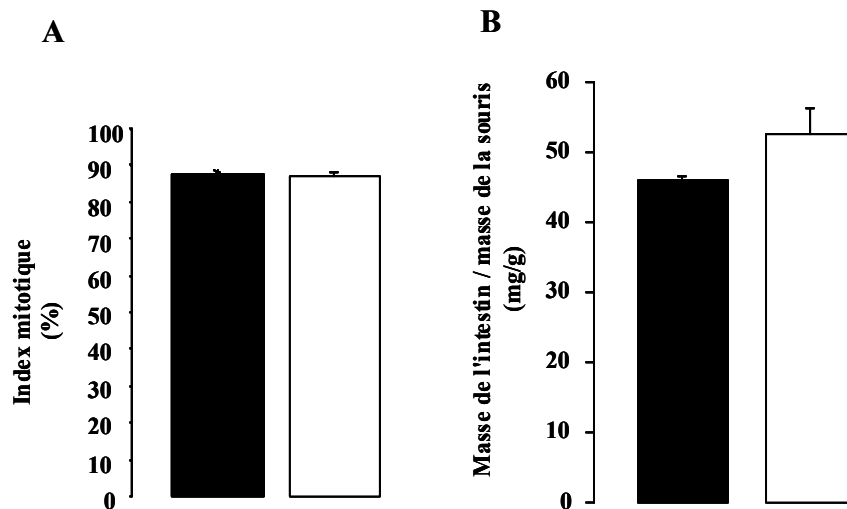


Fig. 47 : Impact de la teneur en lipides du régime sur l'index mitotique jéjunal (A) et la masse relative de l'intestin (B).

L'index mitotique correspond au rapport nombre de cellules positive au Ki-67 / nombre de cellules totales dans la crypte. Moyenne \pm SEM; n = 30 cryptes par animal, 4 souris par lot.

Souris témoins (■), souris sur-exprimant PPARβ (□)

3 La sur-expression intestinale de PPARβ diminue l'expression des gènes impliqués dans l'absorption des AGLC chez les souris soumises à un régime hyperlipidique.

Comme l'indique la figure 48, le taux d'ARNm de la FATP-4, la I-FABP et de la MTP est significativement plus faible chez les souris sur-exprimant PPARβ que chez les témoins. Même si le taux d'ARNm de FAT/CD36 et de l'apoA-IV des souris sur-exprimant PPARβ n'est pas significativement différent de celui des animaux témoins, il tend à être plus faible.

Il est intéressant de noter que contrairement au régime normolipidique, l'augmentation du taux d'ARNm de la L-FABP chez les animaux sur-exprimant PPARβ disparaît lorsque ces animaux sont soumis au régime hyperlipidique. Ce résultat est la conséquence d'une induction plus faible de la L-FABP par le régime hyperlipidique chez les animaux doubles transgéniques.

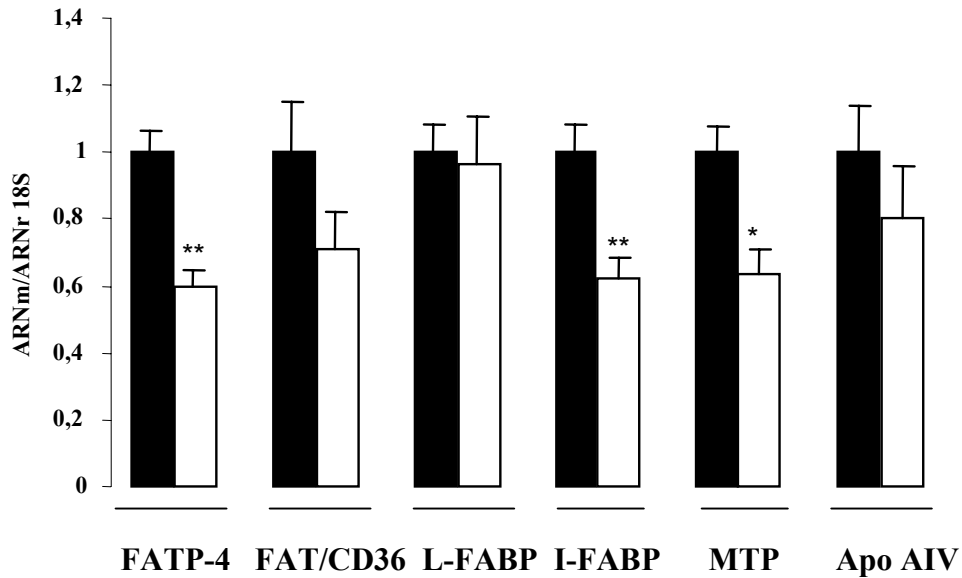


Fig. 48 : La sur-expression de PPAR β induit une diminution de l'expression de certaines LBP impliquées dans l'absorption des lipides chez les souris soumises au régime hyperlipidique.

L'expression des différents gènes a été évaluée par Northern Blotting. Le taux d'ARNm est normalisé sur celui de l'ARNr 18S. Moyenne \pm SEM; n = 4. *, p < 0,05; **, p < 0,01.

Souris témoins (■), souris sur-exprimant PPAR β (□)

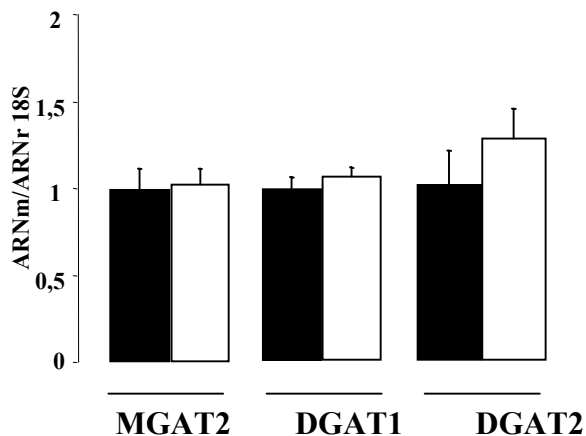


Fig. 49 : Impact de la sur-expression intestinale de PPAR β sur le niveau d'expression des enzymes impliquées dans la ré-estérification des AGC chez les souris soumises au régime hyperlipidique.

L'expression des différents gènes a été évaluée par PCR en temps réel. Le taux d'ARNm est normalisé sur celui de l'ARNr 18S. Moyenne \pm SEM; n = 4.

Souris témoins (■), souris sur-exprimant PPAR β (□)

En revanche, les résultats de la figure 49 indiquent qu'il n'y a pas de modifications significatives du taux d'ARNm des gènes impliqués dans la ré-estérification des AGLC en TG chez les souris sur-exprimant PPAR β dans ces conditions.

Compte tenu des fonctions respectives de la FATP-4, la I-FABP et de la MTP dans l'influx des AGLC, le trafic entérocytaire, la synthèse et la sécrétion des chylomicrons, la plus faible expression de ces gènes pourrait contribuer à l'adaptation moins efficace des capacités d'absorption de l'intestin des souris sur-exprimant PPAR β (Fig. 50).

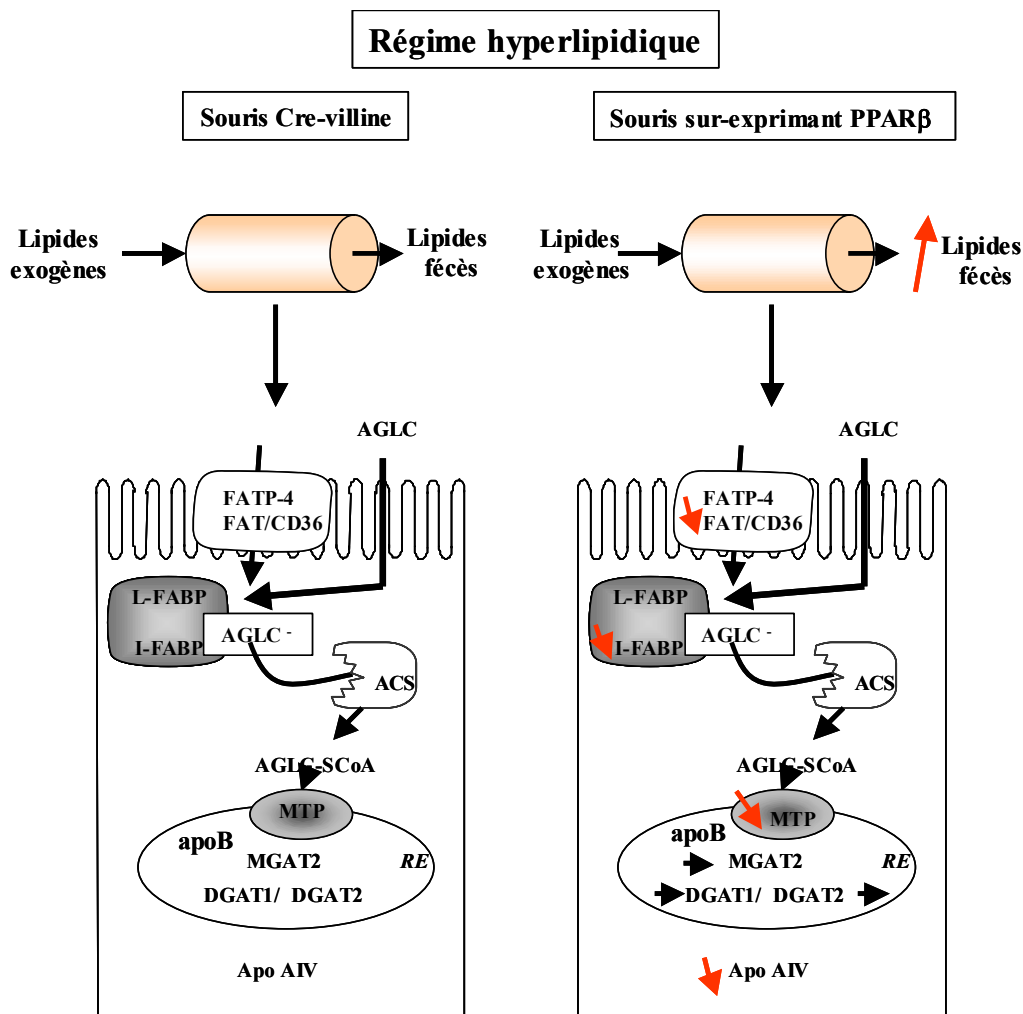


Fig. 50 : Résumé de l'impact de la sur-expression intestinale de PPAR β sur la physiologie intestinale des souris soumises à un régime hyperlipidique pendant 21 jours.

ACS : acylCoA synthétase; AGLC⁻/AGLCH : acides gras à longue chaîne ionisé/protoné; AGLC-SCoA : acylCoA; Apo : apolipoprotéine; DGAT : diacylglycérol-acyltransférase; FATP-4 : fatty acid transport protein 4; FAT/CD36 : fatty acid transporter; I-FABP : intestinal fatty acid-binding protein; L-FABP : liver fatty acid-binding protein; MGAT2 : monoacylglycérol-acyltransférase 2; MTP : microsomal triglycerides transfer protein; RE : réticulum endoplasmique

PPAR β et lipémie post-prandiale

Comme des études ont rapporté que l'utilisation d'agonistes spécifiques de PPAR β conduit à des modifications de la triglycéridémie chez la souris et le singe (Leibowitz *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2001; Akiyama *et al.*, 2004), nous avons évalué le rôle de PPAR β intestinal dans cette régulation. Ainsi, notre démarche a été d'évaluer l'impact de la sur-expression intestinale de PPAR β sur la triglycéridémie post-prandiale.

1 Effet de la sur-expression intestinale de PPAR β sur la triglycéridémie post-prandiale chez des souris soumises au régime normolipidique.

1.1 La sur-expression intestinale de PPAR β diminue la clairance des TG des chylomicrons.

Des souris mâles témoins et sur-exprimant PPAR β âgés de 7 mois ont reçu une charge en lipides (0,5 ml d'huile iso-4 utilisé pour la composition des régimes normolipidique et hyperlipidique) après un jeûne de 16h. Comme le montre la figure 51, la triglycéridémie est identique pour les deux lots d'animaux à t = 0. Ce résultat indique que PPAR β n'altère pas la triglycéridémie à jeun. En revanche, 30 min après la charge en lipides, le taux de TG des souris sur-exprimant PPAR β devient significativement supérieure à celle des animaux témoins. Ce phénomène s'amplifie en fonction du temps.

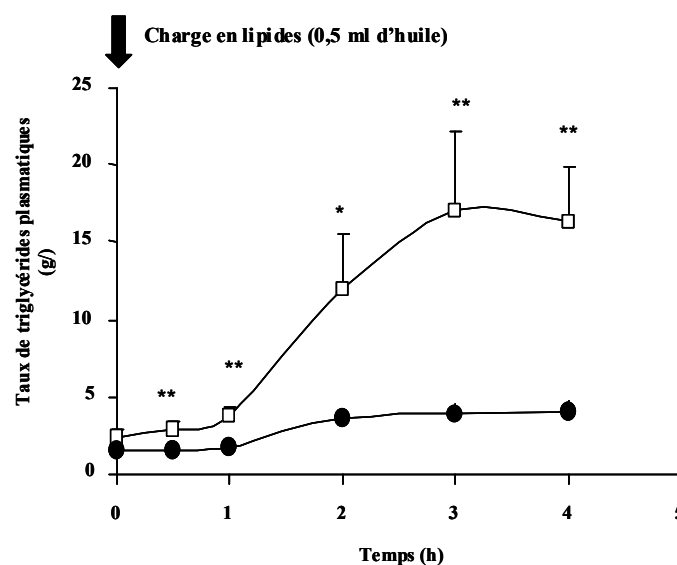


Fig. 51 : Effet de la sur-expression intestinale de PPAR β sur la triglycéridémie post-prandiale chez les souris soumises au régime normolipidique.

Suite à un jeûne de 16h, les souris témoins et sur-exprimant PPAR β ont subi une charge en lipides (0,5 ml). La triglycéridémie post-prandiale a été mesurée à différents temps après le gavage par prélèvement de sang au bout de la queue. Moyenne \pm SEM, n = 7. *, p < 0,05; **, p < 0,01.

Souris témoins (●), souris sur-exprimant PPAR β (□)

En effet, le taux de TG des souris sur-exprimant PPAR β est 4 fois plus élevé que chez les témoins 3h après la charge en lipides (Fig. 51). Cette triglycéridémie soutenue peut résulter soit d'une augmentation de la sécrétion intestinale des TG et/ou d'une diminution de la clairance des TG plasmatiques chez les animaux doubles transgéniques.

Pour répondre à cette question, l'effet de la charge en lipides a été étudié en présence de Tyloxapol, inhibiteur de la LPL. Les résultats de la figure 52 montrent que dans ces conditions, la différence de triglycéridémie n'existe plus entre les souris témoins et sur-exprimant PPAR β . Ces données démontrent que l'hypertriglycéridémie des souris sur-exprimant PPAR β ne résulte pas d'une modification de la sécrétion des TG mais plutôt d'une diminution de leur clairance plasmatique. Ainsi, PPAR β pourrait affecter la nature (taille et/ou composition en apoC) des lipoprotéines riches en TG.

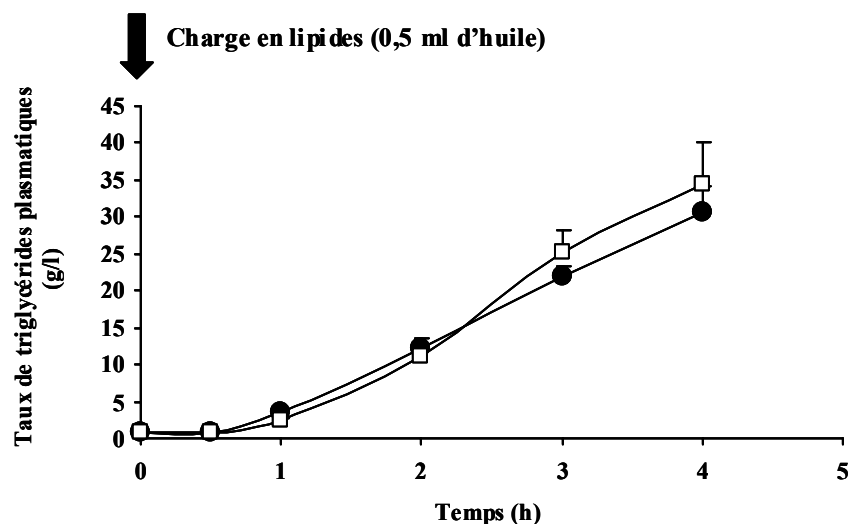


Fig. 52 : Effet de la sur-expression intestinale de PPAR β sur la triglycéridémie post-prandiale en présence de Tyloxapol chez les souris soumises au régime normolipidique.

Suite à un jeûne de 16h, les souris témoins et sur-exprimant PPAR β ont été préalablement traitées au Tyloxapol, inhibiteur de l'activité lipoprotéine lipase, avant de subir une charge en lipides (0,5 ml). La triglycéridémie post-prandiale a été mesurée à différents temps après le gavage par prélèvement de sang au bout de la queue. Moyenne \pm SEM, n = 8.

Souris témoins (●), souris sur-exprimant PPAR β (□)

Comme le foie sécrète également ce type de lipoprotéines, nous avons voulu vérifier que les TG hépatiques ne contribuent pas à ces modifications de la triglycéridémie. Pour ce faire, le taux de TG plasmatiques a été mesuré chez des souris traitées au Tyloxapol (Triton

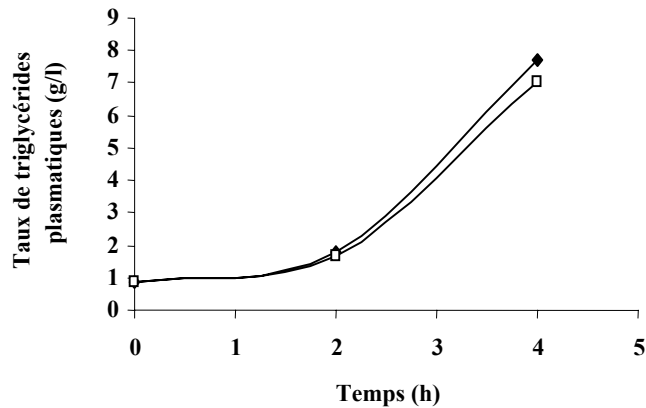


Fig. 53 : Impact de la sur-expression intestinale de PPAR β sur la triglycéridémie de souris à jeun.

Suite à un jeûne de 16h, les souris témoins et sur-exprimant PPAR β ont été traitées au Tyloxapol. Le taux de TG plasmatiques a été mesuré à différents temps. Moyenne \pm SEM, n = 5.

Souris témoins (●), souris sur-exprimant PPAR β (□)

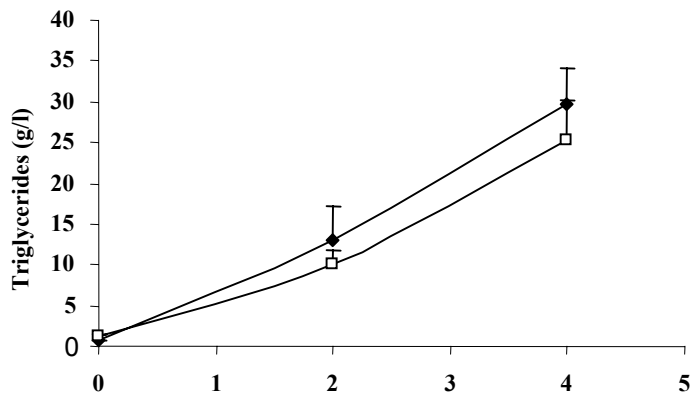


Fig. 54 : Impact de la sur-expression de PPAR β sur la sécrétion intestinale des TG chez la souris en condition nutritionnelle standard.

Suite à un jeûne de 16h, les souris témoins et sur-exprimant PPAR β ont été préalablement traitées au Tyloxapol, inhibiteur de l'activité lipoprotéine lipase, avant de subir une charge en lipides (0,5 ml). La triglycéridémie post-prandiale a été mesurée à différents temps après le gavage par prélèvement de sang au bout de la queue. Moyenne \pm SEM, n = 8.

Souris témoins (●), souris sur-exprimant PPAR β (□)

WR 1339) et maintenues à jeun pour s'affranchir des sécrétions intestinales. Les résultats de la figure 53 montrent que d'une part la sécrétion de TG à l'état à jeun est faible et d'autre part qu'elle n'est pas différente entre les deux lots d'animaux. Lorsque l'on soustrait les valeurs de triglycéridémie à jeun à celles obtenues après la charge en lipides, le taux de TG reste identique entre les deux lots d'animaux (Fig. 54). Ces résultats montrent que le taux de TG plasmatiques mesuré après la charge lipidique est porté majoritairement par les lipoprotéines d'origine intestinale.

Cette faible efficacité de clairance qui caractérise les souris sur-exprimant PPAR β est retrouvé à l'état post-prandial lors d'un régime normolipidique. En effet, les souris doubles transgéniques ont une triglycéridémie supérieure de 50% à celle des témoins à 9h du matin (Fig. 55A et B).

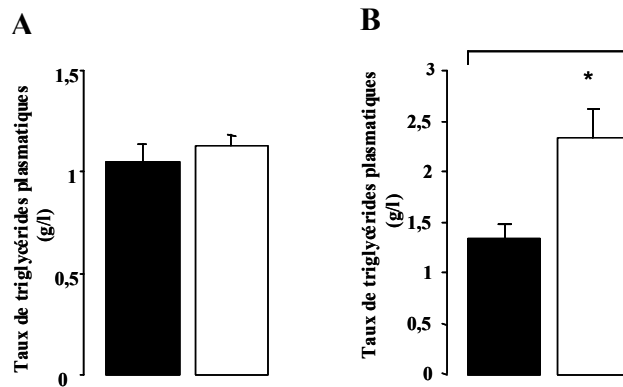


Fig. 55 : Effet de la sur-expression intestinale de PPAR β sur la triglycéridémie chez des souris à l'état de jeûne (A) et post-prandial (B).

Le taux de triglycéride plasmatique a été déterminé par mesure enzymatique à 9h du matin chez des souris à jeun 16h et en état post-prandial. Moyenne \pm SEM; n = 4. *, p < 0,05. Souris témoins (■), souris sur-exprimant PPAR β (□)

Une analyse par Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) du plasma de ces souris a permis de montrer que cette différence n'est pas portée par les VLDL puisque les souris sur-exprimant PPAR β ont le même contenu en TG dans ces fractions lipoprotéiques que les animaux témoins (Fig. 56). Par conséquent, seuls les chylomicrons, non élués par cette technique, pourraient être responsables de la différence de triglycéridémie observée entre les deux lots de souris. L'absence d'effet chez les souris doubles transgéniques à l'état à jeun confirme cette hypothèse (Fig. 55A).

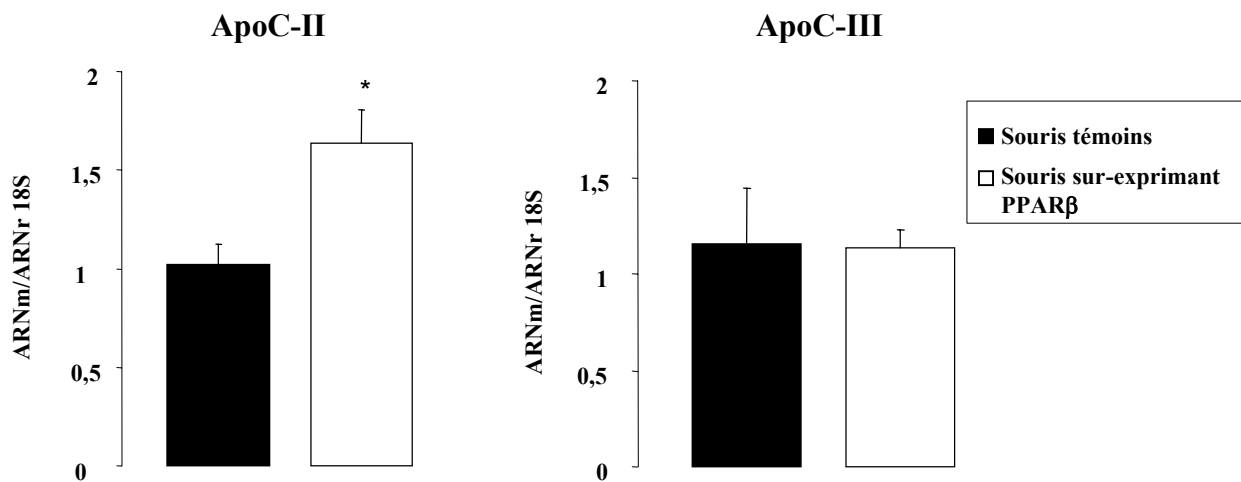


Fig. 57 : Impact de la sur-expression intestinale de PPAR β sur le niveau d'expression jéjunal de l'apoC-II et de l'apoC-III de souris soumises à un régime normolipidique.

Le niveau d'expression des gènes a été évaluée par PCR quantitative en temps réel. Le taux d'ARNm est standardisé sur le taux d'ARNr 18S. Moyenne \pm SEM, n = 6. * p < 0,05.

Souris témoins (■), souris sur-exprimant PPAR β (□)

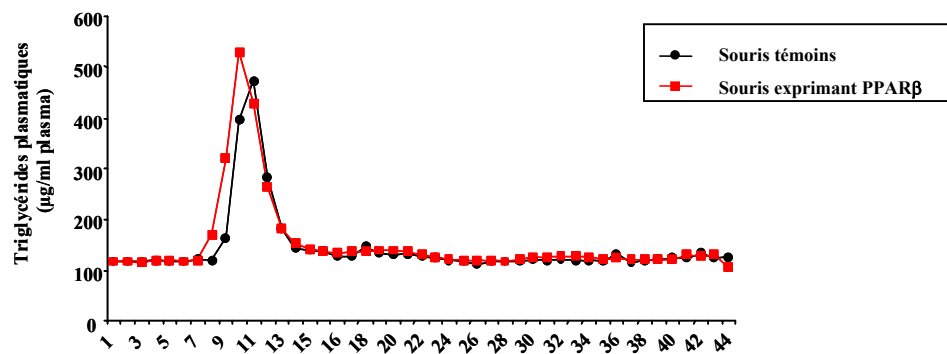


Fig. 56 : Distribution des triglycérides dans les lipoprotéines plasmatiques de souris témoins et sur-exprimant PPAR β soumise au régime hyperlipidique.

Les souris témoins et sur-exprimant PPAR β ont été soumises à un régime normolipidique. Les lipoprotéines ont été séparées par FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) et le taux de triglycérides a été dosé dans les différentes fractions éluées. Chaque point correspond à la moyenne \pm SEM de 6 souris témoins et 5 souris sur-exprimant PPAR β .

1.2 La sur-expression intestinale de PPAR β augmente l'expression intestinale de l'apoC-II.

Comme décrit dans la partie expérimentale 1, au niveau de l'intestin, le rapport en ARNm de l'apoC-II/ARNm de l'apoC-III pourrait moduler l'efficacité de la dégradation des TG. L'hypertriglycéridémie observée chez les souris doubles transgéniques pourrait s'expliquer par la formation de chylomicrons plus riches en apoC-III et plus pauvres en apoC-II.

Contrairement à notre hypothèse, le taux d'ARNm d'apoC-II est significativement plus élevé chez les souris sur-exprimant PPAR β que chez les animaux témoins au niveau du jéjunum alors que le niveau d'expression d'apoC-III est identique entre les deux lots d'animaux (Fig. 57). L'induction du taux d'ARNm de l'apoC-II semble indiquer que ce gène tout comme la L-FABP pourrait être une cible de PPAR β .

Ces résultats indiquent que les niveaux d'expression des apoC-II et C-III ne peuvent expliquer l'hypertriglycéridémie des souris sur-exprimant PPAR β . Par conséquent, un autre facteur inhibe l'efficacité de la clairance.

1.3 La sur-expression intestinale de PPAR β ne modifie pas le nombre de chylomicrons sécrétés.

Comme décrit précédemment, le nombre et/ou la taille des chylomicrons conditionnent également l'efficacité de clairance des TG. Afin de connaître si des modifications du nombre de particules pouvaient expliquer l'hypertriglycéridémie observée chez les souris doubles transgéniques, nous avons mesuré le taux d'apoB48 sanguin 4h après la charge en lipides chez les deux lots de souris préalablement traitées au Tyloxapol. Comme l'indique la figure 58, le taux d'apoB48 sécrété 4h après la charge en lipides n'est pas différent entre les deux lots de souris. Ce résultat indique que le nombre de chylomicrons sécrétés est identique et donc que seule l'augmentation ou la diminution de la taille des chylomicrons pourrait être le paramètre expliquant l'hypertriglycéridémie des souris sur-exprimant PPAR β .

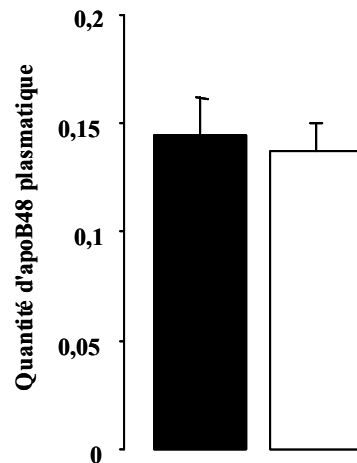


Fig. 58 : Quantité d'apoB48 plasmatique 4h après une charge en lipides.

Un prélèvement de sang a été réalisé avant et 4h après la charge en lipides chez des souris témoins et sur-exprimant PPAR β à jeun 16h et traitées au Tyloxapol. Le plasma obtenu a été déposé sur gel SDS-PAGE. Après coloration au Bleu de Coomassie, le gel a été analysé par un densitomètre (Biorad GS800). Moyenne \pm SEM, n = 4. Souris témoins (■), souris sur-exprimant PPAR β (□).

2 Effet de la sur-expression intestinale de PPAR β sur la triglycéridémie post-prandiale chez des souris soumises au régime hyperlipidique.

Puisque le régime hyperlipidique induit une plus faible triglycéridémie chez les souris témoins, nous avons voulu savoir si la sur-expression intestinale de PPAR β était à l'origine de ce phénomène.

2.1 La sur-expression intestinale de PPAR β semble induire une rétention des TG dans la muqueuse.

La triglycéridémie post-prandiale a été mesurée chez des souris mâles âgés de 7 mois soumises au régime hyperlipidique pendant 3 semaines. La figure 59 montre que le taux de TG plasmatiques n'est pas significativement différent entre les souris sur-exprimant PPAR β et les témoins après une charge en lipides contrairement à ce que nous avons observé en régime normolipidique (Fig. 44). Ces résultats indiquent que l'impact de la sur-expression de PPAR β sur la triglycéridémie est annulé quand les souris sont soumises au régime hyperlipidique.

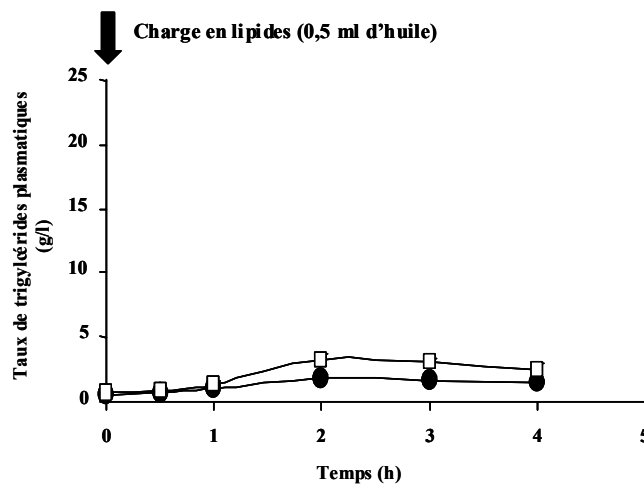


Fig. 59 : Effet de la sur-expression intestinale de PPAR β sur la triglycéridémie post-prandiale chez les souris soumises au régime hyperlipidique.

Suite à un jeûne de 16h, les souris témoins et sur-exprimant PPAR β soumises au régime hyperlipidique ont subi une charge en lipides (0,5 ml). La triglycéridémie post-prandiale a été mesurée à différents temps après le gavage par prélèvement de sang au bout de la queue. Moyenne \pm SEM, n = 7 pour les témoins et n = 8 pour les sur-exprimant PPAR β . Souris témoins (●), souris sur-exprimant PPAR β (□).

Comme la clairance des chylomicrons est diminuée chez les souris sur-exprimant PPAR β en condition normolipidique, l'absence de différence de triglycéridémie en régime hyperlipidique peut s'expliquer par une amélioration de ce paramètre. Pour éprouver cette hypothèse, nous avons mesuré la triglycéridémie après une charge en lipides en présence de Tyloxapol.

La figure 60 indique que la sur-expression intestinale de PPAR β ne modifie pas de manière significative la sécrétion des TG. Toutefois, la triglycéridémie des souris doubles

transgéniques est inférieure à celle des témoins pour les temps 2, 3 et 4h (Fig. 60). Cette plus faible triglycéridémie pourrait traduire une diminution de la sécrétion des TG.

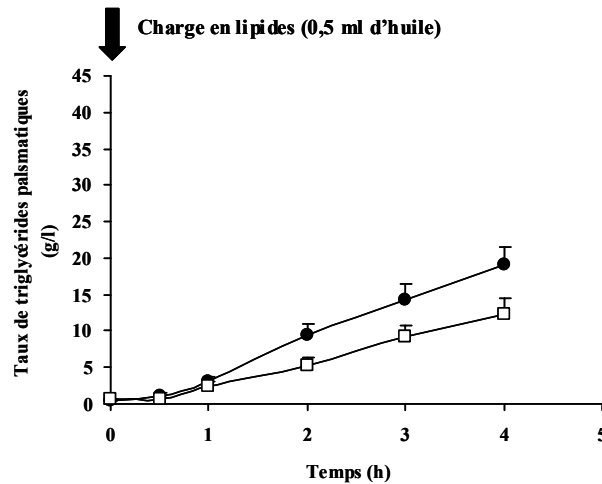


Fig. 60 : Effet de la sur-expression intestinale de PPAR β sur la sécrétion des TG chez les souris en régime hyperlipidique.

Suite à un jeûne de 16h, les souris témoins et sur-exprimant PPAR β en régime hyperlipidique ont été préalablement traitées au Tyloxapol, inhibiteur de l'activité lipoprotéine lipase, avant de subir une charge en lipides (0,5 ml). La triglycéridémie post-prandiale a été mesurée à différents temps après le gavage par prélèvement de sang au bout de la queue. Moyenne \pm SEM, n = 6. Souris témoins (●), souris sur-exprimant PPAR β (□).

Les mesures de l'apoB48 sanguine confortent cette hypothèse puisque 4h après la charge en lipides, le taux d'apoB48 est plus faible chez les souris sur-exprimant PPAR β que chez les témoins (Fig. 61).

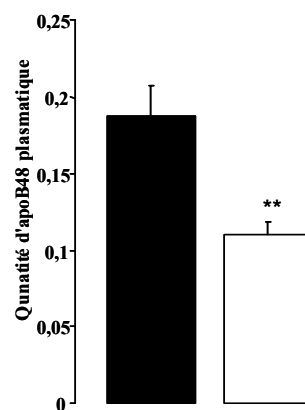


Fig. 61 : Quantité d'apoB48 plasmatique 4h après une charge en lipides.

Un prélèvement de sang a été réalisé avant et 4h après la charge en lipides chez des souris témoins et sur-exprimant PPAR β à jeun 16h et traitées au Tyloxapol. Le plasma obtenu a été déposé sur gel SDS-PAGE. Après coloration au Bleu de Coomassie, le gel a été analysé par un densitomètre (Biorad GS800). Moyenne \pm SEM, n = 5. ** p < 0,01. Souris témoins (■), souris sur-exprimant PPAR β (□)

Le défaut d'induction du niveau d'expression jéjunale de la MTP chez les souris sur-exprimant PPAR β en régime hyperlipidique pourrait également contribuer à cette accumulation de TG au niveau de la muqueuse (Fig. 48). L'hypothèse d'une rétention entérocytaire sera confirmée par la mesure des TG dans la muqueuse, 4h après la charge en lipides chez ces animaux.

2.2 La sur-expression intestinale de PPAR β ne modifie pas l'expression des apoC-II et C-III au niveau du jéjunum.

Cette diminution de la sécrétion n'exclue pas une modification de la clairance des TG puisque la triglycéridémie des souris sur-exprimant PPAR β est légèrement supérieure à celle des témoins. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré comme précédemment le niveau d'expression jéjunale des apoC-II et C-III. La figure 62 montre que la sur-expression intestinale de PPAR β ne modifie ni le taux d'ARNm jéjunale de l'apoC-II ni celui de l'apoC-III chez les souris témoins et doubles transgéniques.

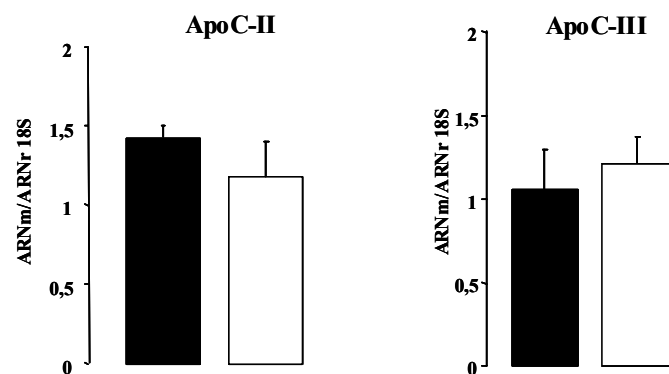


Fig. 62 : Effet de la sur-expression intestinale de PPAR β sur le niveau d'expression jéjunale de l'apoC-II et de l'apoC-III chez des souris soumises à un régime hyperlipidique.

Le niveau d'expression des gènes a été évalué par PCR quantitative en temps réel. Le taux d'ARNm est standardisé sur le taux d'ARNr 18S. Moyenne \pm SEM, n = 4. Souris témoins (■), souris sur-exprimant PPAR β (□).

Nous pouvons remarquer que l'augmentation du taux d'ARNm de l'apoC-II chez les souris sur-exprimant PPAR β n'existe plus dans ces conditions. Ces données indiquent que le taux d'ARNm de l'apoC-II des souris témoins est plus induite que celle des animaux doubles transgéniques par le régime hyperlipidique tout comme la L-FABP. Puisque les apoC ne sont

pas modifiées et que la clairance est altérée, alors le seul facteur pouvant expliquer ces différences pourrait être la taille des chylomicrons sécrétés par l'intestin.

Ensemble, ces résultats montrent le rôle de PPAR β dans la clairance et la sécrétion des TG plasmatiques. D'après nos résultats, la sur-expression intestinale de PPAR β conduirait à des modifications de structuration des chylomicrons. Il semblerait que les souris doubles transgéniques sécrètent moins de TG dans des chylomicrons probablement de petite taille.

3 Effet de la sur-expression intestinale de PPAR β sur la cholestérolémie post-prandiale chez des souris soumises au régime normolipidique.

Parallèlement à ces modifications de triglycéridémie, la sur-expression intestinale de PPAR β a également un impact sur la cholestérolémie post-prandiale. En effet, nos résultats montrent qu'à l'état à jeun, les souris sur-exprimant PPAR β ont un taux de cholestérol plasmatique identique à celui des animaux témoins (Fig. 63A) alors qu'en situation post-prandiale normolipidique, la cholestérolémie des souris doubles transgéniques est supérieure de 30% à celle des témoins (Fig. 63B).

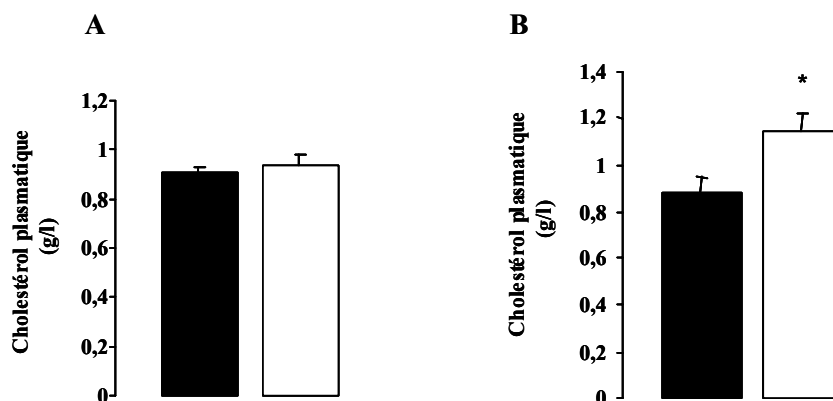


Fig. 63 : Effet de la sur-expression intestinale de PPAR β sur la cholestérolémie chez des souris à l'état de jeûne (A) et post-prandial (B).

Le taux de cholestérol plasmatique a été déterminé par mesure enzymatique à 9h du matin chez des souris à jeun 16h et en état post-prandial. Moyenne \pm SEM; n = 5. *, p < 0,05.

Souris témoins (■), souris sur-exprimant PPAR β (□)

L'analyse du profil lipoprotéique des souris en période post-prandiale montre que la sur-expression intestinale de PPAR β affecte la teneur en cholestérol des fractions VLDL et HDL (Fig. 64).

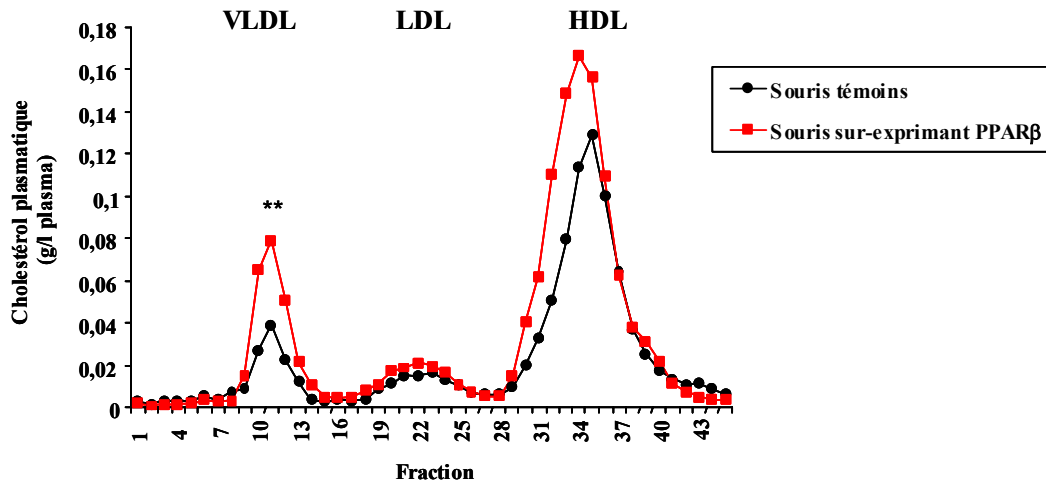


Fig. 64 : Distribution du cholestérol dans les lipoprotéines plasmatiques de souris témoins et sur-exprimant PPAR β soumises à un régime normolipidique.

Les souris témoins et sur-exprimant PPAR β ont été soumises à un régime normolipidique. Les lipoprotéines ont été séparées par FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) et le cholestérol total a été dosé dans les différentes fractions éluées. Chaque point correspond à la moyenne \pm SEM de 7 souris témoins et 5 souris sur-exprimant PPAR β . **, $p < 0,01$.

HDL : high-density lipoprotein; LDL : low-density lipoprotein; VLDL : very low-density lipoprotein.

Cependant, cette analyse ne nous donne pas de renseignements sur la teneur en cholestérol des chylomicrons qui semble malgré tout modifiée puisque l'effet de la sur-expression intestinale sur la cholestérolémie n'existe qu'à l'état post-prandial.

Ces résultats corroborent en partie les travaux de Oliver *et al.* et de Leibowitz *et al.* montrant une augmentation du cholestérol dans la fraction HDL chez des singes obèses et des souris db/db traités par un agoniste spécifique de PPAR β (Leibowitz *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2001). Nos données indiquent que la sur-expression intestinale de PPAR β semble altérer le métabolisme post-prandiale entérocytaire du cholestérol.

L'absorption du cholestérol, illustrée par la figure 65, est un processus multi-étapes (captage, métabolisme entérocytaire, assemblage et sécrétion des lipoprotéines) régulé par de nombreux gènes. Elle peut avoir lieu tout le long de l'intestin grêle, principalement au niveau du duodénum et du jéjunum proximal.