

N° d'ordre : 2445

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE BORDEAUX I

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DU VIVANT, GEOSCIENCES,
SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

Anabelle REDONNET

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION

**ETUDE DE LA FONCTIONNALITE DE LA VITAMINE A LORS D'UNE
PRISE DE POIDS D'ORIGINE ALIMENTAIRE : APPROCHES
EXPERIMENTALE ET BIOMEDICALE**

Soutenu le : 18 décembre 2001

Après avis de:

Mme LAVILLE Martine, Professeur, Université Claude Bernard, Lyon I.

M. MARTINEZ J. Alfredo, Professeur, Université de Navarre, Pampelune, Espagne.

Devant la commission d'examen formée de :

M. GARCIN Henri, Professeur Emérite, Université Bordeaux 1

Président

Mme COMBE Nicole, Ingénieur de Recherche ITERG, Bordeaux

Rapporteur

M. GIN Henri, Professeur, Université Bordeaux 2

Examineurs

M. HIGUERET Paul, Professeur, Université Bordeaux 1

Mme LAVILLE Martine, Professeur, Université Claude Bernard, Lyon 1

M. MARTINEZ J. Alfredo, Professeur, Université de Navarre, Pampelune, Espagne

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur **Paul HIGUERET** pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour m'avoir confié ce sujet de thèse des plus intéressants. Trouvez dans ce travail l'expression de toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur **Henri GARCIN**, je tiens tout particulièrement à renouveler mes plus sincères remerciements pour avoir accepté d'être président de mon jury de thèse. Instigateur de la thématique qui a amené mon sujet de thèse, je lui suis d'autant plus reconnaissante d'avoir cru en l'"aventure lipides", sans cela mon sujet n'aurait pas vu le jour... et quel dommage ! Veuillez croire en l'expression de ma sincère reconnaissance et de ma profonde gratitude.

J'accorde à Madame le Professeur **Martine LAVILLE** toute ma gratitude pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail et ainsi de m'avoir accordé de son précieux temps. Je lui exprime également ma reconnaissance pour l'enthousiasme dont elle a fait part concernant ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur **Alfredo MARTINEZ** qui a su se mettre à ma disposition en tant que rapporteur de cette thèse. Malgré la distance et la barrière de la langue il s'est néanmoins montré très à l'écoute de ce travail et a su me procurer de précieux conseils et commentaires. Pour tout cela je lui témoigne toute ma gratitude.

Je tiens à vous exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur **Henri GIN** pour avoir accepté d'examiner ces travaux mais également pour cette fructueuse collaboration qui a donné à ma thèse sa dimension. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Je remercie également Madame **Nicole COMBE**, Ingénieur de Recherches, de m'avoir fait l'honneur d'être présente en tant qu'examineur de cette thèse et pour sa gentillesse et ses conseils.

Je tiens à remercier sincèrement Madame **Catherine NOEL-SUBERVILLE**, Maître de Conférences, pour son aide et surtout sa patience, et pour avoir contribué, grâce à ses qualités humaines, à rendre l'atmosphère de travail particulièrement chaleureuse. Je lui adresse un petit clin d'œil pour l'épreuve à venir et lui souhaite de poursuivre au mieux cette passionnante thématique.

Je tiens également à remercier tout particulièrement,

Valérie ENDERLIN pour son amitié, son soutien morale et sa précieuse aide dans la dernière ligne droite; Véronique PALLET, pour ses précieux conseils et sa bonne humeur et Serge ALFOS, pour sa disponibilité et sa sympathie.

Stéphane BONILLA, pour m'avoir beaucoup appris, conseillé et soutenu, je lui souhaite vivement la réussite qu'il mérite; Carole BOUE, pour m'avoir formée et fourni les "témoins" de ce travail; Marianne HUSSON et Laetitia POIRIER pour leur contribution à ce travail, leur précieuse aide et leur sympathie. Même si Marianne a fuit "le gras" pour lui préférer l'organe noble, je lui adresse tout de même mes plus vifs encouragements pour la suite.

Rachel GROUBET, à qui je souhaite une grande réussite dans un futur proche... Bon courage. Sans oublier Catherine FEART, Catherine BOUCHERON et Barbara DELAGE à qui j'adresse de très sincères encouragements pour mener à bien leur travail de thèse.

Isabelle GAY qui, telle une Périgourdine qui se respecte, a su me conseiller et m'aider dans plus d'une tâche administrative; Laurent CAUNE, pour s'être occupé tout d'abord de mes bébés puis de mon bébé et Liliane REGNIER, pour toutes ses attentions et sa gentillesse.

Enfin, je remercie vivement *mes parents*, de m'avoir suivie et supportée dans cette épreuve et tout au long de mon parcours. Je leur suis également très reconnaissante pour tous leurs encouragements et la confiance qu'ils m'ont accordé même s'ils n'en voyaient plus le bout ! A *Nelly*, ma sœur, et ma nièce, *Chloé* pour leur soutien moral et leurs encouragements, merci.

Je terminerai mes remerciements par *Ludo* qui a toujours été à mes cotés et qui a le plus épongé les humeurs négatives (certes rares !) dont j'ai pu faire preuve au cours de ce travail. Je le remercie de m'avoir prise en charge pendant ma rédaction, me libérant ainsi des corvées nécessaires à la vie quotidienne. Un petit merci également à mon plus fidèle auditoire lors des répétitions de mon oral de thèse, Max et Zoé.

J'adresse également à *Alex, Anne, Bertrand, Carole, Delphine, Fred, J-C, Nadège, Nat, Sarah, Vincent*, et tous ceux que je ne cite pas mais à qui je pense quand même, un grand merci pour leurs précieux et indispensables soutiens affectif et moral.

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| Sommaire | 1 |
| Abréviations | 7 |
| Listes des figures et des tableaux | 9 |
| | 13 |
| CHAPITRE I : CONTEXTE SCIENTIFIQUE DE L'ETUDE | |
| I. Implications de l'alimentation dans la santé humaine | 13 |
| II. Les nutriments modulateurs nucléaires | 15 |
| 1. Les acides gras | 15 |
| 1.1. Rappels sur le métabolisme des acides gras | 15 |
| 1.1.1. Source et transport | 15 |
| 1.1.2. Métabolisme | 17 |
| 1.1.3. Stockage | 19 |
| 1.2. Rôles biologiques des acides gras d'origine alimentaire | 20 |
| 2. La vitamine A | 21 |
| 2.1. Rappels sur le métabolisme de la vitamine A | 21 |
| 2.2.1. Source et stockage | 21 |
| 2.2.2. Métabolisme | 24 |
| 2.2. Rôles biologiques de la vitamine A | 25 |
| 3. Interactions métaboliques | 27 |
| 3.1. Interactions des acides gras et de la vitamine A | 27 |
| 3.2. Interactions des acides gras et la vitamine A avec les hormones thyroïdiennes | 28 |
| III. Mode d'action nucléaire | 29 |
| 1. Les récepteurs nucléaires | 29 |
| 1.1. La superfamille des récepteurs nucléaires | 29 |
| 1.2. Structure générale des récepteurs nucléaires | 32 |
| 1.3. Eléments de réponse et mode d'action | 33 |
| 1.4. Rôle des cofacteurs de transcription | 34 |

| | |
|---|----|
| 2. Récepteurs de l'acide rétinoïque | 35 |
| 2.1. Structure | 35 |
| 2.2. Distribution | 36 |
| 2.3. Gènes régulés par l'acide rétinoïque | 37 |
| 3. Le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes | 38 |
| 3.1. Structure | 38 |
| 3.2. Distribution | 39 |
| 3.3. Gènes régulés par le PPAR | 39 |
| 3.4. Tissus cibles | 40 |
| 3.4.1. Le foie | 40 |
| 3.4.2. Le tissu adipeux blanc | 42 |
| 3.4.2.1. Composition | 44 |
| 3.4.2.2. Adipogenèse | 45 |
| 4. Interactions entre les voies de signalisation des lipides et de la vitamine A | 46 |
| IV. Présentation du projet de recherche | 49 |
| CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES | 51 |
| I. Modèles d'études | 51 |
| 1. Etude biomédicale | 51 |
| 1.1. Recrutement des sujets participant à l'étude | 51 |
| 1.1.1. Critères d'inclusion | 52 |
| 1.1.2. Critères d'exclusion | 52 |
| 1.2. Enquêtes alimentaires | 53 |
| 1.3. Typage phénotypique des patients | 53 |
| 1.4. Prélèvements des échantillons biologiques | 53 |
| 2. Approche expérimentale | 54 |
| 2.1. Les animaux | 54 |
| 2.2. Les régimes expérimentaux | 54 |
| II. Méthodes d'analyses biochimiques et moléculaires | 55 |
| 1. Analyses lipidiques | 55 |
| 1.1. Analyses du tissu adipeux et du plasma | 55 |
| 1.1.1. Extraction des lipides | 55 |
| 1.1.2. Préparation des esters méthyliques d'acides gras (EMAG) | 57 |
| 1.2. Préparation de la fraction microsomale de foie et dosage des acides gras | 57 |

| | |
|---|-----------|
| 1.3. Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse | 58 |
| 1.4. Dosages du cholestérol et des triglycérides sériques chez le rat | 58 |
| 2. Quantification des ARNm par la méthode traditionnelle de transcription inverse et d'amplification enzymatique en chaîne (RT-PCR) semi-quantitative et de RT-PCR en temps réel | 60 |
| 2.1. Principe de la RT-PCR | 60 |
| 2.2. Amorces oligonucléotidiques | 61 |
| 2.3. Mise en œuvre de la méthode | 61 |
| 2.3.1. Extraction des ARNs totaux | 61 |
| <i><u>Dans le foie des rats</u></i> | 61 |
| <i><u>Dans le tissu adipeux blanc des rats</u></i> | 64 |
| <i><u>Dans le tissu adipeux blanc humain</u></i> | 66 |
| 2.3.2. Contrôle de la qualité et dosage des ARNs obtenus | 67 |
| 2.3.3. Quantification des ARNm | 68 |
| 2.3.3.1. Préparation de l'ADNc | 68 |
| <i><u>Pour la PCR semi-quantitative</u></i> | 68 |
| <i><u>Pour la PCR en temps réel</u></i> | 68 |
| 2.3.3.2. Quantification par RT-PCR | 69 |
| <i><u>Amplification enzymatique en chaîne</u></i> | 69 |
| <i><u>Analyse des produits d'amplification</u></i> | 70 |
| <i><u>Expression des résultats</u></i> | 70 |
| 2.3.3.3. Quantification par la technique de PCR en temps réel | 72 |
| <i><u>Principe</u></i> | 72 |
| <i><u>Amplification enzymatique en chaîne</u></i> | 74 |
| <i><u>Expression des résultats</u></i> | 75 |
| 3. Etudes des propriétés de liaison des récepteurs nucléaires de la triiodothyronine et de l'acide rétinoïque | 78 |
| 3.1. Préparation des noyaux des cellules hépatiques | 78 |
| 3.2. Etude des propriétés de liaison des récepteurs nucléaires de la triiodothyronine | 78 |
| 3.3. Etude des propriétés de liaison des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque | 79 |
| III. Traitement statistique des données | 82 |
| CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS | 83 |
| PARTIE I. APPROCHE EXPERIMENTALE : Effets d'un régime hyperlipidique induisant un surpoids sur l'expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine dans le foie et le tissu adipeux de rats | 87 |

| | |
|--|-----|
| 1. Résultats | 87 |
| 1.1. Caractérisation du modèle expérimental | 87 |
| 1.1.1. Consommation alimentaire | 88 |
| 1.1.2. Croissance pondérale | 90 |
| 1.1.3. Statut lipidique des animaux soumis au régime cafétéria | 90 |
| 1.1.3.1. Mesures de paramètres sériques | 90 |
| 1.1.3.2. Composition en acides gras des phospholipides des microsomes hépatiques | 93 |
| 1.1.3.3. Composition en acides gras du tissu adipeux abdominal | 94 |
| 1.2. Effets d'un régime cafétéria administré pendant une période de 8 jours sur l'expression des récepteurs nucléaires dans le foie des rats | 98 |
| 1.2.1. Propriétés de liaisons et taux des ARNm des RARs et des TRs | 98 |
| 1.2.2. Expression du PPAR α , de l'acyl-Coenzyme A oxydase (ACO) et de RXR α | 100 |
| 1.2.2.1. Choix des paramètres étudiés | 100 |
| 1.2.2.2. Taux des ARNm de PPAR α et de l'ACO | 101 |
| 1.3. Effets d'un régime cafétéria administré pendant une période de 28 jours sur l'expression des récepteurs nucléaires dans le foie et le tissu adipeux blanc des rats. | 101 |
| 1.3.1. Propriétés de liaison et taux des ARNm des RARs et des TRs dans le foie | 101 |
| 1.3.2. Expression de PPAR α et de l'ACO dans le foie de rats | 104 |
| 1.3.3. Expression des RAR α , TR $\alpha_1\beta_1$, RXR α et PPAR γ_2 dans le tissu adipeux abdominal de rats | 105 |
| 1.3.3.1. Choix des paramètres étudiés | 105 |
| 1.3.3.2. Taux des ARNm des récepteurs nucléaires | 105 |
| 2. Discussion partielle | 107 |
| 2.1. Régime hyperlipidique et prise de poids | 107 |
| 2.2. Régime inducteur d'obésité et modification de l'expression des PPARs dans le foie et le tissu adipeux | 109 |
| 2.3. Régime inducteur d'obésité et diminution de l'expression des RARs et des TRs dans le foie et le tissu adipeux blanc | 111 |
| 2.3.1. Rappels concernant la régulation de l'expression des RARs | 111 |
| 2.3.2. Rappels concernant la régulation de l'expression des TRs | 112 |
| 2.3.3. Modification de l'expression des récepteurs nucléaires et biodisponibilité du ligand | 114 |
| 2.3.3.1. Régime hyperlipidique et expression des RARs | 114 |
| 2.3.3.2. Régime hyperlipidique et expression des TRs | 116 |

| | |
|--|-----|
| 2.3.4. Interactions des récepteurs nucléaires : rôle du récepteur de l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque (RXR) | 119 |
| 2.4. Conséquences potentielles des modifications d'expression de ces récepteurs nucléaires sur développement du tissu adipeux | 122 |
| 3. Conclusion | 125 |
| Partie II : ETUDE BIOMEDICALE | 126 |
| I : Etude nutritionnelle sur une population de sujets sains et de sujets obèses | 127 |
| 1. Résultats | 127 |
| 1.1. Caractérisation de la population étudiée | 127 |
| 1.2. Consommation alimentaire | 129 |
| 1.3. Statuts lipidiques | 131 |
| 1.3.1. Mesures des paramètres sériques | 131 |
| 1.3.2. Composition en acides gras du plasma | 132 |
| 1.3.3. Composition en acides gras du tissu adipeux | 134 |
| 2. Conclusion | 139 |
| II. Etudes des récepteurs nucléaires PPAR, RAR et TR chez une population humaine obèse et chez une population témoin | 140 |
| 1. Résultats | 140 |
| 1.1. Caractérisation de la population | 141 |
| 1.2. Résultats concernant l'expression des PPARs | 141 |
| 1.3. Résultats concernant l'expression des RARs | 146 |
| 1.4. Résultats concernant l'expression des TRs | 149 |
| 2. Discussion partielle | 152 |
| 2.1. PPAR γ et le contrôle adipocytaire | 152 |
| 2.2. Expression de RAR α et de TR β au cours du développement adipocytaire | 154 |
| 2.3. Conséquences des modifications de l'expression des récepteurs nucléaires PPARs, RARs et TRs | 155 |
| 3. Conclusion | 158 |
| CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION | 159 |
| Références bibliographiques | 167 |

ABREVIATIONS

| | |
|---------|--|
| ACO | acyl-CoA oxydase |
| ADD1 | adipocyte differentiation and determination factor |
| ADN | acide désoxyribonucléique |
| ADNc | acide désoxyribonucléique complémentaire |
| AET | apport énergétique total |
| AGL | acide gras libre |
| AGMI | acides gras monoinsaturés |
| AGPI | acides gras polyinsaturés |
| AGS | acides gras saturés |
| AP1 | activator protein 1 |
| ARN | acide ribonucléique |
| ARNm | acide ribonucléique messenger |
| C/EBP | CCAAT-enhancer –binding protein |
| Cmax | capacité maximale de liaison |
| CRABP | protéine cellulaire liant l'acide rétinoïque |
| CT | cholestérol total |
| CPG | chromatographie en phase gazeuse |
| dCTP | désoxycytidine triphosphate |
| DNase I | désoxyribonucléase I |
| dNTP | désoxyribonucléotides |
| DO | densité optique |
| DR | direct repeat |
| DTT | dithiothréitol |
| EC | esters de cholestérol |
| EDTA | acide éthylènediaminetétraacétique |
| EMAG | ester méthylique d'acides gras |
| FABP | fatty acid binding protein |

| | |
|-----------------|--|
| GT | guanidium thiocyanate |
| HDL | lipoprotéine de haute densité |
| HETE | acide hydroxyeicosatetraenoïque |
| HODE | acide hydroxyoctadecadienoïque |
| HOMA | homeostasis model assessment |
| IAA | alcool isoamylique |
| IMC | indice de masse corporelle |
| Kd | constante de dissociation |
| LDL | lipoprotéine de faible densité |
| min | minute |
| pb | paire de bases |
| PCR | "polymerase chain reaction": amplification enzymatique en chaîne |
| PL | phospholipide |
| PPAR | récepteur activé par les proliférateurs de péroxysomes |
| PPRE | élément de réponse aux proliférateurs de péroxysomes |
| RAR | récepteur nucléaire de l'acide tout- <i>trans</i> rétinoïque |
| RARE | élément de réponse à l'acide rétinoïque |
| RT-PCR | "reverse transcription and polymerase chain reaction" |
| RXR | récepteur nucléaire de l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque |
| RXRE | élément de réponse à l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque |
| T ₂ | diiodothyronine |
| T ₃ | 3,5,3'-triiodothyronine |
| rT ₃ | réverse-T ₃ |
| T ₄ | 3,5,3',5'-triiodothyronine |
| TBG | protéine plasmatique liant la thyroxine |
| TG | triglycérides |
| TR | récepteur nucléaire de la triiodothyronine |
| TRE | élément de réponse aux hormones thyroïdiennes |
| TRH | thyrolibérine |
| TSH | thyrotropine |
| TTR | transthyrétine |
| VDR | récepteur nucléaire de la vitamine D ₃ |
| VLDL | very low density lipoprotéin |
| WHR | waist to hip ratio |

LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Liste des figures :

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Figure 1. | Métabolisme les lipides. | 18 |
| Figure 2. | Métabolisme et mode d'action de la vitamine A. | 23 |
| Figure 3. | Formules chimiques de rétinoïdes. | 26 |
| Figure 4. | Modèle illustrant la cascade de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation adipocytaire. | 47 |
| Figure 5. | Méthologie suivie pour l'analyse des lipides des différents tissus. | 59 |
| Figure 6. | Extraction des ARN totaux. | 65 |
| Figure 7. | Exemple d'une représentation semi-logarithmique d'incorporation du dCTP $\alpha^{32}\text{P}$ au cours de l'amplification des fragments d'ADNc et régression linéaire de la phase exponentielle. | 73 |
| Figure 8. | Exemple de courbes d'amplification obtenues par PCR en temps réel dans du tissu adipeux humain. | 77 |
| Figure 9. | Principales étapes de préparation des noyaux de cellules de foie de rats. | 80 |
| Figure 10. | Structure de l'acide rétinoïque et du CD367 tritié. | 81 |
| Figure 11. | Croissance pondérale des rats nourris avec les différents régimes. | 91 |
| Figure 12. | Représentation de Scatchard de l'influence d'un régime cafétéria administré chez des rats pendant 8 jours ou 28 jours sur les propriétés de liaison des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque. | 103 |
| Figure 13. | Représentation de Scatchard de l'influence d'un régime cafétéria administré chez des rats pendant 8 jours ou 28 jours sur les propriétés de liaison des récepteurs nucléaires de la triiodothyronine. | 103 |
| Figure 14. | Taux des ARNm de $\text{TR}\alpha\beta\text{1}$, $\text{RAR}\alpha$, et $\text{PPAR}\gamma$ et $\text{RXR}\alpha$ dans du tissu adipeux abdominal de rats nourris avec le régime cafétéria durant 28 jours. | 106 |
| Figure 15. | Corrélation entre les triglycérides sériques et l'IMC des patientes. | 142 |
| Figure 16. | Taux d'ARNm de $\text{PPAR}\gamma$ dans le tissu adipeux humain. | 144 |

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Figure 17. | Corrélation entre le taux d'ARNm de PPAR γ et l'IMC des patientes. | 145 |
| Figure 18. | Corrélation entre le taux d'ARNm de PPAR γ et les triglycérides sériques des patientes. | 145 |
| Figure 19. | Taux d'ARNm de RAR α dans le tissu adipeux humain. | 147 |
| Figure 20. | Corrélation entre le taux d'ARNm de PPAR γ et de RAR α dans le tissu adipeux humain. | 148 |
| Figure 21. | Taux d'ARNm de TR β dans le tissu adipeux humain. | 150 |
| Figure 22. | Relation entre les taux d'ARNm de PPAR γ et de TR β dans le tissu adipeux blanc humain. | 151 |
| Figure 23. | Relation entre les taux d'ARNm de TR β et des RAR α dans le tissu adipeux humain. | 151 |
| Figure 24. | Profils d'expression des récepteurs nucléaires dans le tissu adipeux et le foie de rats en phase de prise de poids. | 161 |
| Figure 25. | Relation entre le taux d'ARNm de RAR α et de PPAR γ dans le tissu adipeux humain. | 162 |
| Figure 26. | Représentation d'un des mécanismes d'intervention de facteurs nutritionnels et hormonaux dans l'homéostasie cellulaire. | 164 |

Liste des tableaux :

| | | |
|------------------------|--|-----|
| Tableau I. | Quelques membres de la superfamille des récepteurs nucléaires des hormones. | 31 |
| Tableau II. | Exemples de gènes du métabolisme lipidique régulés par les PPARs. | 41 |
| Tableau III. | Caractéristiques principales des PPAR α et PPAR γ . | 43 |
| Tableau IV. | Energie apportée par les lipides, les glucides et les protéines du régime (en % de l'énergie apportée par le régime). | 56 |
| Tableau V. | Composition en acides gras de la fraction lipidique des régimes standard et cafétéria. | 56 |
| Tableau VI. | Séquences des amorces oligonucléotidiques et taille des fragments amplifiés chez le rat. | 62 |
| Tableau VII. | Séquences des amorces oligonucléotidiques et taille des fragments amplifiés chez l'homme. | 63 |
| Tableau VIII a. | Consommation énergétique journalière des rats témoins et des rats nourris avec le régime cafétéria. | 89 |
| Tableau VIII b. | Consommation lipidique journalière des rats témoins et des rats nourris avec le régime cafétéria. | 89 |
| Tableau IX. | Effets d'un régime cafétéria administré pendant 8 jours ou 28 jours sur la croissance pondérale des animaux. | 91 |
| Tableau X. | Effets d'un régime cafétéria administré pendant 8 jours ou 28 jours sur les lipides sériques des animaux. | 92 |
| Tableau XI. | Proportions des acides gras des microsomes de foie chez les rats nourris avec un régime standard ou cafétéria. | 95 |
| Tableau XII. | Proportions des acides gras du tissu adipeux abdominal de rats nourris avec des régimes standard et cafétéria. | 97 |
| Tableau XIII. | Propriétés de liaison des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) et de la triiodothyronine (TR), et quantification des ARNm dans le foie des rats nourris avec le régime cafétéria pendant 8 jours. | 99 |
| Tableau XIV. | Effets d'un régime cafétéria sur le taux des ARNm des récepteurs nucléaires RXR α et PPAR α et de l'enzyme acyl-CoA oxydase (ACO) dans le foie de rats. | 102 |
| Tableau XV. | Propriétés de liaison des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) et de la triiodothyronine (TR), et quantification des ARNm dans le foie des rats nourris avec le régime cafétéria pendant 28 jours. | 102 |
| Tableau XVI. | Âges et IMC des deux populations étudiées. | 128 |

| | | |
|-----------------------|---|-----|
| Tableau XVII. | Apport énergétique total (AET) journalier d'une population obèse et d'une population témoin et pourcentages de lipides, protéines et glucides de cet AET. | 130 |
| Tableau XVIII. | Apports journaliers (% de l'apport lipidique total) en acides gras saturés (AGS), acides gras monoinsaturés (AGMI), acides gras polyinsaturés (AGPI) chez des populations non-obèses et obèses. | 130 |
| Tableau XIX. | Paramètres sériques mesurés chez les patients à jeun. | 133 |
| Tableau XX. | Caractéristiques de la population obèse. | 133 |
| Tableau XXI. | Proportions des différents acides gras dans les lipides totaux du plasma. | 135 |
| Tableau XXII. | Composition en acides gras des lipides du tissu adipeux des patients (% des acides gras totaux). | 138 |
| Tableau XXIII. | Caractéristiques des individus ayant participé à l'étude des récepteurs nucléaires. | 142 |

CHAPITRE I.
CONTEXTE SCIENTIFIQUE
DE L ETUDE

CONTEXTE SCIENTIFIQUE DE L'ETUDE

I. Implications de l'alimentation dans la santé humaine

Il est aujourd'hui admis que la balance énergétique chez l'homme s'est fortement modifiée au cours de l'histoire, et notamment lors de ce dernier siècle, avec une élévation marquée de sa consommation en graisses (Leaf et coll., 1987). De profonds changements en terme d'alimentation et d'activité physique se sont produits, en particulier chez les populations occidentales. En revanche, le profil génétique de l'homme a, quant à lui, peu évolué (Simopoulos, 1990). Ainsi, d'un point de vue strictement génétique, l'homme contemporain vit dans un environnement nutritionnel différent de celui pour lequel a été sélectionné son patrimoine génétique. Ce constat n'est sûrement pas sans conséquences sur la santé des individus, compte tenu du fait qu'il est de plus en plus vraisemblable que celle-ci est sous l'influence d'interactions entre divers facteurs environnementaux (et donc les facteurs nutritionnels) et le patrimoine génétique des individus.

On sait, depuis longtemps, que les lipides alimentaires occupent une place essentielle dans le métabolisme énergétique des organismes. Dès 1929, l'importance physiologique des lipides avait été pressentie par George et Mildred Burr qui avaient suggéré que des composants lipidiques étaient nécessaires pour la croissance et le bon développement des animaux et sûrement des hommes. Toutefois, la consommation actuellement élevée de lipides dans la plupart des pays occidentaux suscite une attention toute particulière de la part des

consommateurs, des cliniciens et des scientifiques. Cet intérêt est justifié par la mise en évidence de liens plus ou moins étroits entre une consommation riche en lipides et le développement du surpoids, voire de l'obésité.

L'obésité correspond à une hypertrophie du tissu adipeux blanc spécialisé dans le stockage et la libération des acides gras. Ces acides gras adipocytaires sont largement d'origine alimentaire d'où une relation directe entre la nutrition, le tissu adipeux et l'obésité. L'influence de la nature des acides gras alimentaires sur le développement du tissu adipeux chez l'animal est bien connue (revue dans Grocolas et Raclot, 1998). Chez l'homme, cette démonstration nécessite encore de nombreux travaux.

L'obésité d'origine nutritionnelle est actuellement considérée comme un problème de santé publique car elle est très souvent associée à d'autres pathologies telles que les maladies cardio-vasculaires, certaines atteintes respiratoires et le développement d'un diabète non insulino-dépendant, dont la fréquence est trois fois plus élevée chez les sujets obèses. L'obésité s'accompagne aussi de dyslipidémies, c'est à dire de dérèglements du métabolisme lipidique, ainsi que d'un risque accru de cancers (cancer de la prostate chez l'homme, du sein chez la femme) (Basdevant et Oppert, 1998). Les mécanismes cellulaires à l'origine des effets pro- ou anticarcinogènes des acides gras ne sont pas encore élucidés. Il a d'abord été envisagé une action sur la croissance tumorale via une modification de la composition membranaire et de la transmission de signaux extracellulaires. On sait que les acides gras sont impliqués dans un grand nombre de processus incluant des activités d'enzymes liées aux membranes, des liaisons d'hormones à leurs transporteurs ou encore la transduction de signaux extra ou intracellulaires. On sait également aujourd'hui que les acides gras influencent les processus de différenciation des cellules adipeuses (Tontonoz et coll., 1994 ; Shillabeer et Lau, 1994). En effet, ils peuvent moduler l'expression de gènes impliqués dans les processus de prolifération ou de différenciation cellulaire.

Actuellement, les recherches en nutrition s'orientent de plus en plus vers l'étude des nutriments capables de moduler l'expression génique. Parmi ces nutriments on trouve l'acide rétinoïque dont le mode d'action cellulaire est comparable à celui décrit pour les acides gras. En effet, la capacité de l'acide rétinoïque et des acides gras à moduler l'expression de gènes passe par leur liaison à un récepteur nucléaire qui appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ainsi, dans les paragraphes qui suivent nous allons successivement présenter les données actuellement connues sur le métabolisme et le mode d'action cellulaire des acides gras et de l'acide rétinoïque et préciser les interférences dont ils font l'objet.

II. Les nutriments modulateurs nucléaires

1. Les acides gras

Les recherches entreprises pour déterminer le rôle des lipides dans la physiologie cellulaire ont révélé la grande diversité d'action des acides gras. Il apparaît clairement que chaque type d'acides gras agit de façon précise et sélective au niveau des cellules. Ce constat suggère l'existence d'une organisation cellulaire contrôlant strictement le devenir et l'action des lipides dans le cytoplasme au même titre que tout autre molécule informative (hormone ou vitamine).

1.1 Rappels sur le métabolisme des acides gras (figure 1)

1.1.1 Source et transport

Les acides gras sont les constituants des lipides qui sont apportés par l'alimentation, soit sous forme libre ou sous forme de matières grasses retenues dans la trame de divers produits d'origine animale (viandes, œufs...) ou bien manufacturés, appelés lipides complexes (comme les triacylglycérols : TG, les phospholipides : PL et les esters de cholestérol : EC). Les TG et les EC sont hydrolysés dans l'estomac puis la lumière intestinale avant d'être

absorbés par les cellules épithéliales de l'intestin où ils seront à nouveau estérifiés. Ils sont alors délivrés dans la circulation générale, via le système lymphatique, dans les chylomicrons composés de TG et de lipoprotéines. Les acides gras sous forme libre sont, quant à eux, liés à des protéines spécifiques comme l'albumine ou la protéine cytoplasmique liant les acides gras (FABP). Ces deux systèmes permettent à la fois d'augmenter la quantité des acides gras présents dans les phases aqueuses et de limiter la présence d'acides gras libres, en contrôlant leur biodisponibilité, car ceux-ci sont potentiellement nocifs pour la cellule sous forme libre (Van der Vusse, 1992).

Une enzyme extracellulaire, la lipoprotéine lipase (LPL), localisée à la surface des cellules endothéliales vasculaires, hydrolyse les TG composant les chylomicrons, délivrant ainsi des acides gras pour les cellules cibles. Les chylomicrons remnants, qui sont enrichis en cholestérol, entrent ensuite dans les hépatocytes par endocytose, après hydrolyse par une lipase hépatique.

Les études menées sur l'incorporation des acides gras par les cellules suggèrent qu'elle se fait en deux étapes. Une protéine membranaire lie l'albumine associée aux acides gras et dissocie ce complexe libérant les acides gras au contact de la membrane. Une FABP associée à la membrane agit alors comme un accepteur de ces acides gras ce qui permet de les concentrer à la surface cellulaire. Par la suite, la migration transmembranaire des lipides est réalisée soit par diffusion passive, soit avec l'aide des FABPs associées à la membrane qui agissent comme translocases (revue dans Glatz et coll., 1997). La FABP compléterait ce dispositif. En effet, Wolfrum et coll. (1999) ont montré une corrélation positive entre la quantité de L-FABP (localisée dans le foie) et le flux entrant d'acides gras dans la lignée cellulaire HepG2.

Bien que les acides gras n'aient pas nécessairement besoin de ces protéines pour leur translocation, leur présence implique un rôle physiologique potentiel. L'intervention de ces protéines pourrait ainsi aboutir à une incorporation plus efficace et mieux contrôlée des acides

gras par la cellule. En outre, il est possible que ces protéines aient des affinités variables envers les différents acides gras, ce qui se traduirait alors par une absorption sélective de ceux-ci (Glatz et coll., 1997).

Dans la cellule, les protéines cytoplasmiques liant les acides gras (FABP) et les protéines liant les acyl-CoA (ACBP) sont impliquées dans le transport et le métabolisme intracellulaire des acides gras. Les FABPs comptent jusqu'à neuf types distincts localisés dans différents tissus (revue dans Van Nieuwenhoven et coll., 1996). Dans le foie, on trouve la L-FABP présente aussi dans d'autres tissus tels que le cerveau, les reins, l'épithélium intestinal, tissus qui possèdent en plus leurs propres FABPs (revue dans Glatz et coll., 1995). Ceci suggère que les différentes FABPs recensées peuvent avoir des fonctions distinctes. Il est à noter que quelques FABPs ont des affinités pour d'autres ligands. C'est le cas de la FABP du tissu adipeux qui lie l'acide rétinoïque ou de la L-FABP capable de lier certaines prostaglandines (revue dans Glatz et coll., 1995).

1.1.2. Métabolisme

Les lipides complexes provenant de l'alimentation, essentiellement des triacylglycérols, sont transformés en acides gras libres (AGL) et monoacylglycérols (MAG), tout d'abord dans l'estomac sous l'action d'une lipase linguale et surtout dans l'intestin sous l'action de la lipase pancréatique. Les AGL et les MAG ainsi générés par ces 2 lipases, seront ensuite absorbés au niveau de la muqueuse intestinale, après leur solubilisation préalable au sein de micelles de sels biliaires. Dans l'entérocyte s'effectue ensuite une resynthèse des TG, à partir des MAG et AGL, qui passent alors dans la lymphe, puis le sang, transportés par les chylomicrons.

Le foie joue un rôle central dans le métabolisme des acides gras. Selon le contexte physiologique, il dirigera soit leur incorporation dans les triacylglycérols par estérification, soit leur dégradation pour la fourniture d'énergie par la voie de la β -oxydation.

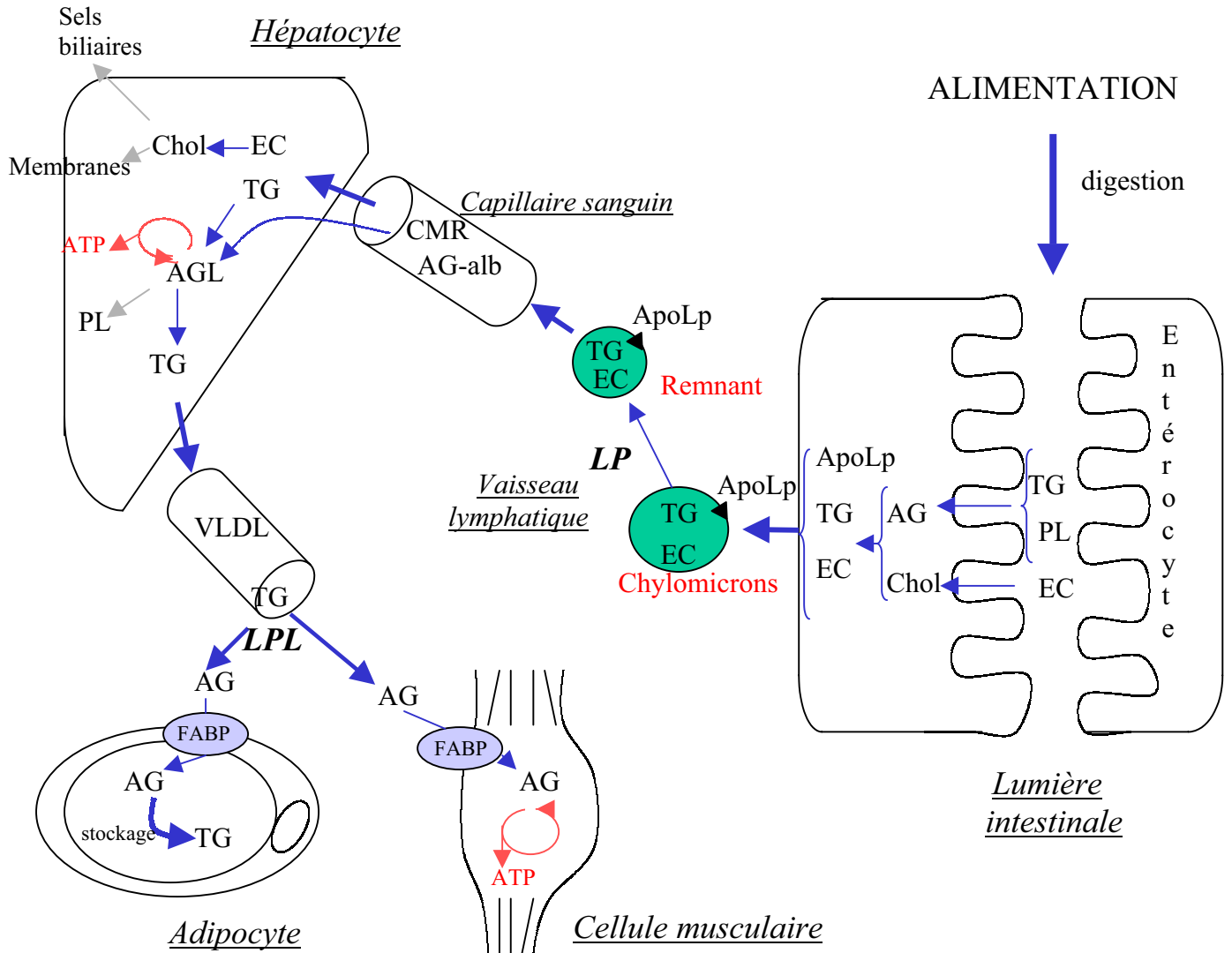


Figure 1 : Métabolisme des lipides

TG : triacylglycérol ; PL : phospholipides ; EC : esters de cholestérol ; Chol : Cholestérol non estérifié ; AG : acides gras ; ApoLp : apolipoprotéine ; LPL : Lipoprotéine Lipase ; CMR : chylomicrons remnants ; AG-alb : Acides Gras liés à l'albumine ; AGL : Acides Gras Libres ; VLDL : Lipoprotéine de très faible densité ; FABP : Protéine de transport liant les acides gras ; ATP : adénosine triphosphate.

Les acides gras incorporés dans les triacylglycérols seront sécrétés dans le sang associés à des lipoprotéines de très faible densité (VLDL), qui les relargueront dans le tissu adipeux via une lipolyse catalysée par la LPL. En cas de besoin en énergie de l'organisme ou en cas d'excès de TG plasmatiques, les acides gras seront oxydés dans le foie et le muscle. Les acides gras incorporés dans l'hépatocyte sont activés sous forme d'acyl-CoA thioéther grâce à l'action de diverses acyl-CoA synthétases (ACS). L'acyl-CoA à longue chaîne peut ensuite entrer dans la voie de la β -oxydation qui a lieu dans le peroxysome. Les acétyl-CoA produits lors de la β -oxydation sont les précurseurs de corps cétoniques, qui seront utilisés comme source d'énergie préférentielle par le muscle, le foie et le cerveau en période de jeûne prolongé.

1.1.3. Stockage

Les acides gras constituent donc la réserve énergétique de l'organisme. Dans ce but, ils sont stockés sous forme de triacylglycérols, 3 molécules d'acides gras estérifiées à un glycérol, dans les adipocytes du tissu adipeux blanc. Ces TG peuvent être composés d'un large spectre d'acides gras dont la longueur de chaîne va de 12 à 24 atomes de carbones et le nombre de doubles liaisons de 0 à 6. La composition en acides gras de ces TG reflète largement celle du régime mais n'est pas exactement identique à celle-ci. En effet, la proportion d'acides gras polyinsaturés (AGPI) est par exemple plus faible que celle contenue dans le régime (Field et coll., 1988). Les acides gras à longue chaîne (18 à 22 atomes de carbones) et/ou fortement insaturés (4 à 6 doubles liaisons) sont faiblement incorporés. Les AGPI n-3 du tissu adipeux ne reflètent pas la consommation en AGPI n-3 car ces acides gras ne se répartiraient pas de façon égale entre les TG et les PL. Il existe également des différences dans le stockage des différents AGPI. L'acide éicosapentaénoïque (EPA) (20:5 n-3) est moins efficacement stocké que l'acide docosahexaénoïque (DHA) (22:6 n-3).

La cellule adipeuse différenciée se charge donc en triglycérides jusqu'à atteindre un volume critique au-delà duquel elle "recrute" un nouveau préadipocyte. Le nombre des

cellules adipeuses peut continuer de croître si le stockage d'énergie est rendu nécessaire par un excès durable d'apport énergétique. La taille cellulaire est assez finement régulée tandis que le nombre des adipocytes peut s'accroître dans de larges proportions.

1.2. Rôles biologiques des acides gras d'origine alimentaire

En fonction de la situation physiologique et de leur nature, les acides gras se voient attribuer des fonctions très diverses. C'est ainsi que les acides gras saturés (AGS) et les acides gras monoinsaturés (AGMI) sont utilisés principalement pour l'énergie ou le stockage. Certains acides gras polyinsaturés (AGPI), essentiellement ceux à longue chaîne, servent préférentiellement pour la constitution des phospholipides membranaires, la synthèse de métabolites actifs ou la régulation d'un certain nombre de fonctions cellulaires incluant la transcription de gènes.

Les lipides possèdent un rôle structural important puisqu'ils contribuent à l'architecture membranaire. La bicouche lipidique est essentiellement constituée de lipides complexes dont 70 à 90% sont représentés par des phospholipides. Le cholestérol est également un élément constitutif important. La composition en acides gras des phospholipides est influencée par la disponibilité des acides gras dans le milieu extracellulaire, elle-même dépendante des apports alimentaires en lipides. Ainsi, la fonction structuro-modulatrice des lipides membranaires peut être modulée par les apports alimentaires en graisse.

Les lipides possèdent également des rôles fonctionnels en tant que précurseurs des éicosanoïdes, comme les prostaglandines (PG) et des leukotriènes (LT). Ils dérivent des produits de désaturation et d'élongation des acides gras estérifiés. La voie des PG aboutit notamment à la synthèse de thromboxane A₂ impliqué dans l'induction de l'agrégation plaquettaire.

Des travaux récents indiquent que les acides gras sont impliqués dans la modulation de l'expression de gènes. La fonction de second messager des lipides dans certaines voies de

signalisation cellulaire avait été bien décrite (revue dans Nishizuka, 1995) lorsque plusieurs travaux, dont ceux de Clarke et Jump (1994), ont conduit à l'hypothèse d'une action directe des acides gras sur l'expression des gènes. Par ailleurs, la découverte d'un nouveau récepteur d'hormones stéroïdes activé par les proliférateurs de peroxyosomes, le PPAR (Isseman et Green, 1990), a ouvert un large champ d'investigation sur les voies de signalisation des lipides et de leurs dérivés. En effet, Göttlicher et coll. (1992) ont rapidement montré que les acides gras pouvaient activer le PPAR devenant ainsi de bons candidats pour être les ligands naturels de ce nouveau récepteur nucléaire. Le PPAR est un facteur de transcription - inductible par son ligand - qui régule l'expression de gènes cibles en interagissant avec un élément de réponse (PPRE) localisé dans la séquence promoteur (Tugwood et coll., 1992). Les éléments de la caractérisation du PPAR sont rapportés dans un paragraphe ultérieur.

2. La vitamine A

La vitamine A est une molécule essentielle à l'organisme qui doit être apportée par l'alimentation, car l'organisme ne peut pas la synthétiser. Cependant, malgré son caractère essentiel pour de nombreux tissus, un excès de vitamine A peut être toxique. Ainsi, les quantités de vitamine A présentes au niveau cellulaire doivent être régulées de façon très stricte en fonction des besoins cellulaires.

2.1. Rappels sur le métabolisme de la vitamine A

2.2.1. Source et stockage (figure 2)

La vitamine A est un nutriment, apporté sous forme de rétinol, sous formes estérifiées du rétinol (origine animale) ou de provitamines A (constituées par les carotènes d'origine végétale). Les formes estérifiées sont hydrolysées dans la lumière intestinale avant que le rétinol soit absorbé par les entérocytes, selon une diffusion facilitée pour des concentrations physiologiques ou par diffusion passive lors d'administration de doses thérapeutiques. Dans

ces cellules, une estérification du rétinol permet son transport dans le système lymphatique (Ong et coll., 1987). La LRAT (lecithine:rétinol acyl transférase) joue un rôle prépondérant dans l'estérification du rétinol lorsque celui-ci est lié à une protéine cytoplasmique spécifique, la CRBP II ("cellular retinol binding protein") (Quick et Ong, 1990). Lorsque de grandes quantités de rétinol sont ingérées, les capacités de liaison de la CRBP II sont dépassées et une autre enzyme, l'ARAT (acyl-CoA:rétinol acyl transférase), participe alors aux processus d'estérification. Les protéines de liaison intracellulaire jouent un rôle important de régulation du métabolisme du rétinol et protègent les cellules du risque lié à la présence excessive de rétinol libre dans leurs membranes. Les rétinyl esters ainsi formés sont ensuite incorporés dans les chylomicrons puis excrétés dans la circulation sanguine via la voie lymphatique. Au cours de leur circulation, quelques chylomicrons peuvent être captés directement par les tissus qui possèdent des récepteurs en surface de leurs cellules, permettant ainsi une action rapide des rétinoïdes (Skrede et coll., 1992), mais la plupart atteignent le foie (Mahley et Hussain, 1991) qui constitue le principal organe de stockage et de métabolisation de la vitamine A. Les cellules parenchymateuses sont responsables de la captation hépatique des chylomicrons (Blaner et coll., 1985). Le rétinyl ester y est hydrolysé en rétinol qui est ensuite transféré vers les lipocytes (aussi appelés cellules de Ito ou cellules étoilées ou stellaires), par un mécanisme non encore élucidé mais dans lequel participent certainement les CRBP. Il est alors stocké, majoritairement sous forme de palmitate de rétinol (Nanni et coll., 1997).

Le foie libère la vitamine A dans la circulation sanguine sous la forme alcool (rétinol) liée à une protéine de transport spécifique, la RBP ("retinol binding protein"). Des modalités diverses ont été proposées quant à la manière dont les cellules cibles captent le rétinol et restent encore discutées (revue dans Vieira et coll., 1995). Cette captation pourrait se faire grâce à des récepteurs cellulaires spécifiques de la RBP ou bien encore de façon tout à fait indépendante de ce récepteur.

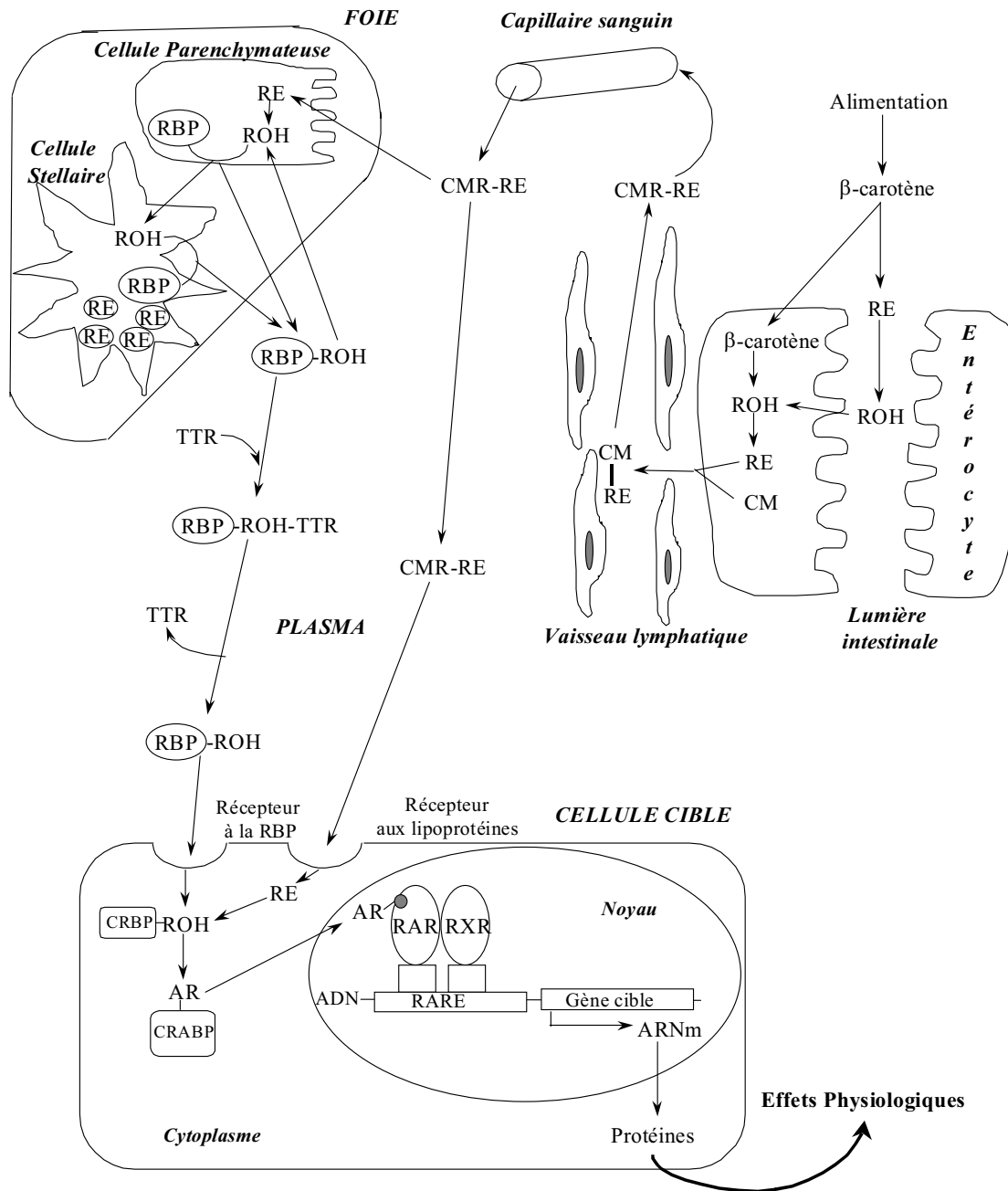


Figure 2 : Métabolisme et mode d'action de la vitamine A

AR : acide rétinoïque ; CM : chylomicrons ; CMR : chylomicrons remnants ; CRABP : "cellular retinoic acid binding protein" ; CRBP : "cellular retinol binding protein" ; RAR : récepteur nucléaire de l'acide tout-trans rétinoïque ; RARE : élément de réponse à l'acide rétinoïque ; RBP : "retinol binding protein" ; RE : rétinyl esters ; ROH : rétinol ; RXR : récepteur nucléaire de l'acide 9-cis rétinoïque ; TTR : transthyrétine.

(D'après Blomhoff, 1994)

Les résultats de nouvelles études suggèrent une participation active des CRBPI et CRBPPII dans le passage membranaire du rétinol. Sudaram et coll. (1998) ont proposé que le récepteur membranaire de la RBP et la CRBPI seraient capables d'interagir pour canaliser le passage de ligands hydrophobes de la RBP extracellulaire vers la CRBPI intracellulaire. Herr et coll. (1999) ont, quant à eux, montré que le transfert du rétinol à travers une membrane phospholipidique impliquait la CRBPI et la CRBPPII par deux mécanismes distincts. Le transfert du rétinol par la CRBPI ferait intervenir des interactions de types collisionnelles entre la CRBPI et les lipides et/ou enzymes membranaires. A l'opposé, la CRBPPII interviendrait dans un processus de diffusion passive du rétinol sans interagir avec un seul des composants de la membrane.

2.2.2. Métabolisme (figure 3)

Dans la cellule cible, il existe un métabolisme non oxydatif produisant des rétinyl esters, rétinyl-phosphate, 3-déhydrorétinol ainsi qu'un métabolisme oxydatif donnant du rétinol puis de l'acide rétinoïque, métabolite considéré comme étant le plus actif.

Au niveau cytosolique, la formation du composé intermédiaire, le rétinaldéhyde, peut être catalysée par des alcool déshydrogénases NAD dépendantes (ADH) (Yang et coll., 1994 ; Boleda et coll., 1993). Le rétinaldéhyde peut ensuite être converti de manière irréversible en acide rétinoïque par des aldéhydes déshydrogénases cytosoliques de classe I (Chen et coll., 1994). Toutefois ces enzymes, comme les ADH, ne sont pas spécifiques du rétinol et récemment des enzymes plus spécifiques appelées rétinol déshydrogénases ont été mises en évidence par l'équipe de McCaffery (McCaffery et Dräger, 1995 ; Zhao et coll., 1996). Par ailleurs, les cytochromes P450 sont aussi impliqués dans l'oxydation du rétinol en acide rétinoïque (Roberts et coll., 1992).

Cet acide rétinoïque est le principal métabolite actif de la vitamine A et exerce, au niveau de la cellule, diverses fonctions de régulations.

2.2. Rôles biologiques de la vitamine A

La vitamine A est impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques fondamentales telles que la vision, la régulation de l'expression du génome, l'immunité et la différenciation cellulaire.

Les incidences physiologiques marquées d'une carence en vitamine A ou à l'inverse d'une intoxication par excès révèlent l'étendue de l'action des rétinoïdes. Il est connu, depuis très longtemps, que la carence conduit à des troubles de la vision, un arrêt de la croissance et, d'une façon générale, à une kératinisation des épithéliums. L'hypervitaminose a des conséquences notables sur la peau et les muqueuses (Miller et Hayes, 1980), le système nerveux (Mikkelsen et coll., 1974), les os (Murray, 1976), et elle génère en outre un dysfonctionnement hépatique accompagné de changements structuraux marqués (Leo et Lieber, 1988 ; Minuk et coll., 1988). L'intervention de la vitamine A au cours du développement a été très largement étudiée (revue par Linney et LaMantia, 1994) ainsi que son action tératogène dans des situations de déficiences ou d'excès (revue dans Collins et Mao, 1999).

L'acide rétinoïque, forme active de la vitamine A, pénétrerait dans le noyau soit librement, soit lié à la CRABP II ("cellular retinoic acid binding protein") (Dong et coll., 1999). Il est ensuite pris en charge par ses récepteurs nucléaires, les RARs, qui lui sont spécifiques et vont médier son action sur la transcription de gènes cibles. Plus de 150 gènes ont été identifiés dans le système de réponse de l'acide rétinoïque (Chytil et Haq, 1990) ce qui explique les effets pléiotropiques de cette molécule.

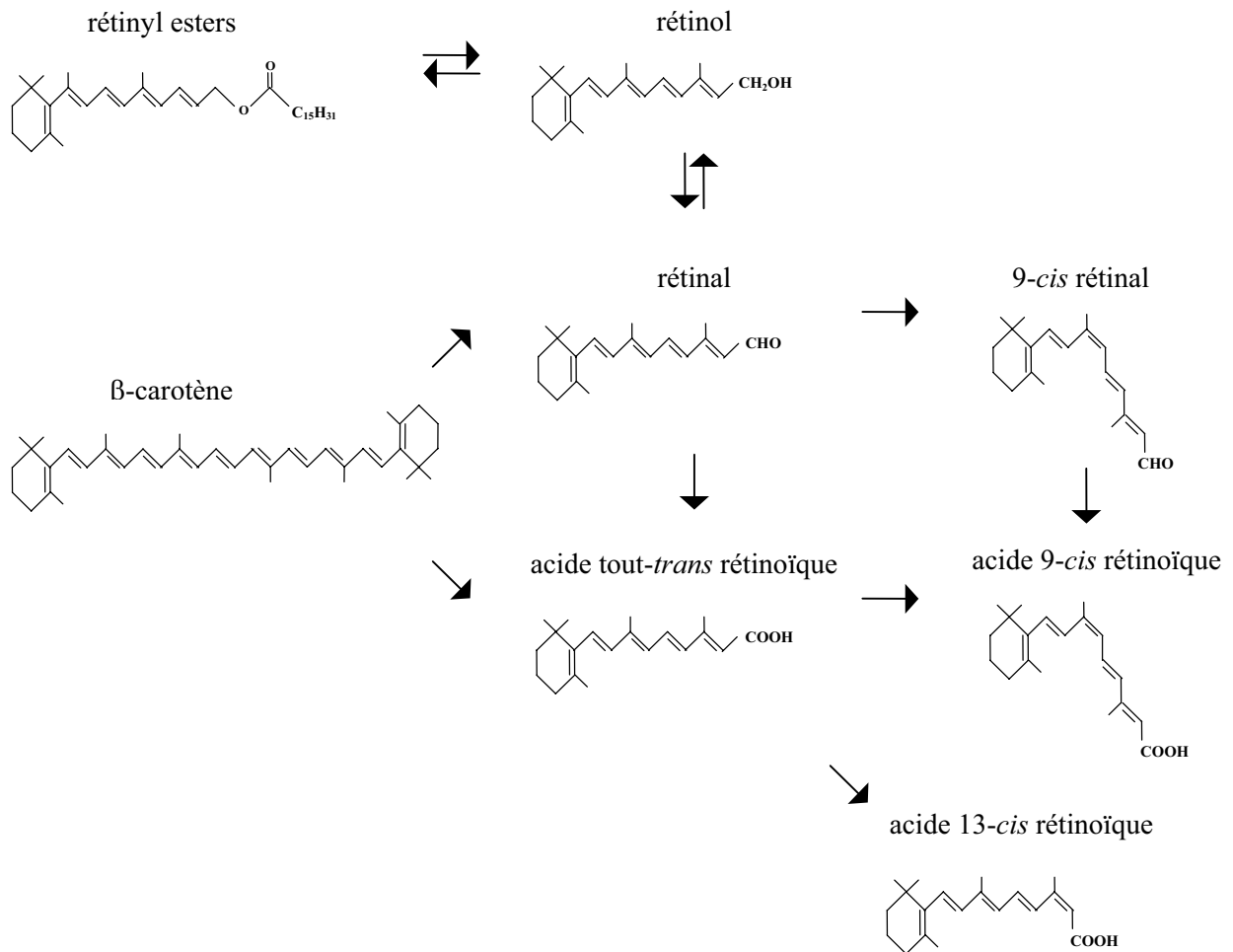


Figure 3 : Formules chimiques de rétinoïdes

Les principales formes de la vitamine A ont été représentées. Lorsque cela n'est pas précisé, il s'agit d'une configuration tout-*trans*.

3. Interactions métaboliques

Les données ci-dessus témoignent de grandes similitudes entre les métabolismes des acides gras et de la vitamine A. Cependant, d'autres facteurs peuvent également interférer dans ces métabolismes et c'est le cas du statut hormonal. C'est ainsi que de nombreuses sources bibliographiques montrent l'existence de relations entre les hormones thyroïdiennes ou les lipides alimentaires et la vitamine A.

3.1. Interactions des acides gras et de la vitamine A

Les lipides alimentaires constituent des véhicules pour l'absorption et le transport de cette vitamine liposoluble mais il existe également des interactions entre le métabolisme de la vitamine A et celui des acides gras.

Les études de biologie cellulaire ont apporté des éclairages nouveaux sur la diversité des interventions des acides gras sur le métabolisme de la vitamine A. Il est connu que leurs protéines de transport cytoplasmique (CRBP, CRABP et FABP) appartiennent à une même famille de protéines intracellulaires liant les lipides et possèdent les mêmes fonctions pour leur ligand respectif (Bass, 1993). Nous avons vu que certains auteurs n'excluent pas la possibilité d'interférences entre ces protéines. De plus, la ressemblance structurale entre l'acide rétinoïque et certains acides gras, par exemple l'acide arachidonique, conforte cette hypothèse. Une illustration en a été donnée par Sani et coll. (1987) qui ont montré que les acides linoléique et arachidonique inhibaient la liaison de l'acide rétinoïque à la CRABP avec pour conséquence une perturbation éventuelle de la disponibilité de l'acide rétinoïque pour les organites cellulaires. Egalement, les régimes riches en acides gras insaturés jouent un rôle important dans l'absorption intestinale et le métabolisme du rétinol et du β -carotène en régulant le gène de la CRPBII (Takase et coll., 1998). Ainsi, il a été décrit, chez des sujets atteints d'hyperlipémies, un taux de rétinol sérique diminué (Ribalta et coll., 1997).

De plus, la disponibilité du rétinol pour la cellule afin de le métaboliser ultérieurement en acide rétinoïque est sous l'influence des acides gras exogènes. En effet, les travaux de Drevon et coll. (1985) ont mis en évidence que le stockage de la vitamine A sous forme d'esters du rétinol était régulé par les acides gras.

3.2. Interactions des acides gras et la vitamine A avec les hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes sont essentielles pour le développement de différents organes, notamment la maturation du cerveau normal (Oppenheimer et Schwartz, 1997) ainsi que pour la régulation du métabolisme énergétique de tous les tissus de l'organisme.

De nombreuses étapes du métabolisme des hormones thyroïdiennes, de la vitamine A et des lipides présentent des similitudes et parfois aussi des interactions. Il en est ainsi pour le transport, le métabolisme, les sites et modes d'action (particulièrement nucléaire). Des études menées au laboratoire de Nutrition ont contribué à la mise en évidence d'interactions métaboliques entre les hormones thyroïdiennes et la vitamine A, au cours de leur transport ou de leur métabolisation périphérique.

Ainsi, la répartition des hormones thyroïdiennes sur leurs protéines vectrices est modifiée chez un rat carencé en vitamine A (Higueret et Garcin, 1979 ; Garcin et Higueret, 1980). Par ailleurs cette situation de carence s'accompagne d'une augmentation du taux sérique des hormones thyroïdiennes (Garcin et Higueret, 1980 ; Garcin et Higueret, 1983). Au contraire, ces taux diminuent lorsque les apports en vitamine A sont élevés (Morley et coll., 1980 ; Garcin et coll., 1984). Un autre exemple d'interaction vitamine A - hormones thyroïdiennes est rencontré dans des situations d'hyperthyroïdie où l'on observe une baisse des concentrations de rétinol circulant (Smith et Goodman, 1971 ; Di Costanzo-Dufetel et coll., 1985). De plus, une carence en vitamine A entraîne une diminution de l'activité désiodante des microsomes qui s'accompagne d'une baisse de la formation de triiodothyronine (T₃), l'hormone thyroïdienne la plus active, par le foie et les reins (Higueret et Garcin, 1982).

Toutefois les mécanismes d'intervention des hormones thyroïdiennes dans la métabolisation de la vitamine A restent encore à préciser.

Tout comme pour l'acide rétinoïque, les acides gras ont la capacité d'interférer avec le métabolisme des hormones thyroïdiennes. Par exemple, il a été observé, dans le cas de certaines pathologies, une diminution du taux sérique de la thyroxine en présence d'un excès d'acides gras non estérifiés (Chopra et coll., 1985 ; Hermann et coll., 1984).

Ces interactions laissent présager que les voies de signalisation des hormones thyroïdiennes, de la vitamine A ou des lipides peuvent subir des modifications si l'une de ces molécules est en situation de déséquilibre physiologique. Ces modifications peuvent au final se répercuter (via une modification de la biodisponibilité de l'un des ligands) sur leur action nucléaire. Cette action consiste, dans un premier temps, en la modulation de l'expression de leur propre récepteur nucléaire (TRs, RARs et PPARs) puis, dans un second temps, en la modulation de l'expression de gènes cibles de ces molécules "informatives".

III. Mode d'action nucléaire

1. Les récepteurs nucléaires

1.1. La superfamille des récepteurs nucléaires

Des données bibliographiques ont permis d'établir que les hormones stéroïdes et thyroïdiennes agissent dans les cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires pour réguler la synthèse d'ARN messagers spécifiques. Les récepteurs nucléaires sont des protéines capables de se fixer, généralement sous forme de dimères, au niveau de séquences spécifiques d'ADN, appelées éléments de réponse aux hormones HRE ("hormone response element"), situées dans le promoteur de gènes cibles et de moduler ainsi, en tant que facteurs de transcription, leur expression génique (revue dans Mangelsdorf et Evans, 1995). La caractérisation de ces récepteurs nucléaires, dont les premiers clonés furent le récepteur des glucocorticoïdes (GR) (Hollenberg et coll., 1985 ; Miesfield et coll., 1986) et le récepteur des

œstrogènes (ER) (Green et coll., 1986), a permis de montrer la forte homologie de structure entre ces protéines et de les regrouper en une même superfamille de récepteurs nucléaires. Elle comprend des récepteurs pour différents ligands hydrophobes tels que les stéroïdes, les hormones thyroïdiennes, les dérivés hydroxylés de la vitamine D, l'acide rétinoïque (ce qui justifie d'assimiler les formes actives de la vitamine A et de la vitamine D à des hormones au point de vue de leur mode d'action) ou encore les acides gras et éicosanoïdes. En plus de ces récepteurs dont les ligands sont connus, de nombreux travaux de clonage ont permis d'identifier des gènes inconnus jusqu'alors et homologues aux gènes codant pour les récepteurs nucléaires. Les ligands des protéines codées par ces gènes n'étant pas encore connus, ces récepteurs ont été regroupés sous le terme de récepteurs orphelins (revue dans Enmark et Gustafsson, 1996), pour certains d'entre eux leur(s) ligand(s) ont récemment été trouvés (revue dans Laudet et Vamacker, 1999) (tableau I).

La famille des récepteurs nucléaires, pour laquelle plus de 300 séquences ont été décrites, constitue ainsi la plus grande famille de facteurs de transcription connue chez les eucaryotes. Mangelsdorf et coll. (1995) ont divisé cette superfamille de récepteurs en quatre classes en accord avec leurs propriétés de liaison du ligand, de liaison à l'ADN et de dimérisation. La première classe comprend les récepteurs des hormones stéroïdes (récepteurs des glucocorticoïdes, androgènes, œstrogènes, minéralocorticoïdes et progestérone). Les récepteurs qui forment des hétérodimères avec les RXRs (récepteurs de l'acide 9-*cis* rétinoïque), forment la deuxième classe. Les classes III et IV regroupent des récepteurs qui se distinguent selon qu'ils se fixent à l'ADN sous forme d'homodimères ou de monomères ; la plupart des récepteurs orphelins appartiennent à ces deux sous-familles (Mangelsdorf et coll., 1995 ; Giguère et coll., 1997). Très récemment, une totale réorganisation de cette classification a été proposée avec pour objectif de clarifier la situation de ces nombreux récepteurs au sein de cette superfamille (Nuclear Receptor Nomenclature Committee, 1999).

Tableau I : Quelques membres de la superfamille des récepteurs nucléaires des hormones

| Récepteurs avec ligand naturel | | Récepteurs orphelins |
|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| AR | androgènes | EAR-1 |
| ER | œstrogènes | EAR-2 |
| GR | glucocorticoïdes | EAR-3 (COUP) |
| MR | minéralocorticoïdes | ERR-1 |
| PR | progestérone | ERR-2 |
| RAR α,β,γ | acide tout- <i>trans</i> rétinoïque | HNF4 |
| RXR α,β,γ | acide 9- <i>cis</i> rétinoïque | NGF1B (NUR77) |
| TR α,β | hormone thyroïdienne | TR2 |
| VDR | 1,25 dihydroxyvitamine D ₃ | |
| PPAR | acides gras - éicosanoïdes | |
| *LXR α | oxystérols | |
| *FXR | dérivés des farnésols | |
| *PXR | dérivés des prégnates | |
| *CAR β | androsténol | |

Sur la gauche les récepteurs sont présentés avec le ligand naturel connu pour lequel ils ont la plus grande affinité. Sur la droite, sont listés les récepteurs orphelins dont les ligands, s'ils existent, n'ont pas encore été identifiés.

Abréviations : AR : récepteur des androgènes ; ER : récepteur de l'œstrogène ; GR : récepteur des glucocorticoïdes ; MR : récepteur des minéralocorticoïdes ; PR : récepteur de la progestérone ; RAR : récepteur de l'acide rétinoïque ; RXR : récepteur de l'acide 9-*cis* rétinoïque ; TR : récepteur de la triiodothyronine ; PPAR : récepteur des activateurs de prolifération peroxysomale ; VDR : récepteur de la vitamine D₃ ; EAR : récepteur apparenté à v-erbA ; ERR : récepteur apparenté au récepteur de l'œstrogène ; HNF4 : facteur nucléaire mis en évidence dans l'hépatocyte ; CAR β : récepteur actif constitutivement

* anciens récepteurs orphelins dont les ligands ont été identifiés récemment

1.2. Structure générale des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires présentent une forte homologie de structure, avec quatre domaines principaux possédant divers degrés de conservation entre les différents membres de la superfamille.

- Le domaine A/B : ce domaine, impliqué dans la transactivation de manière indépendante du ligand (Nagpal et coll., 1992), est faiblement conservé et correspond à l'extrémité NH₂ de la protéine codée.
- Le domaine C : ce domaine de liaison à l'ADN, de 66 à 68 acides aminés, montre un fort degré d'homologie entre les différents membres de la superfamille. Deux motifs en doigt de zinc (C_I et C_{II}), composés chacun d'un atome de zinc chélaté par quatre résidus cystéines, jouent un rôle complémentaire dans les processus de liaison spécifique aux éléments de réponse situés dans le promoteur des gènes cibles (revue dans Mignotte, 1997). Ce domaine participe aussi à la dimérisation des récepteurs (Hirst et coll., 1992).
- Le domaine D : cette région charnière entre le domaine C et E permet la réalisation de différentes configurations fonctionnelles et pourrait être impliquée dans la localisation nucléaire des récepteurs (Ylikomi et coll., 1992).
- Le domaine E : le domaine carboxyterminal possède une structure complexe, la plus longue en acides aminés. Il assure la fixation du ligand mais intervient également dans la dimérisation et la régulation de la transcription dépendante du ligand. La partie centrale du domaine E riche en leucine serait destinée à la dimérisation (modèle "leucine-zipper"), alors que la régulation de la transcription serait assurée par un domaine dénommé Ti. En fait la partie du domaine E qui est impliquée dans la liaison du ligand est très conservée entre récepteurs ayant la même spécificité de liaison mais elle ne possède pas de similarité apparente entre les récepteurs de différents types. A l'inverse le domaine Ti montre une conservation de 20-45 % entre tous les récepteurs (O'Donnell et Koenig, 1990).

Certains membres de cette superfamille, c'est le cas des RAR, des RXR, des récepteurs des œstrogènes ou encore des récepteurs des hormones thyroïdiennes, possèdent en plus une région F dont le rôle n'est pas encore bien élucidé.

1.3. Eléments de réponse et mode d'action

Les éléments de réponse aux hormones comprennent plusieurs types (GRE, TRE, RARE) selon le ligand responsable de l'activation de la transcription (revue dans Fuller, 1991). Leur structure est généralement basée sur un même principe : deux $\frac{1}{2}$ sites pour la plupart hexanucléotidiques, dérivés d'une séquence consensus qui leur est propre et combinés de manière palindromique ou directement répétée (mais parfois plus complexes), séparés de 1 à 5 nucléotides ou bien strictement contigus (Umesono et coll., 1991). Plusieurs motifs peuvent répondre à un même récepteur nucléaire, mais la liaison sera plus ou moins favorisée et la transcription sera régulée différemment. Les PPARs se fixent sur les éléments DR-1 (1 nucléotide sépare 2 demi-sites) appelés PPRE.

Les éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes et à l'acide rétinoïque situés dans le promoteur des gènes cibles lient plus facilement les dimères de récepteurs et donnent lieu à une meilleure transactivation de la transcription avec des hétérodimères. L'hétérodimérisation la plus importante apparaît être la combinaison avec un autre membre de la superfamille des récepteurs nucléaires, les RXRs (Forman et coll., 1995a ; Glass, 1996). Ces récepteurs de l'acide 9-*cis* rétinoïque constituent les coactivateurs communs de nombreux récepteurs nucléaires et jouent ainsi un rôle central dans la régulation de l'expression génique. Comme les autres membres des récepteurs de classe II, les PPARs s'hétérodimérisent avec les RXRs (Kliwer et coll., 1992a ; Gearing et coll., 1993). Les hétérodimères TR/RXR et RAR/RXR sont les principaux médiateurs de l'action transactivatrice de la T₃ et de l'AR sur la transcription, leur présence diminue la liaison des TR/RAR à divers TRE et RARE (Yen et coll., 1992). Les éléments de réponse DR-1 reconnus par l'hétérodimère PPAR/RXR le sont

également par l'hétérodimère RAR/RXR et par les homodimères des RXR. Ainsi, la compétition pour le site DR-1 est responsable, en partie, des mécanismes d'interaction existants entre les différentes voies de signalisation impliquant ces récepteurs. Par ailleurs, il a été mis en évidence que les récepteurs orphelins interfèrent avec l'activité des récepteurs "classiques". Par exemple, des études sur le mécanisme d'action du récepteur orphelin COUP-TF ont montré que ce dernier est capable de se lier sur les éléments de réponse des récepteurs des hormones thyroïdiennes et de l'acide rétinoïque entraînant par conséquent la répression des fonctions de ces récepteurs (Wu et coll., 1997).

Les TRs ont l'aptitude de se lier, en absence de ligand (aporécepteur), aux TRE leur conférant une capacité de répression de la transcription basale qui n'a été que peu observée avec les autres types de récepteurs de la superfamille (l'activité répressive du RAR n'a été relevée que dans certains types cellulaires) (revue dans Chin et Yen, 1997).

1.4. Rôle des cofacteurs de transcription

Les travaux de recherche de ces dernières années ont montré que les récepteurs nucléaires sont au centre d'un système complexe de régulation, et que la fixation du ligand n'est pas toujours suffisante pour que le récepteur induise l'expression d'un gène (Katzenellenbogen et coll., 1996). Le récepteur doit alors interagir, soit directement, soit indirectement avec la "machinerie" de transcription pour induire l'expression du gène cible. Des protéines appelées cofacteurs de transcription régulent l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs, leur permettant soit d'activer (coactivateurs), soit de réprimer (corépresseurs) l'expression d'un gène. Depuis la découverte en 1995 des premiers cofacteurs (Chen et Evans, 1995, Lee et coll., 1995) le nombre de ces protéines découvertes ne cesse d'augmenter (revue dans Gelman et coll., 1997) ce qui ne facilite pas la compréhension du mode d'action de ces facteurs avec les récepteurs nucléaires (revue dans Freedman, 1999). La capacité de ces

cofacteurs à interagir avec plusieurs récepteurs leur confère un rôle central dans l'intégration des signaux hormonaux, d'autant plus qu'ils sont présents en quantité limitée dans la cellule.

L'activation des récepteurs nucléaires passe par l'action de ces cofacteurs. Dans une première étape, la fixation du ligand sur son récepteur entraîne un changement de conformation de ce dernier permettant une activité transcriptionnelle basale après le relargage des corépresseurs. Dans une deuxième étape, les coactivateurs de transcription peuvent se fixer sur l'hétérodimère, créant ainsi un "pont" entre ces récepteurs et le complexe de transcription, ce qui permet une expression maximale du gène.

2. Récepteurs de l'acide rétinoïque

Nos connaissances sur le mode d'action de la vitamine A ont été fondamentalement marquées par la découverte récente de ses récepteurs nucléaires (Petkovich et coll., 1987) et la mise en évidence de leur action en tant que facteurs de transcription dans le contrôle de l'expression des gènes. Aujourd'hui de nombreux travaux cherchent à préciser les mécanismes d'intervention des rétinoïdes dans la signalisation cellulaire et à mieux définir, en particulier, le rôle des récepteurs dans la transcription génique.

2.1. Structure

Deux familles multigéniques codent pour les récepteurs nucléaires des rétinoïdes. La première de ces familles comprend des récepteurs de type RAR qui présentent une affinité élevée pour l'acide tout-*trans* rétinoïque ($K_d = 10$ nM) (Ishikawa et coll., 1990 ; Yang et coll., 1991). La seconde famille code pour des récepteurs de type RXR qui affichent une affinité plus élevée pour l'acide 9-*cis* rétinoïque ($K_d = 1-5$ nM) (Heyman et coll., 1992 ; Levin et coll., 1992). La masse moléculaire de ces récepteurs est d'environ 50 kDa. Pour chacun de ces récepteurs, trois types de protéines ont été isolés, codées par trois gènes distincts : RAR α , β , γ et RXR α , β , γ (revue dans Chambon, 1996). Les séquences d'acides aminés de ces trois

formes sont très similaires dans les domaines B, C, D et E mais différent dans les domaines A et F. Seul le domaine C de liaison à l'ADN est très conservé entre les différentes classes de RAR et RXR. Comme pour les TRs, chaque gène peut coder pour plusieurs isoformes essentiellement différentes au niveau de l'extrémité aminoterminal, suite à l'utilisation de deux promoteurs alternatifs ou résultant de l'épissage alternatif (Giguère, 1994 ; Chambon, 1996). Il faut remarquer que les séquences de RXR sont plus proches de celles de récepteurs orphelins comme COUP-TF que de celles de RAR. Par ailleurs, un gène (*usp*) équivalent au RXR existe chez la drosophile (alors qu'il n'y a pas d'équivalent aux RARs) (Yao et coll., 1992). Cela est en faveur d'une origine plus ancestrale des gènes codant pour RXR comme le montre son classement dans la nouvelle nomenclature établie par le Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999).

2.2. Distribution

De nombreux travaux ont eu pour objet d'étudier la répartition spatio-temporelle des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque au cours du développement, dans l'espoir de pouvoir attribuer aux différents récepteurs des rôles particuliers (Lohnes et coll., 1994 ; Mendelsohn et coll., 1994). La distribution des différentes isoformes chez l'adulte est aussi spécifique (revue dans Wan, 1993). Ainsi les transcrits du RAR α sont distribués dans l'ensemble des tissus, ceux de la forme β sont plutôt restreints au cerveau, foie, rein et poumons, tandis que ceux de la forme γ sont restreints à la peau et aux poumons.

L'expression du RXR α est forte dans le foie mais non négligeable dans les reins, poumons, rate et muscle. Par contre le RXR β est répandu à peu près partout même s'il est faiblement exprimé dans le foie, l'intestin et les testicules. Enfin, RXR γ a une expression réduite dans les muscles, cœur, foie, reins, cerveau et glandes surrénales.

2.3. Gènes régulés par l'acide rétinoïque

La multiplicité des effets des rétinoïdes peut en partie s'expliquer par le nombre considérable de configurations des récepteurs nucléaires, mais aussi par la large gamme de gènes régulés par l'acide rétinoïque.

Les RARE ont été décrits dans de nombreux gènes et leur liste est loin d'être close aujourd'hui. Parmi ces gènes se trouvent les gènes de ses propres récepteurs RAR α_2 , β_2 , γ_2 , des CRBPI, CRABPI et II, de l'alcool déshydrogénase (enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque), plus des facteurs de transcription tels que AP-1 et AP-2. Les effets des rétinoïdes s'exercent aussi sur l'expression de gènes essentiels impliqués dans les processus de croissance, de différenciation et d'homéostasie cellulaire. C'est le cas notamment des homéogènes (gènes impliqués dans le développement des embryons de mammifères) (Boncinelli et coll., 1991), des gènes de l'hormone de croissance (Bedo et coll., 1989), des récepteurs aux facteurs de croissance NGF, EGF, FGF, TGF- β , PDGF- α (Wion et coll., 1987), des protéines de structure ou d'agencement cellulaire comme le collagène, la collagénase, la laminine, la stromélysine, la chaîne α de la myosine cardiaque ou encore les connexines impliquées dans la communication entre les cellules.

Une étude théorique récente, basée sur la recherche de la séquence de RARE dans les promoteurs de gènes répertoriés dans une banque de données, a permis d'établir une liste impressionnante de gènes présentant une potentialité de réponse à l'acide rétinoïque. Cette liste traduit les effets pléiotropes des rétinoïdes car on y trouve des gènes du système immunitaire (récepteurs des IgE, interleukines 2), des gènes de prolifération et de différenciation (oncogène c-myc, gène Hox-4), des gènes du métabolisme des lipides (enzyme malique, apolipoprotéine A1) et des gènes de protéines de structure (γ -cristalline) (Kamei et coll., 1993).

3. Le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes

Découvert par Isseman et Green (1990) le PPAR fut longtemps considéré comme un récepteur orphelin même s'il avait été montré que les acides gras pouvaient l'activer (Gottlicher et coll., 1992 ; Schmidt et coll., 1992 ; Banner et coll., 1993). Actuellement sa classification en tant que récepteur orphelin n'est plus exacte. En effet, le développement de nouvelles approches pour la recherche de ses ligands naturels a permis l'identification en tant que tels des acides gras et de leurs dérivés éicosanoïdes pour les différentes isoformes du PPAR (Forman et coll., 1995b et 1997 ; Kliewer et coll., 1997 ; Krey et coll., 1997 ; Lin et coll., 1999 ; Murakami et coll., 1999 ; Xu et coll., 1999).

3.1. Structure

Après le clonage du PPAR α chez la souris, différentes isoformes ont été isolées chez plusieurs espèces. On connaît aujourd'hui trois sous-types du PPAR nommés PPAR α , PPAR β ou δ (appelé aussi FAAR ou NUC1 suivant l'espèce où il a été cloné) et le PPAR γ existant sous les formes γ 1 et γ 2 issues à la fois de l'utilisation de promoteurs alternatifs et d'un épissage différentiel (revue dans Sorensen et coll., 1998). Ces trois isoformes sont codées par trois gènes distincts. Les diverses formes du PPAR α , récepteur d'environ 55 kDa, présentent de très fortes homologies entre les espèces. Par exemple, les PPAR α de rat et de l'homme possèdent une homologie de 93 % de leurs séquences en acides aminés. Il en est de même entre les PPAR α de rat et de souris, et cette homologie n'est plus que de 86 % avec celui de xénope. Une situation similaire est observée pour les différentes formes du PPAR β entre espèces. Il existe en outre une grande homologie entre les formes alpha et bêta du PPAR. C'est le cas pour le PPAR β humain et PPAR α de rat qui présentent 86 % et 70 % d'homologie pour leurs domaines de liaison à l'ADN et de liaison aux ligands. Les formes gamma du PPAR possèdent une homologie plus faible avec les autres formes de PPAR.

Zhu et coll. (1993) ont cloné la forme gamma du PPAR chez la souris puis Tontonoz et coll. (1994) ont cloné une autre isoforme, le PPAR γ 2 qui semblait présenter une spécificité pour le tissu adipeux. L'ADN complémentaire du PPAR γ 2 code pour 30 acides aminés supplémentaires du côté N-terminal en amont du codon ATG du PPAR γ 1. Si l'on compare les séquences en acides aminés de ces sous-types de PPAR γ entre les espèces, on constate une similarité de 99% chez le rat, la souris, le hamster et l'homme.

3.2. Distribution

Les gènes des PPARs sont différentiellement exprimés dans un grand nombre de tissus, la localisation de ces récepteurs a été étudiée afin de clarifier le rôle physiologique de ces PPARs. L'étude de Braissant et coll. (1996) sur la distribution du PPAR chez le rat adulte, en utilisant les techniques de northern blot, hybridation *in situ* et immunocytochimie, a montré une forte expression du PPAR α dans le foie, les reins, le cœur, les intestins et le muscle squelettique. La présence du PPAR α au niveau du cerveau, des poumons et de la rate est moins marquée. Une distribution identique a été montrée chez l'homme et la souris (Mukherjee et coll., 1994 et Isseman et Green, 1990). En ce qui concerne le PPAR β , il est ubiquitaire et abondamment exprimé chez le rat adulte, tandis que le PPAR γ est dominant dans le tissu adipeux, la rate et s'exprime aussi dans le côlon mais est faiblement exprimé dans le foie, les reins, le cœur, les intestins et le cerveau. Il est intéressant de noter que la forme PPAR γ 2 est principalement exprimée dans le tissu adipeux (Tontonoz et coll., 1994) alors que PPAR γ 1 est plus spécifique du muscle squelettique.

3.3. Gènes régulés par le PPAR

Le PPAR contrôle les fonctions clés du métabolisme des acides gras incluant leur transport, leur incorporation cellulaire, leur activation et leur oxydation (tableau II).

L'action du PPAR ne se limite pas au contrôle du métabolisme lipidique. Il apparaît de plus en plus que le PPAR est un facteur clé de la différenciation de plusieurs types cellulaires : oligodendrocytes (Granneman et coll., 1998), kératinocytes (Hanley et coll., 1998), myoblastes (Grimaldi et coll., 1997) et des monocytes (revue dans Kliewer et Wilson, 1998). A ce titre la liste des gènes sous la régulation du PPAR est loin d'être complète.

Actuellement, l'identification de ces gènes révèle le rôle critique des lipides non seulement sur leur propre métabolisme mais aussi sur le contrôle de la croissance et/ou différenciation cellulaire et par voie de conséquence sur le développement des cancers (revue dans Vanden Heuvel, 1999).

3.4. Tissus cibles

Les rôles des PPARs dans la régulation génique du métabolisme lipidique ont été étudiés dans deux tissus majeurs : le foie et le tissu adipeux (tableau III). Alors que le PPAR α est principalement exprimé dans le foie, le PPAR γ est, quant à lui, abondamment exprimé dans le tissu adipeux. Cette distinction tissulaire permet de différencier fonctionnellement ces deux récepteurs. Le PPAR α est impliqué dans les métabolismes liés à la β -oxydation des acides gras, c'est à dire à l'utilisation de ces acides gras. Au contraire, le PPAR γ est considéré comme un facteur adipogénique efficace et sera donc associé au stockage de ces acides gras dans le tissu adipeux.

3.4.1. Le foie

Comme décrit précédemment, le foie joue un rôle central dans le métabolisme des acides gras. Le PPAR α joue un rôle d'une grande importance dans ce métabolisme lipidique hépatique où il régule différentes enzymes de la β -oxydation (tableau II) et notamment des enzymes intervenant dans la voie de la β -oxydation qui a lieu dans le peroxyosome. Une

Tableau II : Exemples de gènes du métabolisme lipidique régulés par les PPARs.

| sigle | dénomination | régulation | références |
|------------|--|------------|--------------------------------|
| Hépatocyte | | | |
| L-FABP | Protéine hépatique liant les acides gras | + | Meunier-Durmort et coll., 1996 |
| Apo AI ¶ | Apolipoprotéine AI | +/- | Staels et Auwerx, 1998 |
| Apo AII | Apolipoprotéine AII | + | Vu-dac et coll., 1995 |
| Apo cIII | Apolipoprotéine CIII | - | Hertz et coll., 1995 |
| LPL* | Lipoprotéine lipase | + | Schoonjans et coll., 1996a |
| ACO | Acyl-CoA oxydase | + | Dreyer et coll., 1992 |
| HD | Enzyme bifonctionnelle | + | Zhang et coll., 1992 |
| ACS* | Acyl-CoA synthétase | + | Schoonjans et coll., 1995 |
| MCAD | Déshydrogénase des acyl-CoA à chaîne moyenne | + | Gulick et coll., 1994 |
| HMG-CoAS | Hydroxy-méthyl-glutaryl CoA synthase | + | Rodriguez et coll., 1994 |
| CYP4A6 | Cytochrome P450 4A6 | + | Muerhoof et coll., 1992 |
| ME | Enzyme malique | + | Castelein et coll., 1994 |
| Adipocyte | | | |
| aP2 | Protéine adipocytaire liant les acides gras | + | Tontonoz et coll., 1994 |
| PEPCK | Phosphoénol pyruvate carboxykinase | + | Tontonoz et coll., 1995 |
| Muscle | | | |
| UCP3 | Protéine découplante de type 3 | + | Brun et coll., 1999 |
| UCP2 | Protéine découplante de type 2 | + | Aubert et coll., 1997 |
| CPT1 | Carnitine palmitoyl transférase de type I | + | Mascaró et coll., 1998 |

* régulation identique dans les adipocytes

¶ régulation positive chez l'homme et négative chez les rongeurs

conséquence importante de l'induction de ces enzymes par l'activation du PPAR α est une augmentation du nombre de peroxysomes. Cette prolifération est particulièrement marquée lorsque l'organisme est exposé à certains composés chimiques comme les xénobiotiques (phtalates, herbicides...) ou les fibrates chez les rongeurs. Toutes ces substances sont des activateurs potentiels du PPAR α . Une prolifération intensive des peroxysomes peut aboutir à l'apparition d'hépatocarcinomes chez le rongeur. Le mécanisme d'induction des tumeurs n'a pas encore été clairement décrit. Il pourrait se produire en réponse à un stress oxydatif suite au déséquilibre entre la production, au cours de la β -oxydation et la dégradation, par la catalase, des radicaux libres peroxysomaux (Reddy et coll., 1983). L'apparition des hépatocarcinomes pourrait également s'expliquer par une diminution des phénomènes d'apoptose dans les hépatocytes.

3.4.2. Le tissu adipeux blanc

Ce tissu joue un rôle primordial dans l'homéostasie lipidique et dans le maintien de la balance énergétique et le contrôle de son développement est en partie nutritionnel. Ce tissu a longtemps été considéré comme un simple tissu passif de stockage d'énergie. Depuis peu, il s'est avéré être d'une importance extrême grâce à sa capacité à synthétiser des molécules bioactives comme la leptine ou le TNF- α . Bien que les mécanismes d'action soient loin d'être élucidés, il apparaît que le tissu adipeux joue un rôle primordial dans le contrôle de la prise de la nourriture et dans l'insulino-resistance. Le PPAR γ est un facteur fondamental dans la différenciation adipocytaire, qui aboutit à la formation du tissu adipeux.

Tableau III : Caractéristiques principales des PPAR α et PPAR γ

| | PPARα | PPARγ |
|---|---|---|
| <i>Localisation tissulaire principale</i> | foie | tissu adipeux |
| <i>Métabolisme ciblé</i> | β -oxydation | adipogenèse |
| <i>Effets physiologiques</i> | production de corps cétoniques, d'apolipoprotéines, effets divers sur l'inflammation, hépatocarcinogénèse chez le rongeur | Stockage des acides gras, formation de la graisse, maintien de la différenciation, effets divers sur l'inflammation |
| <i>Ligands naturels</i> | leucotriène B4 acides gras polyinsaturés 8-S-HETE | 15-désoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ ₂ acides gras polyinsaturés HODEs, 8-R-HETE |
| <i>Ligands synthétiques</i> | fibrates NSAIDs | thiazolidinédiones NSAIDs |

HETE : acide hydroxyeicosatétranoïque ; PGJ₂ : Prostaglandine J₂ ; NSAID : nonsteroidal inflammatory drug ; HODE : acide hydroxyoctadécadiénoïque.

3.4.2.1. Composition

Le tissu adipeux blanc est constitué principalement d'adipocytes et représente ainsi la principale réserve d'énergie de l'organisme. En effet, ces cellules stockent de l'énergie sous forme de triacylglycérols et libèrent des acides gras libres pour les besoins en énergie de l'organisme. Le dérèglement de la balance énergétique peut conduire à une hypertrophie de ce tissu et à une augmentation considérable de la quantité des acides gras stockés. Un grand nombre d'études montrent qu'il existe une corrélation directe entre l'apport lipidique et le degré d'obésité. Cependant, il n'est pas actuellement possible de conclure si les lipides alimentaires stimulent le développement de la prise de poids indépendamment d'une augmentation de l'apport calorique total ingéré (Seidell, 1998).

Dans les conditions habituelles de l'alimentation, la néolipogenèse ne contribue pas à la mise en réserve d'énergie. C'est pourquoi le profil des acides gras du tissu adipeux blanc est un reflet des acides gras ingérés. A cet égard, l'analyse de la composition en acides gras du tissu adipeux est un marqueur biochimique qualitatif des graisses alimentaires et représente un complément utile à l'étude des ingesta lipidiques de l'homme.

Le renouvellement des acides gras dans le tissu adipeux est lent. Chez l'adulte de poids stable le temps de renouvellement des acides gras est d'environ 600 jours. Toutefois, la vitesse de modification de la composition en acides gras des triacylglycérols de réserve en réponse à un changement qualitatif des graisses alimentaires varie en fonction des circonstances tant physiologiques que pathologiques et des acides gras considérés. Ainsi, une modification qualitative de la ration lipidique alimentaire sera d'autant plus rapidement observée dans les triacylglycérols de réserve qu'elle surviendra chez un sujet dont la masse grasse augmente rapidement (grossesse, phase dynamique de l'obésité par exemple).

3.4.2.2. Adipogenèse

La quantité de tissu adipeux blanc résulte d'un processus de différenciation et de développement qui est continu tout au long de la vie. La différenciation adipocytaire ou adipogenèse est le processus aboutissant à la formation des adipocytes à partir de cellules précurseurs appelées préadipocytes ou adipoblastes. L'adipogenèse est un mécanisme complexe caractérisé par une expression ordonnée de gènes spécifiques de l'adipocyte dont la transcription est sous le contrôle de facteurs de transcription interdépendants (figure 4). Cette coordination transcriptionnelle se fait à l'aide de trois types de facteurs : les protéines de fixation à l'élément CCAAT ou C/EBP (CCAAT-enhancer-binding protein), le facteur de détermination et de différenciation adipocytaire ou ADD-1 (adipocyte differentiation and determination factor) et enfin le PPAR γ .

Le rôle du PPAR γ a été démontré par l'induction d'un phénotype adipocytaire dans des cellules fibroblastiques ou myoblastiques surexprimant le PPAR γ 2, après infection par un vecteur d'expression rétroviral exprimant cette protéine (Tontonoz et coll., 1994 ; Hu et coll., 1995). Le PPAR γ 2, l'un des sous-types de l'isoforme PPAR γ , presque exclusivement exprimé dans le tissu adipeux, joue un rôle fondamental dans la physiologie adipocytaire.

Les trois membres de la famille des C/EBPs (α , β et δ) sont exprimés à des temps différents de l'adipogenèse, chacun ayant un rôle régulateur différent. Les C/EBP β et C/EBP δ interviennent au début du processus de différenciation adipocytaire (Cao et coll., 1991). Le C/EBP β , en synergie avec le C/EBP δ , induit l'expression du PPAR γ 2 dans le préadipocyte (Wu et coll., 1996). C/EBP α est exprimé relativement tard lors du processus de différenciation et n'intervient donc probablement pas dans l'initiation de l'adipogenèse. Une co-expression d'ADD1 avec le PPAR γ permet d'augmenter l'activité transcriptionnelle de PPAR γ , même en l'absence de ligand (Kim et coll., 1996).

Si PPAR γ a été reconnu comme un activateur de la différenciation adipocytaire, l'acide rétinoïque, quant à lui, a été décrit comme un inhibiteur de la différenciation adipocytaire (Stone et coll., 1990 ; Kamei et coll., 1994). Il ne peut cependant plus bloquer le processus si C/EBP α a déjà été induit. Il a donc été proposé que l'AR bloque l'activation de PPAR γ et C/EBP α par C/EBP β (Schwarz et coll., 1997). Nous rencontrons là une des interférences possibles entre ces deux voies d'action que nous allons développer dans le paragraphe suivant. Egalement, il a été suggéré une potentialisation de l'action inhibitrice de RAR sur la différenciation adipocytaire par les TRs.

D'autre part, Pou et coll. (1986) ont mis en évidence une expression transitoire du récepteur TR β , sous le contrôle de T3 et VD3 à un stade préadipocytaire précoce. Or, l'expression du gène S14 (spot 14), impliqué dans le métabolisme lipidique, est activée par les hormones thyroïdiennes dans le foie et le tissu adipeux blanc. L'augmentation de l'expression du gène S14 lors de l'étape de maturation des cellules suggère un rôle important de S14 dans la différenciation adipocytaire. Ces données suggèrent également une intervention des TRs dans le contrôle de la différenciation adipocytaire.

4. Interactions entre les voies de signalisation des lipides et de la vitamine A

Les données récentes ne manquent pas témoignant des nombreuses interférences entre ces deux voies de signalisations : depuis les gènes du métabolisme des lipides régulés par l'acide rétinoïque jusqu'aux acides gras régulant la transcription du gène codant pour le RXR dans des cellules hépatiques de rats (Steiniger et coll., 1998) ou la mise en évidence de l'acide docosahexaénoïque comme ligand potentiel de ce même RXR dans le cerveau de souris (de Urquiza et coll., 2000). Egalement, des ligands du RXR ont été démontrés comme fonctionnant comme des sensibilisateurs à l'insuline, capables de diminuer l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie et l'hypertriglycéridémie (Mukherjee et coll., 1997a) et réduisant la prise

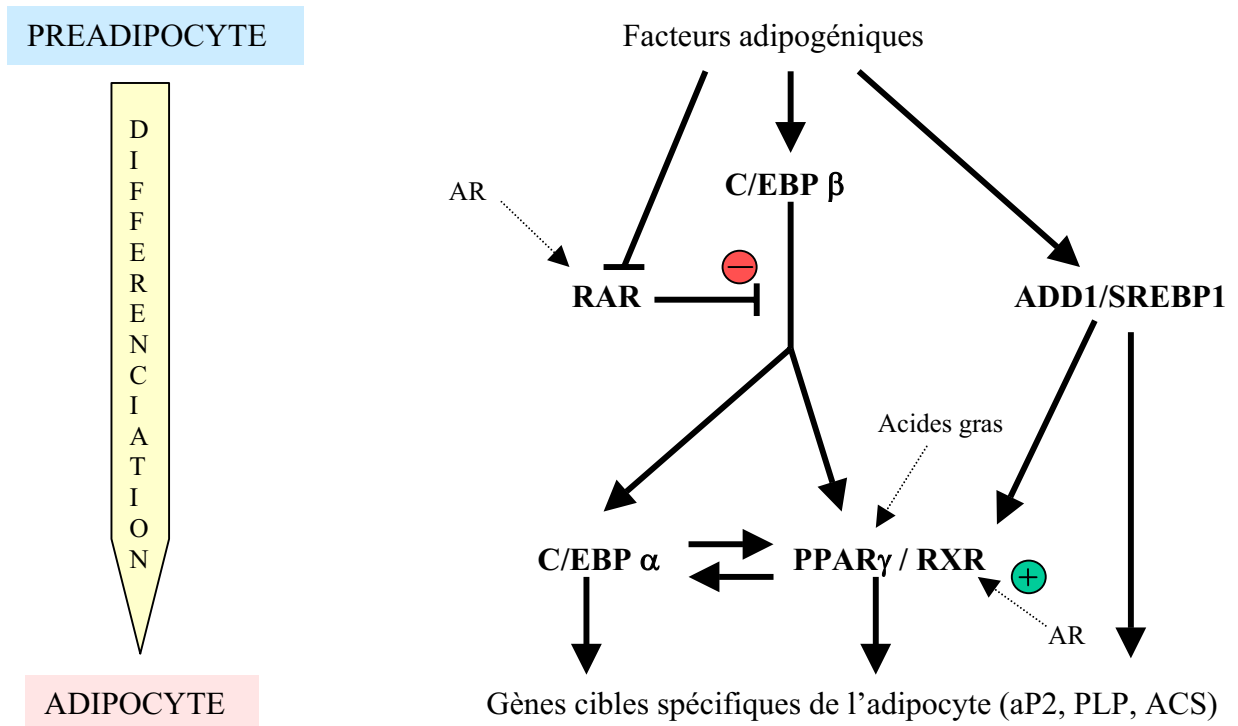


Figure 4 : Modèle illustrant la cascade de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation adipocytaire

RA : retinoic acid ; C/EBP : CAAT/enhancer binding protein ; RAR : RA receptor ; RXR : retinoid-X receptor ; PPAR : peroxisome proliferator-activates receptor ; ADD :adipose differentiation and determination factor ; SREBP : sterol regulatory binding protein ; aP2 : acid-binding protein ; PLP : lipoprotein lipase ; ACS : acyl-CoA synthetase

alimentaire quotidienne et le poids du corps chez des rats génétiquement obèses (Emilsson et coll., 2000). Ces rétinoides fourniraient ainsi une nouvelle approche pour le traitement de la résistance à l'insuline et du diabète non-insulino dépendant. Par ailleurs, une étude récente démontre que des souris dépourvues de RXR α dans leurs adipocytes deviennent ainsi résistantes à une obésité induite par un régime hyperlipidique ou par une induction chimique (Imai et coll., 2001). Ils suggèrent que l'hypertrophie induite par un régime hyperlipidique est médiée par l'hétérodimère RXR α -PPAR γ .

Le développement des approches moléculaires a conduit à un ensemble de résultats cohérents sur les interférences entre les voies de signalisation des acides gras et des rétinoides notamment au niveau de leurs récepteurs nucléaires via le partenaire commun, le RXR (récepteur de l'acide 9-*cis* rétinolique) (Kliwer et coll., 1992a ; Juge-Aubry et coll., 1995). Un des mécanismes invoqué à l'issue des résultats obtenus *in vitro*, pour expliquer ces interférences, est que l'activation d'une des voies entraînerait un changement de la disponibilité des RXRs pour les autres récepteurs.

Des études ont montré que l'hétérodimère PPAR/RXR se fixe sur des éléments de réponse de type DR-1 (1 nucléotide sépare les deux demi-sites). Ces éléments DR-1 sont également reconnus par les hétérodimères RAR/RXR. Ainsi, la compétition pour le site DR-1 est responsable, en partie, des mécanismes d'interaction existants entre les différentes voies de signalisation impliquant ces récepteurs. Ce phénomène se manifeste notamment lors de la différenciation adipocytaire. Ainsi, en raison du niveau très fluctuant de RAR et de PPAR γ au cours de l'adipogenèse, il s'opère un échange de partenaires pour RXR qui pourrait résulter en une altération de l'activité des gènes qui passeraient de l'état activé à un état réprimé ou vice et versa (Di Renzo et coll. 1997).

Les données bibliographiques présentées ci-dessus mettent en évidence les interactions, à différents niveaux, que peuvent présenter les voies de signalisation cellulaire

des rétinoïdes et des acides gras. Des études effectuées au laboratoire ont mis en évidence des diminutions d'expression des RARs et des TRs chez des rats nourris avec des régimes hyperlipidiques (Bonilla et coll., 2000). Ainsi, une situation nutritionnelle caractérisée par une consommation excessive de lipides alimentaires pourrait être liée à des modifications des voies de signalisation de la vitamine A et des hormones thyroïdiennes. Chez l'homme, de telles situations sont de plus en plus le reflet du comportement alimentaire actuel dans les pays industrialisés et entraînent des bouleversements physiologiques qui, à la longue, conduisent à l'apparition de pathologies.

IV. Présentation du projet de recherche

A ce jour, de nombreux travaux de biologie cellulaire et moléculaire visent à préciser les mécanismes d'interventions (et d'interactions) des acides gras et de l'acide rétinoïque dans le contrôle de l'expression génique (en particulier sur les gènes cibles de leurs actions). Dans ce cadre de recherche, ces travaux, principalement *in vitro*, se concentrent sur l'identification de nouveaux cofacteurs des récepteurs nucléaires ou bien sur l'identification de la nature exacte des interactions physiques existant entre ces différents récepteurs.

En comparaison, peu de travaux sont consacrés à l'étude des relations existant entre l'expression des récepteurs nucléaires et le statut nutritionnel. Des études précédentes ont montré que le niveau d'expression des RARs et des TRs était notamment sensible aux modifications du statut hormonal ou vitaminique de l'animal. C'est dans cette dernière orientation de recherche que s'inscrit notre travail. Celui-ci est, en effet, l'étude des profils d'expression des RARs, TRs et PPARs dans des organismes dont le statut lipidique était perturbé et plus précisément dans des organismes développant un état d'obésité.

- La première partie de cette étude a été effectuée chez des animaux nourris avec un régime hyperlipidique connu pour entraîner une obésité d'origine alimentaire. Par cette approche physiologique, nous avons soumis des rats à un régime appétant, appelé régime

cafétéria, soit pendant 8 jours (durée qui correspond à la mise en place de réponses précoces), soit pendant 28 jours (durée correspondant au début de la phase dynamique de prise de poids) afin d'observer l'évolution des dérégulations cellulaires accompagnant la prise de poids.

- La deuxième partie de ce travail a été réalisée chez une population obèse suivie en milieu hospitalier. En effet, une étude biomédicale nous a permis de disposer de tissu adipeux humain et nous nous sommes intéressés à l'expression de ces récepteurs nucléaires chez une population obèse, en phase dynamique de prise de poids ou, au contraire, en phase de perte de poids comparativement à une population témoin.

CHAPITRE II.
MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

Dans ce chapitre sont exposées les conditions générales concernant les modèles et les techniques utilisées.

I. MODELES D'ETUDES

1. ETUDE BIOMEDICALE

1.1. Recrutement des sujets participant à l'étude

Cette étude a été réalisée sur 121 sujets volontaires obèses et/ou diabétiques non insulino-dépendants. Elle porte sur 21 hommes et 100 femmes, âgés de 18 à 65 ans, hospitalisés dans le service de Nutrition-Diabétologie et Maladies Métaboliques de l'Hôpital Haut-Lévêque (CHU Bordeaux). Cette étude a reçu un avis favorable du Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Bordeaux A.

A Bordeaux, une étude préalable chez le sujet sain a été conduite auprès de 187 patientes volontaires, âgées de 18 à 50 ans, lors d'un travail collaboratif entre les services de Gynécologie-Obstétrique des Professeurs DALLAY et LENG, le service de Chirurgie Générale du Professeur BASTE et le laboratoire du Professeur ENTRESSANGLES. Cette étude a fait l'objet de la thèse de Carole BOUE et a permis d'établir une population de référence quant à la composition en acides gras de leur tissu adipeux et de leur plasma. Les critères retenus pour le recrutement des patients excluent les sujets affectés de : hypertension artérielle, athérosclérose (artérite ou coronaropathie), diabète(s), hyperlipidémie familiale, obésité, dénutrition ou maladies chroniques induisant une dénutrition (cancers, tuberculose...), alcoolisme. Parmi cette population, les 72 patientes hospitalisées, non enceintes, pourront donc être considérées comme population "contrôle" dans l'Etude Biomédicale de type "cas/contrôle".

Le service de Nutrition et Diabétologie de l'Hôpital Haut-Lévêque s'est chargé du recrutement des sujets parmi les patients hospitalisés présentant une obésité ou un diabète insulino-dépendant. Lors du premier contact avec le patient le médecin lui remet une lettre d'information expliquant le but et l'organisation de l'étude. Chaque patient ayant accepté de participer à l'étude signe une lettre de consentement après avoir eu avec le médecin un entretien et un examen clinique qui permettront au médecin de décider, en fonction des critères d'inclusion et d'exclusion indiqués ci-après, si le patient peut être définitivement recruté.

1.1.1. Critères d'inclusion

Les patients devaient :

- être obèses et/ou diabétiques non insulino-dépendants
- être âgés de 20 à 65 ans
- accepter qu'un échantillon de tissu adipeux sous-cutané abdominal et un échantillon de sang soient prélevés lors de leur hospitalisation
- accepter de répondre à une enquête alimentaire

1.1.2. Critères d'exclusion

Etaient exclus de l'étude :

- les patients non obèses
- les femmes enceintes
- les patients présentant une pathologie associée de type néoplasique, insuffisance rénale ou insuffisance hépatique
- les patients ayant des troubles de la coagulation, prenant des anticoagulants ou des anti-agrégants
- les patients ayant des antécédents de transfusion

- les patients de moins de 18 ans ou de plus de 65 ans
- les patients prenant des médicaments pouvant modifier le statut lipidique (hypolipémiant, hormones thyroïdiennes ou stéroïdiennes)

1.2. Enquêtes alimentaires

L'enquête alimentaire a été réalisée par la diététicienne du service lors de l'entrée du patient à la clinique. Il s'agit d'un questionnaire de type semainier effectué auprès du patient dans le but de déterminer ses habitudes alimentaires et ses apports caloriques journaliers. Son analyse a été effectuée par le logiciel BILNUT.

1.3. Typage phénotypique des patients

Lors de leur hospitalisation, diverses données ont été recueillies concernant les patients et permettant leur typage phénotypique telles que leur : poids, taille, (permettant le calcul de l'IMC : indice de masse corporelle = poids / taille² en kg/m²), tension artérielle, tour de taille, tour de hanche (permettant le calcul du rapport WHR, "waist/hip ratio" = tour de taille /sur tour de hanches).

1.4. Prélèvements des échantillons biologiques

Des dosages sériques de l'insuline, du glucose, des triglycérides et du cholestérol total ont été effectués à l'hôpital chez les patients à jeun.

De plus, un échantillon de sang a été prélevé sur les patients à jeun. 2 fois 5 ml de sang ont été recueillis dans 2 tubes lithium héparine puis ont été immédiatement réfrigérés à 4°C, dans l'attente de leur acheminement (rapide et en présence de glace) à notre laboratoire. Dès leur arrivée au laboratoire, les tubes de sang ont été centrifugés (3500 tours/min pendant 10 min à 4°C) de façon à séparer le plasma des globules rouges. Après avoir été prélevé, le plasma était ensuite stocké à -20°C.

Un échantillon de tissu adipeux a été prélevé au niveau de l'abdomen, après anesthésie locale, par aspiration à l'aide d'un trocart. Le tissu ainsi récupéré est immédiatement lavé dans une solution physiologique de NaCl (9 g/l) puis plongé dans l'azote liquide avant stockage à –80°C.

2. APPROCHE EXPERIMENTALE

2.1. Les animaux

Les expériences ont été effectuées sur des rats mâles de souche Wistar, âgés de 6 semaines, fournis par IFFA CREDO (l'Arbresle, France). Ils ont été élevés dans une animalerie maintenue à 22-24°C dont le rythme lumière-obscurité était de 10-12 heures et ont été pesés quotidiennement. Les animaux, répartis par cages de deux rats, ont été soumis au régime standard pendant 10 jours afin de permettre leur adaptation. Ils ont été séparés au hasard en 4 lots de 8 rats chacun, en fonction du type et de la durée du régime donné (8 ou 28 jours). Les animaux recevaient la nourriture et la boisson *ad libitum* renouvelées une fois par jour en fin d'après-midi.

A la fin de la période expérimentale, les rats ont été sacrifiés par décapitation, leur sang était recueilli et leur foie et le tissu adipeux rapidement prélevés. Après lavage des tissus dans une solution saline (NaCl, 9 g/l), des échantillons étaient plongés dans l'azote liquide avant stockage à –80°C.

2.2. Les régimes expérimentaux

Deux régimes ont été utilisés : un régime standard et un régime dit "cafétéria", qui est un régime hyperlipidique, riche en acides gras saturés (Berraondo et coll., 2000) (tableaux IV et V).

Le régime cafétéria est constitué d'aliments variés qui présentent une forte appétence et induisent une importante prise alimentaire volontaire et spontanée chez les rats. Il est

composé de pâté, de chocolat, de chips, de biscuits, de lardons et d'aliments standards dans les proportions 2/1/1/1/1/1.

Chaque aliment est donné à raison de 5 g/rat/jour, hormis le pâté (10 g/rat/jour), soit 35 g de nourriture/rat/jour pour le régime cafétéria. Le régime standard (UAR, A04) est aussi donné à raison de 35 g/rat/jour, sous forme de bouchons. Les animaux ayant reçu le régime standard servent de témoins.

Chaque aliment donné a été pesé précisément chaque jour, ainsi que les aliments non consommés de la veille, afin de connaître la quantité énergétique ingérée par les rats.

II. METHODES D'ANALYSES BIOCHIMIQUES ET MOLECULAIRES

1. Analyses lipidiques

1.1. Analyses du tissu adipeux et du plasma (figure 5)

1.1.1. Extraction des lipides

Les lipides sont extraits des tissus selon la méthode de Folch et coll. (1957) avec 20 volumes de chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v) par g de tissu (broyé pour le tissu adipeux) ou par ml (pour le plasma). L'extraction est faite sous agitation magnétique à température ambiante pendant 1 h, au terme de laquelle 0,2 volume de KCl à 0,8% dans de l'eau sont ajoutés par volume de mélange d'extraction. On provoque ainsi la séparation des phases hydroalcoolique et chloroformique. Cette dernière est prélevée puis lavée 3 fois avec 0,2 volume de phase dite "supérieure" selon Folch et coll. (1957).

La phase chloroformique finale est filtrée, le solvant est évaporé sous vide, à température ambiante, à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait brut est ensuite repris dans du chloroforme. La solution chloroformique obtenue est filtrée, le solvant évaporé sous vide et l'extrait sec repris quantitativement par un volume convenable de chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v). La solution ainsi obtenue est appelée par la suite "extrait de Folch" ; elle est conservée à -20° C jusqu'aux analyses.

Tableau IV : Energie apportée par les lipides, les glucides et les protéines du régime (en % de l'énergie apportée par le régime).

| | <i>régime standard</i> | <i>régime cafétéria</i> |
|----------------------|------------------------|-------------------------|
| lipides (%) | 8 | 65 |
| glucides (%) | 71 | 25 |
| protéines (%) | 21 | 10 |

Tableau V : Composition en acides gras de la fraction lipidique des régimes standard et cafétéria.

| | <i>régime standard (A04)</i> | <i>régime cafétéria</i> |
|--------------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| acides gras saturés (%) | 30 | 42,5 |
| 14:0 | 4,3 | 1,9 |
| 16:0 | 17,6 | 26,6 |
| 18:0 | 3,1 | 12,8 |
| acides gras monoinsaturés (%) | 17 | 38,5 |
| 16:1 (n-7) | 0,2 | 1,4 |
| 18:1 (n-9) | 16,3 | 34,4 |
| 20:1 (n-9) | 0,4 | 0,5 |
| acides gras polyinsaturés (%) | 54 | 18 |
| 18:2 (n-6) | 49,7 | 15,2 |
| 18:3 (n-3) | 3,4 | 1 |

1.1.2. Préparation des esters méthyliques d'acides gras (EMAG)

Les acides gras des lipides totaux du tissu adipeux et du plasma ont été méthylés selon la méthode de Morrisson et Smith (1964). Pour cela, un volume convenable d'"extrait de Folch" (équivalent à 8 mg de lipides) du tissu adipeux a été traité en présence de 0,5 ml d'hexane et de 1 ml de trifluorure de bore à 14 % dans le méthanol (Fluka, France), pendant 60 min à 90° C, dans un tube de verre (10 ml) hermétiquement fermé (bouchon à vis avec pastille de téflon). Les EMAG ainsi obtenus sont extraits, après addition de 1 ml d'eau distillée, par trois fois avec 2 ml d'hexane. Les phases hexaniques réunies ont été concentrées et, après avoir été lavées avec 1 ml d'eau distillée, sont stockées à -20° C dans l'attente des analyses par CPG (décrites dans le § 1.3).

1.2. Préparation de la fraction microsomale de foie de rats et dosage des acides gras

4 g de foie frais sont homogénéisés dans 32 ml de tampon sucrose/EDTA (saccharose 0,25 M, EDTA 0,05 mM, tris-HCl 10 mM, pH 7,4) à 800 tr/min L'homogénat est soumis à une série de centrifugations différentielles (20 min à 9000 g, 10 min à 75000 g et 60 min à 105000 g). Le culot de la dernière centrifugation contenant la fraction microsomale est repris et lavé dans 4 ml d'un tampon sucrose (saccharose 0,25 M, tris-HCl 10 mM, pH 7,4). Des fractions de microsomes de 2 ml sont congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

Lors de l'extraction des lipides totaux des microsomes, l'"extrait de Folch" est préparé selon le protocole décrit précédemment (décrit dans le § 1.1.1). 2 ml de préparation de microsomes sont nécessaires à cette extraction. A partir de l'"extrait de Folch" microsomal, les phospholipides des microsomes sont isolés par chromatographie en couche mince sur une plaque de verre recouverte de silice 60H, avec le solvant de migration éther/acétone (60:20). Les fractions lipidiques sont révélées par pulvérisation de dichlorofluorescine et observation

sous UV 254-366 nm. Les phospholipides restent au niveau du dépôt et sont récupérés par grattage de la silice.

Les phospholipides sont ensuite méthylés par ajout de BF₃ dans un bain d'huile à 100°C pendant 1h30. Les EMAG ainsi obtenus sont stockés à -20°C.

1.3. Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse

La composition de EMAG est établie par CPG dans les conditions suivantes : colonne (60 m) capillaire (diamètre intérieur : 0,25 mm) en silice greffée BPX 70 (épaisseur de film : 0,25 µm) ; chromatogramme (CARLO-ERBA ; GC-8000) avec détecteur à ionisation de flamme et couplé à un intégrateur enregistreur SP 4400 (Sprectra physics); gaz vecteur : hydrogène.

L'identification des EMAG est basée sur la comparaison de leurs temps de rétention avec ceux d'esters méthyliques standards (Sigma), chromatographiés dans les mêmes conditions, ainsi que sur des données de la littérature.

1.4. Dosages du cholestérol et des triglycérides sériques chez le rat

Les dosages du cholestérol et des triglycérides sériques des rats ont été effectués par le laboratoire de biochimie de l'hôpital Pellegrin. Ils ont été réalisés sur un automate SYNCHRON CX5 Beckman, qui utilise des réactifs spécifiques à cet appareil. Les méthodes de dosage des triglycérides et du cholestérol, reposent sur une hydrolyse et une oxydation successives de ces composés afin d'obtenir du peroxyde d'hydrogène.

A partir d'H₂O₂ une peroxydase catalyse la formation d'un composé coloré; la variation d'absorbance mesuré à 520 nm, est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol et de triglycérides de l'échantillon et permet donc d'en déterminer par le calcul, la concentration.

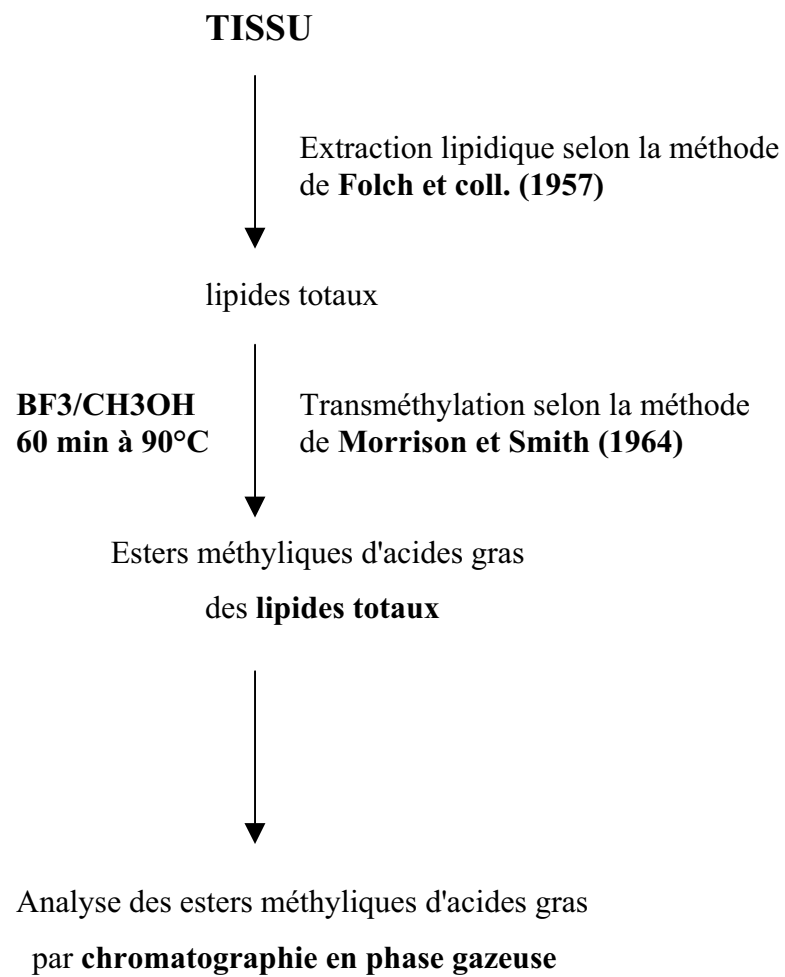


Figure 5 : Méthologie suivie pour l'analyse des lipides des différents tissus.

2. Quantification des ARNm par la méthode traditionnelle de transcription inverse et d'amplification enzymatique en chaîne (RT-PCR) semi-quantitative et de RT-PCR en temps réel

Nous avons utilisé la technique de RT-PCR semi-quantitative pour quantifier les ARNm des récepteurs nucléaires RAR, RXR, TR et PPAR, et les ARNm de l'acyl-CoA oxydase (ACO) chez le rat et la technique de PCR en temps réel pour quantifier les récepteurs nucléaires RAR, TR et PPAR chez l'homme.

2.1. Principe de la RT-PCR

L'amplification enzymatique en chaîne ou "Polymerase Chain Reaction" (PCR) est une méthode *in vitro* permettant d'amplifier un fragment spécifique d'ADN en utilisant l'activité catalytique d'une polymérase thermorésistante : la "Taq DNA polymerase", purifiée à partir de la bactérie thermophile *Thermophilus aquaticus* (Chien et coll., 1976 ; Saiki et coll., 1988).

Pour amplifier les ARNm par la technique de la PCR, il faut au préalable réaliser une transcription inverse de ces ARNm en ADN complémentaires (ADNc). Cette étape est réalisée par la transcriptase inverse (SuperScript™II RnaseH⁻) du virus de la leucémie murine de Moloney (M-MLV), qui synthétise l'ADNc à partir d'une amorce complémentaire d'une séquence localisée en 3' (en aval) de la partie à amplifier. Une seconde amorce, équivalente à la séquence de l'ARNm est rajoutée et la "Taq polymérase" synthétise le second brin entre les amorces puis effectue l'amplification.

La quantité d'ARNm des récepteurs nucléaires (RAR, TR, RXR, PPAR) et du gène ACO dans le foie et des récepteurs nucléaires dans le tissu adipeux n'est pas connue en valeur absolue, leur proportion est déterminée par rapport à un étalon interne, l'ARNm de la β -actine, simultanément transcrit en ADNc et amplifié dans le milieu réactionnel de l'ARNm à quantifier. La β -actine a été choisie comme étalon pour sa stabilité dans l'organisme, quelles

que soient les conditions expérimentales. En effet, le gène de la β -actine est transcrit chez l'animal indépendamment des conditions nutritionnelles (Ma et coll., 1990) et du statut hormonal (Mitsubishi et coll., 1989).

2.2. Amorces oligonucléotidiques

Les oligonucléotides ont été synthétisés par la société Genset (Paris). Afin de vérifier la spécificité de ces amorces, les fragments de PCR ainsi amplifiés ont été séquencés au laboratoire de biochimie de l'hôpital Pellegrin par la technique de terminaison de chaîne (kit ABI Prism) sur un séquenceur Perkin Elmer 377 DNA Sequencer. Les résultats du séquençage montrent que ces techniques nous permettent d'amplifier spécifiquement les ARNm des séquences d'intérêt.

Les séquences des amorces oligonucléotidiques de la β -actine, des RAR, TR, RXR, PPAR et ACO de rat sont présentées dans le tableau VI, celles de la β -actine, des RAR, TR et PPAR chez l'homme sont données dans le tableau VII.

2.3. Mise en œuvre de la méthode

2.3.1. Extraction des ARN totaux

Dans le foie des rats

L'extraction des ARN a été réalisée selon une méthode dérivée de celle de Chomczynski et Sacchi (1987) (figure 6).

Les ARN totaux sont extraits à partir de 250 mg de tissu. L'échantillon est broyé, pendant 1 min à l'aide d'un potter à 600 tr/min, dans 5 ml de tampon d'extraction : Tris-HCl (100 mM) pH 7,5, thiocyanate de guanidium (4 M), EDTA (20 mM), DTT (0,5%) et N-lauryl sarcosine (0,5%).

Tableau VI : Séquences des amorces oligonucléotidiques et taille des fragments amplifiés chez le rat.

| amorces | séquences 5' → 3' | sites complémentaires | taille des fragments amplifiés |
|--|-----------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| β-actine * | amont AGGATGCAGAAGGAGATTACTGCC | 2814-2837 | 222 pb |
| | aval GTAAAACGCAGCTTCAGTAACAGTCC | 3159-3135 | |
| RARα *** | amont GCTGGGCAAGTACACTACGAAC | 843-864 | 118 pb |
| | aval GGCGAACTCCACAGTCTTAATG | 960-939 | |
| RARβ ** | amont CTCCTGAGAAGATCCGGAAAGCCCACC | 538-565 | 143 pb |
| | aval TTGGTGGCCAGCTCACTGAATTTGTCCC | 680-653 | |
| TRα₁β₁ ## | amont TCCTGATGAAGGGTGACGGACCTGC | 1247-1270 | 118 pb |
| | aval TCAAAGACTCCAAGAAGAGAGGC | 1364-1341 | |
| RXRα § | amont GCTGGTGTCTGAAGATGCGTGAC | 1238-1259 | 171 pb |
| | aval GGGTACTTGTGTTTGACAGTACG | 1388-1367 | |
| PPARα # | amont GCCATCTTACGATGCTGTCC | 245-265 | 140 pb |
| | aval GCGAAGTCAAACCTGGGTCC | 384-364 | |
| PPARγ₂ ♦ | amont CCCTTTGGTGACTTTATGGAGC | 1078-1099 | 146 pb |
| | aval CCTCGATGGGCTTCACGTTACAG | 1225-1204 | |
| ACO ‡ | amont GGTGCGGTCGGGGAAGTTGGTG | 1396-1417 | 122 pb |
| | aval CCTCCAGGCTGTTGATGTCCAC | 1496-1517 | |

* déterminée à partir de la séquence du gène de la β-actine de rat (Nudel et coll. 1983).

*** déterminée à partir de la séquence de l'ADNc de RARα de rat (Akmal et coll. 1996).

** déterminée à partir de la séquence de l'ADNc de RARβ de souris (Zelent et coll. 1989).

déterminée à partir de la séquence de l'ADNc de TR de rat (Murray et coll. 1988).

§ déterminée à partir de la séquence de l'ADNc de RXRα de rat (Gearing et coll. 1993).

déterminée à partir de la séquence de l'ADNc de PPARα de rat (Goettlicher et coll. 1992).

♦ déterminée à partir de la séquence de l'ADNc de PPARγ de rat (Miyakita et coll. 1998).

‡ déterminée à partir de la séquence de l'ADNc de ACO de rat (Miyazawa et coll. 1987).

Tableau VII : Séquences des amorces oligonucléotidiques et taille des fragments amplifiés chez l'homme.

| amorces | séquences 5' → 3' | sites complémentaires | taille des fragments amplifiés |
|---------------------------|----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| β-actine * | amont GAGCTACGAGCTGCCTGACG | 787-806 | 120 pb |
| | aval GTAGTTTCGTGGATGCCACAG | 906-886 | |
| RARα** | amont GGGTGGACATGCTGCAGGAGCC | 1142-1163 | 132 pb |
| | aval CCTTGGCGCTGATGCTTCGCAG | 1273-1252 | |
| TRβ₁*** | amont CCGAAGCACTGTCCAGACCGAGAAC | 334-358 | 90 pb |
| | aval TCAAAGACTTCCAAGAAGAGAGGC | 423-399 | |
| PPARγ## | amont CACAAGAACAGATCCAGTGGTTGCAG | 339-364 | 101 pb |
| | aval AATAATAAGGTGGAGATGCAGGCTCC | 439-414 | |

* déterminée à partir de la séquence de l'ADNc de la β-actine humaine (Vandekerckhove et coll. 1978).

** déterminée à partir de la séquence de l'ADNc de RARα humain (Giguere et coll. 1987).

*** déterminée à partir de la séquence de l'ADNc de TRβ humain (Weinberger et coll. 1986).

déterminée à partir de la séquence de l'ADNc de PPARγ humain (Mukherjee et coll. 1997).

Après avoir ajouté un volume équivalent d'une solution Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique (P/C/IAA) (25:24:1), l'homogénat est agité pendant 1 min pour obtenir une émulsion. Les protéines sont ainsi éliminées dans la phase phénolique. Après centrifugation 10 min à 12000 g la phase aqueuse, contenant les acides nucléiques, est récupérée pour une seconde extraction identique avec un volume de P/C/IAA. La phase aqueuse subit alors deux nouvelles extractions successives par addition d'un volume de chloroforme, afin d'éliminer les traces de phénol.

Les acides nucléiques sont alors précipités dans 2,5 volumes d'éthanol absolu et 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) et placés pendant 1 nuit à -20°C. Après centrifugation 10 min à 12000 g le culot est séché sous flux d'azote et repris dans 1 ml d'acétate de sodium 3 M. La suspension est centrifugée 15 min à 12000 g à température ambiante. Le surnageant contenant l'ADN est éliminé et le culot d'ARN est repris dans 200 µl d'eau milliQ stérile. 5 µl de cette suspension sont utilisés pour le dosage spectrophotométrique des ARN, le reste est à nouveau précipité avec 2,5 V d'éthanol absolu et 0,1 V d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2), et conservé à -20°C jusqu'à une utilisation ultérieure.

Dans le tissu adipeux blanc des rats

L'extraction des ARN totaux du tissu adipeux blanc abdominal de rat est réalisée selon la méthode Vidal et coll. (1997) avec le kit QIAGEN mini RNeasy.

300 à 400 mg de tissu adipeux abdominal sont broyés sous azote liquide, à l'aide d'un pilon et d'un mortier jusqu'à obtention d'une poudre. L'échantillon est alors transféré dans un potter puis est homogénéisé 1 minute à faible vitesse (400 à 600 tours par minute) en présence de tampon hautement dénaturant contenant de l'isothiocyanate de guanidium (tampon RLT) auquel est rajouté du β-Mercaptoéthanol (10 µl de β-Mercaptoéthanol pour 1 ml de tampon RLT).

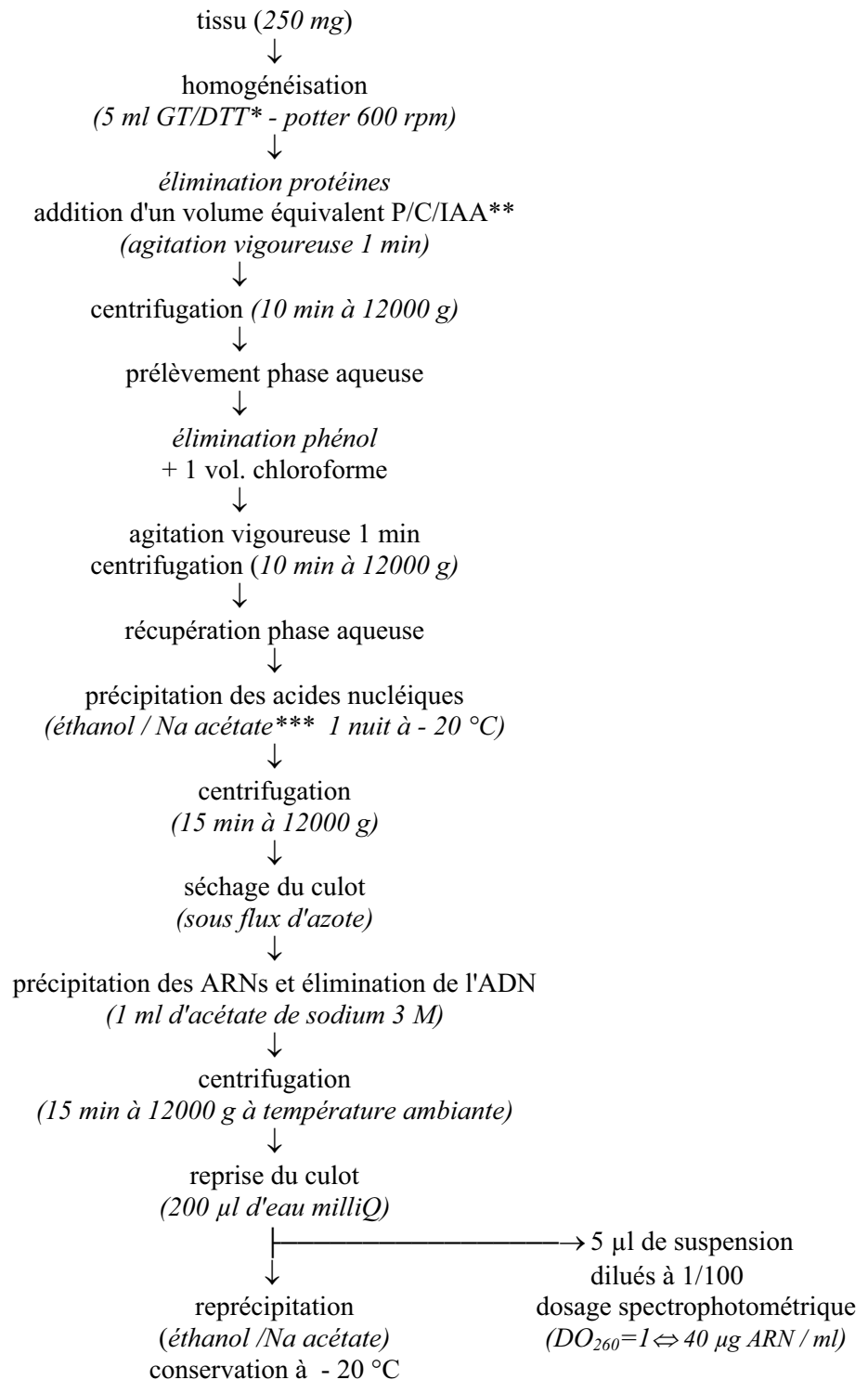


Figure 6 : Extraction des ARN totaux

(Selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987) modifiée).

* GT/DTT : Tris-HCl (100 mM) pH 7,5 ; guanidium thiocyanate (4 M) ; EDTA (20 mM) ; DTT (0,5 %) ; lauroyl sarcosine (0,5 %)

** P/C/IAA : phénol / chloroforme / alcool isoamylique (25:24:1)

*** éthanol / Na acétate : 2,5 V d'éthanol absolu + 0,1 V d'acétate de sodium 3 M

L'échantillon est homogénéisé par passage sur colonne filtrante (colonne QIAshredder). Il est ensuite mis en présence d'éthanol à 70% (v/v) puis déposé sur une colonne contenant un gel de silice. On utilise ainsi les propriétés de liaison des ARNs à la silice dans des conditions particulières de force ionique et de pH pour séparer les ARNs des autres constituants de l'échantillon. Des centrifugations successives de 15 secondes à 8000 g sont réalisées et les ARNs se lient sélectivement sur la colonne, puis les contaminants sont éliminés par des lavages successifs au moyen de tampons fournis par le kit.

Les ARNs sont alors élués par 100 µl d'eau. Les ARNs sont précipités pendant une nuit à -20°C avec 2,5 volumes d'éthanol absolu et 0,1 volume d'acétate de sodium. Une centrifugation de 30 minutes à 12000 g permet d'éliminer le surnageant. Le culot est alors rincé avec de l'éthanol à 70%. Une nouvelle centrifugation de 30 minutes à 12000 g permet de récupérer le culot d'ARNs qui est ensuite séché sous une cloche à vide. Le culot est alors repris dans 10 µl d'eau.

Dans le tissu adipeux blanc humain

L'extraction des ARN totaux du tissu adipeux blanc abdominal humain a été réalisée selon une méthode dérivée de celle de Chomczynski et Sacchi (1987) en utilisant le kit d'extraction Trizol (Life Technologies).

Les ARN totaux sont extraits à partir de 30 à 100 mg de tissu. L'échantillon est directement homogénéisé dans 800 µl de réactif Trizol, contenant du phénol et de l'isothiocyanate de guanidium, à l'aide d'un potter à 600 tr/min pendant 1 min. L'homogénat ainsi obtenu est laissé 5 min à température ambiante afin de permettre une complète dissociation des complexes nucléoprotéiques. 10 µl de glycogène sont ajoutés afin de réaliser une précipitation des ARNs pendant 1 mois à -80° C.

Après avoir ajouté 200 µl de chloroforme, l'homogénat est centrifugé pendant 15 min à 12 000 g et la phase aqueuse, contenant les acides nucléiques, est prélevée, les protéines étant éliminées dans la phase phénolique.

Les ARNs sont précipités par addition de 0,5 µl d'isopropanol (incubation de 10 min à 15-30°C). Une centrifugation à 12 000 g (10 min à 4°C) permet de récupérer le culot qui est, par la suite, lavé avec 1 ml d'éthanol à 75%. Après une centrifugation à 7500 g (5 min à 4°C), l'éthanol est éliminé, le culot est séché sous une cloche à vide et les ARNs sont alors repris dans de l'eau (10 µl) puis conservés à -80°C jusqu'à une utilisation ultérieure.

2.3.2. Contrôle de la qualité et dosage des ARN obtenus

L'intégrité des ARNs est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose.

Le dosage des ARNs met en œuvre une méthode spectrophotométrique dans laquelle une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 40 µg d'ARN/ml (Sambrook et coll., 1989).

Des mesures spectrophotométriques à différentes longueurs d'ondes permettent de contrôler :

- l'absence de contamination par le thiocyanate de guanidium, déterminée par le calcul du rapport DO 260/DO 230 qui doit être supérieur à 2,
- l'absence de contamination protéique, déterminée par le calcul du rapport DO 260/DO 280 qui doit être compris entre 1,7 et 2. Les valeurs en dessous de 1,7 témoignent d'une contamination protéique importante,
- l'absence de contamination phénolique, déterminée par le calcul du rapport DO 260/DO 270 qui doit être compris entre 1,27 et 1,29, mais surtout traduite par l'absence de pic à 270 nm sur le spectre.

2.3.3. Quantification des ARNm

2.3.3.1. Préparation de l'ADNc

Pour la PCR semi-quantitative

La transcription inverse des ARN totaux en ADNc est réalisée à partir de 20 µg d'ARN totaux (quantité permettant la PCR qualitative et la PCR quantitative).

Le milieu réactionnel a un volume final de 20 µl. Il contient 20 µg d'ARN totaux, 40 unités d'inhibiteur de ribonucléases et 25 unités de DNaseI-RNase free. Une première incubation de 15 min à 37°C est réalisée, puis les amorces avales (150 ng) sont ajoutées. Une deuxième incubation de 10 min à 70°C est lancée pour la dénaturation de la DNase. Le tampon de réaction de transcription inverse 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM, DTT 0,1 M) et les dNTP (0,12 mM) sont ajoutés ainsi que 100 unités de la transcriptase inverse superScript™II. Une incubation d'une heure à 42°C est réalisée pour synthétiser l'ADNc.

L'ADNc est conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

Pour la PCR en temps réel

La technique de préparation des ADNc est semblable à celle décrite ci-dessus pour la PCR. Cependant la sensibilité de la technique permet l'utilisation d'une quantité d'ARN moindre puisque nous n'utilisons plus que 1 µg d'ARN totaux. Le milieu réactionnel a un volume final de 20 µl. La transcriptase inverse utilisée est la même que précédemment (superScript™II), les concentrations des réactifs diffèrent par soucis d'adaptation aux conditions de PCR qui vont suivre. Nous utilisons 20 unités d'inhibiteur de ribonucléases, 10 unités de Dnase-Rnase free et 120 ng de l'amorce aval désirée. Les dNTPs sont ajoutés à une concentration de 0,25 mM et l'enzyme à une concentration de 200 unités. Les ADNc sont obtenus après une incubation de 1 h à 42°C. Ils sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

2.3.3.2. Quantification par RT-PCR

Amplification enzymatique en chaîne

Les amplifications qualitatives et quantitatives sont effectuées dans les mêmes conditions ; un thermocycleur (Perkin Elmer Cetus, DNA Thermal Cycler 480) réalise 34 cycles dont chacun se décompose en :

- 1 min de dénaturation à 95°C
- 1 min d'hybridation des amorces à 60°C
- 2 min de polymérisation à 72°C.

Seul le volume réactionnel final n'est pas le même : 100 µl pour l'amplification qualitative et 180 µl pour l'amplification quantitative. L'ADNc de la β-actine, qui sert d'étalon interne, sera coamplifié dans le même tube soit avec l'ADNc des RAR et TR, soit avec celui des RXR et PPAR, soit avec l'ADNc de l'ACO. Des résultats précédemment obtenus au laboratoire ont montré que la coamplification de l'ADNc de RAR, de TR et de l'ADNc de la β-actine ne diminue pas le rendement d'amplification, et que les amorces ne s'hybrident pas entre elles (Higueret et coll., 1992). Il en est de même pour les RXR et PPAR avec la β-actine ou l'ACO avec la β-actine. D'autre part pour chaque série de PCR, un tube contenant tous les constituants du milieu réactionnel mais dans lequel l'ADNc est remplacé par de l'eau, sert de témoin négatif pour vérifier l'absence d'ADN contaminant.

Le milieu réactionnel est composé de l'ADNc, du tampon d'amplification (gélatine 10 mg/l ; MgCl₂ 2 mM ; KCl 50 mM ; Tris-HCl 10 mM pH 8,5), de 0,2 mM de chaque dNTP, de 900 ng de chaque amorce aval et de 1000 ng de chaque amorce amont. Après 12 min de dénaturation à 97°C, 0,5 unités de Taq polymérase (Perkin Elmer Cetus N801-0060) /100 µl de milieu réactionnel est ajouté. Pour une amplification quantitative 1,85 MBq d'α³²P dCTP (activité spécifique 370 MBq/ml) (ICN 39011X) sont ajoutés au milieu réactionnel. Les cycles sont alors enclenchés.

Analyse des produits d'amplification

Pour l'amplification qualitative : 10 µl du milieu réactionnel sont prélevés à la fin du 34^{ème} cycle de PCR. Les fragments d'ADN coamplifiés sont séparés par une électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10 % pendant 2 heures à 50 mA. Les bandes sont révélées dans un bain de bromure d'éthidium (0,8 mg/l de bromure d'éthidium) et visualisées sous U.V. à une longueur d'onde de 254 nm (Sambrook et coll., 1989).

Pour l'amplification quantitative : 8 µl du milieu réactionnel sont prélevés, en fin de chaque cycle, du 7^{ème} au 22^{ème} cycle. Les fragments d'ADN coamplifiés à chaque cycle sont séparés par une électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10% pendant 2 heures à 50 mA. La radioactivité incorporée lors de l'amplification est visualisée après 2 heures d'autoradiographie, puis les bandes sont découpées sur le gel et la radioactivité émise est mesurée par comptage en scintillation dans 3 ml de liquide scintillant (liquide Beckman Ready Safe ; compteur Beckman LS 6000 Sc) (Higueret et coll., 1992).

Expression des résultats

La radioactivité mesurée au niveau d'une bande est proportionnelle au nombre de molécules d'ADN formées au cours de l'amplification. Théoriquement ce nombre double à chaque cycle, et de même la quantité (Y) de dCTP marqué incorporée au cours de l'amplification suit l'équation :

$$Y = A \times 2^n \quad (1)$$

Y = radioactivité incorporée lors de l'amplification

A = quantité initiale d'ADN

n = nombre de cycles d'amplification

Lorsqu'on représente le logarithme de la radioactivité incorporée (Y) en fonction du nombre de cycles (n), la courbe obtenue présente 2 phases (figure 7) :

- une phase exponentielle au début et au milieu de la réaction d'amplification,
- un plateau en fin de réaction dû à une diminution de l'activité de la Taq polymérase et/ou à une diminution du rapport de la quantité de molécules qui servent de matrices sur la quantité des amorces et des dNTP.

Or le rendement (R) de l'amplification n'est jamais de 100%, car, par exemple, toutes les molécules d'ADN présentes dans le milieu réactionnel ne servent pas toutes de matrice à chaque cycle d'amplification.

L'équation (1) s'écrit alors sous la forme :

$$Y = A (1 + R)^n$$

R = rendement de l'amplification déduit de la courbe $\log(Y) = f(n)$

Chelley et coll. (1990) ont montré que dans la partie linéaire de la courbe, c'est à dire la phase exponentielle de la réaction, et uniquement pendant cette phase, la quantité d'ADN amplifiée (Y) est proportionnelle à la quantité initiale d'ADNc (A), qui elle-même reflète la quantité initiale d'ARNm. Ces auteurs ont aussi montré qu'on peut calculer la proportion (A) d'un type d'ARNm donné (dans cette étude les ARNm des RAR (A_{RAR}), des TR (A_{TR}), des RXR (A_{RXR}), des PPAR (A_{PPAR}) et de l'ACO (A_{ACO})) par rapport aux ARNm de la β -actine ($A_{\beta-act}$) par la formule (si on prend l'exemple des RAR) :

$$\frac{A_{RAR}}{A_{\beta-act}} = \frac{Y_{RAR} (1 + R_{\beta-act})^n}{Y_{\beta-act} (1 + R_{RAR})^n}$$

Dans la pratique, un logiciel de représentation scientifique (Sigma Plot, Jandel Corporation) permet de tracer la droite de régression linéaire de la partie exponentielle de la courbe $\log(Y) = f(n)$.

L'équation de cette droite, calculée par l'ordinateur, est de la forme :

$$\log (Y) = \log (1+ R) n + \log (A) \Leftrightarrow y = ax + b.$$

La quantité initiale d'ARNm (A) est donnée par l'ordonnée à l'origine de la droite de régression linéaire (log (A)) et le rendement de l'amplification enzymatique en chaîne par la pente de la droite (log (1 + R)).

Le calcul se simplifie alors :

$$\frac{A_{\text{RAR}}}{A_{\beta\text{-act}}} = \frac{10^{\text{bRAR}}}{10^{\text{b}\beta\text{-act}}} \quad \text{et } R = 10^{\text{a}} - 1.$$

2.3.3.3. Quantification par la technique de PCR en temps réel

Principe

La PCR est réalisée à l'aide d'un thermocycler Light CyclerTM (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) qui combine le processus d'amplification à la détection en temps réel des produits de PCR. En effet, le système LightCyclerTM est constitué d'une chambre thermique et d'une unité optique.

Dans la chambre thermique, les cycles de PCR sont assurés par un flux d'air pulsé dont la température est contrôlée très précisément. Ceci permet une montée ou une descente en température de 20°C/sec. La réaction d'amplification s'effectue dans des capillaires de verre borosilicaté dont le rapport surface/volume élevé permet une très rapide mise à température du milieu réactionnel. La capacité maximale du Light Cycler est de 32 capillaires. La chambre thermique, dans laquelle chaque échantillon est chauffé grâce à un air rapidement distribué, contribue à une grande uniformité de températures pour tous les échantillons. Ainsi toutes les réactions sont réalisées dans des conditions identiques. Egalement, les caractéristiques générales de cet appareil permettent de réaliser 40 cycles d'amplification en moins de 30 min.

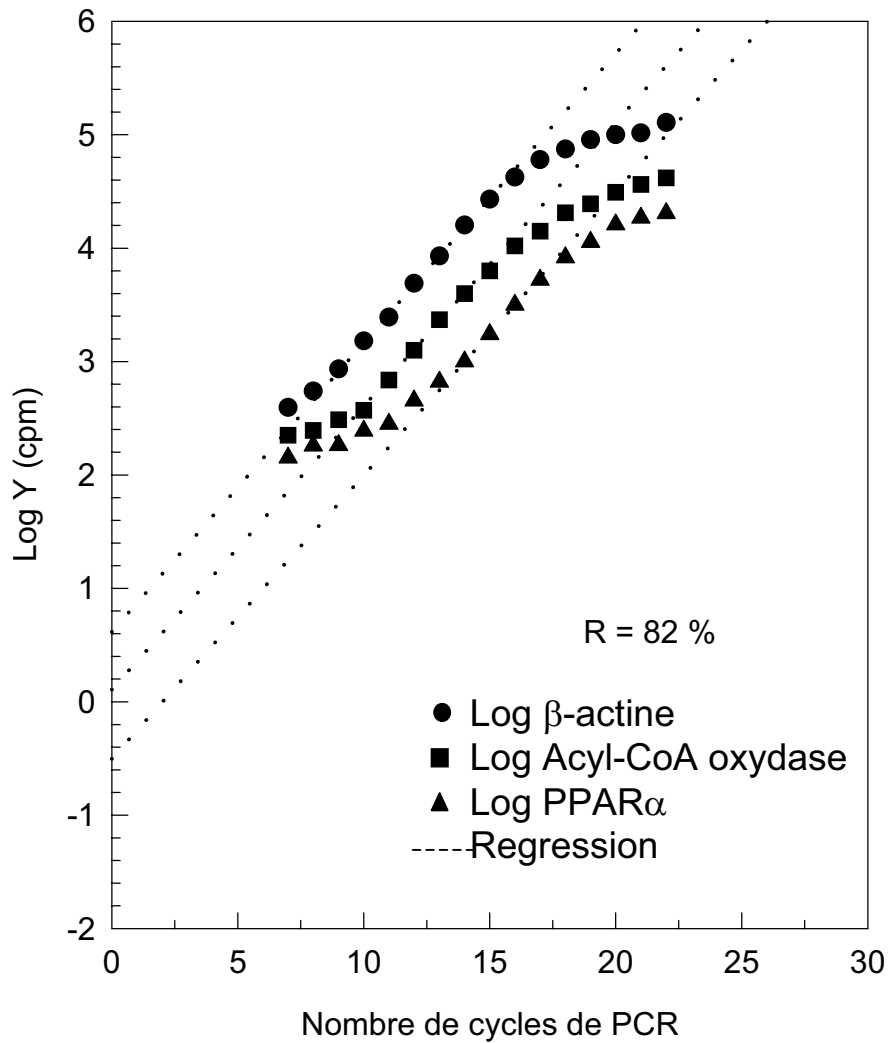


Figure 7 : Exemple d'une représentation semi-logarithmique d'incorporation du dCTP α ³²P au cours de l'amplification des fragments d'ADNc et régression linéaire de la phase exponentielle.

Un bloc optique, constitué de microfluorimètres, permet de détecter les produits d'amplification par la mesure d'une émission de fluorescence dont l'intensité est directement corrélée à la quantité de produits de PCR présents à chaque nouveau cycle. Plusieurs formats de fluorescence peuvent être utilisés pour suivre la PCR, nous avons utilisé le SYBR Green I. Le SYBR Green I est un fluorophore (excitable à 470 nm) qui a une émission de fluorescence lorsqu'il est intercalé dans le double brin d'ADN. De ce fait, à chaque nouveau cycle de la PCR, le SYBR Green I se fixe sur les produits d'amplification dont la présence est détectée par la mesure de leur fluorescence à 530 nm à la fin de chaque élongation. Par ailleurs, l'utilisation de ce fluorophore permet de réaliser des courbes de fusion des produits d'amplification étudiés, ce qui nous permet de déterminer le degré de spécificité et de sensibilité des couples d'amorces des gènes cibles choisis pour les amplifications.

Amplification enzymatique en chaîne

La réaction d'amplification est réalisée dans les capillaires de verres de 2 ml. Le volume réactionnel final est de 20 µl. Il contient 20 ng de cDNA, 0,5 µl d'amorce amont et 0,5 µl d'amorce aval, 4 mM de MgCl₂ ainsi que le tampon LC FastStart DNA Master SYBR Green I, prêt à l'emploi, qui est composé de dNTP (10 mM), de MgCl₂ (1 mM), le SYBR Green I et la FastStart Taq ADN polymérase dans son milieu réactionnel. La Taq polymérase FastStart est une forme modifiée de Taq ADN polymérase. Elle est inactive à température ambiante car certains de ses acides aminés sont bloqués par un composé chimique sensible à la chaleur. Une étape d'activation de l'enzyme à haute température est donc nécessaire pour éliminer son groupe bloquant. Le programme thermique comprend donc une étape initiale de 10 min à 95°C suivie par 45 cycles d'amplification comprenant chacun 3 étapes :

- 8 s de dénaturation à 95°C
- 6 s d'hybridation des amorces à 64°C
- 10 s de polymérisation à 72°C

Expression des résultats

Pour chaque échantillon et chaque couple d'amorces une courbe d'amplification est réalisée (figure 8), témoignant de l'augmentation de la quantité de fluorescence à chaque cycle de PCR comme décrit précédemment pour la PCR semi-quantitative.

La réaction de PCR réalisée par le LightCycler peut donc être décrite par la formule suivante :

$$N_n = N_0 \times E^n$$

N_n : quantité d'ADN pour un cycle donné

N_0 : quantité initiale d'ADN (=ARNm initial)

E : efficacité de la PCR

N : nombre de cycle de PCR

Comme décrit précédemment, Chelley et coll. ont montré que l'on peut calculer la proportion N_0 d'un ARNm donné par le rapport à l'ARNm d'un gène de ménage utilisé comme standard interne par la formule :

$$\frac{N_0 \text{ gène cible}}{N_0 \text{ gène de ménage}} \times 100$$

Le LightCycler est équipé d'un logiciel permettant de calculer ce rapport à partir du premier cycle de PCR correspondant à la phase exponentielle de celle-ci. Pour cela une ligne de base est positionnée au-dessus de la fluorescence basale. Elle permet de déterminer, sur les courbes d'amplification, le point de départ (crossing point, Cp) de la phase exponentielle de la PCR. Le Cp représente l'intersection entre la tangente de l'amplification exponentielle et la ligne de base.

Des courbes standards sont réalisées avec un gène de ménage utilisé comme étalon interne, la β -actine (figure 8a). Des dilutions sérielles de l'ADNc de la β -actine (10 ng, 2,5 ng, 0,625 ng et 0,156 ng d'ADNc) donnent une gamme de courbes d'amplification permettant de tracer une droite représentant C_p en fonction du logarithme du nombre de copies initiales de l'ADN standard (figure 8b).

La pente (p) de cette droite standard témoigne de l'efficacité de la PCR et est définie par l'équation :

$$C_p = p (\log N_0) + \log (N_n/E)$$

C_p = cycle de croisement

N_0 = quantité initiale d'ADNc

N_n = quantité d'ADN pour un cycle donné

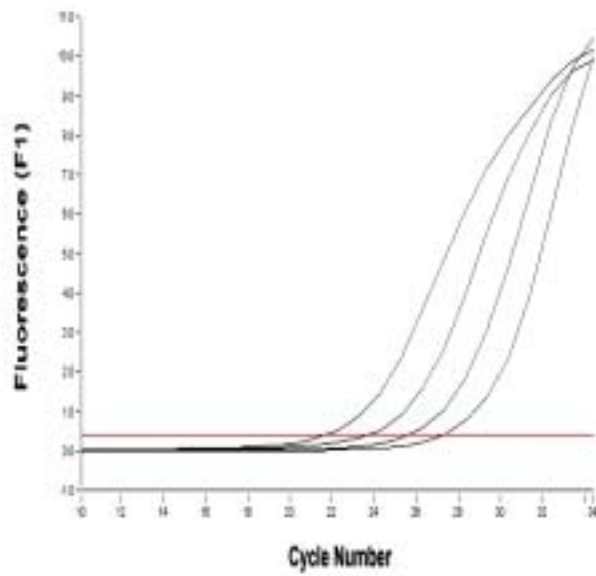
p = pente ($p = -1/\log E$)

E = efficacité ($E = 10^{-1/p}$)

Des droites standards d'amplification du gène de ménage, la β -actine, sont réalisées dans nos différentes conditions expérimentales afin de s'assurer que l'expression de la β -actine est stable. En pratique, les droites standards se superposent avec une erreur tolérée inférieure à 5% pour la pente.

La gamme réalisée avec la β -actine permet de déterminer la valeur C_p de chaque ADNc d'intérêt afin de calculer, à l'aide du logiciel LightCyclerTM, la valeur initiale d'ADNc. Afin de quantifier le gène d'intérêt, la β -actine et le gène cible sont amplifiés pour une même concentration initiale d'ADNc (correspondant à l'une des concentrations de la gamme standard de dilution de la β -actine). Les reports des C_p de la β -actine et du gène cible, pour une concentration fixe sur la droite standard de la β -actine, nous permettent d'obtenir les valeurs des concentrations initiales N_0 et, ainsi, d'exprimer le niveau d'expression du gène cible en % de celui de la β -actine.

A)



B)

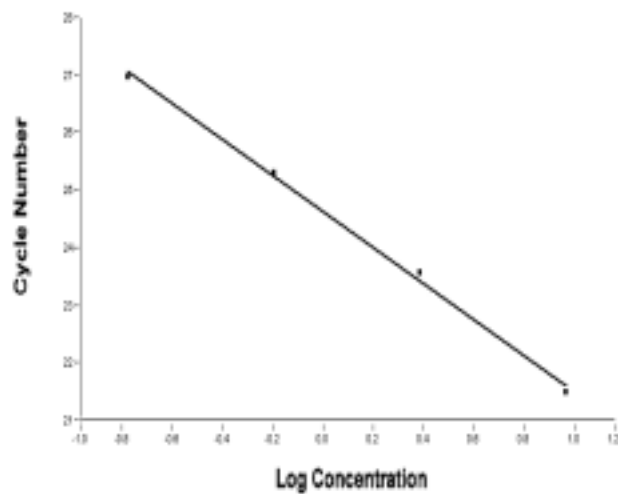


Figure 8 :A) Courbes d'amplifications de la β -actine, gamme de dilutions au quart d'ADNc obtenus à partir d'ARN totaux de tissu adipeux. B) Droite standard de la β -actine, cette droite est la représentation graphique des C_p en fonction de la concentration initiale d'ADNc. La pente était de -3.2 et le coefficient de régression de 1.

3. Etudes des propriétés de liaison des récepteurs nucléaires de la triiodothyronine et de l'acide rétinoïque

Différentes représentations graphiques permettent de visualiser la liaison à l'équilibre d'un ligand en fonction de la concentration de ce ligand. Les unes directes, de type michaëlien, permettent de suivre la liaison hormone-récepteur en fonction du ligand libre ; d'autres comme la représentation de Scatchard (1949) permettent de visualiser les résultats selon une représentation linéaire. Dans ce cas la pente de la droite obtenue par régression linéaire permet de calculer la valeur apparente de la constante d'association (pente = $-K_a$), qui traduit l'affinité du récepteur envers le ligand. L'extrapolation de la droite jusqu'à son intersection avec l'axe des abscisses permet de calculer la concentration de l'hormone liée à l'équilibre et la valeur apparente de capacité maximale de liaison des récepteurs (C_{max}).

3.1. Préparation des noyaux des cellules hépatiques

Cette opération a été décrite par DeGroot et Torresani (1975). Les noyaux sont préparés par fractionnement cellulaire à partir d'un homogénat de foie, dans du saccharose (0,32 M). La dernière étape de purification se fait par centrifugation à 105000 x g pendant 60 min sur coussin de saccharose (2,2 M) (figure 9).

3.2. Etude des propriétés de liaison des récepteurs nucléaires de la triiodothyronine

Les méthodes utilisées pour obtenir les récepteurs et pour étudier leurs propriétés sont celles décrites par Torresani et DeGroot (1975).

Les noyaux provenant de 1 g de foie sont repris dans 1,33 ml de tampon TKEM (Tris-HCl (20 mM), KCl (0,4 M), EDTA (2 mM), MgCl₂ (1 mM), pH 7,9). L'extrait nucléaire est obtenu par centrifugation à 100000 x g pendant 30 min.

Les protéines nucléaires extraites (50 µg de protéines) sont incubées dans 0,2 ml de tampon TKEM renfermant des quantités croissantes de [¹²⁵I]T₃ (L-[3'-¹²⁵I] triiodothyronine, réf. IM321, activité spécifique > 1,2 mCi/µg, (Johnson et Johnson)) (0,02 à 0,325 ng/ml). La réaction de liaison dure 3 heures à 20°C, elle est arrêtée par l'addition de 0,8 ml d'une suspension de résine Dowex 1X8-400 (25 mg/ml) dans le TKEM, à 0°C. Après agitation, la résine est sédimentée par centrifugation (1000 x g, 2 min). L'hormone libre, fixée par la résine, se retrouve dans le culot alors que l'hormone liée reste dans le surnageant.

La quantité de T₃ liée est calculée à partir de la mesure de la radioactivité des culots et d'une partie des surnageants (compteur KONTRON MR 252). Une incubation en parallèle, en présence d'un excès de T₃ froide (1000 fois la concentration de T₃ marquée) permet de calculer la liaison non spécifique.

La liaison spécifique est le résultat de la différence entre la liaison totale et la liaison non spécifique.

Dans nos expériences, les incubations sont effectuées en double.

3.3. Etude des propriétés de liaison des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque

Cette liaison est étudiée selon la méthode décrite par Cavey et coll. (1990).

Pour obtenir les récepteurs de l'acide rétinoïque, les noyaux provenant de 1 g de foie sont lavés trois fois avec le tampon de liaison HMK (Hépès (10 mM), MgCl₂ (1,5 mM), KCl (10 mM)) puis soumis à une digestion avec de la DNase I (4000 UI/ml) pendant 30 min à température ambiante suivie d'une extraction saline (NaCl (5 M)). L'extrait nucléaire est alors obtenu par centrifugation à 10000 x g pendant 5 min.

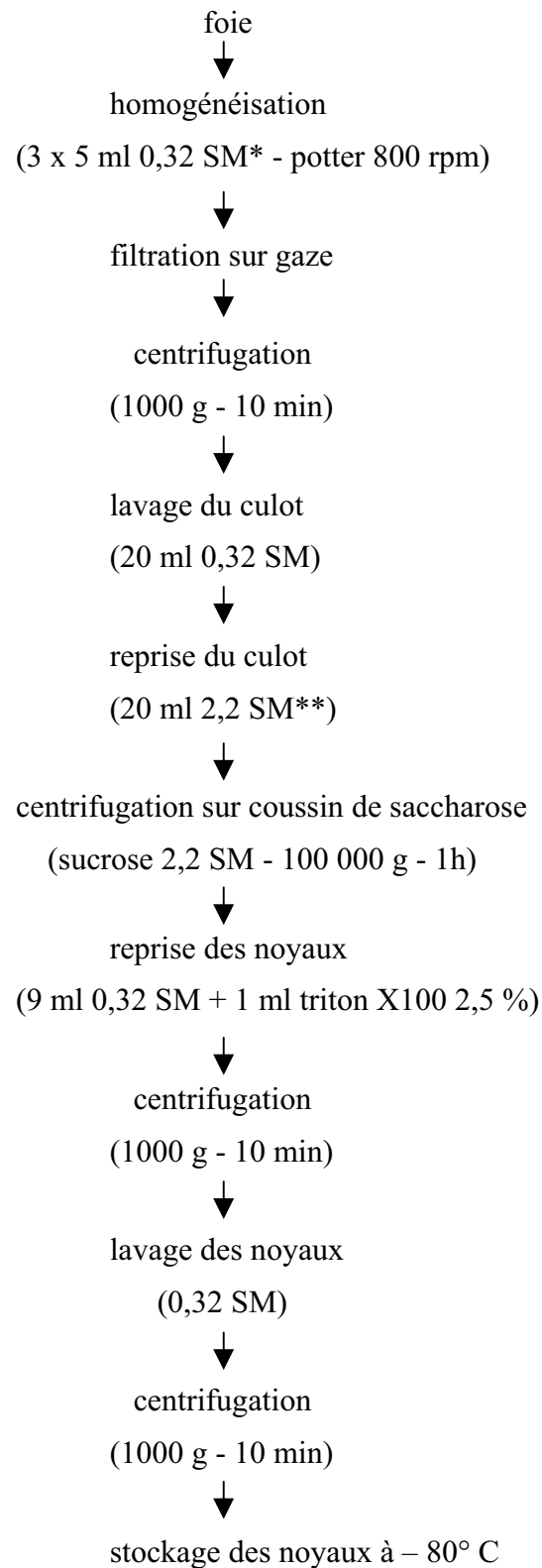


Figure 9 : Principales étapes de préparation des noyaux de cellules de foie de rats

(D'après DeGroot et Torresani, 1975)

* 0,32 SM : solution de sucrose (0,32 M) ; MgCl₂ 1 mM

** 2,2 SM : solution de sucrose (2,2 M) ; MgCl₂ 1 mM

Des fractions de 96 μl d'extraits nucléaires sont mélangées avec 2 μl de concentrations croissantes (0,05 à 0,3 $\mu\text{mol/l}$ dans du DMSO) d'acide [^3H] 4-(5,6,7,8-tétra-hydro-5,5,8,8-tétraméthyl-2-anthracényl) benzoïque (CD367), un analogue de l'acide rétinoïque fourni par Galderma RD (Sophia Antipolis, Valbonne, France) (figure 10).

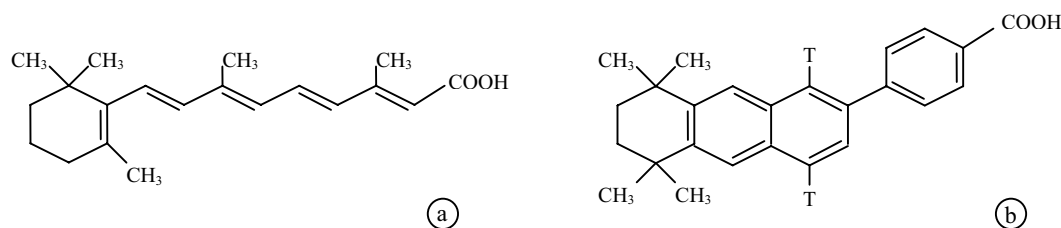


Figure 10 : Structure a) de l'acide rétinoïque, b) du CD367 tritié

Après une heure d'incubation à 4 °C, à partir de 50 μl du mélange d'incubation, le ligand lié au récepteur est séparé du ligand par chromatographie liquide haute performance sur colonne d'exclusion diffusion TSK SW 3000 (300 x 7,5 mm, Tosho Haas, Stuttgart, Germany). Les composés sont séparés en fonction de leur poids moléculaire. Celui des RARs étant de 45 kDa, nous avons utilisé une colonne qui fractionne les espèces moléculaires dans un domaine de poids moléculaire compris entre 10^4 et 5.10^5 .

L'élution est réalisée avec du tampon KH_2PO_4 (0,3 M, pH 7,8), à un débit de 0,5 ml/min. La colonne a été préalablement étalonnée avec un mélange d'albumine humaine (67 kDa), d'ovalbumine (45 kDa) et de myoglobine de cheval (16,8 kDa). Des fractions de 0,2 ml sont collectées et comptées au compteur de scintillation liquide Beckman LSC 6000, dans du liquide scintillant "Ready safe cocktail" (Beckman Instruments).

Les valeurs du comptage radioactif obtenues dans les fractions contenant les complexes RAR- ^3H CD367 sont additionnées puis exprimées en nM afin d'évaluer les C_{max} dans les représentations de Scatchard, ces dernières sont ensuite calculées en fmoles de ^3H CD367 lié/mg de protéines dans les tableaux. La liaison non spécifique est déterminée par

incubation en présence d'un excès de CD367 non marqué (1000 fois la concentration de CD367 marqué).

III. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES

Les traitements statistiques des résultats ont été réalisés au moyen du logiciel de statistique SPSS (Chicago, Illinois). Les tests utilisés ont été les suivants :

- Pour tester d'éventuelles différences entre les 2 populations humaines (obèses et non obèses), le "test t student" ou de Mann et Whitney ont été employés selon que les 2 variables testées étaient normalement distribuées ou non.
- Dans nos séries expérimentales et pour chaque paramètre mesuré, nous avons calculé la moyenne arithmétique des n valeurs obtenues. Chaque moyenne est accompagnée de son erreur standard (SEM). La comparaison des moyennes des valeurs obtenues dans les deux groupes expérimentaux le test "t" de Student pour les séries indépendantes (Schwartz, 1993). Nous considérons comme significative une différence entre deux moyennes lorsqu'elle est associée à une probabilité $p < 0,05$.
- Le coefficient de Pearson ou le rho de Spearman ont été déterminés avec leurs seuils de signification ($p < 0,05$) de façon à connaître les relations qui existent entre deux variables indépendantes. Le coefficient de Pearson s'applique à des variables quantitatives, normalement distribuées, alors que pour des données non réparties normalement c'est le rho de Spearman qui a été choisi. Ont été considérées comme significatives, les corrélations dont le coefficient de Spearman ($= r$) était supérieur à 0,4 et le seuil de signification ($= p$) était inférieur à 0,05.

CHAPITRE III.
RESULTATS ET DISCUSSIONS

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les données bibliographiques présentées dans la partie décrivant le contexte scientifique mettent en évidence des relations entre une alimentation riche en lipides, la mise en place du surpoids, voire de l'obésité et le risque de développement de pathologies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, des diabètes ou certains cancers. Par ailleurs, la découverte récente du rôle des acides gras dans l'expression des gènes a généré un courant de recherche destiné à mieux comprendre l'intervention des acides gras dans les processus de contrôle de l'homéostasie cellulaire. Il est aujourd'hui bien établi que l'un des mécanismes de l'action cellulaire des acides gras s'exerce par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires, les PPARs qui appartiennent à la sous famille des récepteurs nucléaires comprenant les RARs et les TRs. Ces récepteurs présentent le même mode d'action lors de leur intervention dans la régulation de gènes et il existe des interférences entre les voies de signalisation des acides gras et celles des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes. Dans ce contexte, une étude menée au laboratoire par Stéphane Bonilla a permis de mettre en évidence des modifications dans ces voies de signalisation cellulaire chez des rats nourris durant 4 semaines avec différents régimes supplémentés en huiles. En effet, l'expression des PPARs dans le foie des rats nourris avec ces régimes hyperlipidiques augmentait tandis que les taux des RARs et des TRs diminuaient, ceci indépendamment de la nature des acides gras composant les régimes (Bonilla et coll., 2000).

Ces résultats nous ont conduit à formuler l'hypothèse qu'une alimentation naturelle, riche en lipides, entraînant une prise de poids pouvait conduire, via l'activation des PPARs, à des dysfonctionnements dans la voie d'action de l'acide rétinoïque. Nous avons donc étudié

les conséquences d'un excès de lipides alimentaires engendrant un surpoids sur l'action cellulaire de l'acide rétinoïque. Notre travail a été essentiellement consacré à l'expression de récepteurs nucléaires (PPAR, RAR, RXR et également TR) chez des rats en phase dynamique de prise de poids ou chez des sujets obèses.

Pour les mesures d'expression des ARNm dans les foies de rats nous avons choisi les isoformes RAR β et TR α 1, β 1. Nos critères de choix ont été leur niveau d'expression dans le foie, leur aptitude à répondre aux variations de concentration en ligands, leur aptitude à coder pour des récepteurs fonctionnels. Dans le tissu adipeux, nous avons favorisé l'étude de RAR α , impliqué dans le contrôle de l'adipogenèse et également soumis aux régulations de son ligand.

La première partie de notre travail a été consacrée à l'étude des effets de la consommation d'un régime hyper énergétique et hyperlipidique sur l'expression des RARs et des TRs dans le foie et le tissu adipeux de rats. Un régime appétant a été administré pendant 8 jours, période correspondant à une phase précoce de la mise en place du surpoids ou pendant une durée de 28 jours pendant laquelle les animaux sont en phase dynamique de la prise de poids. Nous avons quantifié les ARNm de RAR β , TRs, PPAR α , RXR α et ACO dans le foie et de RAR α , TR, RXR α et PPAR γ dans le tissu adipeux blanc abdominal des animaux en phase de prise de poids.

Dans une deuxième partie, une étude comparable a été réalisée chez une population humaine. Sur du tissu adipeux sous-cutané, nous avons recherché d'éventuelles dérégulations chez des individus obèses en phase de gain ou, au contraire, de perte de poids. Nous avons donc mesuré les taux de PPAR γ 2, RAR α et TR β dans le tissu adipeux sous-cutané de patients obèses et témoins par une technique de RT-PCR quantitative en temps réel.

Les résultats de ce travail ont donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publications

Bonilla S., **Redonnet A.**, Noël-Suberville C., Pallet V., Garcin H., Higuieret P.
High-fat diets affect the expression of nuclear retinoic acid receptor in rat liver.
British Journal of Nutrition (2000) 83, 665-671.

Bonilla S., **Redonnet A.**, Noël-Suberville C., Groubet R., Pallet V., Higuieret P.
Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) by bezafibrate affects
retinoic acid (RAR) and triiodothyronine (TR) nuclear receptor expression in rat liver.
Journal of Physiology and Biochemistry (2001), 57 (1), 1-8.

Redonnet A., Groubet R., Noël-Suberville C., Bonilla S., Martinez A., Higuieret P.
Exposure to an obesity-inducing diet early affects the pattern of expression of peroxisome
proliferator, retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptors in the rat.
Metabolism (2001), 50 (10), 1161-1167.

Redonnet A., Bonilla S., Noël-Suberville C., Dabadie H., Gin H., Higuieret P.
Relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and
retinoic acid receptor alpha (RAR α) gene expression in obese human adipose tissue.
Soumise à *International Journal of Obesity*.

Communications

Noël-Suberville C., Bonilla S., **Redonnet A.**, Higuieret P.

Effects of the nature and the quantity of dietary lipids on the expression of retinoic acid (RAR) and triiodothyronine (TR) nuclear receptors in the rat liver.

Fonctionnalité des nutriments, 3^{ème} colloque Franco-Britannique de Nutrition, Nancy, 30 septembre-2 octobre 1998.

Redonnet A., Noël-Suberville C., Bonilla S., Groubet R., Higuieret P.

Effects of a high fat diet on the expression of retinoic acid (RAR), retinoid X (RXR) and peroxisome proliferator activated (PPAR) nuclear receptors in rat liver.

Body weight regulation and obesity: metabolic and clinical aspects, Conjoint congress SEN/NS, Pamplona, 8th-11th September, 1999.

Bonilla S., **Redonnet A.**, Groubet R., Higuieret P., Noël-Suberville C.

Effects of a pharmacological induction of PPAR by bezafibrate on the expression of retinoic acid (RAR) and triiodothyronine (TR) nuclear receptors in rat liver.

Body weight regulation and obesity: metabolic and clinical aspects, Conjoint congress SEN/NS, Pamplona, 8th-11th September, 1999.

Redonnet A., Noël-Suberville C., Bonilla S., Groubet R., Higuieret P.

Effets d'un régime hyperlipidique sur l'expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (RAR) de la triiodothyronine (TR) et des proliférateurs de peroxysomes (PPAR) dans le foie de rats.

Corps gras, Nutrition et Santé, Question d'actualité Journées CHEVREUL 1999, AFECA, Pessac, 25-26 novembre 1999 paru dans *Oléagineux et Corps gras Lipides*, (2000), 7 (1), p 107.

Redonnet A., Noël-Suberville C., Bonilla S., Groubet R., Higuieret P.

Effects of a high fat diet on the expression of retinoic acid (RAR), retinoid X (RXR) and peroxisome proliferator activated (PPAR) nuclear receptors.

11th European Fat-soluble Vitamins Group Meeting, Toulouse, 9-11th march 2000.

PARTIE I. APPROCHE EXPERIMENTALE :

Effets d'un régime hyperlipidique induisant un surpoids sur l'expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine dans le foie et le tissu adipeux de rats

1. Résultats

La première partie de notre travail a été réalisée chez des rats développant un surpoids d'origine alimentaire. Nous avons utilisé le régime cafétéria dont la composition se rapproche du régime alimentaire occidental et qui engendre, chez le rat, une hyperphagie volontaire pouvant entraîner une obésité. Ce modèle expérimental nous a permis d'appréhender l'impact d'une alimentation riche en lipides caractérisée par un apport quotidien excessif en acides gras et en énergie. Nous avons cherché à préciser les éventuels effets d'une telle consommation sur l'expression des RARs et des TRs.

1.1. Caractérisation du modèle expérimental

Pour ces expériences nous avons utilisé des rats mâles de souche Wistar âgés de 6 semaines, élevés dans les conditions générales décrites dans le chapitre "matériel et méthodes". Des rats nourris avec des aliments standards ont servi de témoins pour l'étude des récepteurs nucléaires chez des rats nourris avec le régime cafétéria.

Les régimes ont été donnés aux animaux soit pendant une période de 8 jours, correspondant à la mise en place de réponses précoces, soit pendant 28 jours afin d'étudier la mise en place du surpoids.

1.1.1. Consommation alimentaire

Pendant la période expérimentale, la nourriture était donnée aux rats en excès. Nous avons mesuré la quantité de chaque type d'aliments ingérée quotidiennement par chaque rat. Nous en avons déduit la consommation énergétique totale journalière de chaque rat et l'énergie apportée respectivement par les lipides, glucides et protéines et par chaque type d'acide gras (tableaux VIII a et b).

Les rats témoins ont consommé approximativement 26 g/j de l'alimentation standard contenant 16,38 g de glucides, 4,42 g de protéines et 0,78 g de lipides, ce qui représente 377 kJ (73 % de glucides, 20 % de protéines, 7 % de lipides).

Les rats nourris avec le régime cafétéria ont consommé 4,8 g d'aliments standards, 2,0 g de chips, 2,4 g de chocolat, 5,0 g de lardons, 4,9 g de biscuits et 9,7 g de pâté ce qui représente approximativement 480 kJ/jour (30 % de glucides, 9 % de protéines, 61 % de lipides).

La prise énergétique élevée des rats nourris avec le régime cafétéria peut donc être attribuée à une consommation excessive en lipides. Celle-ci est principalement caractérisée par une proportion élevée d'acides gras saturés et d'acides gras monoinsaturés (respectivement multipliés par 17,6 et 28,1 par rapport au régime standard) tandis que les acides gras polyinsaturés ont un taux multiplié par 4,1 (tableau VIII b). Les rats soumis au régime cafétéria consomment des proportions plus importantes d'acides gras saturés et d'acides gras monoinsaturés (respectivement, 42,5 % et 38,5 %) que les rats nourris avec un régime standard (respectivement, 30 % et 17 %) tandis que la proportion d'acides gras polyinsaturés consommés est inférieure pour les rats "cafétéria" (18 %) comparés aux rats témoins (54 %) (tableau V).

Tableau VIII a : Consommation énergétique journalière des rats témoins et des rats nourris avec le régime cafétéria¹.

| | <i>Rats témoins</i> | <i>Rats "cafétéria"</i> |
|--------------------------------------|---------------------|-------------------------|
| Consommation en glucides (%) | 73 ± 0,7 | 30 ± 0,5 * |
| Consommation en protéines (%) | 20 ± 0,4 | 9 ± 0,1 * |
| Consommation en lipides (%) | 7 ± 0,1 | 61 ± 0,7 * |
| Apport calorique (kJ/j) | 377 ± 24 | 480 ± 36 * |

¹ résultats représentant la moyenne ± SEM de 8 rats

*significativement différent des valeurs du témoin (test "t" de Student, $P < 0,05$)

Tableau VIII b : Consommation lipidique journalière des rats témoins et des rats nourris avec le régime cafétéria¹.

| | <i>Rats témoins</i> | <i>Rats "cafétéria"</i> |
|---|---------------------|-------------------------|
| Lipides consommés (mg/j) | 788 ± 40 | 9700 ± 500 * |
| Acides gras saturés (mg/j) | 234 ± 16 | 4122 ± 290 * |
| 14:0 | 33,5 ± 1,7 | 184 ± 12 * |
| 16:0 | 137 ± 8 | 2580 ± 158 * |
| 18:0 | 24,2 ± 3,3 | 1242 ± 86 * |
| Acides gras monoinsaturés (mg/j) | 133 ± 10 | 3734 ± 250 * |
| 16:1 | 1,6 ± 0,1 | 136 ± 13 * |
| 18:1 | 127 ± 9 | 3337 ± 223 * |
| 20:1 | 3,1 ± 0,2 | 48,5 ± 4 * |
| Acides gras polyinsaturés (mg/j) | 421 ± 16 | 1746 ± 80 * |
| 18:2 | 388 ± 12 | 1474 ± 57 * |
| 18:3 | 26,5 ± 1,7 | 97 ± 6,2 * |

¹ résultats représentant la moyenne ± SEM de 8 rats

*significativement différent des valeurs du témoin (test "t" de Student, $P < 0,05$)

1.1.2. Croissance pondérale

Le poids des rats nourris avec le régime cafétéria pendant 1 semaine (300 ± 3 g) n'était pas significativement différent de celui des rats témoins (303 ± 4 g). Tandis qu'après 4 semaines de régime, le poids des rats nourris avec le régime cafétéria (404 ± 7 g) était légèrement plus élevé que celui des rats témoins (385 ± 5 g) (environ 6-7 %) (tableau IX et figure 11). Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment rapportés par Proenza et coll. (1992) qui montrent une faible augmentation de poids chez des animaux nourris avec ce type d'aliments durant un mois, le surpoids ne s'installant qu'après 3 mois de régime cafétéria.

Le tableau IX montre cependant qu'après 1 mois de régime cafétéria, les rats présentent une augmentation importante de la masse de tissu adipeux blanc (+ 61 %). Cette même différence s'observe déjà après 8 jours seulement de régime. Si les rats nourris durant 8 jours avec le régime cafétéria ne présentent pas de différences de poids avec des animaux nourris avec un régime standard, ils semblent cependant développer déjà une masse adipeuse conséquente.

1.1.3. Statut lipidique des animaux soumis au régime cafétéria

Pour mieux appréhender l'impact du régime cafétéria sur le statut lipidique des animaux, nous avons mesuré le taux des lipides sériques et analysé la composition en acides gras de la fraction "phospholipides" des microsomes de foie, que l'on considère comme représentative du statut lipidique, et des triglycérides du tissu adipeux blanc abdominal.

1.1.3.1. Mesures de paramètres sériques

Le dosage du taux de cholestérol sérique des rats nous a permis de constater une augmentation déjà significative après 8 jours de régime (+ 58 %), et qui augmente jusqu'à + 138 % après 28 jours de régime (tableau X). Ces résultats sont en accord avec ceux observés

Tableau IX : Effets d'un régime cafétéria administré pendant 8 jours ou 28 jours sur la croissance pondérale des animaux¹.

| | Régime 8 jours | | Régime 28 jours | |
|--------------------------------|----------------|------------------|-----------------|------------------|
| | <i>témoins</i> | <i>cafétéria</i> | <i>témoins</i> | <i>cafétéria</i> |
| Poids (g) | 303 ± 4 | 300 ± 3 | 385 ± 5 | 404 ± 7 |
| Tissu adipeux blanc (g) | 5,3 ± 0,6 | 8,7 ± 0,5* | 16,6 ± 1,3 | 27,5 ± 1,8* |

¹ résultats représentant la moyenne ± SEM de 8 rats

*significativement différent des valeurs du témoin (test "t" de Student, $P < 0,05$)

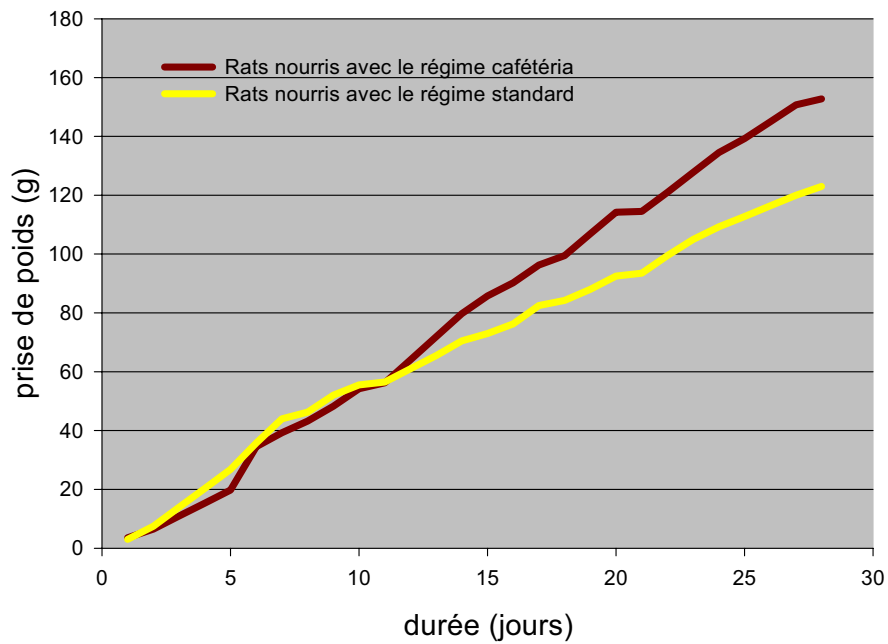


Figure 11 : Croissance pondérale des rats nourris avec les différents régimes.

Tableau X : Effets d'un régime cafétéria administré pendant 8 jours ou 28 jours sur les lipides sériques des animaux¹.

| | Régime 8 jours | | Régime 28 jours | |
|-------------------------------------|----------------|------------------|-----------------|------------------|
| | <i>témoins</i> | <i>cafétéria</i> | <i>témoins</i> | <i>cafétéria</i> |
| cholestérol sérique (mmol/l) | 0,93 ± 0,05 | 1,47 ± 0,08* | 0,57 ± 0,02 | 1,36 ± 0,10* |
| triglycérides (mmol/l) | 0,70 ± 0,04 | 0,68 ± 0,06 | 1,13 ± 0,11 | 1,08 ± 0,11 |

¹ résultats représentant la moyenne ± SEM de 8 rats

*significativement différent des valeurs du témoin (test "t" de Student, $P < 0,05$)

lors d'études précédentes montrant que la concentration en cholestérol sérique total était augmenté par les acides gras saturés provenant d'une consommation excessive en lipides (Matsuzawa, 1998).

Les triglycérides sériques ne sont, quant à eux, pas modifiés par ce régime, et ceci quelle que soit sa durée.

1.1.3.2. Composition en acides gras des phospholipides des microsomes hépatiques

La composition en acides gras des lipides totaux des microsomes hépatiques a été déterminée pour les rats nourris avec le régime cafétéria pendant 28 jours ainsi que pour les rats témoins (tableau XI). La proportion en acides gras saturés dans les microsomes ne varie pas entre les animaux ayant reçu les différents régimes. Si nous considérons plus précisément certains de ces acides gras, nous observons une diminution non significative de la part de l'acide palmitique (16:0) dans les phospholipides des rats nourris avec le régime cafétéria par rapport aux rats témoins, qui est compensée par une augmentation de la proportion de l'acide stéarique (18:0) (+ 22 %). Les acides gras monoinsaturés sont moins représentés chez les animaux ayant reçu le régime hyperlipidique (- 26 %). Ceci peut être attribué à une forte diminution du 16:1 (n-7) et du 18:1 (n-7) chez ces animaux (respectivement, - 230 % et - 64 %, $p < 0,05$).

La proportion des acides gras polyinsaturés totaux reste inchangée dans les microsomes de foie de rats nourris avec les deux régimes. Nous avons cependant observé une diminution non significative de la proportion de l'acide linoléique (18:2 (n-6)) (- 15 %) chez les animaux nourris avec le régime cafétéria par rapport aux rats témoins. Cette diminution peut être associée à la faible proportion de ce même acide gras dans le régime cafétéria par rapport au régime standard (- 69 %).

Ces résultats nous indiquent cependant que, chez les rats nourris avec un régime de type cafétéria, les proportions en acides gras des microsomes hépatiques ne sont que peu, voire pas, modifiées. Ces animaux ne manifestent donc pas de carence en acides gras essentiels.

1.1.3.3. Composition en acides gras du tissu adipeux abdominal

La composition en acides gras des lipides totaux du tissu adipeux abdominal a été déterminée pour les rats nourris avec le régime cafétéria ainsi que pour les rats témoins nourris avec une alimentation standard pendant 28 jours (tableau XII).

La proportion d'acides gras saturés reste quasiment inchangée dans le tissu adipeux blanc abdominal des rats nourris avec le régime cafétéria par rapport aux rats témoins nourris avec un régime standard. En revanche, la composition en AGMI et AGPI de ce tissu semble refléter la composition en acides gras des deux différents régimes. En effet, dans le tableau XII, nous observons que les acides gras monoinsaturés sont largement plus représentés dans le tissu adipeux des animaux nourris avec le régime cafétéria (+ 32,5 %, $p < 0,05$) tandis que le taux d'acides gras polyinsaturés diminue de 47,4 % chez ces animaux par rapport aux témoins.

Si nous regardons plus précisément les différents acides gras nous observons cependant des modifications parmi les acides gras saturés. En effet, l'acide palmitique 16:0, qui est le principal acide gras saturé (en moyenne 76 % des AGS totaux) dans ce tissu, présente une diminution non significative de 8 % chez les rats nourris avec le régime cafétéria par rapport aux rats témoins. L'acide stéarique 18:0, représentant 18,5 % des AGS totaux, est quant à lui augmenté de 21,6 %. Le ratio 18:0/16:0, calculé à partir du tableau XII, est significativement augmenté dans le tissu adipeux des rats nourris avec le régime cafétéria par rapport aux rats témoins ($0,28 \pm 0,09$ pour les rats nourris avec le régime cafétéria ; $0,211 \pm 0,036$ pour les rats témoins) suggérant une augmentation du flux à travers la voie de l'élongation qui ne semble pas être entièrement dépendante du régime.

Tableau XI : Proportions des acides gras des microsomes de foie chez les rats nourris avec un régime standard ou cafétéria

| | <i>Rats témoins</i> | | | <i>Rats "cafétéria"</i> | | | |
|------------------|---------------------|------------|-------------|-------------------------|------------|-------------|----|
| | Moyenne | +/- | E T | Moyenne | +/- | E T | |
| AGS | 43,65 | +/- | 3,50 | 47,18 | +/- | 2,73 | |
| 14:0 | 0,33 | +/- | 0,03 | 0,44 | +/- | 0,02 | |
| 15:0 | 0,155 | +/- | 0,03 | 0,12 | +/- | 0,01 | |
| 16:0 | 18,79 | +/- | 0,68 | 17,19 | +/- | 0,05 | |
| 17:0 | 0,45 | +/- | 0,01 | 0,29 | +/- | 0,01 | |
| 18:0 | 22,49 | +/- | 0,45 | 27,50 | +/- | 0,54 | * |
| 20:0 | 0,09 | +/- | 0,00 | 0,25 | +/- | 0,03 | ** |
| 22:0 | 0,24 | +/- | 0,01 | 0,36 | +/- | 0,01 | * |
| 24:0 | 0,81 | +/- | 0,02 | 0,85 | +/- | 0,03 | |
| AGMI cis | 8,87 | +/- | 1,02 | 6,56 | +/- | 4,49 | * |
| 16:1(n-7) | 0,89 | +/- | 0,45 | 0,27 | +/- | 0,20 | * |
| 17:1(n-7) | 0,17 | +/- | 0,01 | 0,20 | +/- | 0,01 | |
| 18:1(n-9) | 3,14 | +/- | 0,98 | 4,20 | +/- | 0,58 | * |
| 18:1(n-7) | 3,28 | +/- | 0,65 | 1,17 | +/- | 0,56 | ** |
| 20:1(n-9) | 0,10 | +/- | 0,02 | 0,12 | +/- | 0,05 | |
| 22:1(n-9) | 0,58 | +/- | 0,30 | 0,24 | +/- | 0,20 | ** |
| 24:1(n-9) | 0,56 | +/- | 0,20 | 0,27 | +/- | 0,05 | ** |
| AGPI | 44,96 | +/- | 4,77 | 42,49 | +/- | 4,56 | |
| AGPI n-6 | 38,07 | +/- | 3,25 | 38,46 | +/- | 3,79 | |
| 18:2(n-6) | 12,21 | +/- | 3,50 | 10,48 | +/- | 2,56 | |
| 18:3(n-6) | 0,15 | +/- | 0,01 | 0,11 | +/- | 0,05 | |
| 20:2(n-6) | 0,20 | +/- | 0,01 | 0,17 | +/- | 0,04 | |
| 20:3(n-6) | 0,96 | +/- | 0,02 | 1,43 | +/- | 0,20 | * |
| 20:4(n-6) | 24,10 | +/- | 4,49 | 24,71 | +/- | 0,96 | |
| 22:4(n-6) | 0,32 | +/- | 0,00 | 0,38 | +/- | 0,10 | |
| 22:5(n-6) | 0,13 | +/- | 0,01 | 0,19 | +/- | 0,07 | |
| AGPI n-3 | 6,89 | +/- | 0,22 | 6,32 | +/- | 0,92 | |
| 22:5(n-3) | 0,69 | +/- | 0,03 | 0,77 | +/- | 0,02 | |
| 22:6(n-3) | 6,20 | +/- | 0,34 | 5,55 | +/- | 0,46 | * |

Résultats représentant la moyenne+/- ET (écart type) de 4 pools différents de 2 rats

* différence significative par rapport aux témoins, p<0,05

** différence significative par rapport aux témoins, p<0,001

En ce qui concerne les acides gras monoinsaturés, l'acide oléique 18:1 est le principal AGMI car il représente 68% des AGMI totaux du tissu adipeux abdominal chez les rats nourris avec le régime standard et 84% chez des animaux soumis au régime cafétéria. L'acide oléique présente une augmentation de 62,6 % ($p < 0,05$) dans le tissu adipeux abdominal des rats nourris avec le régime cafétéria comparé à celui de leurs témoins tandis que les proportions de 16:1 et 20:1 diminuent. Chez l'homme, des travaux ont suggéré que l'étape limitante pour la conversion des AGS en AGMI était l'élongation du 16:0 en 18:0, alors que la désaturation se produit ensuite assez rapidement. La voie de l'élongation semble favorisée.

Parmi les acides gras polyinsaturés, les 18:2 (n-6), 20:2 (n-6) et 20:4 (n-6) sont significativement diminués dans le tissu adipeux des rats nourris avec le régime cafétéria. La baisse de 46 % ($p < 0,05$) du taux d'acide linoléique dans le tissu adipeux de ces animaux peut être attribuée, malgré une quantité de cet acide gras consommée supérieure, à une proportion inférieure de 18:2 (n-6) dans le régime cafétéria (15,2 %) par rapport au régime témoin qui en contient 49,7 %. Nous n'avons pas observé de différence significative dans les tissus des deux groupes de rats en ce qui concerne la proportion en acides gras polyinsaturés de la série n-3.

Le régime cafétéria peut donc être considéré comme un régime hyperlipidique engendrant un développement du tissu adipeux blanc et des modifications dans la composition de ce tissu. Ce régime semble avoir un impact sur la sélectivité du tissu adipeux pour la capture et le relargage des acides gras et peut également affecter les voies d'élongation et sûrement d'autres aspects du métabolisme énergétique.

Tableau XII : Proportions des acides gras du tissu adipeux abdominal de rats nourris avec des régimes standard et cafétéria.

| | Rats témoins | | | Rats "cafétéria" | | | |
|-------------------|--------------|------------|-------------|------------------|------------|-------------|----|
| | Moyenne | +/- | E T | Moyenne | +/- | E T | |
| AG saturés | 35,52 | +/- | 2,46 | 34,20 | +/- | 2,73 | |
| 14:0 | 1,34 | +/- | 0,01 | 1,07 | +/- | 0,03 | |
| 15:0 | 0,28 | +/- | 0,02 | 0,17 | +/- | 0,01 | * |
| 16:0 | 27,77 | +/- | 0,11 | 25,43 | +/- | 0,19 | |
| 17:0 | 0,19 | +/- | 0,01 | 0,25 | +/- | 0,00 | |
| 18:0 | 5,87 | +/- | 0,01 | 7,12 | +/- | 0,07 | |
| AGMI | 38,93 | +/- | 3,80 | 51,60 | +/- | 5,20 | ** |
| 16:1(n-9) | 0,37 | +/- | 0,006 | 0,37 | +/- | 0,02 | |
| 16:1(n-7) | 6,26 | +/- | 0,144 | 3,41 | +/- | 0,26 | ** |
| 17:1(n-7) | 0,15 | +/- | 0,015 | 0,27 | +/- | 0,05 | ** |
| 18:1(n-9) | 26,55 | +/- | 0,289 | 43,18 | +/- | 0,52 | ** |
| 18:1(n-7) | 5,03 | +/- | 0,052 | 3,82 | +/- | 0,05 | ** |
| 20:1(n-9) | 0,35 | +/- | 0,061 | 0,41 | +/- | 0,02 | * |
| 20:1(n-7) | 0,17 | +/- | 0,106 | 0,14 | +/- | 0,03 | |
| AGPI | 24,87 | +/- | 4,80 | 13,58 | +/- | 3,55 | ** |
| AGPI n-6 | 23,68 | +/- | 4,60 | 12,45 | +/- | 3,50 | ** |
| 18:2(n-6) | 22,70 | +/- | 0,17 | 12,30 | +/- | 0,09 | ** |
| 20:2(n-6) | 0,15 | +/- | 0,03 | 0,05 | +/- | 0,03 | ** |
| 20:4(n-6) | 0,67 | +/- | 0,03 | 0,02 | +/- | 0,00 | ** |
| AGPI n-3 | 1,07 | +/- | 0,20 | 1,02 | +/- | 1,22 | |
| 18:3(n-3) | 1,02 | +/- | 0,08 | 1,02 | +/- | 0,12 | |

Résultats représentant la moyenne+/- ET (écart type) de 4 pools différents de 2 rats

* différence significative par rapport aux témoins, p<0,05

** différence significative par rapport aux témoins, p<0,001

1.2. Effets d'un régime cafétéria administré pendant une période de 8 jours sur l'expression des récepteurs nucléaires dans le foie des rats.

1.2.1. Propriétés de liaisons et taux des ARNm des RARs et des TRs

Dans un premier temps nous avons déterminé les propriétés de liaison des récepteurs de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine dans le foie des rats. La représentation de Scatchard (1949) permet de linéariser les résultats. Sur cette représentation sont portés, en ordonnée le rapport de l'hormone liée/hormone libre et en abscisse, la concentration en hormone liée. L'intersection de la droite avec l'axe des abscisses nous permet de calculer la capacité maximale de liaison des récepteurs (C_{max}) qui représente une évaluation de la quantité de récepteurs par extrapolation, sachant que chaque récepteur possède un seul site de liaison au ligand. Le tableau XIII regroupe les résultats obtenus sur les expressions des RARs et des TRs après une semaine de régime cafétéria. Les mesures effectuées chez ces animaux montrent une baisse de la C_{max} des RARs (- 20,1 %) et des TRs (- 35 %). En ce qui concerne les constantes de dissociation (K_d) respectives de ces récepteurs nucléaires, elles ne sont pas significativement modifiées par le régime cafétéria par rapport aux animaux nourris avec le régime standard (figures 12 et 13).

Par ailleurs, nous avons mesuré le taux des ARNm de ces récepteurs nucléaires dans le foie de ces rats. Les résultats font apparaître une diminution des ARNm du RAR β (- 17,4 %) tandis que le taux d'ARNm de TR $\alpha_1\beta_1$ n'est pas significativement modifié par rapport aux témoins.

Tableau XIII : Propriétés de liaison des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) et de la triiodothyronine (TR), et quantification des ARNm dans le foie des rats nourris avec le régime cafétéria pendant 8 jours ¹

| | Cmax | | ARNm | |
|-------------------------|------------------------|-----------|-------------------|----------------|
| | (fmol/mg de protéines) | | (% ARNm β-actine) | |
| | <i>RAR</i> | <i>TR</i> | <i>RARβ</i> | <i>TRα1,β1</i> |
| Régime Standard | 529 ± 11 | 446 ± 30 | 4,2 ± 0,1 | 4,0 ± 0,17 |
| Régime Cafétéria | 422 ± 10* | 291 ± 20* | 3,6 ± 0,15* | 3,6 ± 0,15 |

¹résultats représentant la moyenne ± SEM (4 pools différents de 2 rats)

*significativement différent des valeurs du témoin (test "t" de Student, $P < 0,05$)

Les résultats présentés ci-dessus font apparaître l'incidence d'un régime cafétéria, dès 8 jours, sur l'expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine dans le foie des animaux. Nous nous sommes alors interrogés sur l'origine de la baisse d'expression des récepteurs nucléaires. A partir de données bibliographiques et de certains résultats acquis au laboratoire, nous avons formulé l'hypothèse que la baisse des RARs et des TRs pouvait résulter, du moins en partie, de l'activation de la voie des PPARs. Il est en effet connu que les acides gras ont la capacité d'activer les PPARs qui agissent en s'hétérodimérisant avec le RXR, comme le font RAR et TR.

Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré l'expression du PPAR et du RXR dans le foie des animaux soumis au régime cafétéria pendant une période de 8 jours. Les résultats obtenus sont présentés dans le paragraphe suivant.

1.2.2. Expression du PPAR α , de l'acyl-Coenzyme A oxydase (ACO) et de RXR α

1.2.2.1. Choix des paramètres étudiés

Nous avons choisi d'étudier l'expression des isoformes PPAR α et RXR α car, pour ces récepteurs, ce sont les isoformes qui sont les plus représentées dans le foie de rat adulte (Braissant et coll., 1996 ; Mangelsdorf et coll., 1992). Par ailleurs, nous avons aussi mesuré l'expression de l'acyl-CoenzymeA oxydase (ACO) (EC 1.3.3.6). Cette enzyme catalyse la première étape de la voie de la β -oxydation peroxysomale hépatique (Lazarow et de Duve, 1976) et est soumise à une forte régulation positive de la part du PPAR α lorsque celui-ci est activé par ses ligands (Osumi et coll., 1991 ; Tugwood et coll., 1992). Actuellement, l'expression de l'ACO est considérée comme un excellent indicateur de l'activation du PPAR α dans le foie. Les expressions du PPAR α , du RXR α et de l'ACO ont été mesurées par la détermination du taux de leurs ARNm respectifs par RT-PCR.

1.2.2.2. Taux des ARNm de PPAR α et de l'ACO

Après seulement 8 jours de régime, les résultats reportés dans le tableau XIV montrent que les taux d'ARNm de PPAR α et l'ACO ne sont pas significativement modifiés par rapport aux animaux témoins.

Les résultats présentés dans ce paragraphe font apparaître des modifications précoces dans l'expression des RARs et des TRs, tandis que des récepteurs nucléaires tels que PPAR ou RXR ne semblent pas encore affectés par une exposition à un régime de courte durée. Nous avons cependant remarqué une tendance à la hausse, non significative, du taux d'ARNm des PPARs. Nous avons donc voulu vérifier comment évoluaient ces paramètres à la suite d'une période de régime plus longue qui s'accompagnait de la mise en place du surpoids. Pour cela nous avons effectué les mêmes mesures que précédemment dans le foie d'animaux nourris avec un régime cafétéria pendant une période de 28 jours. Nous avons également quantifié l'expression de RAR, TR et PPAR dans le tissu adipeux abdominal de ces animaux. Les résultats sont reportés dans le paragraphe ci-dessous.

1.3. Effets d'un régime cafétéria administré pendant une période de 28 jours sur l'expression des récepteurs nucléaires dans le foie et le tissu adipeux blanc des rats.

1.3.1. Propriétés de liaison et taux des ARNm des RARs et des TRs dans le foie

Le tableau XV indique que dans le foie des rats nourris avec le régime cafétéria pendant 4 semaines, l'expression des RARs ainsi que celle des TRs sont affectées. En effet, les Cmax de RAR et TR sont diminuées (- 16 % et -23,4 %, respectivement) (figures 12 et 13).

Tableau XIV : Effets d'un régime cafétéria sur le taux des ARNm des récepteurs nucléaires RXR α et PPAR α et de l'enzyme acyl-CoA oxydase (ACO) dans le foie de rats¹.

| Régimes | ARNm RXR (% ARNm β -actine) | ARNm PPAR (% ARNm β -actine) | ARNm ACO (% ARNm β -actine) |
|------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 8 jours | | | |
| <i>témoin</i> | 23,5 \pm 1,3 | 4,1 \pm 0,2 | 22,2 \pm 2,0 |
| <i>cafétéria</i> | 24,3 \pm 2,0 | 4,5 \pm 0,3 | 22,9 \pm 2,2 |
| 28 jours | | | |
| <i>témoin</i> | 22,9 \pm 1,2 | 4,8 \pm 0,3 | 30,1 \pm 2,8 |
| <i>cafétéria</i> | 23,2 \pm 1,5 | 7,4 \pm 0,3** | 41,5 \pm 2,1* |

¹ Valeurs moyennes \pm SEM déterminées sur 4 pools différents de 2 animaux.
Différence significative par rapport aux animaux témoins (test "t" de Student, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Tableau XV : Propriétés de liaison des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) et de la triiodothyronine (TR), et quantification des ARNm dans le foie des rats nourris avec le régime cafétéria pendant 28 jours ¹.

| | Cmax | | ARNm | | |
|-------------------------|------------------------|---------------|------------------------------|---|-------------------------------|
| | (fmol/mg de protéines) | | (% ARNm β -actine) | | |
| | <i>RAR</i> | <i>TR</i> | <i>RARβ</i> | <i>TR$\alpha 1, \beta 1$</i> | <i>RXRα</i> |
| Régime standard | 560 \pm 11 | 394 \pm 8 | 5,0 \pm 0,4 | 4,6 \pm 0,5 | 22,9 \pm 1,2 |
| Régime Cafétéria | 472 \pm 6** | 302 \pm 6** | 3,6 \pm 0,3* | 3,1 \pm 0,2* | 23,2 \pm 1,5 |

¹ résultats représentant la moyenne \pm SEM (4 pools différents de 2 rats)

*significativement différent des valeurs du témoin (test "t" de Student, $P < 0,05$)

** significativement différent des valeurs du témoin (test "t" de Student, $P < 0,01$)

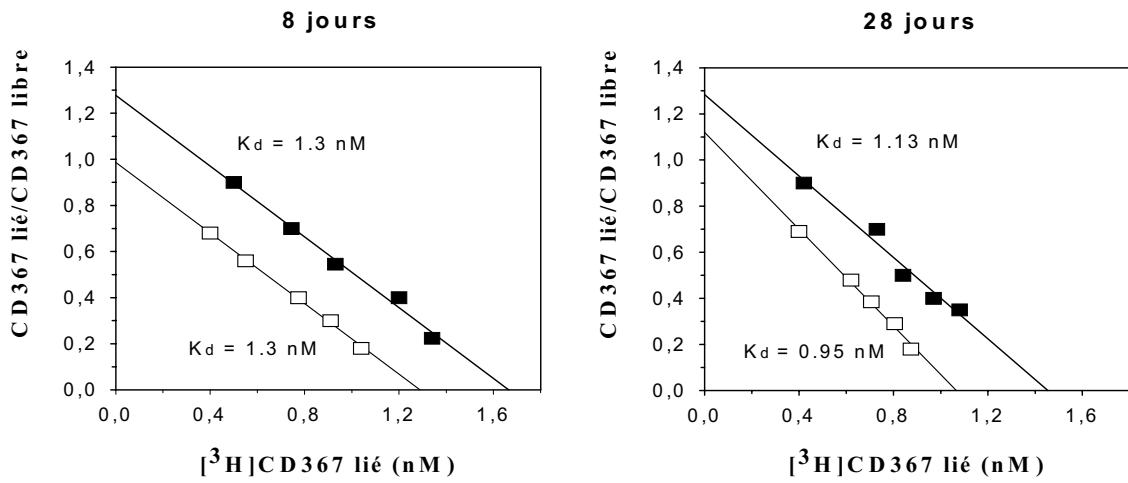


Figure 12 : Représentation de Scatchard de l'influence d'un régime cafétéria administré chez des rats pendant 8 jours ou 28 jours sur les propriétés de liaison des récepteurs nucléaires de l'acide rétinéique, □ chez les rats « cafétéria » et ■ chez les rats témoins.

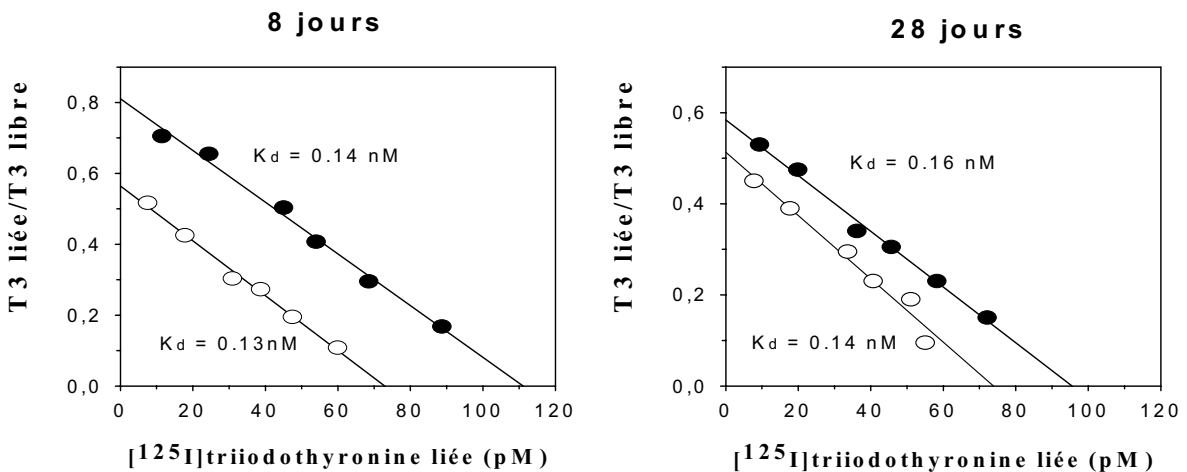


Figure 13 : Représentation de Scatchard de l'influence d'un régime cafétéria administré chez des rats pendant 8 jours ou 28 jours sur les propriétés de liaison des récepteurs nucléaires de la triiodothyronine, ○ chez les rats « cafétéria » et ● chez les rats témoins.

Les résultats obtenus pour les taux des ARNm sont en accord avec les résultats concernant les Cmax. Le taux des ARNm des RAR β est diminué d'environ 28,5 %. Quant au taux des ARNm des TRs qui n'est pas touché chez les animaux nourris avec le régime cafétéria pendant 8 jours, il est significativement diminué, après 28 jours de régime d'environ 32,7 %.

Le taux des ARNm de RXR α n'apparaît pas modifié dans le foie des animaux. La durée du régime ne semble donc pas davantage affecter l'expression de ce récepteur dans le foie. Toutefois, il apparaît que, dans le foie, le taux des ARNm du RXR α est supérieur à ceux des autres récepteurs nucléaires (RAR, TR, PPAR). Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus au laboratoire par Stéphane Bonilla qui a montré que ni la quantité de lipides, ni la nature des acides gras majoritaires dans ces régimes n'avaient d'influence sur l'expression du RXR α dans le foie de rats après 4 semaines de régime.

1.3.2. Expression de PPAR α et de l'ACO dans le foie de rats

Nous n'avons pas vu de différence significative du taux d'ARNm de PPAR α et de l'ACO dans le foie des rats nourris pendant 8 jours avec le régime hyperlipidique mais l'expression de PPAR α tendait à augmenter (tableau XIV). Au bout de 4 semaines de régime cafétéria, nous constatons une augmentation moyenne d'environ 54,5 % du taux des ARNm du PPAR α . Cette augmentation de l'expression du PPAR α est en accord avec la hausse du taux des ARNm de l'ACO chez ces même animaux (+37,8 %). Ces résultats traduisent une activation du PPAR α chez les animaux soumis au régime cafétéria pendant une période de 28 jours.

Lors de l'étude bibliographique nous avons souligné les interactions entre les voies de signalisation de l'acide rétinoïque, des hormones thyroïdiennes et des acides gras, notamment au niveau du tissu adipeux blanc et de l'adipogenèse. L'administration d'un régime cafétéria

pendant 28 jours ayant pour conséquence un début de prise de poids, donc un développement du tissu adipeux blanc, nous avons mesuré l'expression des récepteurs (RAR, TR et PPAR) dans le tissu adipeux abdominal de ces animaux.

1.3.3. Expression des RAR α , TR $\alpha_1\beta_1$, RXR α et PPAR γ dans le tissu adipeux abdominal de rats

1.3.3.1. Choix des paramètres étudiés

Les isoformes de RAR et PPAR étudiées dans le tissu adipeux blanc ne sont pas les mêmes que le foie car PPAR γ est l'isoforme principalement impliquée dans l'adipogenèse et spécifique du tissu adipeux. RAR α , est quant à lui l'isoforme de RAR qui intervient dans la régulation du développement adipocytaire, RAR β n'étant que très faiblement exprimé dans ce tissu.

1.3.3.2. Taux des ARNm des récepteurs nucléaires

Les résultats de l'expression de RAR α , TR $\alpha_1\beta_1$ et PPAR γ sont présentés dans la figure 14. Dans le tissu adipeux blanc des rats nourris avec le régime cafétéria pendant 28 jours nous avons constaté des modifications de l'expression des récepteurs par rapport aux témoins. En effet le taux d'ARNm de RAR α est diminué de 22,3 % par rapport aux témoins, le taux des ARNm de TRs baisse de 31 %. Le taux des ARNm de PPAR γ est de 49,5 % plus élevé que celui retrouvé chez les rats nourris avec le régime standard.

Aucune différence significative n'a été mise en évidence en ce qui concerne l'expression de RXR α chez les rats nourris avec le régime cafétéria par rapport aux rats témoins.

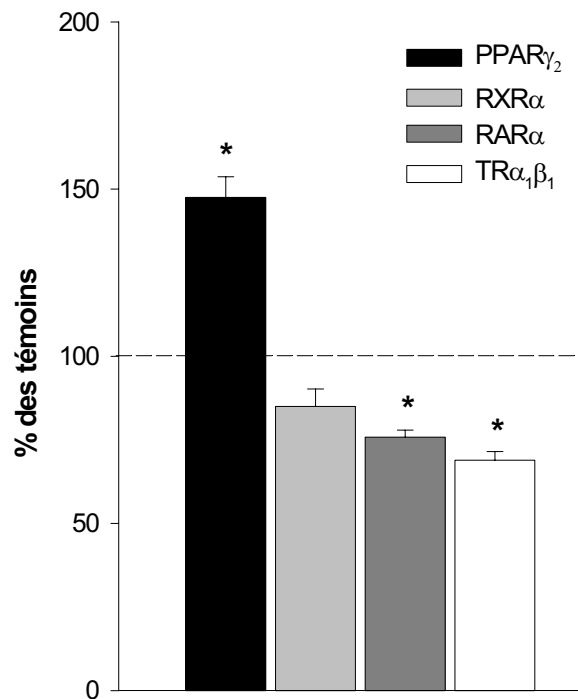


Figure 14 : Taux des ARNm de TR $\alpha_1\beta_1$, RAR α , et PPAR γ et RXR α dans le tissu adipeux abdominal de rats nourris avec le régime cafétéria durant 28 jours.

2. Discussion partielle

2.1. Régime hyperlipidique et prise de poids

Si une prise alimentaire excessive est généralement associée à une prise de poids, ce phénomène ne persiste pas toujours lorsque l'obésité est installée. En effet, parmi les études épidémiologiques certaines révèlent une surconsommation calorique chez les sujets obèses alors que d'autres le contestent. Les résultats contradictoires de ces études transversales peuvent résulter de problèmes méthodologiques : il peut s'avérer difficile d'évaluer les apports alimentaires, de phénotyper l'obésité, de discriminer le sujet en équilibre pondéral de celui qui rentre en phase dynamique de prise de poids. Par ailleurs, il existe une littérature abondante consacrée au sujet obèse et, à l'inverse, peu de données sont disponibles sur la phase dynamique de prise de poids. Plus précisément, dans notre modèle expérimental nous avons cherché à nous placer dans la période d'adaptation à une prise alimentaire excessive, période qui conduit à la prise de poids. Parmi les régimes riches en énergie, les régimes hyperlipidiques conduisent plus facilement à une prise de poids que ceux à forte teneur en sucres (Boozer et coll., 1998). Toutefois, un simple enrichissement en huile ne suffit pas pour entraîner une prise de poids chez les animaux (Gaiva Gomes da Silva et coll., 1996). Il faut remplacer la nourriture monotone habituelle des rats par un régime, constitué d'aliments riches en lipides, palatables et diversifiés, pour générer chez les animaux une importante prise alimentaire spontanée. Rendus hyperphagiques, les animaux entrent rapidement en phase dynamique de prise de poids et lorsqu'ils atteignent la phase stationnaire leur poids et leur masse adipeuse sont significativement plus élevés que celui des témoins.

L'un de ces régimes, dit "cafétéria", est constitué d'aliments appétants et riches en énergie. Par l'hyperphagie qu'il entraîne et par sa composition, ce régime est sensé mimer le comportement

alimentaire de l'homme de nos sociétés occidentales caractérisé notamment par un apport excessif en lipides. Ce régime cafétéria permet d'obtenir des modèles animaux développant une obésité d'origine nutritionnelle. Chez les animaux nourris avec le régime cafétéria, l'énergie est apportée principalement sous forme de lipides (61 % de l'énergie totale ingérée) et représente 480 kJ/jour alors que dans le régime standard, elle ne représente que 377 kJ/jour. Ces lipides sont principalement constitués d'acides gras saturés et monoinsaturés (45 % d'AGS, 43 % d'AGMI, 12 % d'AGPI).

Dès les premiers jours d'exposition au régime cafétéria, les rats présentent une augmentation de leur masse adipeuse. Jusqu'à 28 jours de régime cette augmentation est proportionnelle au poids du corps. Proenza et coll. (1992) ont déjà décrit l'augmentation modérée du poids corporel pendant le premier mois de régime et une augmentation significative seulement après 3 mois de régime cafétéria. Rothwell et Stock (1986) suggèrent que les animaux soumis à une surconsommation d'aliments palatables présentent une réponse adaptative précoce par un mécanisme de thermogénèse qui limite l'excès du stockage énergétique. Ceci est en accord avec l'hypertrophie observée par Levin et coll. (1986) au niveau du tissu adipeux brun. La réponse thermogénique adaptative chez les jeunes rats, leur confère une capacité de résistance au développement de l'obésité. Cette capacité paraît dépassée lorsque l'exposition au régime cafétéria se prolonge. Les animaux entrent alors dans une phase dynamique de prise de poids caractérisée par le développement du tissu adipeux.

Le développement du tissu adipeux peut résulter de la formation de nouveaux adipocytes à partir de cellules précurseurs (différenciation adipocytaire) et/ou de l'augmentation de la taille des adipocytes (hypertrophie adipocytaire). Faust et coll. (1978) ont montré qu'une augmentation significative du tissu adipeux chez des rats nourris avec un régime hyperlipidique résultait de l'augmentation du nombre des adipocytes. Parmi les facteurs adipogéniques intervenant dans le contrôle des programmes cellulaires, des facteurs

de transcription tels que les récepteurs nucléaires (PPAR, RAR, TR) peuvent jouer un rôle essentiel.

2.2. Régime inducteur d'obésité et modification de l'expression des PPARs dans le foie et le tissu adipeux

Nos résultats montrent que des consommations énergétiques élevées, riches en lipides, entraînent une augmentation de l'expression des ARNm de PPAR α dans le foie et de PPAR γ dans le tissu adipeux blanc des animaux.

Ces résultats constituent un nouvel exemple de l'autorégulation, *in vivo*, de ces récepteurs, résultant probablement d'une augmentation de la biodisponibilité des acides gras dans les cellules cibles. En effet, Xu et coll. (1999) ont montré que parmi les différentes isoformes du PPAR, le PPAR α avait la propriété de lier les acides gras saturés et insaturés avec des affinités proches (de l'ordre du micromolaire). Le PPAR δ liait les mêmes acides gras que le PPAR α mais avec des affinités plus faibles alors que le PPAR γ liait principalement les acides gras polyinsaturés avec de fortes affinités. Des expériences de compétition *in vitro* ont permis d'identifier certains acides gras comme activateurs potentiels des PPARs *in vivo* (Kliwer et coll., 1997). Ainsi, il a également été démontré que l'acide oléique et les acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléique, l'acide linoléique et l'acide arachidonique se comportent comme des ligands de PPAR α et de PPAR γ .

Par ailleurs, des données bibliographiques récentes sont en faveur d'une régulation du niveau d'expression des PPARs par les acides gras. Ainsi, Wan et coll. (1995) ont suggéré que la baisse de l'expression du gène du PPAR α dans le foie de rats alcoolisés était la conséquence d'une diminution du pool hépatique d'acides gras polyinsaturés. Plus récemment, Takase et coll. (1998) ont publié des résultats confortant ceux de Wan et coll. (1995). En effet, ces auteurs ont mesuré une diminution des ARNm du PPAR α dans l'intestin de rats nourris avec un régime pauvre en lipides, ainsi qu'une augmentation de ces mêmes ARNm

dans l'intestin de rats soumis à un régime hyperlipidique (Suruga et coll., 1999). Par ailleurs, une étude récente a montré qu'une hausse de la concentration des acides gras dans le foie de jeunes rats stimulait l'expression du gène du PPAR α (Panadero et coll., 1999). Ces résultats obtenus *in vivo* confortent les premières données acquises sur des cultures d'hépatocytes qui ont révélé le rôle des acides gras dans la régulation de l'expression du PPAR α (Steineger et coll., 1994).

L'augmentation significative de l'expression des ARNm du PPAR α observée après une période de 28 jours de régime, s'accompagne d'une augmentation du taux des ARNm de l'acyl-CoA. Ces résultats sont en accord avec les données qui rapportent que les acides gras régulent la transcription de gènes par le biais de l'activation de PPAR α et que cette activation de PPAR α se traduit par une augmentation de l'expression de l'acyl-CoA oxydase (Roberts et coll., 1998).

Dans le tissu adipeux abdominal, nous avons également observé une augmentation de l'expression des ARNm de PPAR γ . Cependant, l'activation de PPAR γ chez les rongeurs dans une situation de surconsommation lipidique est controversée. En effet, Vidal-Puig et coll. (1996) ont rapporté une augmentation de l'expression de PPAR γ dans le tissu adipeux de souris normales soumises à un régime hyperlipidique mais n'ont pas observé le même phénomène chez 2 lignées de souris obèses soumises au même régime. Ces auteurs ont montré que PPAR γ était régulé négativement lors d'un jeûne ; Shimoike et coll. (1998) ont également observé une importante diminution de l'expression de ces récepteurs nucléaires chez des rats Wistar soumis à un jeûne de 48h. Toutefois, il a été décrit que des régimes hyperlipidiques n'influaient pas sur le taux d'ARNm de PPAR γ_2 chez des rats Wistar sevrés (Rousseau et coll., 1997). Plus récemment, chez des rats Zucker génétiquement obèses, Gorla-Bajszczak et coll. (2000) ont observé que le taux des ARNm de PPAR γ du tissu adipeux blanc doublait comparativement à celui des rats Zucker non-obèses. Par contre, ils n'ont noté aucune

différence d'expression dans des cultures primaires d'adipocytes issues de rats obèses et témoins. Ces auteurs ont également constaté que cette augmentation de l'expression de PPAR γ dans le tissu adipeux était déjà observable chez des animaux âgés de 28 jours. Enfin, des travaux récents ont mis en évidence une augmentation des ARNm de PPAR γ_2 dans le tissu adipeux blanc de rats Wistar nourris avec un régime palatable durant 4 semaines, période de mise en place du surpoids (Margareto et coll., 2001).

L'ensemble de ces données obtenues chez les rongeurs est en faveur de l'existence de "up-régulation" de l'expression de PPAR γ au cours de la phase dynamique de la prise de poids. Il semble s'agir d'un phénomène adaptatif précoce qui paraît plus difficile à mettre en évidence lorsque l'obésité est installée.

2.3. Régime inducteur d'obésité et diminution de l'expression des RARs et des TRs dans le foie et le tissu adipeux blanc

Les rats soumis au régime "cafétéria" présentent une diminution de l'expression des RARs et des TRs dans le foie et le tissu adipeux. Ce phénomène apparaît précocement et semble constituer un mécanisme adaptatif qui précède la phase dynamique de prise de poids.

Dans le paragraphe qui va suivre nous nous sommes attachés à rechercher, dans la littérature, les données pouvant expliquer les relations entre un régime hyperlipidique, associé à une prise de poids, et les dérégulations des voies de signalisation cellulaire de la vitamine A et des hormones thyroïdiennes.

2.3.1. Rappels concernant la régulation de l'expression des RARs

Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont considérés actuellement comme les principaux médiateurs de l'action nucléaire de la vitamine A (revue dans Chambon, 1996). De plus, de nombreuses études ont montré que l'acide rétinoïque régule de manière positive

l'expression des RARs. Une telle régulation a été mise en évidence sur des lignées cellulaires en mesurant l'expression des ARNm de ces récepteurs nucléaires. Ainsi, il a été montré une augmentation du taux des ARNm des RAR β après addition d'acide rétinoïque dans le milieu de culture, les isoformes α et γ des RARs étant peu ou pas sensibles à ce traitement (de Thé et coll., 1989 ; Clifford et coll., 1990 ; Wu et coll., 1992). Plus récemment, Wan et coll. (1998) ont observé une induction des trois isoformes du RAR dans une lignée hépatocytaire (Hep3B) sous l'action de l'acide rétinoïque. Dans des adipocytes bruns en culture, l'acide rétinoïque a été décrit comme un modulateur de l'expression de RAR α (Bonet et coll., 1997). Egalement, dans la lignée de préadipocytes 3T3-L1, le taux des ARNm de RAR α et RAR γ a été augmenté par un traitement à l'acide rétinoïque (Kamei et coll., 1993 ; Kawada et coll., 2000), RAR β n'étant que très faiblement exprimé dans ce tissu. Par ailleurs, des résultats d'autorégulation des RAR β ont été obtenus *in vivo* sur des rats carencés en vitamine A et traités par l'acide rétinoïque (Haq et coll., 1991 ; Kato et coll., 1992 ; Audouin-Chevallier et coll., 1993) et chez des souris soumises à des régimes riches en rétinoïdes (Johanning et coll., 2001).

Toutes ces données indiquent que l'acide rétinoïque est essentiel non seulement pour l'activation des RARs mais aussi pour le contrôle de leur niveau d'expression via le phénomène d'autorégulation. Il en résulte que l'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes va dépendre en grande partie de la biodisponibilité de l'acide rétinoïque dans le noyau.

2.3.2. Rappels concernant la régulation de l'expression des TRs

Le foie représente un organe essentiel dans le métabolisme périphérique des hormones thyroïdiennes et la synthèse de la triiodothyronine (T₃). Dans les cellules cibles, la biodisponibilité de l'hormone est un facteur essentiel dans la régulation de l'expression des

TRs même si, dans ce cas, la situation est moins claire que celle que nous avons discutée ci-dessus pour les RARs.

En effet, les travaux de Strait et coll. (1990) ont montré que l'administration de T_3 à des rats euthyroïdiens entraînait une diminution de 50% des ARNm de l'isoforme $TR\alpha 1$ sans affecter les ARNm de $TR\beta 1$ et la capacité de liaison des TRs dans le foie. De même, Hodin et coll. (1990) ont montré que l'administration de T_3 à des rats rendus hypothyroïdiens entraînait une diminution de la quantité des ARNm de $TR\alpha 1$ dans le foie alors que celle des ARNm de $TR\beta 1$ était stable. Par contre, ces mêmes auteurs n'ont pas observé de modifications des taux des ARNm des $TR\beta 1$ dans le cerveau, alors que Lebel et coll. (1993) ont mis en évidence, sur des astrocytes de rats en culture, une régulation positive du gène codant pour $TR\beta$ par la T_3 . Une régulation positive de $TR\beta 1$ par la T_3 a aussi été décrite sur des lignées cellulaires d'hypophyse (Davis et Lazar, 1992). Contrairement aux résultats de Strait et coll. (1990) et de Hodin et coll. (1990), ceux obtenus au laboratoire de Nutrition chez des animaux rendus hyperthyroïdiens, par administration de T_3 , ont montré une augmentation de la capacité maximale de liaison (C_{max}) des TRs (Higueret et coll., 1992) et du taux des ARNm des $TR\alpha 1\beta 1$ chez des rats rendus hypothyroïdiens et traités par la T_3 (Coustaut et coll., 1996). Ces résultats étaient en accord avec ceux obtenus par Hamada et coll. (1979). Dans une situation différente, Bernal et coll. (1978) n'avaient pas obtenu de modifications de la C_{max} des TRs chez des rats thyroïdectomisés et traités par la T_3 , tandis que Nakamura et coll. (1979), en utilisant un modèle animal comparable, ont obtenu une élévation de l'expression des TRs associée à une hausse des ARNm des TRs.

Malgré certaines contradictions résultant de ces données, il est aujourd'hui admis que le statut thyroïdien est l'une des composantes essentielles à prendre en compte dans la régulation de l'expression des TRs. Par ailleurs, une étude a décrit la présence d'un élément de réponse aux hormones thyroïdiennes (TRE) dans le promoteur du gène humain de $TR\beta 1$

(Suzuki et coll., 1994). Ceci constitue un argument en faveur de l'existence d'une autorégulation de cette isoforme qui représente 80% des TRs dans le foie.

2.3.3. Modification de l'expression des récepteurs nucléaires et biodisponibilité du ligand

2.3.3.1. Régime hyperlipidique et expression des RARs

Une étude menée par Drevon et coll. (1985) et portant sur l'estérification du rétinol dans les cellules hépatiques (hépatocytes et cellules stellaires) avait conclu que ces deux types de cellules avaient la capacité d'estérifier le rétinol à des concentrations physiologiques et que les esters du rétinol représentaient 80% de la forme de stockage de la vitamine A. Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont rapporté une augmentation de l'estérification du rétinol, dans les hépatocytes, en présence d'un apport important d'acide oléique à forte concentration dans le milieu de culture. Ces données plaident en faveur d'une intervention des acides gras dans la régulation de l'estérification du rétinol.

Ce rôle a été précisé par McCloskey et coll. (1988). En effets, ces auteurs ont montré que les acides gras saturés et insaturés (acide palmitique, stéarique, palmitoléique, oléique, docosahexaénoïque) participaient à la hausse du taux d'estérification du rétinol dans la lignée de macrophage J774. L'importance de cette estérification était de plus fonction de la concentration en acides gras dans le milieu. Ce phénomène semble généralisable puisque ces auteurs ont aussi observé une plus forte estérification du rétinol en présence d'acides gras dans des lignées d'hépatomes humains (HepG2) ou de rats (Fu5AH), ainsi que dans la lignée de carcinome mammaire humain (MCF-7). De plus, ces données sont en accord avec les résultats de Randolph et Ross (1991) qui ont montré que le statut lipidique des lignées HepG2 et MCF-7 est un paramètre clé de l'incorporation cellulaire puis de l'estérification du rétinol.

La cohérence des résultats obtenus sur différents types de cellules est un argument en faveur de l'intervention des acides gras dans le métabolisme des rétinoïdes. Cette hypothèse a

été confortée par les travaux de Randolph et Simon (1995). Ces auteurs ont montré que des acides gras exogènes avaient la capacité de réguler la concentration intracellulaire en rétinoïdes (sous forme acide ou alcool) dans des kératinocytes en culture. Outre l'augmentation du taux d'estérification du rétinol, les acides gras réduisaient simultanément l'utilisation des esters du rétinol endogènes avec pour conséquence finale une diminution du rétinol libre dans la cellule. Cette baisse du rétinol se répercutait sur la concentration (et donc la biodisponibilité) de ses métabolites actifs que sont l'acide rétinoïque et l'acide 3,4-didéhydrorétinoïque.

L'augmentation du rétinol sous forme estérifiée peut être envisagée dans nos conditions expérimentales. Si l'on s'attache à préciser les apports en acides gras participant à l'estérification du rétinol on constate une proportion significativement plus élevée de l'acide palmitique, stéarique, palmitoléique, oléique, et docosahexaénoïque dans le régime cafétéria par rapport au régime standard. La proportion de certains de ces acides gras est également significativement augmentée dans les lipides du foie et du tissu adipeux, c'est le cas de l'acide stéarique et de l'acide oléique (respectivement, + 23 % et + 34 % dans le foie et + 44 % et + 100 % dans le tissu adipeux). Ainsi, il est possible d'envisager que les acides gras substrats de la LRAT privilégieraient les réactions d'estérification du rétinol et contribueraient à réduire la biodisponibilité de l'acide rétinoïque.

Une autre source d'interférences entre le métabolisme des lipides et celui des rétinoïdes se situe au niveau de leurs protéines de liaison dans les cellules cibles. Il est aujourd'hui connu que les protéines cytoplasmiques liant les rétinoïdes (CRBPs et CRABPs) et les protéines cytoplasmiques liant les acides gras (FABPs) possèdent des structures et des fonctions proches, et appartiennent à une même famille de protéines dont les gènes sont bien conservés (revue dans Bass, 1993). Par ailleurs, certaines données suggèrent que ces protéines contribuent aux interférences entre le métabolisme des lipides et celui des rétinoïdes. Ainsi,

Sani et coll. (1987) ont montré que les acides gras polyinsaturés de la série (n-6), l'acide linoléique et arachidonique, inhibaient la liaison de l'acide rétinoïque aux CRABPs. Cette inhibition, liée aux analogies de structure que présentent l'acide rétinoïque et ces deux acides gras, pourrait être à l'origine d'une moindre disponibilité de l'acide rétinoïque dans le compartiment nucléaire. Ainsi, les acides gras ont la capacité d'agir sur la biodisponibilité de l'acide rétinoïque dans les cellules cibles.

Une baisse de biodisponibilité de l'acide rétinoïque peut donc être l'une des causes qui entraîne la baisse des récepteurs nucléaires dans le foie et le tissu adipeux des animaux soumis au régime cafétéria

2.3.3.2. Régime hyperlipidique et expression des TRs

Le régime hyperlipidique utilisé lors dans nos expérimentations était caractérisé par sa richesse en acides gras saturés. Cet aspect qualitatif de l'apport lipidique a des répercussions importantes sur le métabolisme des hormones thyroïdiennes. En effet, les données obtenues par Smith et coll. (1993) mais aussi par Lewis et coll. (1993) montrent que la concentration plasmatique en T_3 est plus faible chez des animaux nourris avec un régime riche en acides gras saturés par rapport à celle mesurée chez des animaux nourris avec un régime riche en acides gras polyinsaturés. Ces résultats ont été précisés par Takeuchi et coll. (1995). En effet, ces auteurs ont montré qu'un régime riche en acides gras saturés (20% de la composition du régime) entraînait une baisse de la T_3 dans le sérum des rats alors que le taux de thyroxine (T_4) n'était pas affecté. De plus, la diminution de la T_3 circulante était suffisante pour entraîner des effets métaboliques, notamment sur l'activité de la Na^+/K^+ ATPase (enzyme cible de l'action thermogénique des hormones thyroïdiennes) qui était diminuée dans le foie des animaux. L'ensemble des données présentées ci-dessus plaide en faveur de l'établissement d'un état d'hypothyroïdie généré par la consommation de régimes riches en acides saturés. Nos résultats concernant la baisse d'expression des récepteurs nucléaires de la

triiodothyronine permettent d'envisager que celle-ci résulte, au moins en partie, de la baisse de la biodisponibilité tissulaire en triiodothyronine.

En ce qui concerne les relations entre la consommation excessive d'acides gras et l'action des hormones thyroïdiennes, d'autres arguments proviennent d'études sur l'obésité. L'étude de Iossa et coll. (1997) rapporte que des rats souffrant d'hypothyroïdisme développaient une obésité lorsqu'on les nourrissait avec un régime hyperlipidique. Aussi, il a été décrit une diminution de la concentration des TRs dans le foie de souris (ob/ob) obèses (Guersney et Morsihige, 1979 ; Khan et coll., 1986). Dans cette situation pathologique, l'hypothèse d'une moindre disponibilité de la T₃ dans le noyau peut-être aussi évoquée pour expliquer la baisse des récepteurs nucléaires. Ainsi, Hillgartner et Romsos (1988) ont montré une forte baisse de l'incorporation des hormones thyroïdiennes dans les hépatocytes de souris obèses (ob/ob). Ces auteurs ont attribué ce phénomène à la diminution de la perméabilité membranaire résultant d'une modification de la composition lipidique des membranes plasmiques caractérisée par un faible degré d'insaturation des lipides membranaires. Ce phénomène apparaît également au niveau de l'enveloppe nucléaire des cellules hépatiques de souris nourries avec un régime riche en acides gras saturés et pauvre en polyinsaturés, et il contribue à accentuer la diminution de la concentration de T₃ active dans le noyau des cellules (Verkatraman et coll., 1986).

Dans nos conditions expérimentales, le calcul du rapport polyinsaturés/saturés (P/S) à partir de la composition lipidique des régimes fait apparaître une forte différence qui reflète la grande proportion d'acides gras saturés du régime. En effet, le rapport P/S est égal à 1,9 pour le régime témoin et est égal à 0,4 pour le régime hyperlipidique. Si nous prenons en compte les résultats de Verkatraman et coll. (1986), et d'une façon plus générale le rôle des acides gras alimentaires sur les fonctions membranaires (revue dans Clandinin et coll., 1991), il est

envisageable que dans nos expériences des modifications dans la composition des membranes cellulaires contribuent à diminuer la quantité de T₃ disponible dans les noyaux cellulaires.

Une autre source d'interférences entre les lipides et les hormones thyroïdiennes se situe au niveau de leurs protéines de transport plasmatique. Il a été montré que les acides gras peuvent moduler la fixation des hormones à leurs protéines de transport.

Ainsi, chez l'homme, les acides gras se lient aussi bien à l'albumine qu'à la TBG ("Thyroid Binding Globulin") et, dans ce cas, provoquent un déplacement de l'hormone (Chopra et coll., 1985). Cette compétition entre les acides gras et les hormones thyroïdiennes a d'abord été décrite *in vitro* et semble être dépendante de la concentration en lipides (Tabachnik, 1964 ; Shaw et coll., 1976). Des études ultérieures ont confirmé ce résultat en montrant que des concentrations élevées en acides gras libres s'accompagnaient de l'inhibition de la liaison de la thyroxine à la TBG (Chopra et coll., 1985 ; Tabachnik et Korcek, 1986). Concernant le taux de T₃ circulante, Vermaak et coll. (1986) ont décrit une diminution significative de la triiodothyronine totale dans le plasma de sujets présentant une forte concentration en acides gras non estérifiés. Ces auteurs ont pu établir une relation inverse entre la concentration en acides gras et le taux de T₃ totale dans le plasma.

En conclusion, la compétition des acides gras sur les sites de liaison des protéines vectrices des hormones thyroïdiennes peut contribuer à diminuer la disponibilité de ces hormones pour les tissus cibles. Par ailleurs, cette compétition entre acides gras et triiodothyronine a été récemment mise en évidence au niveau des récepteurs nucléaires.

Un ensemble de données, acquises à partir d'expérimentations *in vitro*, ont montré que les acides gras inhibaient la liaison de la T₃ à ses récepteurs nucléaires (Wiersinga et coll., 1988 ; Van der Klis et coll., 1989 ; Mazzachi et coll., 1992). L'effet inhibiteur le plus fort était obtenu avec les acides gras monoinsaturés (acide oléique) et polyinsaturés. Van der Klis et coll. (1991) ont montré que cette inhibition compétitive des acides gras insaturés était

équivalente pour les isoformes $\alpha 1$ et $\beta 1$ des TRs. D'autre part, les études de Li et coll. (1990) ont mis en évidence que les formes estérifiées des acides gras (acylCoAs) ont des effets inhibiteurs plus puissants que les acides gras libres sur la liaison de la T_3 aux TRs. Cette même équipe (Li et coll., 1993) a montré, par la suite, que les acylCoAs, et plus particulièrement l'oleylCoA, se liaient aux TR $\alpha 1\beta 1$ avec une affinité comparable à l'affinité qu'ils ont pour la protéine liant les acylCoAs (ACBP), protéine cytosolique liant spécifiquement les acylCoAs seulement et non les acides gras libres (revue dans Knudsen, 1990). Les caractéristiques de la liaison des acylCoAs aux TRs ont conduit ces chercheurs à émettre l'hypothèse que les TRs pouvaient être considérés comme des protéines nucléaires spécifiques des acylCoAs, tout du moins *in vitro* (Li et coll., 1993).

2.3.4 Interactions des récepteurs nucléaires : rôle du récepteur de l'acide 9-*cis* rétinolique (RXR).

Il est aujourd'hui bien établi que le RXR est un co-activateur des récepteurs nucléaires de l'acide rétinolique, des hormones thyroïdiennes, de la vitamine D et d'autres récepteurs orphelins. L'hétérodimérisation des RXR stabilise la liaison des récepteurs à leurs éléments de réponse au niveau de leurs gènes cibles (Yu et coll., 1991 ; Kliewer et coll., 1992b ; Leid et coll., 1992). Ainsi, le RXR joue un rôle central dans la régulation des voies de signalisation cellulaire des modulateurs nucléaires. De ce fait, et au même titre que la biodisponibilité des ligands, la disponibilité du RXR va être déterminante dans l'induction des effets biologiques des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes.

Cette notion a été vérifiée lors de différentes études. Ainsi, Hsu et coll. (1995) ont observé que la réponse cellulaire à la T_3 était fonction de la quantité de RXR présente dans les cellules cibles. Il en est de même pour le RAR dont la liaison à ses éléments de réponse (RAREs) est diminuée lorsqu'on génère une baisse de l'expression des RXR α,γ (Nagao et coll., 1998). Des résultats récents, obtenus sur des cultures primaires d'hépatocytes, montrent

que la stimulation de l'expression du RXR α par les glucocorticoïdes entraîne l'activation des voies de signalisation de la T₃ et de l'acide rétinoïque, qui se traduit notamment pour cette dernière par une hausse des ARNm du RAR β (Yamaguchi et coll., 1999).

Aujourd'hui, un ensemble de données permet de souligner le rôle central que joue le RXR dans la régulation de l'expression des récepteurs avec lesquels il dimérise. Par ailleurs, l'existence d'un pool relativement stable de RXR dans la cellule, a conduit à formuler une hypothèse dans laquelle le "piégeage" des RXRs par un type de récepteurs entraîne une sous activation d'autres voies de signalisation dépendantes de ce co-activateur.

Un argument en faveur de cette hypothèse a été apporté par Baretino et coll. (1993). Ces auteurs ont mis en évidence que l'aporocepteur de la T₃ inhibait l'induction du gène du RAR β_2 par l'acide rétinoïque en entrant en compétition avec le RAR pour la formation d'hétérodimères avec le RXR. Le résultat final de cette compétition était la dissociation du complexe ternaire RAR/RXR-RARE. Une étude plus complète menée par Lehmann et coll. (1993) a confirmé l'existence d'un réseau complexe d'interactions entre les récepteurs nucléaires de la sous famille incluant les RARs et les TRs. Ces auteurs ont montré que lorsque le RXR était en concentration limitante, les TRs et les RARs entraient en compétition pour se lier au RXR. La séquestration du RXR par l'un des deux récepteurs aux dépens de l'autre conduisait à la répression de la voie de signalisation du récepteur privé de RXR.

Un tel mécanisme a été aussi évoqué par Wilson-Miller et coll. (1997) pour expliquer les effets inhibiteurs de la T₃ sur l'activation de la stéaroyl-CoA désaturase par la vitamine A chez la souris.

D'autres exemples peuvent être cités pour souligner le rôle essentiel du RXR dans l'établissement du profil d'expression des récepteurs nucléaires et la régulation de leur expression génique. Ainsi, Polly et coll. (1997) ont décrit sur des cultures de fibroblastes de souris une transrépression de la voie de signalisation des rétinoïdes résultant de la

séquestration du RXR liée à la surexpression des VDRs (récepteur de la vitamine D). Des résultats récents démontrent l'aptitude des VDRs à séquestrer les RXRs et par conséquent à diminuer la formation des complexes RAR/RXR nécessaires à la régulation du gène du RAR β_2 (Jimenez-Lara et Aranda, 1999).

L'ensemble de ces données suggère que le RXR peut-être un facteur limitant pour l'activation et/ou la répression de l'activité des récepteurs nucléaires. Il est alors logique de penser que tout récepteur interagissant avec le RXR participe à ce jeu complexe de compétition/séquestration du RXR vis à vis des autres récepteurs nucléaires. C'est le cas notamment des PPARs, pour lesquels il est bien établi que le RXR est le partenaire préférentiel. La démonstration de cette forte interaction a été apportée, *in vitro*, par les travaux de Kliewer et coll. (1992a) et de Gearing et coll. (1993) puis, *in vivo*, par Miyata et coll. (1994). Une autre démonstration de l'interférence des PPARs et des RXRs a été apportée par des études portant sur la régulation des gènes de la β -oxydation peroxysomale par les acides gras et les rétinoïdes (Keller et coll., 1993 ; Issemann et coll., 1993). De même, les acides gras ont été décrits comme régulant la transcription du gène codant pour le RXR dans des cellules hépatiques de rats (Steineger et coll., 1998) et il a été mis en évidence que l'acide docosahexaénoïque pouvait être un ligand de ce même RXR dans le cerveau de souris (de Urquiza et coll., 2000).

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent une augmentation de l'expression du PPAR α dans le foie des animaux soumis au régime cafétéria pendant 4 semaines. Au plan fonctionnel, l'activation du PPAR α est confirmée par la hausse significative du taux des ARNm de l'ACO. Nous avons également observé une hausse des ARNm de PPAR γ dans le tissu adipeux blanc de ces animaux. En revanche, en ce qui concerne les taux d'ARNm des RXR, nous n'observons aucune différence significative dans les deux tissus étudiés. Ainsi, il

est tentant de suggérer l'existence d'une compétition entre le PPAR et les RARs et/ou les TRs pour la séquestration du RXR α dans les tissus des animaux soumis au régime hyperlipidique.

Un mécanisme de compétition impliquant les PPARs, les TRs et les RXRs avait déjà été montré, *in vitro*, avec pour conséquence une baisse de l'activité transcriptionnelle des TRs (Meier-Heusler et coll., 1995 ; Juge-Aubry et coll., 1995). Il est à noter que ces auteurs n'excluaient pas la séquestration supplémentaire d'un autre cofacteur par le PPAR. Une situation équivalente (de compétition pour fixer le RXR) a été obtenue par DiRenzo et coll. (1997) entre le PPAR α et le RAR α ayant pour résultat une inhibition de l'activité transcriptionnelle du PPAR α .

Les modifications des profils d'expression des récepteurs nucléaires observées chez les animaux soumis à un régime hyperlipidique nous ont amenés à nous questionner sur l'implication de ces dérégulations dans le développement du tissu adipeux et donc la mise en place de l'obésité.

2.4. Conséquences potentielles des modifications d'expression de ces récepteurs nucléaires sur développement du tissu adipeux

Un ensemble de donnée bibliographique cohérentes démontrent l'implication de PPAR γ dans le développement du tissu adipeux en réponse à une surcharge lipidique (Schoonjans et coll., 1996). A titre d'exemple, des études ont montré que des cellules non adipeuses, fibroblastiques (Tontonoz et coll., 1994) ou myoblastiques (Hu et coll., 1995), infectées par un rétrovirus exprimant PPAR γ_2 , se différenciaient en adipocytes sous l'action d'activateurs de PPAR, comme les thiazolidinediones ou des acides gras polyinsaturés. Ces résultats suggèrent que PPAR γ est un des principaux facteurs de transcription de la lignée adipocytaire. Ces données ont été confirmées par les résultats d'études réalisées chez des souris n'exprimant pas PPAR γ (souris PPAR γ $-/-$), ces animaux sont totalement dépourvus de

tissu adipeux tandis que les souris PPAR γ +/- sont caractérisées par une diminution de leur masse adipeuse (Kubota et coll., 1999 ; Miles et coll., 2000). Aujourd'hui il est admis que PPAR γ constitue un lien essentiel entre le processus de différenciation adipocytaire et le métabolisme lipidique. Dans un travail récent réalisé dans des conditions expérimentales similaires aux nôtres, Margareto et coll. (2001) ont montré une augmentation de l'expression de PPAR γ , et de gènes marqueurs de la différenciation adipocytaires comme l'aP2, dans le tissu adipeux blanc de rats nourris avec un régime hyperlipidique inducteur d'obésité au bout de 30 jours de régime.

Dans ce travail, un résultat comparable a été obtenu, une augmentation de PPAR γ dans le tissu adipeux des rats au cours de la phase dynamique de prise de poids. De plus, les répercussions d'un tel régime hyperlipidique concernent également l'expression des RARs et des TRs.

En ce qui concerne la voie de signalisation cellulaire de la vitamine A, des études ont montré que l'acide rétinoïque était un inhibiteur de la différenciation adipocytaire. En effet, Pairault et coll. (1988) ont rapporté que l'acide rétinoïque, dans la lignée préadipocytaire 3T3-L1, administré à l'arrêt de croissance, inhibait la différenciation adipocytaire terminale. Également, Teboul et coll. (1991) ont précisé que l'acide rétinoïque inhibait une étape précoce de la différenciation dans la lignée préadipocytaire Ob17. En 1994, l'équipe de Kamei a rapporté que cette action de l'acide rétinoïque sur la différenciation adipocytaire des cellules 3T3 s'exerçait par l'intermédiaire de son récepteur nucléaire RAR, et plus précisément, par l'isoforme RAR α . Il a été montré par la suite que l'effet inhibiteur de l'acide rétinoïque et de RAR α sur la différenciation adipocytaire impliquait le blocage de l'action adipogénique de C/EBP β (Schwarz et coll., 1997).

Si l'implication des hormones thyroïdiennes dans la régulation thermogénique est bien décrit (Tulp et coll., 1982), leur rôle dans le développement du tissu adipeux est moins clair. En effet, certains auteurs leur ont attribué un rôle stimulateur de la lipogenèse dans le tissu adipeux blanc (Diamant et coll., 1972 ; Blenneman et coll., 1995), tandis que d'autres ont montré un effet inhibiteur (Roncari et Murphy, 1975). Il a également été souligné que la triiodothyronine stimulait de façon coordonnée l'expression d'un ensemble de facteurs lipogéniques et lipolytiques représentant des marqueurs tardifs de la différenciation adipocytaire (Pou et Torresani, 1989). Enfin, Teboul et coll., (1991) ont rapporté que la triiodothyronine sensibilisait les cellules à l'action de l'acide rétinoïque lorsque celui-ci inhibe la différenciation adipocytaire. A ce jour un ensemble de données plaide en faveur de l'intervention de la T₃ dans l'adipogenèse mais certaines contradictions demeurent sur le rôle précis joué par cette hormone.

Dans notre étude, l'exposition au régime hyperlipidique s'accompagne d'une modification du profil d'expression des récepteurs nucléaires qui se traduit par une hypo-expression des RARs et des TRs et une sur-expression des PPARs. Ce nouveau profil d'expression s'inscrit dans la réponse adaptative précoce à la surcharge énergétique et lipidique du régime qui conduit à la stimulation de l'adipogenèse et au développement du tissu adipeux.

3. Conclusion

Le premier objectif de notre travail était d'étudier la voie de signalisation cellulaire de la vitamine A chez des rats soumis à un régime hyperlipidique inducteur d'une surcharge pondérale. Pour cela nous avons donc étudié l'expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque, des acides gras et de la triiodothyronine dans deux organes clés du métabolisme et du stockage de la vitamine A et des acides gras : le foie et le tissu adipeux. Dans ces deux tissus, les résultats de notre travail font apparaître une diminution de l'expression des RARs et des TRs et une augmentation du taux des ARNm des PPARs lors de la phase dynamique de prise de poids. Il est intéressant de souligner que les modifications d'expression de ces récepteurs nucléaires apparaissent très tôt avant l'apparition claire de la phase dynamique de prise de poids. En effet, nous avons observé une diminution de l'expression de RAR β et du taux des ARNm de TR dans le foie des rats après seulement une semaine d'exposition au régime.

Cette étude nous a donc permis d'établir des modifications précoces dans les profils d'expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque, des acides gras et de la triiodothyronine. Ces facteurs de transcription, inductibles par leurs ligands, interviennent dans les phénomènes de prolifération et de différenciation cellulaire et sont également impliqués dans le contrôle de l'adipogenèse. Ces résultats ont conforté notre hypothèse de travail qui suggère que le régime hyperlipidique induit une modification du profil d'expression des récepteurs nucléaires compatible avec le développement du tissu adipeux. Il était donc intéressant, à la lumière de cette hypothèse d'étudier chez l'homme l'expression de ces récepteurs nucléaires au cours d'une phase dynamique de prise de poids. C'est pourquoi dans la suite de notre travail nous avons étudié l'expression des RAR, TR et PPAR dans le tissu adipeux sous-cutané d'individus obèses.

PARTIE II : ETUDE BIOMEDICALE

Comme il l'a été indiqué dans la présentation du travail de thèse, cette recherche comportait deux volets complémentaires, l'un d'eux mettait en œuvre un modèle animal présentant une obésité d'origine nutritionnelle, l'autre une population de patientes obèses. Commencées simultanément, ces deux études avaient pour but d'essayer de mieux comprendre la genèse de certaines modifications biochimiques constatées dans les organismes à la suite d'une surcharge énergétique.

Les objectifs initiaux de l'étude biomédicale étaient de comparer les aspects quantitatifs et qualitatifs de l'alimentation (connus par la mise en œuvre d'enquêtes alimentaires) au statut lipidique des sujets déterminé, d'une part, par la mesure de paramètres cliniques du métabolisme et, d'autre part, par l'étude de l'incorporation des acides gras dans les différents tissus (tissu adipeux sous-cutané et plasma). En effet, il a été confirmé que les acides gras du tissu adipeux et des lipides plasmatiques sont, chez l'homme, de bons marqueurs biologiques de la consommation des lipides (Wolk et coll., 2001). Les résultats obtenus ont pu être comparés à ceux d'une population saine faisant l'objet de la thèse de Carole Boué (2000) et seront présentés dans le premier volet de cette partie.

Par ailleurs les résultats obtenus chez l'animal, déjà présentés et discutés dans la partie précédente, ont révélé l'intérêt d'étudier, dans le tissu adipeux de quelques patientes obèses, l'expression des récepteurs nucléaires facteurs de transcription. Les résultats de cette étude moléculaire seront présentés dans le deuxième volet de cette partie.

I : Etude nutritionnelle sur une population de sujets sains et de sujets obèses

1. Résultats

1.1. Caractérisation de la population étudiée

La population étudiée est classée en fonction de son statut pondéral défini par l'IMC (indice de masse corporelle égal au rapport du poids (en kg) sur le carré de la taille (en mètres ; $IMC = P/T^2$ en kg/m^2). Chez l'adulte on considère que l'intervalle de l'IMC associé au moindre risque pour la santé se situe entre 18,5 et 24,9 kg/m^2 ; on parle de "surpoids" quand les valeurs d'IMC se situent entre 25 et 29,9 kg/m^2 et "l'obésité" est définie par un $IMC \geq 30$ kg/m^2 , quels que soient l'âge et le sexe ; "l'obésité morbide" ou "sévère" est caractérisée par un IMC supérieur à 40 kg/m^2 .

Les résultats rapportés dans le tableau XVI nous montrent que les deux populations étudiées, l'une de 72 individus (femmes) et l'autre en comprenant 121 (21 hommes et 100 femmes), sont différentes ($IMC = 21 \pm 0,2$ kg/m^2 et $39 \pm 0,7$ kg/m^2 , $p < 0,001$) et correspondent à deux groupes de patients représentatifs, pour l'un de la population normale et pour l'autre de la population obèse. La population non-obèse pourra donc constituer le groupe témoin. Les deux tranches d'âge sont par ailleurs similaires. Les critères de sélection des patients participant à l'étude ont été décrits dans le chapitre "matériel et méthodes".

Tableau XVI : Ages et IMC des deux populations étudiées

| Groupes | Age (ans) | | | IMC (kg/m²) | | |
|-------------------------|------------------|-----|-----|-------------------------------|-----|-----|
| | Moy ± SEM | Min | Max | Moy ± SEM | Min | Max |
| Témoins (n = 72) | 41,8 ± 2,4 | 18 | 57 | 21 ± 0,2 | 17 | 25 |
| Obèses (n = 121) | 47,4 ± 2,3 | 18 | 65 | 39 ± 0,7 ^{**} | 27 | 66 |

Différences significatives, ^{**} p<0,001 par rapport aux témoins.

1.2. Consommation alimentaire

Nous avons étudié les habitudes alimentaires de ces populations afin d'évaluer les conséquences de la composition de leur ration alimentaire sur leur statut lipidique.

Des enquêtes alimentaires de type semainier ont été réalisées par une diététicienne auprès de chaque sujet. Elles nous ont permis d'estimer leur consommation énergétique quotidienne mais également de connaître plus précisément la part des protéines, glucides et lipides de leur alimentation (tableau XVII) et, parmi ces lipides, de connaître les proportions de chaque groupe d'acides gras (acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés) (tableau XVIII). Nous n'avons pas trouvé de différences significatives entre les apports énergétiques journaliers et la proportion des lipides, protéines, glucides de 121 patients obèses et 72 non obèses. Les proportions d'AGMI et d'AGPI dans l'alimentation de la population obèse ne sont pas significativement différentes de celles trouvées pour la population témoin. En revanche, la proportion d'AGS est plus élevée dans l'alimentation de la population obèse (39,8 +/- 8,3 % pour les témoins et 42,4 +/- 7,2 % pour les obèses, $p < 0,05$).

Le constat que les consommations énergétiques quotidiennes moyennes de la population témoin et la population obèse ne sont pas différentes peut être lié à la grande hétérogénéité dans les consommations déclarées de la population obèse. En effet, si la moyenne de leur consommation est similaire à celle de la population non-obèse, il faut cependant noter que les individus, au sein de cette population obèse, peuvent présenter des comportements alimentaires très différents (consommation énergétique de 556 à 5792 kcal/j ; 15,1 à 61,5 % de lipides dans l'AET). Par ailleurs, on connaît la tendance des obèses à sous-estimer leurs apports (Lafay et coll., 2000).

Tableau XVII : Apport énergétique total (AET) journalier d'une population obèse et d'une population témoin et pourcentages de lipides, protéines et glucides de cet AET.

| | Témoins | | | | | Obèses | | | | |
|------------------------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|
| | n = 72 | | | | | n = 121 | | | | |
| | Moy | +/- | E.T. | Min | Max | Moy | +/- | E.T. | Min | Max |
| Energie totale (kcal) | 1748 | +/- | 432 | 999 | 3230 | 1910 | +/- | 827 | 556 | 5792 |
| Lipides (% AET) | 40,7 | +/- | 7,2 | 20,2 | 50,9 | 38,7 | +/- | 7,2 | 15,1 | 61,5 |
| Protéines (% AET) | 18,3 | +/- | 3,8 | 12,4 | 30,5 | 21,3 | +/- | 4,4 | 12,5 | 41,6 |
| Glucides (% AET) | 39 | +/- | 6,85 | 23,3 | 66,3 | 41 | +/- | 8,3 | 21,8 | 84 |
| Lipides totaux (g) | 84 | +/- | 26 | 17 | 136 | 82 | +/- | 45 | 14 | 366 |

Moy = moyenne ; E.T. = écart type ; Min = minimum ; Max = maximum

Tableau XVIII : Apports journaliers (% de l'apport lipidique total) en acides gras saturés (AGS), acides gras monoinsaturés (AGMI) et acides gras polyinsaturés (AGPI) chez des populations non-obèse et obèse.

| | Témoins n=72 | | | | | Obèses n=121 | | | | |
|-------------|---------------|------------|------------|-------------|-------------|--------------|------------|------------|-------------|-------------|
| | Moy | +/- | E.T. | Min | Max | Moy | +/- | E.T. | Min | Max |
| AGS | % 39,8 | +/- | 8,3 | 14 | 54,3 | 42,4* | +/- | 7,2 | 24,4 | 58,2 |
| AGMI | % 39,9 | +/- | 9,7 | 13,2 | 57,4 | 39,8 | +/- | 5,7 | 29,9 | 57,3 |
| AGPI | % 20,3 | +/- | 7,6 | 6,3 | 50,1 | 17,8 | +/- | 8,1 | 5,4 | 45,8 |

Moy = moyenne ; ET = écart type ; Min = minimum ; Max = maximum

* p<0,05, significativement différent de la population témoin.

1.3. Statuts lipidiques

Afin de mieux caractériser ces populations, certains paramètres sériques et métaboliques ont été dosés.

1.3.1. Mesures des paramètres sériques

Les valeurs de certains paramètres sanguins indicateurs du métabolisme lipidique et glucidique de 121 patients obèses et de 72 témoins sont reportées dans le tableau XIX. Chez les patients obèses, on note des taux moyens de triglycérides, TG ($1,64 \pm 0,08$ g/l) et de cholestérol total, CT ($2,48 \pm 0,08$ g/l) significativement plus élevés ($p < 0,01$) par rapport aux témoins (respectivement : $0,92$ g/l $\pm 0,1$ et $1,7$ g/l $\pm 0,04$). En effet, tandis que les valeurs de ces paramètres se situent, pour la population saine, approximativement au centre de l'intervalle des valeurs considérées comme "normales" (de $0,4 - 1,5$ g/l pour les TG et de $1,5 - 2,5$ g/l pour le CT), les valeurs mesurées chez la population obèse sont proches de la limite supérieure de ces intervalles. Les individus obèses semblent présenter donc, en moyenne, une lipémie dans les limites de la "normale" mais néanmoins plus élevée que celle de la population témoin. Ces données sont en accord avec celles d'études rapportant que l'obésité est associée à un taux de triglycérides et de cholestérol sériques élevés (Kanalet et coll., 1993). En effet, les individus obèses semblent présenter, par rapport à une population témoin, un accroissement de la synthèse hépatique de TG, libérés sous forme de VLDL, et une diminution de l'activité lipoprotéine lipase des tissus périphériques (Senti et coll., 2000).

Afin de préciser le statut de la population obèse, nous avons rapporté dans le tableau XX les taux d'insulinémie, la glycémie, l'indice d'insulino-résistance HOMA (défini par Matthews et coll., (1985) = $[(\text{glycémie à jeun} \times \text{insulinémie à jeun}) / 22,5]$ et le ratio WHR (tour de taille /tour de hanches). Parmi la population obèse, 26 patients sont diabétiques type II, 34 sont intolérants au glucose (IFGT, "impaired fasting glucose tolerant"), 65 ne présentent aucun de ces deux symptômes et 14 n'ont pas été diagnostiqués. Nous avons pu constater que

la population obèse saine présentait un WHR caractéristique d'une obésité de type gynoïde (proche de 0,8), tandis que les patients diabétiques type II avaient un WHR caractérisant une obésité de type androïde (proche de 1). Ceci est en accord avec les données de la littérature qui rapportent que l'obésité androïde prédispose au diabète de type II (Mason et coll., 1992 ; Ko et coll., 1999) et que les maladies liées à l'obésité sont influencées par la répartition corporelle du tissu adipeux et que les dépôts graisseux, au niveau de l'abdomen, sont associés avec un risque accru de diabète de type II (Despres, 1993).

A jeun, les patients obèses diabétiques présentent une insulïnémie et une glycémie significativement plus élevées que celles des patients obèses sains ($p < 0,001$), et les patients présentant une intolérance au glucose ont également ce profil comparativement à des sujets dont le métabolisme glucidique n'est pas affecté ($p < 0,05$). Nous observons également des différences significatives entre les diabétiques et les patients intolérants au glucose ($p < 0,05$).

Connaissant l'effet de l'insuline sur la régulation de certains gènes et notamment celle concernant la stimulation de PPAR γ (Vidal-Puig et coll., 1997 ; Rieusset et coll., 1999), il sera nécessaire, pour l'étude moléculaire des récepteurs nucléaires, de tenir compte des différences métaboliques rencontrées au sein du groupe de sujets obèses.

1.3.2. Composition en acides gras du plasma

Les compositions en acides gras des lipides totaux du plasma des individus obèses et non obèses sont représentées dans le tableau XXI.

Parmi les trois groupes d'acides gras (saturés AGS, monoinsaturés AGMI et polyinsaturés AGPI), seul le groupe d'AGPI présente une diminution significative dans le plasma des individus obèses par rapport à celui de sujets témoins (- 7 %, $p < 0,05$). Cette diminution peut être attribuée aux acides gras de la série (n-6) et, plus précisément, à l'acide gras le plus représenté de cette série, l'acide linoléique 18:2 pour lequel on observe une

Tableau XIX : Paramètres sériques mesurés chez les patients à jeun.

| Groupes | TG (g/l) | CT (g/l) |
|------------------|--------------|--------------|
| Témoins (n = 72) | 0,92. ± 0,1 | 1,7 ± 0,04 |
| Obèses (n = 121) | 1,64 ± 0,08* | 2,48 ± 0,08* |

Moyennes +/- SEM ; TG : triglycérides ; CT : cholestérol total
* significativement différent du groupe témoin, p<0,001.

Tableau XX : Caractéristiques de la population obèse.

| | Obèses (population totale) n=121 | Obèses non diabétiques, non IFTG, n=61 | Obèses IFGT n=34 | Obèses diabétiques type II n=26 |
|--------------------------|--|--|------------------------|---------------------------------------|
| Hommes / Femmes | 21 / 100 | 8 / 53 | 3 / 31 | 8 / 14 |
| Age (ans) | 49 +/- 2 | 49 +/- 2 | 45 +/- 2 | 55 +/- 2 °\$ |
| IMC (kg/m ²) | 40 +/- 0,7 | 36 +/- 0,6 | 43 +/- 1,4 * | 39 +/- 1,8 ° |
| Glycémie (mmol/l) | 6,6 +/- 0,3 | 5,1 +/- 0,1 | 5,55 +/- 0,1 ° | 11,5 +/- 4,6* # |
| Insulinémie (μU/l) | 16,9 +/- 0,9 | 10 +/- 0,3 | 25,7 +/- 1,9 * | 17,7 +/- 1,9* # |
| HOMA | 5 +/- 0,4 | 2,3 +/- 0,2 | 6,54 +/- 0,6 * | 8,7 +/- 1* \$ |
| WHR | 0,92 +/- 0,01 | 0,87 +/- 0,01 | 0,92 +/- 0,01 ° | 1 +/- 0,03* \$ |

Les données sont des moyennes ± SEM. IMC: indice de masse corporelle ; HOMA : Homeostasis model assessment ; WHR : waist / hip ratio

° significativement différent par rapport au groupe sain, p<0,05.

* significativement différent par rapport au groupe sain p<0,001.

\$ significativement différent entre les deux groupes diabétiques et IFGT p<0,05.

significativement différent entre les deux groupes diabétiques et IFGT p<0,001.

diminution significative de 13,4 %. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Rossner et coll. (1989) qui ont également constaté une diminution du taux de 18:2 dans les lipides plasmatiques de patients obèses.

Les AGPI à longue chaîne, et notamment l'acide linoléique, possèdent une grande affinité pour la protéine de transport des acides gras (FABP, fatty acid binding protein) qui participeraient ainsi à leur capture au sein des tissus (Kaikaus et coll., 1990), comme par exemple, dans les cellules adipeuses (Sams et coll., 1990). De plus, cette protéine est sur-exprimée chez les animaux obèses (Memon et coll., 1999). Nous pouvons donc supposer que la diminution du taux des AGPI dans le plasma des individus obèses peut être attribuée, du moins en partie, à une augmentation du stockage de ces acides gras.

1.3.3. Composition en acides gras du tissu adipeux

La composition en acides gras des lipides totaux du tissu adipeux a été déterminée pour les deux populations (tableau XXII). Si l'on s'attache à comparer les différents groupes d'acides gras représentés dans ces tissus, les patients obèses présentent une proportion en acides gras saturés significativement plus faible dans leur tissu adipeux que celle retrouvée chez la population témoin (respectivement, $29,9 \pm 3,56$ % et $32,48 \pm 4,4$ %, $p < 0,001$). Celle-ci est compensée par une plus forte proportion d'AGMI ($p < 0,001$) et d'AGPI ($p = 0,024$). Parmi les acides gras, nous observons une augmentation de 19,5 % de l'acide palmitoléique 16:1 (n-7) chez les individus obèses comparativement aux témoins. De même, certains acides gras à longue chaîne, comme notamment les AGPI n-3, sont en proportion plus importante dans le tissu adipeux des obèses. C'est le cas du 22:5 n-3 et également du 22:6 n-3 qui présentent des augmentations significatives (respectivement, 66 % et 57 %, $p < 0,05$).

Tableau XXI : Proportions des différents acides gras dans les lipides totaux du plasma.

| | Témoins (n=72) | | | Obèses (n=121) | | | |
|-----------------|----------------|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-----------|
| | Moyenne | +/- | E T | Moyenne | +/- | E T | |
| AGS | 31,71 | +/- | 2,73 | 32,85 | +/- | 2,90 | |
| 14:0 | 0,84 | +/- | 0,23 | 0,92 | +/- | 0,30 | |
| 15:0 | 0,305 | +/- | 0,05 | 0,27 | +/- | 0,21 | |
| 16:0 DMA | 0,26 | +/- | 0,11 | 0,22 | +/- | 0,13 | |
| 16:0 | 22,148 | +/- | 1,88 | 23,00 | +/- | 2,27 | |
| 17:0 iso | 0,14 | +/- | 0,00 | 0,16 | +/- | 0,04 | |
| 17:0 | 0,36 | +/- | 0,06 | 0,30 | +/- | 0,11 | |
| 18:0 DMA | 0,16 | +/- | 0,08 | 0,12 | +/- | 0,09 | |
| 18:0 | 6,19 | +/- | 1,23 | 6,58 | +/- | 0,99 | |
| 20:0 | 0,22 | +/- | 0,06 | 0,23 | +/- | 0,07 | |
| 22:0 | 0,48 | +/- | 0,22 | 0,55 | +/- | 0,13 | |
| 24:0 | 0,42 | +/- | 0,20 | 0,40 | +/- | 0,14 | |
| AGMI cis | 23,82 | +/- | 2,60 | 25,16 | +/- | 4,49 | |
| 16:1(n-9) | 0,45 | +/- | 0,13 | 0,56 | +/- | 0,13 | |
| 16:1(n-7) | 1,90 | +/- | 0,67 | 2,51 | +/- | 0,65 | |
| 17:1(n-7) | 0,16 | +/- | 0,13 | 0,20 | +/- | 0,05 | |
| 18:1(n-9) | 18,68 | +/- | 1,84 | 19,25 | +/- | 3,90 | |
| 18:1(n-7) | 1,54 | +/- | 0,20 | 1,65 | +/- | 0,35 | |
| 20:1(n-9) | 0,17 | +/- | 0,03 | 0,14 | +/- | 0,16 | |
| 20:1(n-7) | 0,14 | +/- | 0,12 | 0,12 | +/- | 0,06 | |
| 24:1(n-9) | 0,72 | +/- | 0,24 | 0,76 | +/- | 0,22 | |
| AGPI cis | 42,49 | +/- | 3,77 | 39,43 | +/- | 4,77 | * p<0,001 |
| 20:2(n-9) | 0,10 | +/- | 0,18 | 0,17 | +/- | 0,07 | * p=0,09 |
| 20:3(n-9) | 0,12 | +/- | 0,29 | 0,15 | +/- | 0,05 | |
| AGPI n-6 | 38,46 | +/- | 2,02 | 35,22 | +/- | 4,79 | * p<0,001 |
| 18:2(n-6) | 29,26 | +/- | 2,71 | 25,34 | +/- | 3,94 | * p<0,01 |
| 18:3(n-6) | 0,35 | +/- | 0,09 | 0,43 | +/- | 0,14 | |
| 20:2(n-6) | 0,21 | +/- | 0,05 | 0,22 | +/- | 0,05 | |
| 20:3(n-6) | 1,38 | +/- | 0,40 | 1,63 | +/- | 0,36 | |
| 20:4(n-6) | 6,90 | +/- | 1,48 | 6,94 | +/- | 1,49 | |
| 22:4(n-6) | 0,21 | +/- | 0,11 | 0,36 | +/- | 0,07 | * p=0,017 |
| 22:5(n-6) | 0,15 | +/- | 0,05 | 0,11 | +/- | 0,06 | |
| AGPI n-3 | 3,81 | +/- | 0,13 | 3,84 | +/- | 0,92 | |
| 18:3(n-3) | 0,49 | +/- | 0,14 | 0,44 | +/- | 0,45 | |
| 20:5(n-3) | 0,61 | +/- | 0,26 | 0,82 | +/- | 0,32 | |
| 22:5(n-3) | 0,46 | +/- | 0,11 | 0,45 | +/- | 0,13 | |
| 22:6(n-3) | 2,25 | +/- | 0,40 | 2,15 | +/- | 0,64 | |

La diminution de la proportion des AGS dans le tissu adipeux de la population obèse peut s'expliquer, en partie tout au moins, par une augmentation de la proportion des acides gras insaturés ayant pour conséquence une "dilution" des acides gras saturés. En effet, une étude réalisée sur l'influence de l'obésité sur l'oxydation et le stockage des acides gras alimentaires a montré que les acides gras à longues chaînes étaient moins oxydés chez des patients obèses, ceci pouvant être attribué à un excès de stockage (Binnert et coll., 1998). Egalement, l'augmentation significative de la proportion des AGPI de la série n-3 peut être dû à un stockage préférentiel de ces acides gras dans le tissu adipeux des obèses tandis que leur mobilisation est inversement corrélée à leur incorporation *in vivo* (Raclot et Oudart, 1999). Il est possible que cet important stockage des acides gras à longue chaîne puisse être, en partie, attribué à leur grande affinité pour les protéines de transport des acides gras (FABP) adipocytaires (Kaikaus et coll., 1990 ; Sams et coll., 1990). Or, la FABP est sur-exprimée chez les animaux obèses (Memon et coll., 1999). Cette augmentation pourrait être due à une régulation positive, par le récepteur nucléaire PPAR γ , du gène aP2 codant pour la FABP (Lapsys et coll., 2000).

Les résultats de cette étude ont également révélé une augmentation de l'acide palmitoléique dans le tissu adipeux des patients obèses comparativement aux témoins. Enser (1975) avait déjà montré un résultat semblable dans le tissu adipeux de souris obèses et Rossner et coll. (1989) avaient eux aussi trouvé un taux plus important de 16:1 dans le tissu adipeux d'une population obèse par rapport à celui mesuré chez des témoins. L'augmentation de cet acide gras dans le tissu adipeux peut s'expliquer par l'augmentation de l'activité d'une enzyme du métabolisme lipidique, la delta 9 désaturase. En effet, parmi les substrats de cette enzyme, on trouve l'acide palmitique 16:0 qui est alors converti en acide palmitoléique 16:1.

Il a été montré que l'obésité était associée à une augmentation de l'activité de cette enzyme dans le tissu adipeux de différents modèles animaux (Jones et coll., 1996 ; Smith et coll., 1999). De même, une corrélation positive a été trouvée entre l'activité de la delta 9 désaturase dans le muscle squelettique et le pourcentage de masse grasse chez l'homme (Pan et coll., 1994). Il est toutefois difficile d'interpréter clairement une telle augmentation chez les individus obèses de notre étude car cette enzyme peut influencer diverses réponses physiologiques. Ainsi, certains auteurs envisagent l'implication de la delta 9 désaturase dans le métabolisme glucidique et/ou l'insulino-résistance (Jones et coll., 1998 ; Kim et coll., 2000).

Ces résultats révèlent des différences entre les compositions en acides gras du tissu adipeux des patients obèses et non obèses. Ce constat peut résulter, d'une part d'un stockage préférentiel de certains acides gras, pouvant impliquer les FABP adipocytaires, et d'autre part de régulations métaboliques, comme celle impliquant par exemple la delta 9 désaturase.

Tableau XXII : Proportions des acides gras des lipides du tissu adipeux des patients.

| | Témoins (n=72) | | | Obèses (n=121) | | | |
|-----------------|----------------|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-----------|
| | Moyenne | +/- | E T | Moyenne | +/- | E T | |
| AGS | 32,80 | +/- | 3,07 | 30,05 | +/- | 3,64 | * p<0,001 |
| 12:0 | 0,61 | +/- | 0,30 | 0,25 | +/- | 0,14 | * p<0,001 |
| 14:0 | 3,69 | +/- | 0,79 | 2,60 | +/- | 0,69 | * p<0,001 |
| 15:0 | 0,37 | +/- | 0,08 | 0,36 | +/- | 0,08 | |
| 16:0 iso | 0,11 | +/- | 0,03 | 0,09 | +/- | 0,21 | |
| 16:0 | 22,20 | +/- | 1,85 | 20,79 | +/- | 1,79 | |
| 17:0 iso | 0,15 | +/- | 0,04 | 0,18 | +/- | 0,07 | |
| 17:0 | 0,28 | +/- | 0,05 | 0,25 | +/- | 0,06 | |
| 18:0 | 4,97 | +/- | 1,10 | 3,44 | +/- | 1,00 | |
| 20:0 | 0,29 | +/- | 0,10 | 0,23 | +/- | 0,06 | |
| AGMI cis | 47,68 | +/- | 3,04 | 50,82 | +/- | 3,88 | * p<0,001 |
| 14:1(n-9) | 0,42 | +/- | 0,16 | 0,47 | +/- | 0,13 | |
| 16:1(n-9) | 0,54 | +/- | 0,08 | 0,71 | +/- | 0,19 | |
| 16:1(n-7) | 4,25 | +/- | 1,19 | 5,08 | +/- | 1,54 | * p<0,001 |
| 17:1 | 0,27 | +/- | 0,08 | 0,33 | +/- | 0,05 | |
| 18:1(n-9) | 39,60 | +/- | 2,58 | 40,96 | +/- | 2,77 | |
| 18:1(n-7) | 1,70 | +/- | 0,29 | 2,33 | +/- | 0,56 | * p<0,001 |
| 20:1(n-9) | 0,66 | +/- | 0,15 | 0,53 | +/- | 1,00 | |
| 20:1(n-7) | 0,17 | +/- | 0,07 | 0,17 | +/- | 0,07 | |
| 22:1(n-9) | 0,04 | +/- | 0,03 | 0,09 | +/- | 0,05 | |
| AGPI cis | 15,67 | +/- | 3,17 | 16,67 | +/- | 3,17 | * p<0,05 |
| 20:2(n-9) | 0,14 | +/- | 0,08 | 0,17 | +/- | 0,22 | |
| 20:3(n-9) | 0,00 | +/- | 0,01 | 0,03 | +/- | 0,05 | |
| AGPI n-6 | 14,76 | +/- | 3,11 | 15,46 | +/- | 3,15 | |
| 18:2(n-6) | 13,94 | +/- | 2,98 | 14,05 | +/- | 3,02 | |
| 18:3(n-6) | 0,06 | +/- | 0,03 | 0,10 | +/- | 0,04 | |
| 20:2(n-6) | 0,23 | +/- | 0,08 | 0,23 | +/- | 0,06 | |
| 20:3(n-6) | 0,14 | +/- | 0,07 | 0,31 | +/- | 0,11 | * p<0,001 |
| 20:4(n-6) | 0,28 | +/- | 0,11 | 0,53 | +/- | 0,16 | |
| 22:4(n-6) | 0,09 | +/- | 0,07 | 0,21 | +/- | 0,08 | * p<0,001 |
| 22:5(n-6) | 0,02 | +/- | 0,02 | 0,25 | +/- | 0,02 | |
| AGPI n-3 | 0,77 | +/- | 0,22 | 0,94 | +/- | 0,20 | |
| 18:3(n-3) | 0,46 | +/- | 0,10 | 0,46 | +/- | 0,08 | |
| 20:5(n-3) | 0,04 | +/- | 0,02 | 0,02 | +/- | 0,03 | |
| 22:5(n-3) | 0,15 | +/- | 0,07 | 0,25 | +/- | 0,09 | * p<0,001 |
| 22:6(n-3) | 0,14 | +/- | 0,02 | 0,22 | +/- | 0,09 | * p<0,001 |

2. Conclusion

La comparaison du comportement alimentaire d'une population obèse avec celui d'une population saine nous a révélé des consommations énergétiques moyennes comparables et des proportions des lipides alimentaires similaires. Cependant, les sujets obèses sont connus pour sous estimer leur consommation alimentaire. Ceci se traduit par une large fourchette d'apports énergétiques journaliers déclarés chez cette population où certains patients prétendent ne consommer que 556 kcal/j tandis que d'autres en consomment 5792 kcal/j. La fiabilité des enquêtes alimentaires réalisées chez cette population semble constituer un biais qui ne nous a pas permis d'observer de corrélation entre les données alimentaires et la composition en acides gras des tissus des patients.

Cependant, nous avons observé des différences de composition en acides gras dans ces tissus entre la population obèse et la population témoin traduisant, chez les individus obèses, des modifications du stockage et de la mobilisation des acides gras. Ces modifications sont complexes et peuvent résulter à la fois de l'action des nutriments et/ou des hormones et ceci par l'intermédiaire de protéines de transport, d'enzymes du métabolisme ou de récepteurs nucléaires.

Nous avons donc, dans un deuxième temps, cherché à connaître l'impact de la dynamique de l'obésité sur la voie de signalisation cellulaire de la vitamine A. Pour cela, nous avons réalisé, sur certains patients obèses, une étude moléculaire et quantifié les récepteurs PPAR, RAR et TR dans le tissu adipeux.

II. Etudes des récepteurs nucléaires PPAR, RAR et TR chez une population humaine obèse et chez une population témoin

1. Résultats

Une population de 25 femmes, constituée de 15 obèses (moyenne d'âge $47,6 \pm 2,3$ ans, IMC $40,9 \pm 1,9$ kg/m²) et une de 10 témoins (moyenne d'âge $41,8 \pm 3,4$ ans, IMC $23,3 \pm 2,8$ kg/m²) ont été sélectionnées de façon aléatoire parmi les populations décrites ci-dessus pour réaliser la quantification des récepteurs nucléaires dans le tissu adipeux sous-cutané par une technique de PCR en temps réel.

Le groupe d'obèses était composé de 10 sujets toujours en phase dynamique de prise de poids (une prise de 5 kg ou plus sur les 6 derniers mois) et de 5 individus en train de perdre du poids (une perte de 5 kg ou plus sur les 6 derniers mois car ces patients recevaient des conseils nutritionnels dans un contexte médical). Ce qui nous a permis de constituer deux sous-groupes dans la population obèse étudiée. Nous avons ainsi pu observer l'influence de la prise ou de la perte de poids dans une situation d'obésité installée sur les différents paramètres mesurés. Parmi les 10 patients obèses en train de prendre du poids, 6 présentaient une intolérance au glucose. Aucun ne recevait d'insuline, de thiazolidinédione ou d'autres drogues hypolipémiantes. De plus, aucun des sujets de cette étude ne recevait de médicaments connus pour affecter la masse adipeuse ou le métabolisme lipidique.

1.1. Caractérisation de la population

Les caractéristiques cliniques et métaboliques de ces patientes sont rapportées dans le tableau XXIII. Les valeurs d'insuline et de triglycérides plasmatiques à jeun sont plus élevées chez les obèses que chez les témoins. Parmi les sujets obèses, la quantité d'insuline dans le plasma tend à être plus élevée chez des patientes présentant une intolérance au glucose par rapport aux obèses ne présentant pas d'intolérance au glucose (respectivement, $19,8 \pm 2,0$ et $14,0 \pm 2,1$ $\mu\text{U/ml}$, $p=0,065$). La valeur calculée du HOMA des sujets intolérants au glucose est comprise entre 4 et 6,67, alors qu'elle varie de 1,62 à 4,89 chez les patientes non-intolérantes au glucose ($p<0,05$).

Nous constatons également une augmentation significative des triglycérides plasmatiques chez les sujets présentant une intolérance au glucose ($2,4 \pm 0,4$ g/l) par rapport aux autres ($1,3 \pm 0,2$ g/l ; $p<0,05$). Nous avons également pu constater une corrélation positive entre le taux de triglycérides plasmatiques et l'IMC de la population globale ($r=0,547$; $p<0,05$) (figure 15). Cette corrélation n'est plus statistiquement significative si l'on ne considère que la population obèse.

1.2. Résultats concernant l'expression des PPARs

La figure 16 A montre que le taux d'ARNm de PPAR γ était significativement augmenté (+ 91%, $p<0,01$) chez les femmes obèses comparativement aux témoins. Afin de déterminer l'effet de l'état de prise ou de perte de poids sur l'expression de PPAR γ dans le tissu adipeux abdominal sous-cutané, nous avons examiné séparément les niveaux d'expression de ce récepteur dans chacune des sous-population de sujets obèses. Chez les patientes perdant du poids le taux d'ARNm de PPAR γ était inférieur de 42% à celui des obèses en phase dynamique de prise de poids ($p<0,05$), mais restait cependant plus élevé que celui du groupe témoin, même si cette différence n'était pas statistiquement significative (figure 16 B).

Tableau XXIII : Caractéristiques des individus ayant participé à l'étude des récepteurs nucléaires.

| Groupes | Age (ans) | IMC (kg/m ²) | HOMA | plasma | A jeun | | |
|----------------------------|--------------|-----------------------------|------------|-------------------------------|---------------------|------------------------|----------------------------------|
| | | | | glucose à jeun (mmol/l) | insuline (μU/ml) | triglycérides (g/l) | cholestérol total (mmol/l) |
| Témoins (n = 10) | 41,8 ± 3,4 | 23,3 ± 2,8 | 1,3 ± 0,2 | 5,0 ± 0,2 | 6,0 ± 0,1 | 1,0 ± 0,1 | 4,6 ± 0,2 |
| Obèses (n = 15) | 47,6 ± 2,3 | 40,9 ± 1,9* | 2,1 ± 0,6* | 5,5 ± 0,2 | 16,3 ± 1,8* | 1,8 ± 0,2* | 6,5 ± 0,7 |

Les données sont des moyennes ± SEM. Différences significatives, * p<0,05 par rapport aux témoins.

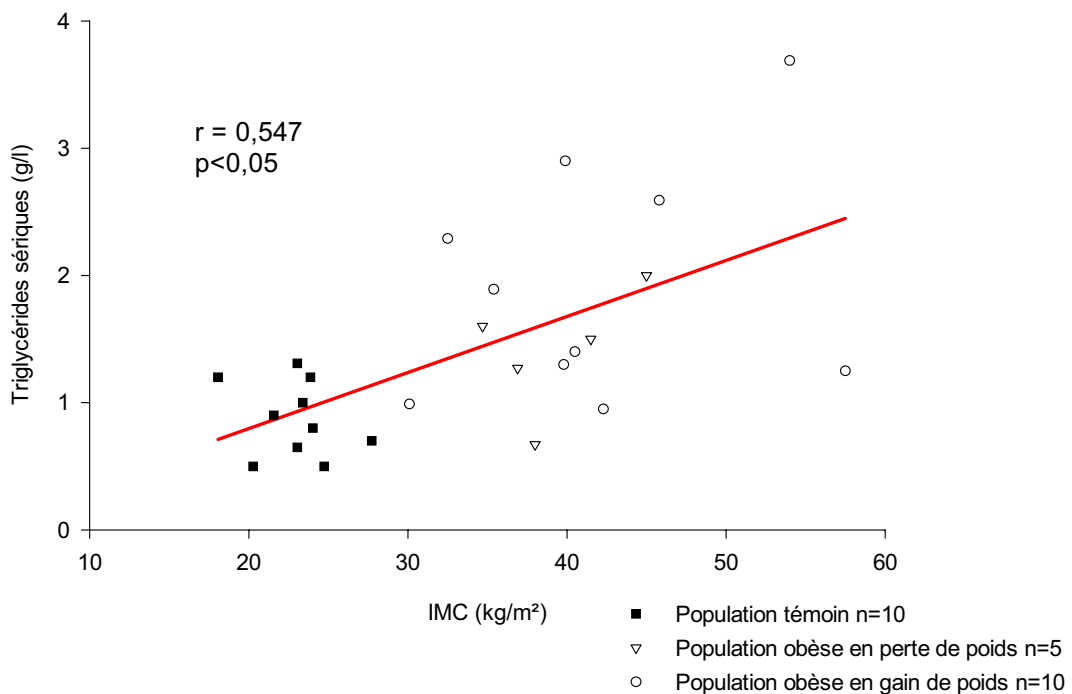
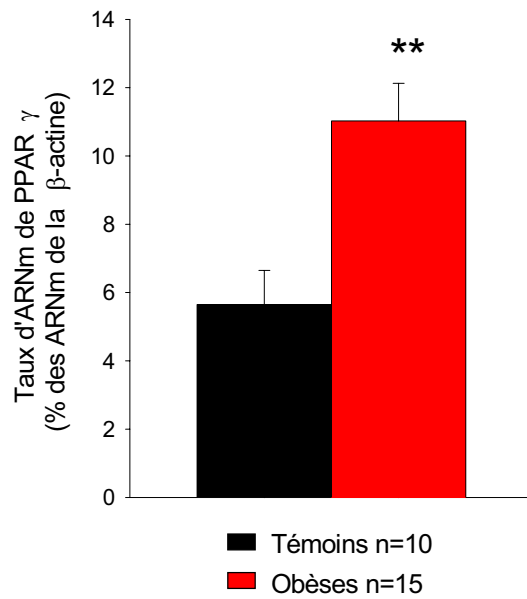


Figure 15 : Corrélation entre les triglycérides sériques et l'IMC des patientes.

Nous avons également obtenu une corrélation positive ($r = 0,51$, $p < 0,01$) entre le taux d'expression des ARNm de PPAR γ et l'IMC de toutes les patientes (figure 17). Cependant, cette corrélation positive semblait induite par le groupe témoin. En effet, nous n'observons plus de corrélation significative entre le taux d'expression de PPAR γ et l'IMC si l'on ne compare que les populations obèses en phase dynamique de prise de poids et en phase de perte de poids. Cependant le faible nombre d'individus pourrait également constituer un facteur limitant concernant la signification des résultats. Il est également important de noter que les résultats concernant PPAR γ obtenus chez les patientes intolérantes au glucose ne différaient pas de ceux des patientes obèses non-intolérantes au glucose.

Nous avons observé une augmentation de la concentration des triglycérides plasmatiques, à la fois chez les sujets obèses en phase de gain de poids et en phase de perte par rapport aux témoins (respectivement, $1,92 \pm 0,29$; $1,41 \pm 0,22$ et $0,88 \pm 0,13$ g/l). Cependant, cette augmentation est significative seulement entre le groupe d'obèses en phase de prise de poids et entre le groupe témoin ($p < 0,05$). De plus, nous avons constaté une corrélation positive entre le taux d'ARNm de PPAR γ et les triglycérides plasmatiques de tous les sujets ($r = 0,45$, $p < 0,05$) (figure 18).

A)



B)

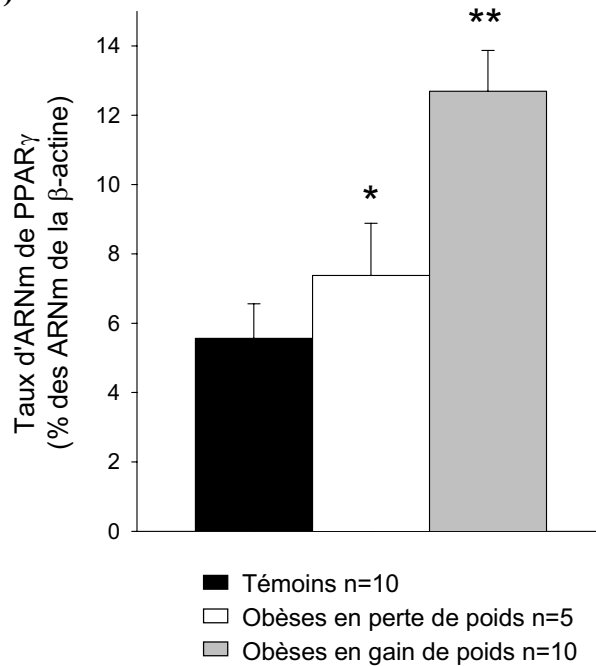


Figure 16 : Taux d'ARNm de PPAR γ dans le tissu adipeux humain A) chez des populations témoin et obèse et B) chez des populations témoin, obèse en phase de perte de poids et obèse phase de gain de poids.

* différences significatives, $p < 0,05$ et ** différences significatives, $p < 0,01$ par rapport à la population témoin.

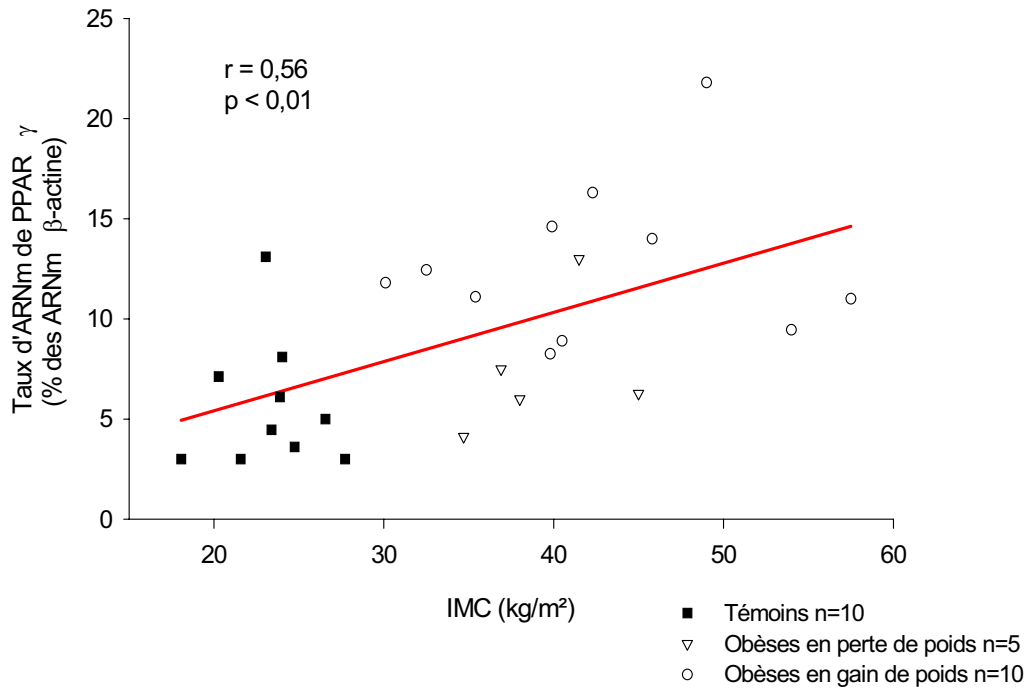


Figure 17 : Corrélation entre le taux d'ARNm de PPAR γ et l'IMC des patientes.

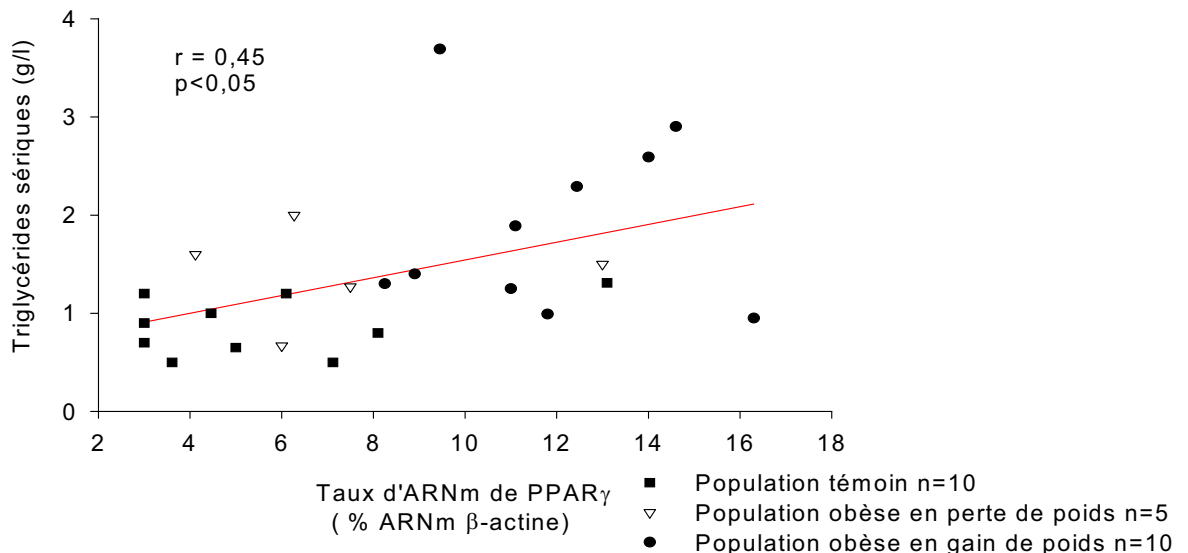


Figure 18 : Corrélation entre le taux d'ARNm de PPAR γ et les triglycérides sériques des patientes.

1.3. Résultats concernant l'expression des RARs

Nous avons mesuré le taux des ARNm de RAR α en fonction de l'état de prise ou de perte de poids chez des sujets obèses. Les rendements d'extraction d'ARNm très faibles et variables dans le tissu adipeux humain ne nous ont pas permis de mesurer les taux d'ARNm de RAR α chez la totalité des sujets obèses et témoins. Le taux relatif d'ARNm de RAR α dans le tissu adipeux abdominal sous-cutané de sujets obèses était significativement plus bas que chez les sujets témoins (- 56 %, $p < 0,01$) (figure 19 A).

Si on regarde plus précisément dans la population obèse, aucune différence n'avait été trouvée chez les groupes d'obèses en fonction de leur tolérance au glucose. Par contre, chez le groupe présentant un gain de poids nos résultats montraient une diminution (- 60 %, $p < 0,01$) du taux d'expression des ARNm de RAR α . Il est à rappeler que c'est dans ce sous-groupe que le taux des ARNm de PPAR γ était le plus augmenté. Comparé au sous-groupe d'obèses en phase dynamique de gain de poids et au groupe témoin, la valeur du taux d'expression des ARNm de RAR α chez le sous-groupe des obèses perdant du poids est intermédiaire entre les deux autres et n'est donc pas significativement différente (figure 19 B). Cependant, vu le faible nombre d'individus obèses en phase de perte de poids ($n=3$) ayant été utilisé pour réaliser la quantification du taux d'ARNm de RAR α , ces résultats peuvent être considérés comme des données partielles.

Comme indiqué dans la figure 20, une corrélation négative, statistiquement significative, a été trouvée entre les taux d'ARNm de PPAR γ et de RAR α dans le tissu adipeux des patients ($r = - 0,75$, $p < 0,01$). Il est intéressant de constater qu'une corrélation similaire tend à être également rencontrée entre les patients obèses en phase de perte ou de gain de poids ($r = - 0,55$, $p = 0,063$). Cette corrélation qui n'apparaît pas significative peut être due au faible nombre d'individus obèses en phase de perte de poids ayant permis la quantification des ARNm de RAR α .

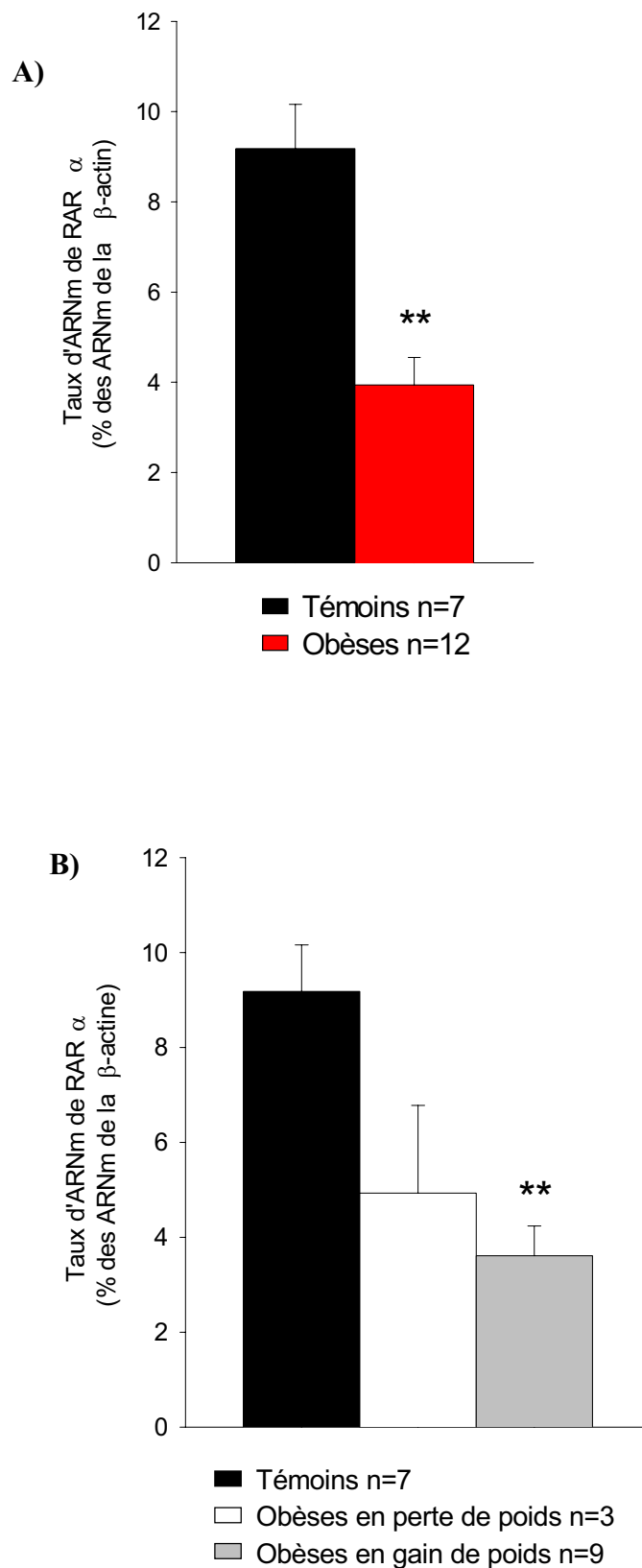


Figure 19 : Taux d'ARNm de RAR α dans le tissu adipeux humain A) chez des populations témoin et obèse ; B) chez des populations témoin, obèse en perte de poids et obèse en gain de poids.

** différences significatives, $p < 0,01$ par rapport à la population témoin.

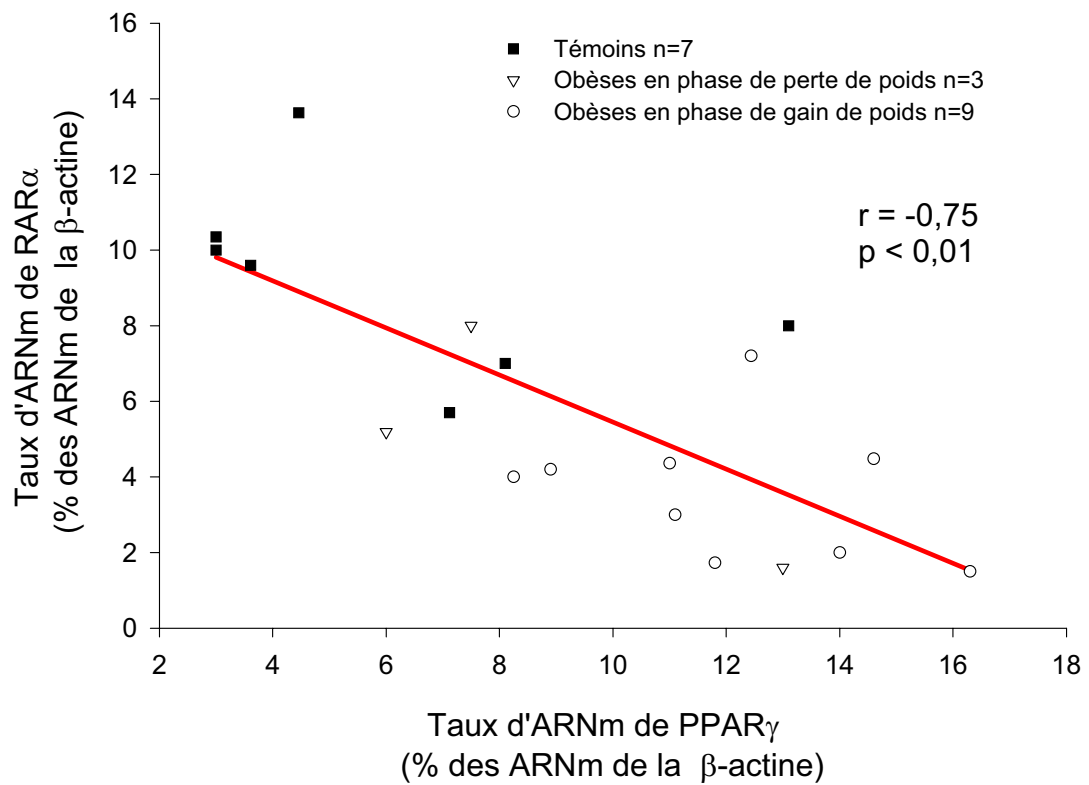


Figure 20 : Corrélation entre le taux d'ARNm de PPAR γ et de RAR α dans le tissu adipeux humain.

1.4. Résultats concernant l'expression des TRs

Nous avons étudié l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires de la triiodothyronine (TR) car il a été démontré que des animaux obèses présentaient une résistance tissulaire à la triiodothyronine (Lehmann et coll., 1993). De plus, des interactions entre les voies de signalisation des TR, RAR et PPAR ont été décrites (Tontonoz et coll., 1994 ; Chu et coll., 1995). Des résultats semblables à ceux obtenus avec les taux d'ARNm des RAR α ont été obtenus en quantifiant les ARNm de TR β dans le tissu adipeux de patientes obèses (n=15) et de témoins (n=10). Cependant la diminution d'expression des TRs chez la population obèse totale par rapport aux témoins était moins importante (-39%, p<0,05) que la diminution observée du taux d'ARNm de RAR α chez les mêmes individus (figure 21 A). Nous n'avons pas observé de différence significative entre les taux d'expression des ARNm des deux sous-populations du groupe obèse (figure 21 B). D'un autre côté, nous n'avons pas observé de corrélation significative entre les taux d'expression des PPAR γ et de TR β dans le tissu adipeux des individus (figure 22) et nous n'avons pas trouvé non plus de corrélation entre les pourcentages d'expression de TR β et de RAR α chez ces sujets (figure 23).

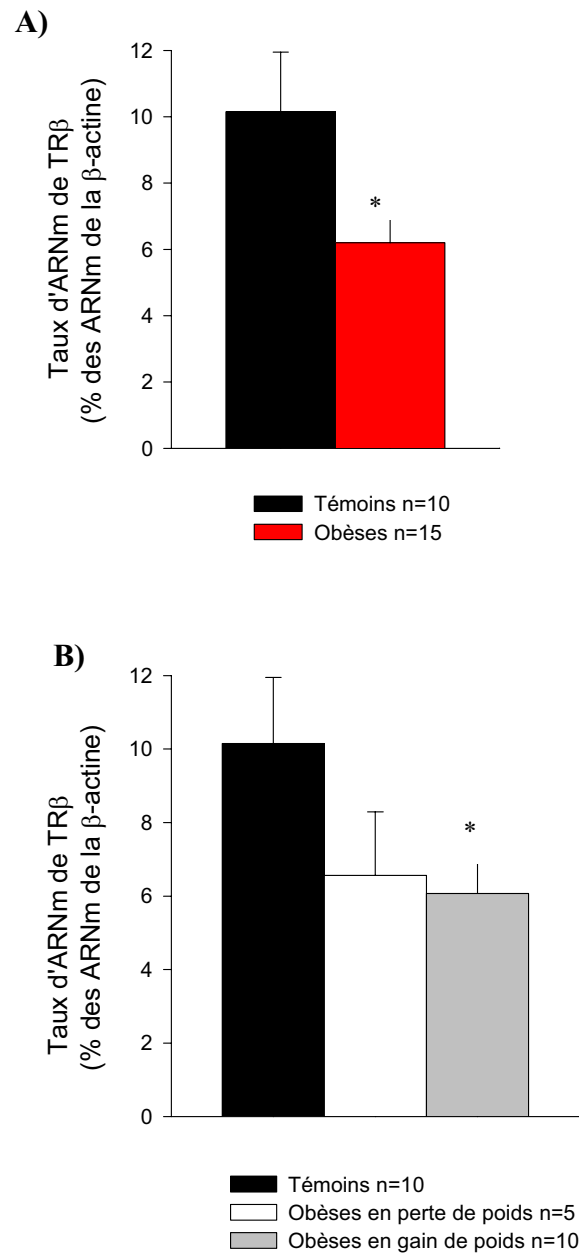


Figure 21 : Taux d'ARNm de TRβ dans le tissu adipeux humain A) chez des populations témoin et obèse ; B) chez des populations témoin, obèse en perte de poids et obèse en gain de poids.

** différences significatives, $p < 0,01$ par rapport à la population témoin.

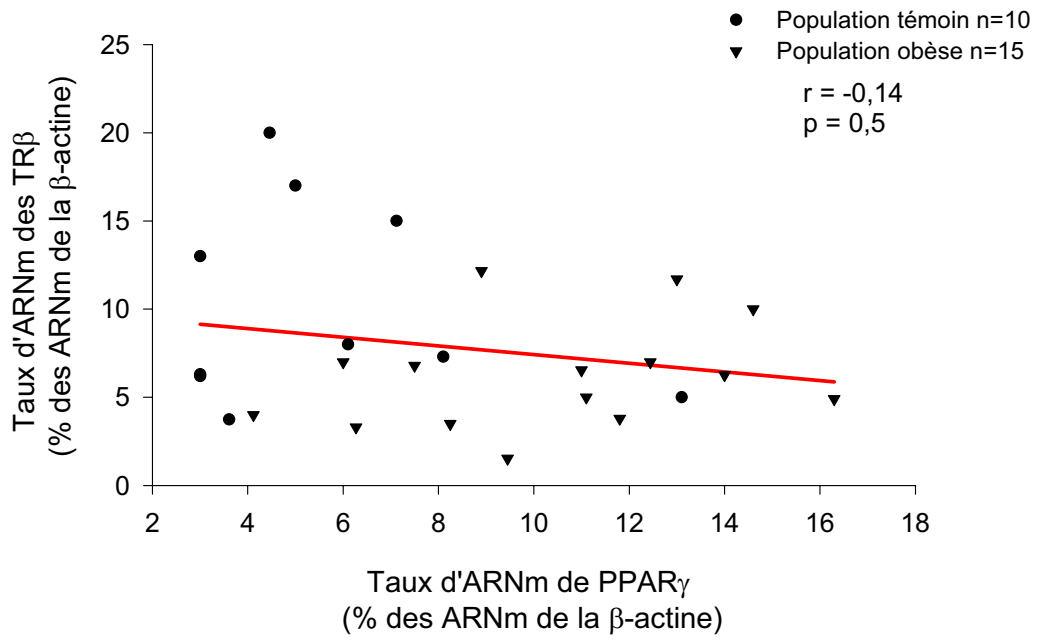


Figure 22 : Relation entre les taux d'ARNm de PPAR γ et de TR β dans le tissu adipeux blanc humain.

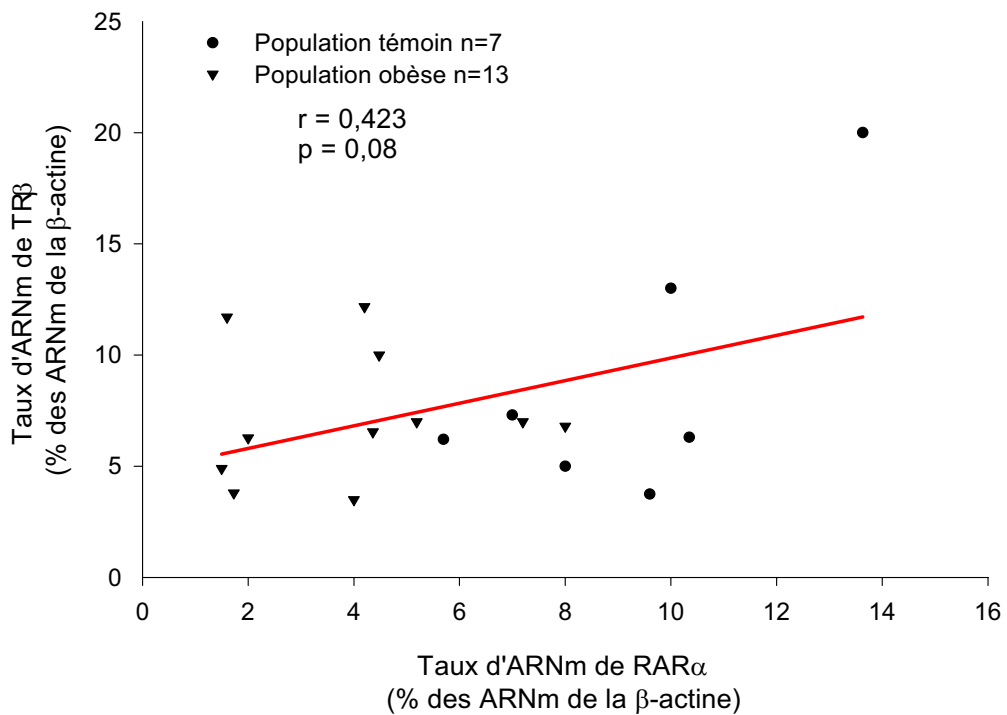


Figure 23 : Relation entre les taux d'ARNm de TR β et des RAR α dans le tissu adipeux humain.

2. Discussion partielle

2.1. PPAR γ et le contrôle adipocytaire

Il est aujourd'hui bien établi que PPAR γ est fortement exprimé dans le tissu adipeux. Il est nécessaire à son développement car il joue un rôle clé dans la régulation de gènes impliqués dans le déclenchement de l'adipogenèse (Tontonoz et coll., 1994 ; Spiegelman et Flier, 1996). Dans ce contexte il semble important d'identifier les facteurs qui sont capables de moduler l'expression des ARNm de PPAR γ à un stade précoce de l'adipogenèse et de connaître leur régulation dans les différentes phases de développement de l'obésité.

Le rôle de PPAR γ dans le contrôle du poids du corps a déjà été clairement démontré sur un modèle animal (Brun et coll., 1997). Chez l'homme, des études génétiques ont contribué à déterminer le rôle de PPAR γ dans le métabolisme lipidique en révélant différentes mutations du gène de PPAR γ . En effet, Ristow et coll. (1998) ont décrit une mutation rare (Pro115 Gln), dans la partie NH₂-terminale de PPAR γ . Celle-ci a été rencontrée chez 4 sujets présentant une obésité sévère ; elle empêche la phosphorylation de la Ser112, il en résulte une activation permanente de PPAR γ conduisant à une augmentation de la différenciation adipocytaire et à l'obésité. De plus, une mutation plus commune, la substitution Pro12 Ala dans l'exon B spécifique de PPAR γ_2 (Yen et coll., 1998 ; Beamer et coll., 1998 ; Deeb et coll., 1998 ; Vigouroux et coll., 1998 ; Hara et coll., 2000) conduit à une forme moins active de PPAR γ qui est associée à une diminution de l'IMC (Deeb et coll., 1998). Ces résultats fournissent des preuves de l'implication de PPAR γ dans le contrôle de l'adipogenèse *in vivo*.

En revanche, les résultats d'études moléculaires divergent quant à l'association de PPAR γ et de l'obésité. En effet, certains auteurs rapportent qu'il n'y a aucune modification du taux d'expression des ARNm de PPAR γ , et plus particulièrement de l'isoforme PPAR γ_2 , dans

le tissu adipeux sous-cutané d'individus très obèses comparés à des témoins (Auboeuf et coll., 1997) ni de modification du rapport γ_1/γ_2 chez des individus présentant des IMC très différentes (Rieusset et coll., 1999). Au contraire, il a été montré une augmentation du PPAR γ_2 ainsi qu'une corrélation avec l'IMC dans le tissu adipeux sous-cutané de sujets obèses tandis que l'expression de PPAR γ ne varie pas chez ces patients obèses dont le poids est stable (Vidal-Puig et coll., 1997)

Nos résultats montrent que le taux des PPAR γ est associé au développement de l'obésité. De plus, ce phénomène semble soumis à une régulation nutritionnelle chez les sujets obèses car nous avons obtenu des résultats différents chez les patientes en phase de perte de poids par rapport à celles qui, au contraire, sont en phase dynamique de prise de poids. Dans notre étude, le taux d'expression de PPAR γ n'était pas corrélé à l'IMC ni aux triglycérides sériques chez les patients obèses. De plus, nous n'avons pas obtenu de corrélation significative entre l'insulinémie à jeun et le taux d'ARNm de PPAR γ . Ce résultat paraît étonnant si l'on considère l'importance de l'insuline dans la régulation de l'expression du PPAR. Il peut être envisagé que les différences d'insulinémie sérique mesurées chez les patientes, bien que comprises dans une large fourchette de concentration (de 7 à 28 $\mu\text{U/ml}$), ne sont pas suffisamment étendues pour engendrer des modifications dans l'expression de PPAR γ . Cette hypothèse a déjà été envisagée par Rieusset et coll. (1999).

L'ensemble de ces données conforte l'hypothèse d'une relation entre le taux d'ARNm de PPAR γ dans le tissu adipeux sous-cutané et le stade d'obésité (perte ou gain de poids), indépendamment du degré d'obésité (IMC) ou de la régulation du glucose sanguin. De plus, ces résultats sont en accord avec ceux des auteurs qui rapportent que le taux des ARNm de PPAR γ dans le tissu adipeux sous-cutané de patients obèses est affecté par une perte de poids engendrée par des régimes hypocaloriques (Bastard et coll., 1999 ; Ribot et coll. 2001).

Il apparaît que les modifications du taux des ARNm de PPAR γ chez les sujets obèses sont concomitantes aux réponses métaboliques dans différentes situations d'apport énergétique.

Néanmoins, ces conclusions devront être précisées notamment par la prise en compte dans nos études ultérieures des différentes isoformes gamma 1 et 2 dans le tissu adipeux.

2.2. Expression de RAR α et de TR β au cours du développement adipocytaire

Les résultats originaux obtenus chez des patientes obèses montrent une diminution du taux des ARNm de RAR α dans leur tissu adipeux par rapport aux sujets témoins. Une corrélation négative entre le taux des ARNm de RAR α et PPAR γ apparaît chez les sujets obèses ou non. De plus, ce phénomène est rencontré chez les sujets obèses en phase dynamique de prise de poids et en phase de perte de poids. Ces données suggèrent la nature adaptative de la régulation de ces deux récepteurs nucléaires en relation avec le statut d'obésité. Par ailleurs, ces données doivent être reliées avec celles suggérant qu'un niveau basal d'expression de RAR est nécessaire pour que l'inhibition de l'adipogenèse par l'acide rétinoïque puisse s'exercer (Xue et coll., 1996).

Dans cette étude, nous n'avons pas observé de corrélation significative entre le taux d'expression des ARNm des TRs et celui des PPAR γ ou de RAR dans le tissu adipeux malgré l'existence d'une diminution du taux des ARNm de TR chez les individus obèses. Ces résultats suggèrent des interactions préférentielles et dynamiques entre les voies de signalisation des PPARs et des rétinoïdes dans la régulation de la plasticité du tissu adipeux.

Ces conclusions sont cohérentes avec les données obtenues sur des modèles cellulaires et qui suggèrent que l'action inhibitrice de l'AR sur la différenciation adipocytaire est le résultat d'un balance complexe entre le métabolisme de l'AR et la disponibilité de RAR, RXR et PPAR dans les préadipocytes, incluant également des cofacteurs limitants communs (Chawla et coll., 1994 ; Xue et coll., 1996).

2.3. Conséquences des modifications de l'expression des récepteurs nucléaires PPARs, RARs et TRs

Nos résultats font apparaître des modifications des profils d'expression des récepteurs nucléaires PPAR γ , RAR α et TR β dans le tissu adipeux du sujet obèse. Les conséquences potentielles de ces modifications sont nombreuses et peuvent conduire à des dysfonctionnements dans les processus d'homéostasie cellulaire. Ainsi, un ensemble de données suggère l'intervention des acides gras, via les récepteurs PPARs, dans les processus de croissance, de différenciation et d'apoptose cellulaire. Toutefois, les résultats disponibles ne sont pas univoques. En effet, il a été montré que l'activation des PPARs était responsable du développement d'hépatocarcinomes (revue dans Vanden Heuvel, 1999). Dans le même temps, les acides gras et certains proliférateurs de peroxysomes (tous activateurs des PPARs) peuvent présenter des effets protecteurs vis-à-vis du développement de tumeurs dans les tissus extrahépatiques (revue dans Vanden Heuvel, 1999). Ces interventions apparemment opposées d'un même récepteur nucléaire montrent bien la complexité du mode d'action des récepteurs nucléaires et l'importance, probable, de l'environnement cellulaire en terme de cofacteurs et/ou d'interactions avec d'autres voies de signalisation cellulaire pour expliquer leurs effets pléiotropiques.

Des données épidémiologiques récentes mettant en avant l'importance des facteurs environnementaux, parmi lesquels figure l'alimentation, suggèrent un rôle potentiel des acides gras et du PPAR γ dans la cancérogenèse colique. En effet, certains de ces acides gras contenus dans les lipides alimentaires comme les acides gras polyinsaturés n-6, seraient susceptibles d'exercer leurs effets carcinogènes par l'intermédiaire de l'activation du PPAR γ . De plus il a récemment été montré qu'une sur-expression du PPAR γ était retrouvée dans les polypes du colon en comparaison avec des zones saines (DuBois et coll., 1998).

C'est pourquoi, les risques de cancer associés à des syndromes comme l'obésité pourraient être liés aux modifications de l'expression de PPAR γ .

En ce qui concerne le rôle régulateur des PPARs sur la croissance et/ou la différenciation cellulaire, plusieurs hypothèses ont été énoncées. Certains auteurs pensent que le stress oxydatif issu de la forte activation de l'oxydation β -peroxysomale est responsable de dommages directs sur l'ADN (revue dans Lake, 1995). D'autres auteurs suggèrent que les PPARs interviennent directement, par un mécanisme toujours discuté, dans l'induction d'oncogènes tels que *c-myc*, *c-jun*, *c-Ha-ras* (revue dans Vanden Heuvel, 1999). Par ailleurs, Ledwith et coll. (1997) ont montré que les proliférateurs de peroxysomes induisaient l'expression de la cyclooxygénase 2 impliquée dans le métabolisme lipidique mais aussi dans les réactions inflammatoires et la promotion de tumeurs. L'action des PPARs dans la régulation de ces gènes reste actuellement en discussion et semble plus complexe que celle décrite pour les gènes du métabolisme lipidique. Cependant des interactions directes du PPAR avec d'autres facteurs de transcription ne sont pas exclues (Sakai et coll., 1995).

Ainsi, les interférences entre les voies de signalisation des récepteurs nucléaires (qui sont des facteurs de transcription inductibles par leur ligand) sont intéressantes à prendre en compte pour tenter d'expliquer les effets variés d'une activation des PPARs sur l'homéostasie cellulaire.

En effet, en ce qui concerne les récepteurs de l'acide rétinoïque, l'existence d'un plus faible niveau d'expression, peut avoir de lourdes conséquences sur l'homéostasie cellulaire. Les rétinoïdes, qui ont des effets pléiotropiques aujourd'hui bien connus, ont notamment un rôle important dans la morphogenèse et la différenciation de différents tissus. Leur rôle dans la prévention de certains cancers a été récemment décrit. Les résultats expérimentaux qui laissent envisager un effet protecteur possible des rétinoïdes dans la tumorigenèse ont été à

l'origine de plusieurs études épidémiologiques. Leurs résultats ont permis d'établir une relation inverse entre la consommation plus ou moins élevée de vitamine A et le risque relatif de développement de tumeurs épidermoïdes, surtout dans les poumons (Graham, 1984). Plus précisément, le rôle de l'isoforme RAR β dans la différenciation ou la prolifération a été mis en évidence dans différents types de cellules tumorales. Li et coll. (1995) ont montré que RAR β était un régulateur négatif de la croissance des cellules épithéliales humaines mammaires. D'autres études effectuées sur la croissance de six lignées de cellules métastatiques humaines issues du pancréas ont montré que l'acide rétinoïque tout-*trans* (par l'intermédiaire de RAR β) et ses dérivés avaient une action antimétastatique (Jimi et coll., 1998). Dans un autre domaine, il a été montré qu'une atteinte dans l'opéron de RAR α ou une translocation de ce gène peuvent jouer un rôle dans la leucémie promyélocytaire (de Thé et coll., 1991, Licht et coll., 1996).

Ainsi, il est aujourd'hui admis que toute modification durable du niveau d'expression du RAR, dans une cellule, peut conduire au développement d'un processus prolifératif. Ceci est d'autant plus plausible si l'on se réfère aux travaux de Li et Wan (1998) qui ont montré que le RAR β jouait probablement un rôle régulateur dans l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs.

En ce qui concerne les TRs, comme les RARs, ils possèdent une action inhibitrice sur l'activité transcriptionnelle du complexe AP-1 (Zhang et coll., 1991 ; Desbois et coll., 1991). Ce complexe est composé par les deux protéines Jun et Fos et est impliqué dans les voies de signalisation de nombreux facteurs de croissance, d'oncogènes et de promoteurs de tumeurs. Les travaux de Desbois et coll. (1991), concernant l'action oncogénique de v-erbA, illustrent parfaitement que les interactions entre les TRs, RARs, et le complexe AP-1 jouent un rôle majeur dans le contrôle hormonal d'un état différencié ou prolifératif de la cellule. Ces résultats font apparaître que les niveaux d'expression des RARs et des TRs sont des paramètres intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire.

3. Conclusion

Chez des individus obèses, en phase dynamique de prise de poids ou, au contraire, en phase de perte de poids nous avons observé des dérégulations dans l'expression de récepteurs nucléaires. Le taux d'expression des ARNm de PPAR γ augmente significativement avec la prise de poids et simultanément on observe une diminution de l'expression des RARs et des TRs. Ces modifications des profils d'expression des récepteurs nucléaires pourraient représenter un des événements importants dans les mécanismes adaptatifs précoces induisant une modification de la plasticité du tissu adipeux et conduisant au développement de l'obésité.

Par ailleurs, l'implication de ces voies de signalisation cellulaire dans le contrôle des processus de croissance/différenciation cellulaire, suggère que la sous-expression des RARs et des TRs dans le tissu adipeux blanc lors de la phase dynamique de la prise de poids peut devenir un indicateur de risque d'apparition de processus pathologiques à long terme.

CHAPITRE IV :
DISCUSSION GENERALE
ET CONCLUSION

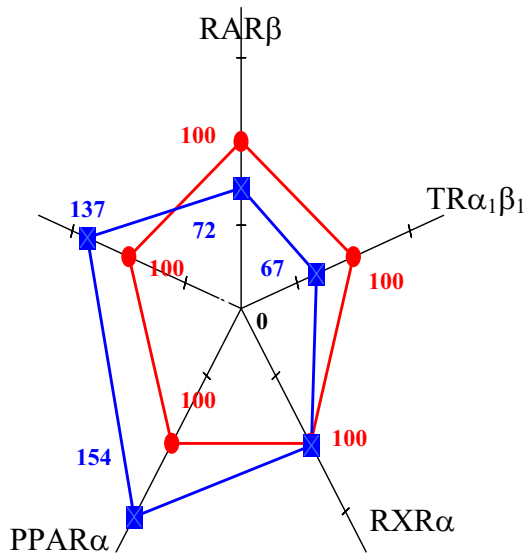
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans les recherches en Nutrition qui ont pour objectif d'établir de nouvelles données scientifiques nécessaires à une meilleure compréhension des relations entre l'alimentation et la santé. L'obésité est souvent associée à des perturbations de la balance énergétique en partie dues à des excès alimentaires. Les régimes riches en lipides sont de bons candidats pour expliquer la prévalence de l'obésité dans les pays industrialisés. Aujourd'hui, la mise en cause d'une alimentation riche en lipides dans le développement de nombreuses pathologies (comme les pathologies cardio-vasculaires et certains cancers) est bien argumentée. Par contre, les mécanismes par lesquels les acides gras seraient impliqués dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire restent à préciser. Une orientation récente des recherches dans ce domaine privilégie l'action des acides gras, *via* l'activation des récepteurs nucléaires PPARs qui sont des facteurs de transcription inductibles par leurs ligands. On sait que ces récepteurs nucléaires interagissent avec d'autres récepteurs nucléaires appartenant à la même superfamille et ayant un mode d'action similaire ; comme les récepteurs de l'acide rétinoïque et ceux de la triiodothyronine. Dans ce contexte, notre hypothèse de travail suggérait que l'exposition à un régime alimentaire inducteur d'obésité pouvait conduire à des modifications de l'expression de récepteurs nucléaires et notamment ceux de la vitamine A. Afin d'éprouver cette hypothèse nous avons utilisé deux approches expérimentales, l'une utilisant un modèle animal soumis à un régime connu pour induire une

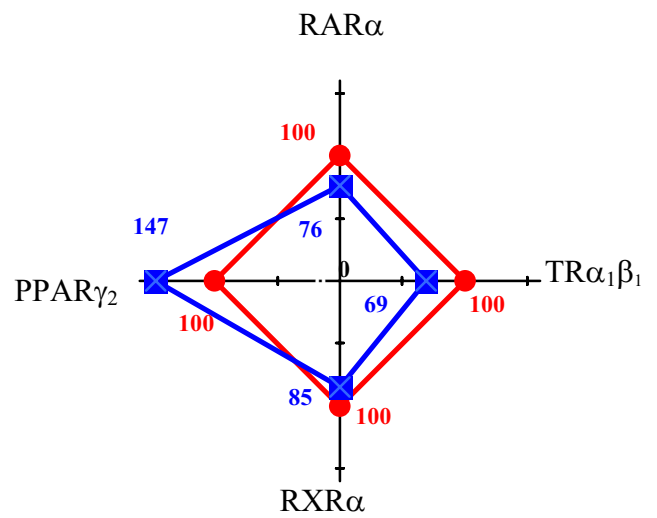
obésité nutritionnelle, et l'autre réalisée chez une population d'individus présentant une obésité déclarée.

L'étude sur modèle animal nous a permis de constater que la dynamique de prise de poids entraînait des modifications des profils d'expression de récepteurs nucléaires. En effet, les résultats obtenus dans le tissu adipeux blanc et le foie des rats nourris avec le régime cafétéria pendant 28 jours révèlent des modifications d'expression de la plupart des récepteurs étudiés (figure 24) : une diminution de l'expression des TRs et des RARs et une augmentation du taux des ARNm des PPARs. L'expression des RXR reste inchangée. Il est intéressant d'observer que l'impact du régime sur l'expression des récepteurs nucléaires est perceptible dans le foie des rats dès la première semaine d'exposition au régime. Dans cette phase précoce de mise en place du surpoids on observe déjà une diminution significative de l'expression de RAR β et du taux d'ARNm des TR.

Dans ce travail, nous avons donc montré que les régimes inducteurs d'obésité entraînent une activation de la voie des PPARs associée à une diminution de l'expression des RARs et des TRs. Ces résultats constituent un nouvel exemple de l'influence du régime hyperlipidique sur les voies de signalisation de PPAR et des rétinoïdes dans le foie et le tissu adipeux, deux organes clés du stockage, du métabolisme et de la mobilisation de la vitamine A mais aussi des acides gras. Ces résultats peuvent être mis en relation avec ce que l'on sait du développement du tissu adipeux. En effet, la diminution de l'expression de RAR ainsi que celle de TR pourraient favoriser une prolifération adipocytaire tandis qu'une augmentation de l'expression de PPAR γ va s'accompagner d'une différenciation adipocytaire et d'une accumulation de lipides dans les cellules différenciées. Ainsi, la modulation de l'expression de ces récepteurs nucléaires pourrait être un des événements importants intervenant dans les mécanismes adaptatifs précoces qui modulent la plasticité du tissu adipeux et conduisent au développement de l'obésité.



Foie



Tissu adipeux blanc

Figure 24 : Profils d'expression des récepteurs nucléaires dans le tissu adipeux et le foie de rats en phase de prise de poids.

● chez les animaux témoins ; ■ chez les rats nourris avec le régime cafétéria

A la lumière de ces résultats, il était donc intéressant d'étudier, chez le sujet obèse, l'expression de ces récepteurs nucléaires. C'est pourquoi dans la suite de notre travail nous avons quantifié les taux des ARNm de RAR, TR et PPAR dans le tissu adipeux d'individus obèses. Ce travail a été réalisé sur une population de femmes dont une partie était en phase de prise de poids, tandis que d'autres, au contraire, étaient en perte de poids. Les résultats obtenus ont révélé des modifications des profils d'expression de ces récepteurs nucléaires : une augmentation du taux des ARNm de PPAR γ et une diminution concomitante de ceux de RAR α et TR β chez la population obèse par rapport à une population témoin. Nous nous sommes intéressés plus précisément à la dynamique de l'obésité chez ces femmes et nous avons constaté que les modifications des profils d'expression de ces récepteurs observées chez les sujets en phase de perte de poids étaient moins importantes que celles observées chez les obèses en phase dynamique de prise de poids. La comparaison de l'expression des PPAR γ et RAR α chez la totalité de cette population montre une corrélation négative entre les niveaux d'expression de ces deux récepteurs (figure 25). Les résultats suggèrent donc que chez les patientes obèses il existe une relation inverse entre l'expression des gènes de PPAR γ et RAR α dans le tissu adipeux sous-cutané.

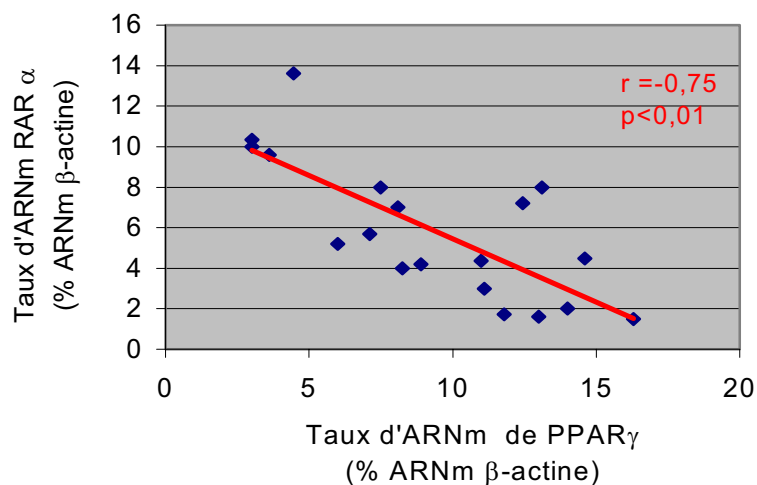


Figure 25 : Relation entre le taux d'ARNm de RAR α et de PPAR γ dans le tissu adipeux humain.

Nous avons donc observé, dans des conditions physiologiques (chez le rat) ou physiopathologiques (chez des patientes obèses), des modulations de l'expression des gènes des PPARs et des récepteurs de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine en fonction du statut lipidique. Il est aujourd'hui connu que le rôle des acides gras, en tant que modulateurs de l'expression génique, ne se cantonne plus aux seuls gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. En effet, la palette connue des gènes régulés par les acides gras s'élargit sans cesse et concerne aussi bien des gènes des facteurs de croissance (Kaminski et coll., 1993) que des cytokines (Robinson et coll., 1996) ou encore des gènes impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire (Sellmayer et coll., 1996). Ainsi, les conséquences potentielles de cette modification du profil d'expression des récepteurs nucléaires sont nombreuses et peuvent concerner les processus de contrôle du cycle cellulaire (figure 26). Les interférences entre les voies de signalisation cellulaire, impliquées dans le contrôle des processus de croissance/différenciation cellulaire, suggèrent que la sous expression conjuguée des RARs et des TRs dans les différents tissus étudiés lors de la phase dynamique de la prise de poids peut être considérée, selon les organes, comme un facteur de mise en place d'un processus adaptatif (comme le développement du tissu adipeux) ou au contraire être un facteur de risque d'apparition de processus pathologiques à long terme (comme les cancers).

Avant la mise en place d'un état pathologique, nous avons pu démontrer qu'une prise alimentaire excessive (trop riche en lipides) pouvait induire un état allostatique en partie dû aux dérégulations observées dans les voies de signalisation cellulaires des acides gras et des rétinoïdes dans différents tissus cibles. Par exemple, une modulation de l'expression de RAR pourrait être un des évènements induisant la plasticité du tissu adipeux en réponse à une forte consommation énergétique et conduisant au développement de l'obésité. D'un autre côté, une

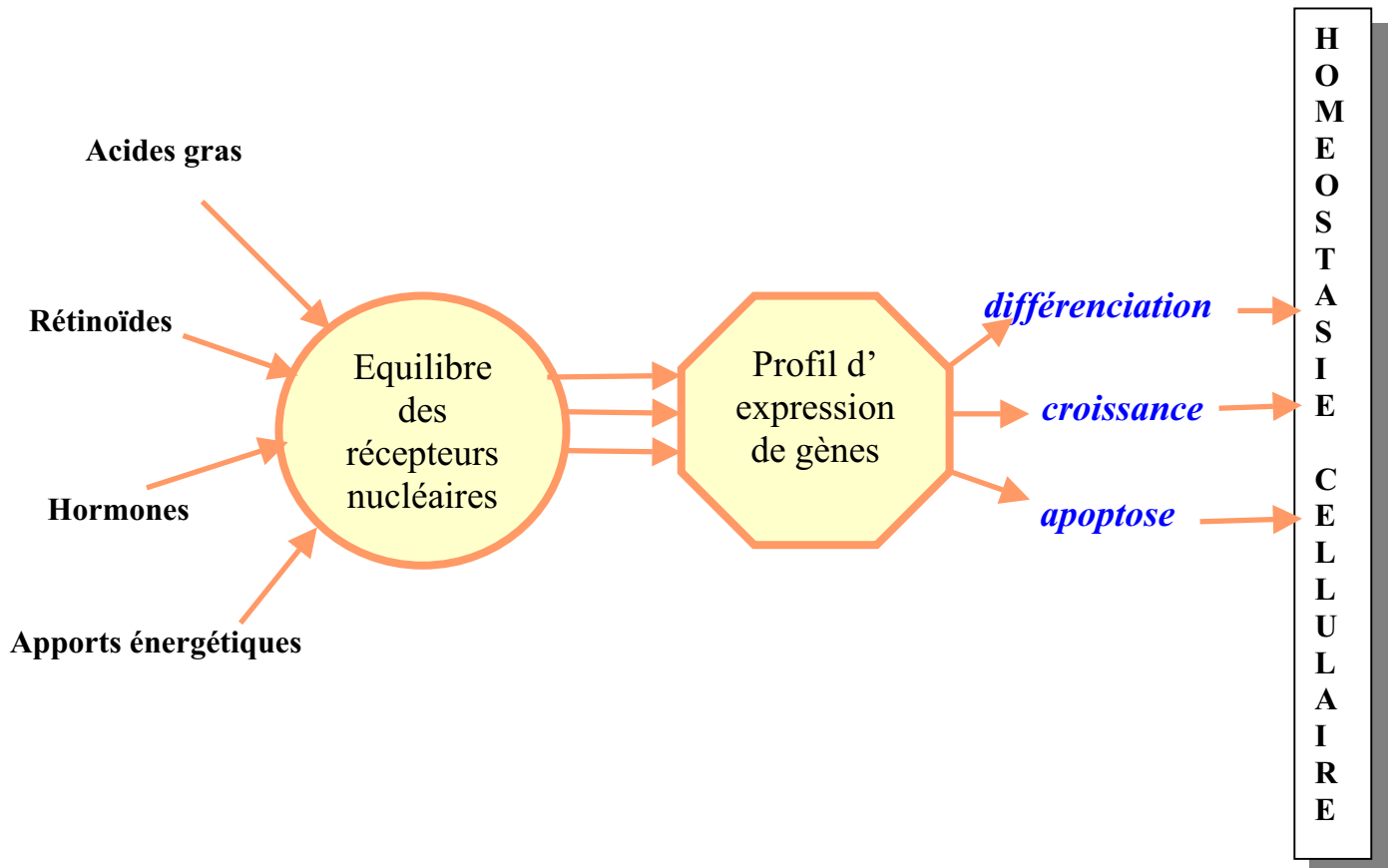


Figure 26 : Représentation d'un des mécanismes d'intervention de facteurs nutritionnels et hormonaux dans l'homéostasie cellulaire.

expression anormale de RAR peut être associée à certains types de cancers (Li et coll., 1995 ; Stewart et Thomas, 1997). Ainsi, une étude réalisée au laboratoire de Nutrition, faisant l'objet de la thèse de Rachel Groubet, sur le modèle de rats nourris avec le régime cafétéria, a permis d'observer une diminution du taux des ARNm de RAR β dans le côlon des animaux en phase dynamique de prise de poids par rapport aux animaux témoins, ainsi qu'une augmentation de PPAR γ au bout d'un mois d'exposition au régime. De plus, chez un modèle animal de cancerogénèse colique, il a été observé une diminution de l'expression des ARNm de RAR β chez des rats nourris avec un régime hyperlipidique. Ces résultats peuvent être mis en relation avec les données impliquant le taux d'expression de ces récepteurs nucléaires dans le développement de certaines tumeurs (Wan et coll., 1992 ; Houle et coll., 1993 ; Swisshelm et coll., 1994). Ces données peuvent être également reliées avec les études épidémiologiques indiquant que les patients obèses présentent un risque important de cancer du côlon (Garfinkel, 1993 ; Giovannucci et coll., 1996).

D'autre part la relation entre l'obésité et l'insulino-résistance est bien établie. Des données récentes témoignent de l'implication de l'insulino-résistance dans le développement du cancer colique (Giovannucci, 1995 ; Bruce et coll., 2000 ; Franceschi et coll., 2001). Des consommations énergétiques et lipidiques excessives joueraient un rôle dans la prolifération de cellules épithéliales coliques passant par une augmentation des taux circulants d'insuline, de triglycérides et d'acides gras libres. Or, des agonistes activant l'hétérodimère PPAR-RXR sont connus pour augmenter la sensibilité à l'insuline et diminuer l'hyperinsulinémie, l'hyperglycémie et l'hypertriglycéridémie (Mukherjee et coll., 1997). De même les thiazolidinédiones, ligands du PPAR γ , permettent une diminution de l'insulino-résistance et de l'hyperglycémie chez les diabétiques de type 2 (Malinowski et Bolesta, 2000). Cependant, ces molécules, par l'intermédiaire d'une activation de ces récepteurs nucléaires favorisent

également le développement du tissu adipeux, donc la prise de poids. Or, des études récentes ont montré que des souris n'ayant pas l'isoforme RXR α dans leurs adipocytes présentaient une résistance à l'obésité induite par un régime hyperlipidique (Imai et coll., 2001). De même, Yamauchi et coll. 2001 ont précisé que l'utilisation d'antagonistes de RXR et de PPAR γ prévenait également d'une obésité d'origine nutritionnelle et diminuait la résistance à l'insuline. Ces données témoignent de la sensibilité et de la complexité des régulations d'expression de ces récepteurs nucléaires pouvant, selon le cas, prévenir ou induire certaines pathologies.

En conclusion, des modifications des profils d'expression de ces récepteurs nucléaires peuvent favoriser les maladies associées à la surcharge pondérale. Ainsi, de meilleures connaissances des interactions et des dérégulations de ces voies de signalisations cellulaires pourraient contribuer à mieux comprendre le rôle de la nutrition dans le maintien de l'homéostasie cellulaire ou, au contraire, dans le développement de pathologies.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akmal K.M., Dufour J.M., Kim K.H. (1996). Region-specific localization of retinoic acid receptor-alpha expression in rat epididymis. *Biology of reproduction* **54**, 1111-1119.
- Auboeuf D., Rieusset J., Fajas L., Vallier P., Frering V., Riou J.P., Staels B., Auwerx J., Laville M., Vidal H. (1997). Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* **46**, 1319-1327.
- Audouin-Chevallier I., Higuere P., Pallet V., Higuere D., Garcin H. (1993). Dietary vitamin A modulates the properties of retinoic acid and glucocorticoid receptors in rat liver. *J. Nutr.* **123**, 1195-1202.
- Banner C.D., Göttlicher M., Widmark E., Sjøvall J., Rafter J.J., Gustafsson J.A. (1993). A systematic analytical chemistry/cell assay approach to isolate activators of orphan nuclear receptors from biological extracts: characterization of peroxisome proliferator-activated receptor activators in plasma. *J. Lipid Res.* **34**, 1583-1591.
- Barettino D., Bugge T.H., Bartunek P., Vivanco-Ruiz M.M., Sonntag-Buck V., Beug H., Zenke M., Stunnenberg H. (1993). Unliganded T3R, but not its oncogenic variant v-erbA, suppresses RAR-dependent transactivation by titrating out RXR. *EMBO J.* **12**, 1343-1354.
- Basdevant A., Oppert J.M. (1998). Approches cliniques des obésités. *O.C.L.* **5**, 222-225.
- Bass N.M. (1993). Cellular binding proteins for fatty acids and retinoids: similar or specialized functions? *Mol. Cell. Biochem.* **123**, 191-202.
- Bastard J.P., Hainque B., Dusserre E., Bruckert E., Robin D., Vallier P., Perche S., Robin P., Turpin G., Jardel C., Laville M., Forest C., Vidal H. (1999). Peroxisome proliferator activated receptor-gamma, leptin and tumor necrosis factor-alpha mRNA expression during very low calorie diet in subcutaneous adipose tissue in obese women. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **15**, 92-98.
- Beamer B.A., Yen C.J., Andersen R.E., Muller D., Elahi D., Cheskin L.J., Andres R., Roth J., Shuldiner A.R. (1998). Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* **47**, 1806-1808.
- Bedo G., Santisteban P., Aranda A. (1989). Retinoic acid regulates growth hormone gene expression. *Nature* **339**, 231-234.
- Bene H., Lasky D., Ntambi J.M. (2001). Cloning and characterization of the human stearoyl-CoA desaturase gene promoter: transcriptional activation by sterol regulatory element binding protein and repression by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 1194-1198.
- Bernal J., Coleoni A.H., DeGroot L.J. (1978). Thyroid hormone receptors from liver nuclei: characteristics of receptor from normal, thyroidectomized, and triiodothyronine-treated rats; measurements of occupied and unoccupied receptors, and chromatin binding of receptors. *Endocrinology* **103**, 403-414.
- Bernlohr D.A., Coe N.R., Simpson M.A., Hertz A.V. (1997). Regulation of gene expression in adipose cells by polyunsaturated fatty acids. *Adv Exp Med Biol*, **422**, 145-156.
- Berraondo B., Marti A., Duncan J.S., Trayhurn P., Martinez J.A. (2000). Up-regulation of muscle UCP2 gene expression by a new b3-adrenoceptor agonist, trectadrine, in obese (cafeteria) rodents, but down-regulation in lean animals. *Int. J. Obes.* **24**, 156-163.

- Binnert C., Pachiaudi C., Beylot M., Hans D., Vandermander J., Chantre P., Riou J.P., Laville M. (1998). Influence of human obesity on the metabolic fate of dietary long- and medium-chain triacylglycerols. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 595-601.
- Blaner W.S., Hendriks H.F., Brouwer A., de Leeuw A.M. Knook D.L., Goodman D.S. (1985). Retinoids, retinoid-binding proteins, and retinyl palmitate hydrolase distributions in different types of rat liver cells. *J. Lipid Res.* **26**, 1241-1251.
- Blennemann B., Leahy P., Kim T.S., Freake H.C. (1995). Tissue-specific regulation of lipogenic mRNAs by thyroid hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* **110**, 1-8.
- Boleda M.D., Saubi N., Farrés J., Parés X. (1993). Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: aldehydes of lipid peroxidation, ω -hydroxy fatty acids, and retinoids. *Arch. Biochem. Biophys.* **307**, 85-90.
- Boncinelli E., Simeone A., Acampora D., Mavilio F. (1991). HOX gene activation retinoic acid. *Trends Genet.* **7**, 329-335.
- Bonet M.L., Puigserver P., Serra F., Ribot J., Vazquez F., Pico C., Palou A. (1997). Retinoic acid modulates retinoid X receptor alpha and retinoic acid receptor alpha levels of cultured brown adipocytes. *FEBS Lett.* **406**, 196-200.
- Bonilla S., Redonnet A., Noël-Suberville C., Pallet V., Garcin H., Higuieret P. (2000). High-fat diets affect the expression of nuclear retinoic acid receptor in rat liver. *Br. J. Nut.* **83**, 665-671.
- Boozar C.N. (1998). Determinants of energy balance in rats selectively bred for susceptibility or resistance to diet-induced obesity. *Appetite* **30**, 235.
- Boozar C.N., Brasseur A., Atkinson R.L. (1993). Dietary fat affects weight loss and adiposity during energy restriction. *Am. J. Clin. Nutr.* **58**, 846-842.
- Boué C. (2000). Etude, chez des femmes d'Aquitaine, de la consommation d'acides gras *trans* et de leur devenir métabolique en relation avec le risque cardio-vasculaire. *Thèse de doctorat Université Bordeaux I*.
- Braissant O., Foufelle F., Scotto C., Dauca M., Wahli W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β and - γ in the adult rat. *Endocrinology* **137**, 354-366.
- Bruce W.R., Giacca A., Medline A. (2000). Possible mechanisms relating diet and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **12**, 1271-1279.
- Brun R.P., Kim J.B., Hu E., Spiegelman B.M. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the control of adipogenesis. *Curr. Opin. Lipidol.* **8**, 212-218.
- Burr G.O., Burr M.M. (1929). A new deficiency disease produced by rigid exclusion of fat from the diet. *J. Biol. Chem.* **82**, 345-367.
- Cao Z., Umek R.M., McKnight S.L. (1991). *Genes & Dev.* **5**, 1538-52.
- Cavey M.T., Martin B., Carvalan I., Shroot B. (1990). *In vitro* binding of retinoids to the nuclear retinoic acid receptor α . *Anal. Biochem.* **186**, 19-23.
- Chambon P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10**, 940-954.
- Chawla A., Lazar M.A. Peroxisome proliferator and retinoid signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1786-1790.
- Chelly J., Montarras D., Pinset C., Berwald-Netter Y., Kaplan J.C., Kahn A. (1990). Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells. *FEBS Lett.* **187**, 691-698.
- Chen M., Achkar C., Gudas L.J. (1994). Enzymatic conversion of retinaldehyde to retinoic acid by cloned murine cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Mol. Pharmacol.* **46**, 88-96.
- Chen J., Evans R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**, 454-457.
- Chien A.S., Edgard B., Trela J.M. (1976). DNA polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* **127**, 1550-1557.
- Chin W.W., Yen P.M. (1997). Molecular mechanisms of nuclear thyroid hormone action. *Contemporary Endocrinology: Diseases of the Thyroid* (éd. Braverman L.E. ; Humana Press Inc., Totowa, NJ), 1-15.

- Chomczynski P., Sacchi N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Chopra I.J., Teco G.N., Mead J.F., Huang T.S., Beredo A., Solomon D.H. (1985). Relationship between serum free fatty acids and thyroid hormone binding inhibitor in nonthyroid illnesses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **60**, 980-984.
- Chu R., Madison L.D., Lin Y., Kopp P., Rao M.S., Jameson J.L., Reddy J.K. (1995). Thyroid hormone (T₃) inhibits ciprofibrate-induced transcription of genes encoding β -oxidation enzymes: cross-talk between peroxisome proliferator and T₃ signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 11593-11597.
- Chytil F., Haq R. (1990). Vitamin A mediated gene expression. *Crit. Rev. Euk. Gene Expr.* **1**, 61-73.
- Clandinin M.T., Cheema S., Field C.J., Garg M.L., Venkatraman J., Clandinin T.R. (1991). Dietary fat : exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J.* **5**, 2761-2769.
- Clarke S.D., Jump D.B. (1994). Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu. Rev. Nutr.* **14**, 83-98.
- Clifford J.L., Petkovich M., Chambon P., Lotan R. (1990). Modulation by retinoids of mRNA levels for nuclear retinoic acid receptors in murine melanoma cells. *Mol. Endocrinol.* **4**, 1546-1555.
- Collins M.D., Mao G.E. (1999). Teratology of retinoids. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 399-430.
- Coustaut M. (1996). Expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine au cours du vieillissement et d'une alcoolisation chronique. *Thèse de doctorat Université Bordeaux I.*
- Davis K.D., Lazar M.A. (1992). Selective antagonism of thyroid hormone action by retinoic acid. *J. Biol. Chem.* **267**, 3185-3189.
- de Thé H., Marchio A., Tiollais P., Dejean A. (1989). Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor α and β genes. *EMBO J.* **8**, 429-433.
- de Urquiza AM, Liu S, Sjoberg M, Zetterstrom RH, Griffiths W, Sjovall J, Perlmann T. (2000). Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* **290**, 2140-2144.
- Deeb S.S., Fajas L., Nemoto M., Pihlajamaki J., Mykkanen L., Kuusisto J., Laakso M., Fujimoto W., Auwerx J. (1998). A Pro12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat. Genet.* **20**, 284-287.
- DeGroot L.J., Torresani J. (1975). Triiodothyronine binding to isolated liver cell nuclei. *Endocrinology* **96**, 357-369.
- Desbois C., Aubert D., Legrand C., Pain B., Samarut J. (1991). A novel mechanism of action for v-ErbA: abrogation of the inactivation of transcription factor AP-1 by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Cell* **67**, 731-740.
- Despres J.P. (1993). Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome. *Nutrition* **9**, 452-459.
- Di Costanzo-Dufetel J., Romette J., Pontier F., Charrel M. (1985). Prealbumine and retinol binding protein. *Pathol. Biol.* **33**, 781-786.
- Diamant S., Gorin E., Shafir E. (1972). Enzyme activities related to fatty-acid synthesis in liver and adipose tissue of rats treated with triiodothyronine. *Eur. J. Biochem.* **26**, 553-559.
- DiRenzo J., Söderström M., Kurokawa R., Ogliaastro M.H., Ricote M., Ingrey S., Hörlein A., Rosenfeld M.G., Glass C.K. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2166-2176.
- Dong D., Ruuska S.E., Levinthal D.J., Noy N. (1999). Distinct roles for cellular retinoic acid-binding protein I and II in regulating signalling by retinoic acid. *J. Biol. Chem.* **274**, 23695-23698.
- Drevon C.A., Blomhoff R., Rasmussen M., Kindberg G.M., Berg T., Norum K.R. (1985). Retinol esterification in cultured rat liver cells. *Biochem. J.* **230**, 617-623.
- DuBois R.N., Gupta R., Brockman J., Reddy B.S., Krakow S.L., Lazar M.A. (1998). The nuclear eicosanoid receptor, PPAR γ , is aberrantly expressed in colonic cancers. *Carcinogenesis* **19**, 49-53.

- Emilsson V., O'Dowd J., Wang S., Liu Y.L., Sennitt M., Heyman R., Cawthorne M.A. (2000). The effects of rexinoids and rosiglitazone on body weight and uncoupling protein isoform expression in the Zucker fa/fa rat. *Metabolism* **49**, 1610-1615.
- Enmark E., Gustafsson J-Å. (1996). Orphan Nuclear receptors - The first eight years. *Mol. Endocrinol.* **10**, 1293-1307.
- Enser M. (1975). Desaturation of stearic acid by liver and adipose tissue from obese-hyperglycaemic mice (ob/ob). *Biochem. J.* **148**, 551-555.
- Faust I.M., Johnson P.R., Stern J.S., Hirsch J. (1978). Diet-induced adipocyte number increase in adults rats: a new model of obesity. *Am. J. Physiol.* **235**, E279-E286.
- Field C.J., Ryan E.A., Thomson A.B., Clandinin M.T. (1988). Dietary fat and the diabetic state alter insulin binding and the fatty acyl composition of the adipocyte plasma membrane. *Biochem. J.* **253**, 417-24.
- Folch J., Less M., Sloane G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
- Forman B.M., Umeson K., Chen J., Evans R.M. (1995a). Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* **81**, 541-550.
- Forman B.M., Tontonoz P., Chen J., Brun R.P., Spiegelman B.M., Evans R.M. (1995b). 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* **83**, 803-812.
- Forman B.M., Chen J., Evans R.M. (1997). Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptor α and γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 4312-4317.
- Franceschi S., Dal Maso L., Augustin L., Negri E., Parpinel M., Boyle P., Jenkins D.J., La Vecchia C. (2001). Dietary glycemic load and colorectal cancer risk. *Ann. Oncol.* **12**, 173-178.
- Freedman L.P. (1999). Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell* **97**, 5-8.
- Fuller P.J. (1991). The steroid receptor superfamily: mechanism of diversity. *FASEB J.* **5**, 3092-3099.
- Gaiva Gomes da Silva M.H., Pithon T.C., Oller do Nascimento C.M. (1996). Effect of saturated and polyunsaturated fatty acids rich diets on hepatic and adipose tissue lipid metabolism in rats. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* **66**, 258-262.
- Garcin H., Higuieret P. (1980). Free and protein-bound triiodothyronine in the serum of vitamin A-deficiency rats. *J. Endocrinol.* **84**, 135-140.
- Garcin H., Higuieret P. (1983). Thyroid hormones in vitamin A-deficient rats : effects of retinoic acid supplementation. *Ann. Nutr. Metab.* **27**, 495-500.
- Garcin H., Higuieret P., Amoikon K. (1984). Effets of a large dose of retinol or retinoic acid on the thyroid hormones in the rat. *Ann. Nutr. Metab.* **28**, 92-100.
- Garfinkel L. (1993). Overweight and cancer. *Ann. Intern. Med.* **103**, 1034-1036.
- Garfinkel L. (1993). The National Cancer Data Base: a cancer treatment resource. *CA Cancer J. Clin.* **43**, 69-70.
- Gearing K.L., Göttlicher M., Teboul M., Widmark E., Gustafsson, J-Å. (1993). Interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 1440-1444.
- Gelman L., Staels B., Auwerx J. (1997). Rôle des co-facteurs transcriptionnels dans la transduction des signaux hormonaux par les récepteurs nucléaires. *Méd. Sci.* **13**, 961-970.
- Giguère V. (1994). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins complex interplay in retinoid signaling. *Endocr. Rev.* **15**, 61-79.
- Giguère V. (1997). Les recepteurs nucléaires orphelins: régulateurs essentiels du développement, de l'organogénèse et de l'homéostasie. *Méd. Sci.* **13**, 459-466.
- Giguere V., Ong E.S., Segui P., Evans R.M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* **330**, 624-629.
- Giovannucci E. (1995). Insulin and colon cancer. *Cancer Causes Control* **6**, 164-179.

- Giovannucci E., Colditz G.A., Stampfer M.J., Willett W.C. (1996). Physical activity, obesity, and risk of colo-rectal adenoma in women (United States). *Cancer Causes Control*. **7**, 253-263.
- Glass C.K. (1996). Some new twists in the regulation of gene expression by thyroid hormone and retinoic acid receptors. *J. Endocrinol.* **150**, 349-357.
- Glatz J.F.C., Borchers T., Spener F., Van der Vusse G.J. (1995). Fatty acids in signalling: modulation by lipid binding proteins. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **52**, 121-127.
- Glatz J.F.C., Luiken J.J.F.P., Van Nieuwenhoven F.A., Van der Vusse G.J. (1997). Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **57**, 3-9.
- Gorla-Bajszczak A., Siegrist-Kaiser C., Boss O., Burger A.G., Meier C.A. (2000). Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in lean and obese Zucker rats. *Eur. J. Endocrinol.* **142**, 71-78.
- Göttlicher M., Widmark E., Li Q., Gustaffson J-Å. (1992). Fatty acids activate a chimera of the clofibrilic acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 4653-4657.
- Graham S. (1984). Epidemiology of retinoids and cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **73**, 1423-1428.
- Grannemann J., Skoff R., Yang X. (1998). Member of the peroxisome proliferator-activated receptor family of transcription factors is differentially expressed by oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.* **51**, 563-573.
- Green S., Walter P., Kumar V., Krust A., Bornert J-M., Argos P., Chambon P. (1986). Human estrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320**, 134-139.
- Grimaldi P.A., Teboul L., Inadera H., Gaillard D., Amri E.Z. (1997). Trans-differentiation of myoblasts to adipoblasts: triggering effects of fatty acids and thiazolidinediones. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **57**, 71-75.
- Grocolas R., Raclot T. (1998). Acides gras, métabolisme adipocytaire et développement du tissu adipeux. *O. C. L.* **5**, 199-205.
- Guersney D.L., Morsihige W.K. (1979). Na⁺ pump activity and nuclear-T₃ receptors in tissues of genetically obese (ob/ob) mice. *Metabolism* **28**, 629-632.
- Hamada S., Nakamura H., Nanno M. (1979). Triiodothyronine-induced increase in rat liver nuclear thyroid hormone receptors associated with increased mitochondrial α -glycerophosphate dehydrogenase activity. *Biochem. J.* **182**, 371-375.
- Hanley K., Jiang Y., He S.S., Friedman M., Elias P.M., Bikle D.D., Williams M.L., Feingold K.R. (1998). Keratinocyte differentiation is stimulated by activators of the nuclear hormone receptor PPAR α . *J. invest. Dermatol.* **110**, 368-375.
- Haq R.U., Pfahl M., Chytil F. (1991). Retinoic acid affects the expression of nuclear retinoic acid receptors in tissues of retinol-deficient rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 8272-8276.
- Hara K., Okada T., Tobe K., Yasuda K., Mori Y., Kadowaki H., Hagura R., Akanuma Y., Kimura S., Ito C., Kadowaki T. (2000). The Pro12Ala polymorphism in PPAR gamma2 may confer resistance to type 2 diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 212-216.
- Hermann J., Alosso G., Beyer M., Heinen E., Romish J., Wyer P., Kruskemper H.L. (1984). Ether-extractable thyroid hormone binding inhibitor in non thyroidal illness. *Ann. Encrinol.* **45**, 76.
- Herr F.M., Li H., Weinberg R.B., Cook V.R., Storch J. (1999). Differential mechanisms of retinal transfer from cellular retinol binding protein type I and II phospholipid membrane. *J. Biol. Chem.* **274**, 9556-9563.
- Heyman R.A., Mangelsdorf D.J., Dyck J.A., Stein R.B., Eichele G., Evans R.M., Thaller C. (1992). 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* **68**, 397-406.
- Higueret P., Garcin H. (1979). Transport of thyroxine in the serum of vitamin A-deficient rats. *J. Endocrinol.* **80**, 223-228.
- Higueret P., Garcin H. (1982). Peripheral metabolism of thyroid hormones in vitamin A-deficient rats. *Ann. Nutr. Metab.* **26**, 191-200.
- Higueret P., Pallet V., Coustaut M., Audouin I., Bègueret J. Garcin, H. (1992). Retinoic acid decreases retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptor expression in the liver of hyperthyroid rats. *FEBS Lett.* **310**, 101-105.

- Hillgartner F.B., Romsos D.R. (1988). Impaired transport of thyroid hormone into livers of obese (ob/ob) mice. *Am. J. Physiol.* **255**, E54-E58.
- Hirst M.A., Hinck L., Danielsen M., Ringold G.M. (1992). Discrimination of DNA response elements for thyroid hormone and estrogen is dependant on dimerization of receptor DNA binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 5527-5531.
- Hodin R.A., Lazar M.A., Chin W.W. (1990). Differential and tissue specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone. *J. Clin. Invest.* **85**, 101-105.
- Hollenberg S.M., Weinberger C., Ong E.S., Cerelli G., Oro A., Lebo R., Thompson E.B., Rosenfeld M.G., Evans R.M. (1985). Primary structure and expression of a functional glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* **318**, 635-641.
- Hsu J.H., Zavacki A.M., Harney J.W., Brent G.A. (1995). Retinoid-X receptor (RXR) differentially augments thyroid hormone response in cell lines as a function of the response element and endogenous RXR content. *Endocrinology* **136**, 421-430.
- Hu E., Tontonoz P., Spiegelman B.M. (1995). Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR γ and C/EBP α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 9856-9860.
- Imai T., Jiang M., Chambon P., Metzger D. (2001). Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor α mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ER^{T2}) in adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 224-228.
- Iossa S., Mollica M.P., Lionetti L., Barletta A., Liverine G. (1997). Effect of high-fat diet on energy balance and thermic effect of food in hypothyroid rats. *Eur. J. Endocrinol.* **136**, 309-315.
- Ishikawa T., Umesono K., Mangelsdorf D. J., Aburatani H., Stanger B.Z., Shibasaki Y., Imawari M., Evans R.M., Takaku F. (1990). A functional retinoic acid receptor encoded by the gene on chromosome 12. *Mol. Endocrinol.* **4**, 837-844.
- Isseman I., Green S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**, 645-650.
- Issemann I., Prince R.A., Tugwood J.D., Green S. (1993). The peroxisome proliferator-activated receptor:retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrates hypolipidaemic drugs. *J. Mol. Endocrinol.* **11**, 37-47.
- Jiménez-Lara A., Aranda A. (1999). Vitamin D represses retinoic acid-dependent transactivation of the retinoic acid receptor- β 2 promoter: the AF-2 domain of the vitamin D receptor is required for transrepression. *Endocrinology* **140**, 2898-2907.
- Jimi S., Shono T., Tanaka M., Kono A., Yamada Y., Shudo K., Kuwano M. (1998). Effect of retinoic acid on morphological changes of human pancreatic cancer cells on collagen gels: a possible association with the metastatic potentials. *Oncol. Res.* **10**, 7-14.
- Johanning G.L., Cope M.B., Wilborn T., Grubbs C.J., Lubet R.A. (2001). Effect of high retinoid doses on retinoid doses RAR-beta mRNA expression in female B6D2F1 mice. *Anticancer Res.* **21**, 1691-1695.
- Jones B.H., Abel M.A., Banz W.J., Zemel M.B., Moustaid N. (1996). Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase mRNA is increased by obesity and decreased by polyunsaturated fatty acids. *Am. J. Physiol.* **272**, E-44-E49.
- Jones B.H., Standridge M.K., Claycombe K.J., Smith P.J. Moustaid N. (1998). Glucose induces expression of stearoyl-CoA desaturase in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.* **335**, 405-408.
- Juge-Aubry C.E., Gorla-Bajszczak A., Pernin A., Lemberger T., Wahli W., Burger A.G., Meier C.A. (1995). Peroxisome proliferator-activated receptor mediates cross-talk with thyroid hormone receptor by competition for retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, 18117-18122.
- Kaikaus R.M., Bass N.M., Ockner R.K. (1990). Functions of fatty acid binding proteins. *Experientia* **46**, 617-30.
- Kamei Y., Kawada T., Kazuki R., Sugimoto E. (1993). Retinoic acid receptor γ 2 gene expression is up-regulated by retinoic acid in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem. J.* **293**, 807-812.
- Kamei Y., Kawada T., Mizukami J., Sugimoto E. (1994). The prevention of adipose differentiation of 3T3-L1 cells caused by retinoic acid is elicited through retinoid acid receptor alpha. *Life Sci.* **55**, 307-312.
- Kaminski W.E., Jendraschak E., Kiefl R., von Schacky C. (1993). Dietary omega-3 fatty acids lower levels of platelet-derived growth factor mRNA in human mononuclear cells. *Blood* **81**, 1871-1879.

- Kanaley J.A., Andresen-Reid M.L., Oenning L., Kottke B.A., Jensen M.D. (1993). Differential health benefits of weight loss in upper-body and lower-body obese women. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**, 20-26.
- Kato S., Mano H., Kumazawa T., Yoshizawa Y., Kojima R., Masushige S. (1992). Effect of retinoid status on α , β and γ retinoic acid receptor mRNA levels in various rat tissues. *Biochem. J.* **286**, 755-760.
- Katzenellenbogen J.A., O'Malley B.W., Katzenellenbogen B.S. (1996). Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as basis for cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol. Endocrinol.* **10**, 119-131.
- Kawada T., Kamei Y., Fujita A., Hida Y., Takahashi N., Sugimoto E., Fushiki T. (2000). Carotenoids and retinoids as suppressors on adipocyte differentiation via nuclear receptors. *BioFactors.* **13**, 103-109.
- Keller H., Dreyer C., Medin J., Mahfoudi A., Ozato K., Wahli W. (1993). Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 2160-2164.
- Khan S.G., Boyle P.C., Lachance P.A. (1986). Decreased triiodothyronine binding to isolated nuclei from livers of preobese and obese (ob/ob) mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **182**, 84-87.
- Kim J.B., Spiegelman B.M. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes & Dev.* **10**, 1096-107.
- Kim Y.C., Gomez F.E., Fox B.G., Ntambi J.M. (2000). Differential regulation of the stearoyl-CoA desaturase genes by thiazolidinediones in 3T3-L1 adipocytes. *J. Lipid Res.* **41**, 1310-1316.
- Kliwer S.A., Umesono K., Nooman D.J., Heyman R.A., Evans R.M. (1992a). Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* **358**, 771-774.
- Kliwer S.A., Umesono K., Mangelsdorf D.J., Evans R.M. (1992b). Retinoid X receptor interacts directly with nuclear receptors involved in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D₃ signaling. *Nature* **355**, 446-449.
- Kliwer S.A., Sundseth S.S., Stacey A.J., Brown P.J., Wisely G.B., Koble C.S., Devchand P., Wahli W., Willson T.M., Lenhard J.M., Lehmann J.M. (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 4318-4323.
- Kliwer S.A., Willson T.M. (1998). The nuclear receptor PPAR γ – bigger than fat. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 576-581.
- Knudsen J. (1990). Acyl-CoA-binding protein (ACBP) and its relation to fatty acid-binding protein (FABP): an overview. *Mol. Cell Biochem.* **98**, 217-223.
- Ko G.T., Chan J.C., Cockram C.S., Woo J. (1999). Prediction of hypertension, diabetes, dyslipidaemia or albuminuria using simple anthropometric indexes in Hong Kong Chinese. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **23**, 1136-1142.
- Krey G., Braissant O., L'Horset F., Kalkhoven E., Perroud M., Parker M.G., Wahli W. (1997). Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol. Endocrinol.* **11**, 779-791.
- Kubota N., Terauchi Y., Miki H., Tamemoto H., Yamauchi T., Komeda K., Satoh S., Natano R., Ishii C., Sugiyama T., Eto K., Tsubamoto Y., Okumo A., Murakami K., Sekihara H., Hasegawa G., Naito M., Toyoshima Y., Tanaka., Shiota K., Kitamura T., Fujita T., Ezaki O., Aizawa S., Nagai R., Tobe K., Kimura S., Kadowari T. (1999). PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol. Cell.* **4**, 597-609.
- Lafay L., Romon M., Basdevant A., Vray M., Borys J.M., Eschwege E. (2000). Caractéristiques des adultes sous-évaluant leurs apports alimentaires. *Données de l'étude Fleurbaix Laventi Ville Santé (FLVS).*
- Lake B.G. (1995). Hepatocarcinogenicity of peroxisome-proliferating drugs and chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 483-507.
- Lapsys N.M., Kriketos A.D., Lim-Fraser M., Poynten A.M., Lowy A., Furler S.M., Chisholm D.J., Cooney G.J. (2000). Expression of genes involved in lipid metabolism correlate with peroxisome

- proliferator-activated receptor gamma expression in human skeletal muscle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 4293-4297.
- Laudet V., Vanacker J-M. (1999). Les récepteurs nucléaires d'hormones en folie ! *m/s* **15**, 225-229.
- Lazarow P.B., De Duve C. (1976). A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 2043-2046.
- Leaf A., Weber P.C. (1987). A new era for science in nutrition. *Am. J. Clin. Nut.* **45**, 1048-1053.
- Lebel J.M., l'Hérault S., Dussault J.H., Puymirat J. (1993). Thyroid hormone up-regulates thyroid hormone receptor β gene expression in rat cerebral hemisphere astrocyte cultures. *Glia* **9**, 105-112.
- Ledwith B.J., Pauley C.J., Wagner L.K., Rokos C.L., Alberts D.W., Manam S. (1997). Induction of cyclooxygenase-2 expression by peroxisome proliferators and non-tetradecanoylphorbol 12,13-myristate-type tumor promoters in immortalized mouse liver cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 3707-3714.
- Lee J.W., Ryan F., Swaffield J.C., Johnston S.A., Moore D.D. (1995). Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. *Nature* **374**, 91-94.
- Lehmann J.M., Zhang X-K., Graupner G., Lee M-O., Hermann T., Hoffmann B., Pfahl M. (1993). Formation of retinoid X receptor homodimers leads to repression of T₃ response : hormonal cross talk by ligand-induced squelching. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7698-7707.
- Leid M., Kastner P., Lyons R., Nakshatri H., Saunders M., Zacharewski T., Chen J-Y., Staub A., Garnier J-M., Mader S., Chambon P. (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* **68**, 377-395.
- Leo M.A., Lieber C.S. (1988). Hypervitaminosis A: a liver lover's lament. *Hepatology* **8**, 412-417.
- Levin B.E., Triscari J., Sullivan A.C. (1986). Metabolic features of diet-induced obesity without hyperphagia in young rats. *Am. J. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **251**, R433-R440.
- Levin A.A., Sturzenbecker L.J., Kazmer S., Bosakowski T., Huselton C., Allenby G., Speck J., Kratzeisen C., Rosenberger M., Lovey A., Grippo J.F. (1992). 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR α . *Nature* **355**, 359-361.
- Lewis D.S., McMahan C.A., Mott G.E. (1993). Breast feeding and formula feeding affect differently plasma thyroid hormone concentration in infant baboons. *Biol. Neonate* **63**, 327-335.
- Li C., Wan Y-J. (1998). Differentiation and antiproliferation effects of retinoic acid receptor β in hepatoma cells. *Cancer Lett.* **124**, 205-211.
- Li Q., Yamamoto N., Inoue A., Morisawa S. (1990). Fatty acyl-CoAs are potent inhibitors of the nuclear thyroid hormone receptor in vitro. *J. Biochem.* **107**, 699-702.
- Li Q., Yamamoto N., Morisawa S., Inoue A. (1993). Fatty acyl-CoA binding activity of the nuclear thyroid receptor. *J. Cell. Biochem.* **51**, 458-464.
- Li X.S., Shao Z.M., Sheikh M.S., Eiseman J.L., Sentz D., Jetten A.M., Chen J.C., Dawson M.I., Aisner S., Rishi A.K., et coll. (1995). Retinoic acid nuclear receptor beta inhibits breast carcinoma anchorage independent growth. *J. Cell. Physiol.* **165**, 449-58.
- Licht J.D., Shaknovich R., English M.A., Melnick A., Li J.Y., Reddy J.C., Dong S., Chen S.J., Zelent A., Waxman S. (1996). Reduced and altered DNA-binding and transcriptional properties of the PLZF-retinoic acid receptor-alpha chimera generated in t(11;17)-associated acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* **12**, 323-36.
- Lin Q., Ruuska S.E., Shaw N.S., Dong D., Noy N. (1999). Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor α . *Biochemistry* **38**, 185-190.
- Linney E., LaMantia A-S. (1994). Retinoic acid signaling during mouse development. *Advances in Development Biology* (éd. Wassarman P.L.).
- Lohnes D., Mark M., Mendelsohn C., Dollé P., Dierich A., Gorry P., Gansmuller A., Chambon P. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RAR) during development. (I) Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* **120**, 2723-2748.
- Ma X.J., Salati L.M., Ash S.E., Mitchell D.A., Kantley S.A., Fantozzi D.A., Goodridge A.G. (1990). Nutritional regulation and tissue specific expression of the malic enzyme gene in the chicken. *J. Biol. Chem.* **265**, 18435-18441.

- Mahley R.W., Hussain M.M. (1991). Chylomicron and chylomicron remnant catabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* **2**, 170-176.
- Malinowski J.M., Bolesta S. (2000). Rosiglitazone in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a critical review. *Clin Ther* **22**, 1151-1168.
- Malvy D.J.M., Preziosi P., Galan P., Roussel A.M., Favier A., Briançon S., Hercberg S. (1999). La consommation de lipides chez les sujets de la cohorte SU. VI. MAX. *O.C.L.* **6**, 257-259.
- Mangelsdorf D.J., Borgmeyer U., Heyman R.A., Zhou J.Y., Ong E.S., Oro A.E., Kakizuka A., Evans R.M. (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev.* **6**, 329-344.
- Mangelsdorf D.J., Evans R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841-850.
- Margareto J., Gomez-Ambrosi J., Marti A., Martinez J.A. (2001). Time-dependent effects of a high-energy-yielding diet on the regulation of specific white adipose tissue genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 6-11.
- Mason E.E., Renquist K., Jiang D. (1992). Predictors of Two Obesity Complications: diabetes and hypertension. *Obes. Surg.* **2**, 231-237.
- Matsuzawa Y., Kameda-Takemura K., Yamashita S. (1998). Treatment of obese patients with dyslipoproteinemia. In *handbook of obesity*, chap **47**, 941-952.
- Matthews D.R., Hosker J.P., Rudenski A.S., Naylor B.A., Treacher D.F., Turner R.C. (1985). Homeostasis model assessment : insulin resistance and b-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412-419.
- Mazzachi B.C., Kennedy J.A., Wellby M.L., Edwards A.M. (1992). Effect of fatty acids on rat liver nuclear T3-receptor binding. *Metabolism* **41**, 788-792.
- Mc Caffery P., Dräger U.C. (1995). Retinoic acid synthesizing enzymes in the embrionic and adult vertebrate. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* **5**, 173-183.
- McCloskey H.M., Glick J.M., Ross A.C., Rothblat G.H. (1988). Effect of fatty acid supplementation on cholesterol and retinol esterification in J774 macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* **963**, 456-467.
- Meier-Heusler S.C., Zhu X., Juge-Aubry C., Pernin A., Burger A.G., Cheng S.Y., Meier C.A. (1995). Modulation of thyroid hormone action by mutant thyroid hormone receptors, c-erbA alpha 2 and peroxisome proliferator-activated receptor: evidence for different mechanisms of inhibition. *Mol. Cell. Endocrinol.* **107**, 55-66.
- Memon R.A., Fuller J., Moser A.H., Smith P.J., Grunfeld C., Feingold K.R. (1999). Regulation of putative fatty acid transporters and acyl-CoA synthetase in liver and adipose tissue in ob/ob mice. *Diabetes* **48**, 121-127.
- Mendelsohn C., Lohnes D., Décimo D., Lufkin T., LeMeur M., Chambon P., Mark M. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RAR) during development. (II) Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* **120**, 2749-2771.
- Miesfield R., Rusconi S., Godowski P.J., Maler B.A., Okret S., Wilkström A.-C., Gustafsson J.-Å., Yamamoto K.R. (1986). Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA. *Cell* **68**, 389-399.
- Mignotte V. (1997). Les doigts de zinc (2) : les récepteurs hormonaux nucléaires. *Hématologie* **4**, 351-353.
- Mikkelsen B., Ehlers N., Thomsen H.G. (1974). Vitamin A intoxication causing papilloedema and simulating acute encephalitis. *Acta Neurol. Scand.* **50**, 642.
- Miles P.D., Barak Y., He W., Evans R.M., Olefsky J.M. (2000). Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J. Clin. Invest.* **105**, 287-292.
- Miller D.R., Hayes K.C. (1980). Vitamin A excess and toxicity in nutrition toxicology. *Nutrition basic and applied science* (éd. Hathcock J.N.) **1**, 81-116.
- Mimouni V., Poisson J.P. (1992). Altered desaturase activities and fatty acid composition in liver microsomes of spontaneously diabetic Wistar BB rat. *Biochim. Biophys. Acta.* **1123**, 296-302.
- Minuk G.Y., Kelly J.K., Hwang W.S. (1988). Vitamin A hepatotoxicity in multiple family members. *Hepatology* **8**, 272-275.

- Mitsuhashi T., Nikodem V. (1989). Regulation of expression of the alternative mRNAs of the rat alpha thyroid hormone receptor gene. *J. Biol. Chem.* **264**, 8900-8904.
- Miyakita A, Okuno S., Watanabe T.K., Oga K., Tsuji A., Hishigaki H., Suto T., Nakagawa K., Nakahara Y., Higashi K. (1998). Molecular cloning of rat PPAR γ gene. *Published only in database.*
- Miyata K.J., McCaw S.E., Marcus S.L., Rachubinski R.A., Capone J.P. (1994). The peroxisome proliferator-activated receptor interacts with the retinoid X receptor in vivo. *Gene* **148**, 327-330.
- Miyazawa S., Hayashi H., Hijikata M., Ishii N., Furuta S., Kagamiyama H., Osumi T., Hashimoto T. (1987). Complete nucleotide sequence of cDNA and predicted amino acid sequence of rat acyl-CoA oxidase. *J. Biol. Chem.* **262**, 8131-8137.
- Morley J.E., Melmed S., Reed A., Kasson B.G., Levin S.R., Pekary A.E., Hershman J.M. (1980). Effect of vitamin A on the hypothalamo-pituitary-thyroid axis. *Am. J. Physiol.* **238**, E174-E179.
- Morrisson W.R., Smith L.M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals with boron fluoride methanol. *J. Lipid Res.* **5**, 600-608.
- Mukherjee R., Jow L., Noonan D., McDonnell D.P. (1994). Human and rat peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) demonstrate similar tissue distribution but different responsiveness to PPAR activators. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **51**, 157-166.
- Mukherjee R., Davies P.J., Crombie D.L., Bischoff E.D., Cesario R.M., Jow L., Hamann L.G., Boehm M.F., Mondon C.E., Nadzan A.M., Paterniti J.R. Jr, Heyman R.A. (1997a). Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature.* **386**, 407-10.
- Mukherjee R., Jow L., Croston G.E., Paterniti JR. (1997b). Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPAR γ 2 versus PPAR γ 1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J. Biol. Chem.* **272**, 8071-8076.
- Murakami K., Ide T., Suzuki M., Mochizuki T., Kadowaki T. (1999). Evidence for direct binding of fatty acids and eicosanoids to human peroxisome proliferator-activated receptor α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 609-613.
- Murray M.B., Zyli N.D., Mc Creary N.L., Mc Donald M.J., Towle H.C. (1988). Isolation and characterization of rat cDNA clones for two distinct thyroid hormone receptors. *J. Biol. Chem.* **263**, 12770-12777.
- Murray R.O. (1976). Iatrogenic lesions of the skeleton. *Am. J. Roentgenol.* **126**, 5.
- Nagao Y., French B.A., Cai Y., French S.W., Wan Y-J.Y. (1998). Inhibition of PPAR α /RXR α -mediated direct hyperplasia pathways during griseofulvin-induced hepatocarcinogenesis. *J. Cell. Biochem.* **69**, 189-200.
- Nagpal S., Saunders M., Kastner P., Durand B., Nakshatri H., Chambon P. (1992). Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell* **70**, 1007-1019.
- Nakamura H., Hamada S., Imura H. (1979). Increase in liver tri-iodothyronine receptors associated with increased deoxyribonucleic acid by long-term administration of tri-iodothyronine in thyroidectomized rats. *Biochem J.* **184**, 143-148.
- Nanni G., Canepa C., Casu A. (1997). Dolichol and vitamin A content in rat liver Ito (perisinusoidal) cells. *Life Sci.* **60**, 21-28.
- Nishizuka Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**, 484-496.
- Ntambi J.M. (1999). Regulation of stearyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J. Lipid Res.* **40**, 1549-1558.
- Nuclear Receptors Nomenclature Committee. (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* **97**, 161-163.
- Nudel U., Zakut R., Shani M., Neuman S., Levy Z., Yaffe D. (1983). The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic β -actine gene. *Nucleic Acids Res.* **11**, 1759-1771.
- Ockner R.K. (1990). Historic overview of studies on fatty acid-binding proteins. *Mol. Cell. Biochem.* **98**, 3-9.
- O'Donnell A.L., Koenig R.J. (1990). Mutational analysis identifies a new functional domain of the thyroid hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* **4**, 715-720.

- Ong D.E., Dakkad B., MacDonald P.N. (1987). Acyl-CoA-independent esterification of retinol bound to cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine. *J. Biol. Chem.* **262**, 2729-2736.
- Oppenheimer J.H., Schwartz H.L. (1997). Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocr. Rev.* **18**, 462-475.
- Pairault J., Quignard-Boulangé A., Dugail I., Lasnier F. (1988). Differential effects of retinoic acid upon early and late events in adipose conversion of 3T3 preadipocytes. *Exp. Cell. Res.* **177**, 27-36.
- Pan D.A., Hulbert A.J., Storlien L.H. (1994). Dietary fats, membrane phospholipids and obesity. *J. Nutr.* **124**, 1555-1565.
- Panadero M.I., Herrera E., Bocos C. (1999). Nutritional-induced changes in the peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) gene expression in liver of suckling rats. *Communication to Conjoint congress SEN/NS, Pamplona*.
- Parrish C.C., Pathy D.A., Angel A. (1990). Dietary fish oils limit adipose tissue hypertrophy in rats. *Metabolism* **39**, 217-219.
- Petkovich M., Brand N.J., Krust A., Chambon P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* **330**, 444-450.
- Polly P., Carlberg C., Eisman J.A., Morrison N.A. (1997). $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ receptor as a mediator of transrepression of retinoid signaling. *J. Cell. Biochem.* **67**, 287-296.
- Pou M.A., Bismuth J., Gharbi-Chihi J., Torresani J. (1986). Triiodothyronine (T₃)-induced down-regulation of the nuclear T₃ receptor in mouse preadipocyte cell lines. *Endocrinology* **119**, 2360-2367.
- Pou M.A., Torresani J. (1989). Coordinated stimulation by triiodothyronine of fatty acid synthesis and isoproterenol-sensitive fatty acid release in two preadipocyte cell lines of lean or genetically obese mice. *Horm. Metab. Res.* **21**, 468-72.
- Proenza A.M., Llado I., Serra F., Pico C., Pons A., Palou A. (1992). Tissue composition in persistent dietary obesity after early and adulthood overfeeding in the rat. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* **100**, 147-154.
- Quick T.C., Ong D.E. (1990). Vitamin A metabolism in the human intestinal Caco-2 cell line. *Biochemistry* **29**, 11116-11123.
- Raclot T., Oudart H. (1999). Selectivity of fatty acids on lipid metabolism and gene expression. *Proc. Nut. Soc.* **58**, 633-646.
- Randolph R.K., Ross C. (1991). Regulation of retinol uptake and esterification in MCF-7 and HepG2 cells by exogenous fatty acids. *J. Lipid Res.* **32**, 809-820.
- Randolph R.K., Simon M. (1995). Metabolic regulation of active retinoid concentrations in cultured human epidermal keratinocytes by exogenous fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **318**, 6-14.
- Reddy J.K. and N.D., Lalwani M.K. (1983). Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators : evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. *CRC CRIT. REV. Toxicol.* **12**, 1-58.
- Ribalta J., LaVille A.E., Girona J., Vallvé J.C., Masana L. (1997). Low plasma vitamin A concentrations in familial combined hyperlipidemia. *Clin. Chem.* **43**, 2379-2383.
- Ribot J., Rantala M., Kesäniemi Y.A., Palou A., Savolainen M.J. (2001). Weight loss reduces expression of SREBP1c/ADD1 and PPAR γ ₂ in adipose tissue of obese women. *Pflügers Arch-Eur. J. Physiol.* **441**, 498-505.
- Rieusset J., Andrelli F., Auboeuf D., Roques M., Vallier P., Riou J.P., Auwerx J., Laville M., Vidal H. (1999). Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ in human adipocytes. *Diabetes.* **48**, 699-705.
- Ristow M., Müller-Wieland D., Pfeiffer A., Krone W., Kahn C.R. (1998). Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N. Engl. J. Med.* **339**, 953-959.
- Roberts A.M., James N.H., Woodyatt N.J., Macdonald N., Tugwood J.D. (1998). Evidence for the suppression of apoptosis by the peroxisome proliferator activated receptor- α (PPAR α). *Carcinogenesis* **19**, 43-48.

- Roberts E.S., Vaz A.D.N., Coon M.J. (1992). Role of isozymes of rabbit microsomal cytochrome P-450 in the metabolism of retinoic acid, retinol, and retinal. *Mol. Pharmacol.* **41**, 427-433.
- Robinson D.R., Urakase M., Huang R., Taki H., Sugiyama E., Knoell C.T., Xu L., Yeh E.T., Auron P.E. (1996). Dietary marine lipids suppress the continuous expression of interleukin-1B gene transcription. *Lipids* **31**, S23-S31.
- Roncari D.A.K., Murthy V.K. (1975). Effects of thyroid hormones on enzymes involved in fatty acid and glycerolipid synthesis. *J Biol Chem.* **250**, 4134-4138.
- Rossner S, Walldius G, Bjorvell H. (1989). Fatty acid composition in serum lipids and adipose tissue in severe obesity before and after six weeks of weight loss. *Int. J. Obes.* **13**, 603-612.
- Rothwell N.J., Stock M.J. (1986). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. In : *Brown Adipose Tissue*. London : Edward Arnold: 269-298.
- Roti E., Minelli R., Salvi M. (2000). Thyroid hormone metabolism in obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **24**, S113-S115.
- Rousseau V., Becker D.J., Ongemba L.N., Rahier J., Henquin J.C., Brichard S.M. (1997). Developmental and nutritional changes of ob and PPAR gamma 2 gene expression in rat white adipose tissue. *Biochem J.* **321**, 451-456.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **236**, 487-491.
- Sakai M., Matsushima-Hibiya Y., Nishizawa M., Nishi S. (1995). Suppression of rat glutathione transferase P expression by peroxisome proliferators: interaction between Jun and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Cancer Res.* **55**, 5370-5376.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. (éd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.), 2^o éd..
- Sams GH, Hargis BM, Hargis PS. (1990). Isolation and characterization of a fatty acid binding protein in adipose tissue of Gallus domesticus. *Comp. Biochem. Physiol.* **96**, 585-90.
- Sani B.P., Allen R.D., Moorer C.M., McGee B.W. (1987). Interference of retinoic acid binding to its binding protein by omega-6 fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**, 25-30.
- Scatchard D. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 660-672.
- Schmidt A., Endo N., Rutledge S.J., Vogel R., Shinar D., Rodan G.A. (1992). Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol. Endocrinol.* **6**, 1634-1641.
- Schoonjans K., Staels B., Auwerx J. (1996). The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* **1302**, 93-109.
- Schwartz S.D. (1993). *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes* (éd. Flammarion, Médecine-Sciences, Paris), 4^o éd.
- Schwarz E., Reginato M., Shao D., Krakow S., Lazar M. (1997) Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPβ-mediated transcription. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1552-1561.
- Seidell J.C. (1998). Dietary fat and obesity : an epidemiologic perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 546S-550S.
- Sellmayer A., Danesch U., Weber P.C. (1996). Effects of different polyunsaturated fatty acids on growth-related early gene expression and cell growth. *Lipids* **31**, S37-S41.
- Senti M., Bosch M., Aubo C., Elosua R., Masia R., Marrugat J. (2000). Relationship of abdominal adiposity and dyslipemic status in women with a common mutation in the lipoprotein lipase gene. *Atherosclerosis* **150**, 135-141.
- Shillabeer G., Lau D.C. (1994). Regulation of new fat cell formation in rats: the role of dietary fats. *J. Lipid. Res.* **35**, 592-600.

- Shimoike T., Yanase T., Umeda F., Ichino I., Takayanagi R., Nawata H. (1998). Subcutaneous or visceral adipose tissue expression of the PPAR γ gene is not altered in the fatty (fa/fa) Zucker rat. *Metabolism* **47**, 1494-1498.
- Simopoulos A.P. (1990). Genetics and nutrition: or what your genes can tell you about nutrition. *World Rev. Nutr. Diet* **63**, 25-34.
- Skrede B., Blomhoff R., Maelandsmo G.M., Ose L., Myklebost O., Norum K.R. (1992). Uptake of chylomicrons remnant retinyl esters in human leucocytes in vivo. *Eur. J. Clin. Invest.* **22**, 229-234.
- Smith F.R., Goodman D.S. (1971). The effects of diseases of the liver, thyroid and kidneys on the transport of vitamin A in the human plasma. *J. Clin. Invest.* **50**, 2426-2436.
- Smith S.B., Mersmann H.J., Smith E.O., Britain K.G. (1999). Stearoyl-coenzyme A desaturase gene expression during growth in adipose tissue from obese and crossbred pigs. *J. Anim. Sci.* **77**, 1710-1716.
- Smith S.M., Johnson P.E., Lukaski H.C. (1993). In vitro hepatic thyroid hormone deiodination in iron-deficient rats: effect of dietary fat. *Life Sci.* **53**, 603-609.
- Sorensen H.N., Treuter E., Gustafsson J-Å. (1998). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Vitamins and hormones* **54**, 121-165.
- Spiegelman B., Flier J. (1996). Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* **87**, 1188-1193.
- Steineger H.H., Arntsen B.M., Spydevold O., Sorensen H.N. (1998). Gene transcription of the retinoid X receptor α (RXR α) is regulated by fatty acids and hormones in rat hepatic cells. *J. Lipid Res.* **39**, 744-754.
- Steineger H.H., Sorensen H.N., Tugwood J.D., Skrede S., Spydevold O., Gautvij K.M. (1994). Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells: hormonal modulation of fatty-acid-induced transcription. *Eur. J. Biochem.* **225**, 967-974.
- Stewart L.V., Thomas M.L. (1997). Retinoids differentially regulate the proliferation of colon cancer cell lines. *Exp. Cell. Res.* **233**, 321-329.
- Stone R.L., Bernlohr D.A. (1990). The molecular basis for inhibition of adipose conversion of murine 3T3-L1 cells by retinoic acid. *Differentiation* **45**, 119-127.
- Strait K.A., Schwartz H.L., Perez-Castillo A., Oppenheimer J.H. (1990). Relationship of c-erbA mRNA content to tissue T₃ nuclear binding capacity and function in developing rat and adult rat. *J. Biol. Chem.* **265**, 10514-10521.
- Sudaram M., Sivaprasadarao A., DeSousa M.M., Findlay J.B. (1998). The transfer of retinal from serum retinal-binding protein to cellular retinal-binding protein is mediated by a membrane receptor. *J. Biol. Chem.* **273**, 3336-3342.
- Suruga K., Mochizuki K., Kitagawa M., Goda T., Horie N., Takeishi K., Takase S. (1999). Transcriptional regulation of cellular retinol-binding protein, type II gene expression in small intestine by dietary fat. *Arch. Biochem. Biophys.* **362**, 159-166.
- Suzuki S., Miyamoto T., Opsahl A., Sakurai A., DeGroot L.J. (1994). Two thyroid hormone response elements are present in the promoter of human thyroid hormone receptor beta 1. *Mol. Endocrinol.* **8**, 305-314.
- Swisshelm K., Ryan K., Lee X., Tsou H.C., Peacocke M., Sager R. (1994). Down-regulation of retinoic acid receptor β in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells. *Cell Growth Differ.* **5**, 133-141.
- Tabachnick M., Korcek L. (1986). Effect of long-chain fatty acids on the binding of thyroxine and triiodothyronine to human thyroxine-binding globulin. *Biochim. Biophys. Acta* **881**, 292-296.
- Tabachnik J. (1964). Thyroxine-binding interactions: effects of fatty acids, 2,4 dinitrophenol and other anionic compounds on the binding of human serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 415.
- Takase S., Tanaka K., Suruga K., Kitagawa M., Igarashi M., Goda T. (1998). Dietary fatty acids are possible key determinants of cellular retinal-binding protein II gene expression. *Am. J. Physiol.* **274**, G626-G632.
- Takeuchi H., Matsuo T., Tokuyama K., Suzuki M. (1995). Serum triiodothyronine concentration and Na⁺, K⁺-ATPase activity in liver and skeletal muscle are influenced by dietary fat type in rats. *J. Nutr.* **125**, 2364-2369.

- Teboul M., Bismuth J., Gharbi-Chihi J., Valette A., Bonne J., Ghiringhelli O., Torresani J. (1991). L'acide rétinolique diminue l'expression des récepteurs nucléaires de triiodothyronine et inhibe une étape précoce de la différenciation adipocytaire dans la lignée préadipocytaire Ob 17. *Annales d'Endocrinologie* **52**, 406-409.
- Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B.M. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ , a lipid activated transcription factor. *Cell* **79**, 1147-1156.
- Tugwood J.D., Issemann I., Anderson R.G., Bundell K.R., McPheat W.L., Green S. (1992). The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognize a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl-CoA oxidase gene. *EMBO J.* **11**, 433-439.
- Tulp O.L., Gregory M.H., Danforth E. (1982). Characteristics of diet-induced brown adipose tissue growth and thermogenesis in rats. *Life Sci.* **30**, 1525-1530.
- Turcotte L.P., Swenberger J.R., Zavitz Tucker M., Yee A.J. (2001). Increased fatty acid uptake and altered fatty acid metabolism in insulin-resistant muscle of obese Zucker rats. *Diabetes* **50**, 1389-1396.
- Umesono K., Murakami K.K., Thompson C.C., Evans R.M. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid and vitamin D₃ receptors. *Cell* **65**, 1255-1266.
- Vamecq J., Latruffe N. (1999). Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* **354**, 141-148.
- Van der Klis F.R.M., Wiersinga W.M., Vijlder J.J.M. (1989). Studies on the mechanism of inhibition of nuclear triiodothyronine binding by fatty acids. *FEBS lett.* **246**, 6-12.
- Van der Klis F.R.M., Schmidt E.D.L., Van Beeren H.C., Wiersinga W.M. (1991). Competitive inhibition of T3 binding to α 1 and β 1 thyroid hormones receptors by fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **179**, 1011-1016.
- Van der Vusse G.J., Glatz J.F.C., Stam H.C.G., Reneman R.S. (1992). Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol. Rev.* **72**, 881-940.
- Van Nieuwenhoven F.A., Van der Vusse G.J., Glatz J.F.C. (1996). Membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Lipids* **31**, S223-S227.
- Vandekerckhove J., Weber K. (1978). Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 1103-1110.
- Vanden Heuvel J.P. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical link among fatty acids, gene expression and carcinogenesis. *J. Nutr.* **129**, 575S-580S.
- Venkatraman J.T., Lefebvre Y.A., Clandinin M.T. (1986). Diet fat alters the structure and function of the nuclear envelope: modulation of membrane fatty acid composition, NTPase activity and binding of triiodothyronine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**, 655-661.
- Vermaak W.J.H., Kalk W.J., Kuyl J.M., Smit A.M. (1986). Fatty acid induced changes in circulating total and free thyroid hormones: in vivo effects and methodological artefacts. *J. Endocrinol. Invest.* **9**, 121-126.
- Vidal H., Auboeuf D., Devos P., Staels B., Riou J.P., Auwerx J., Laville M. (1997). Quantification of leptin mRNA in human adipose tissue by RT-competitive PCR. *Quiagen News* **2**.
- Vidal-Puig A.J., Jimenez-Liñan M., Lowell B.B., Hamann A., Hu E., Spiegelman B.M., Flier J.S., Moller D.E. (1996). Regulation of PPAR γ gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J. Clin. Invest.* **97**, 2553-2561.
- Vidal-Puig A.J., Considine R.V., Jimenez-Liñan M., Werman A., Pories W.J., Caro J.F., Flier J.S. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* **99**, 2416-2422.
- Vieira A.V., Schneider W.J., Vieira P.M. (1995). Retinoids: transport, metabolism, and mechanisms of action. *J. Endocrinol.* **146**, 201-207.
- Vigouroux C., Fajas L., Khallouf E., Meier M., Gyapay G., Lascols O., Auwerx J., Weissenbach J., Capeau J., Magre J. (1998) Human peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2: genetic mapping, identification of a variant in the coding sequence, and exclusion as the gene responsible for lipotrophic diabetes. *Diabetes* **47**, 490-492.

- Walldius G. (1976). Serum triglycerides and fatty acids incorporation into human adipose tissue (FIAT). Their relations with adipose tissue characteristics and glucose tolerance. *Acta. Med. Scand.* **200**, 409-421.
- Wan Y.J., Morimoto M., Thurman R.G., Bojes H.K., French S.W. (1995). Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gene is decreased in experimental alcoholic liver disease. *Life Sci.* **56**, 307-317.
- Wan Y.-J.Y. (1993). Retinoic acid and its receptors. *Am. J. Surg.* **166**, 50-53.
- Wan Y.-J.Y., Wang L., Wu T.-C.J. (1992). Expression of retinoic acid receptor genes in developing rat liver and hepatoma cells. *Lab. Invest.* **66**, 646-651.
- Wan Y.-J.Y., Cai Y., Magee T.R. (1998). Retinoic acid differentially regulates retinoic acid receptor-mediated pathways in the HEP3B cell line. *Exp. Cell Res.* **238**, 241-247.
- Weinberger C., Thompson C.C., Ong E.S., Lebo R., Gruol D.J., Evans R.M. (1986). The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone. *Nature* **324**, 641-646.
- Wiersinga W.M., Chopra I.J., Tecu G.N. (1988). Inhibition of nuclear T3 binding by fatty acids. *Metabolism* **37**, 996-1002.
- Wilson-Miller C., Waters K.M., Ntambi J.M. (1997). Regulation of hepatic stearoyl-CoA desaturase gene 1 by vitamin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 206-210.
- Wion D., Houlgatte R., Barbot N., Baraud P., Dicou E., Brachet P. (1987). Retinoic acid increases the expression of NGF gene in mouse L cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 510-514.
- Wolfrum C., Bulhmann C., Rolf B., Borchers T., Spener F. (1999) Variation of liver-type fatty acid binding protein content in the human hepatoma cell line HepG2 by peroxisome proliferators and antisenseRNA affects the rate of fatty acid uptake. *Biochim. Biophys. Acta.* **1437**, 194-201.
- Wolk A, Furuheim M, Vessby B. (2001). Fatty acid composition of adipose tissue and serum lipids are valid biological markers of dairy fat intake in men. *J. Nutr.* **131**, 828-833.
- Wu Q., Li Y., Liu R., Agadir A., Lee M.O., Liu Y., Zhang X.K. (1997). Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization. *EMBO J.* **16**, 1656-1669.
- Wu T.-C.J., Wang L., Wan Y.-J.Y. (1992). Retinoic acid regulates gene expression of retinoic acid receptors α , β and γ in F9 mouse teratocarcinoma cells. *Differentiation* **51**, 219-224.
- Wu Z., Bucher N.L.R., Farmer S.R. (1996). Induction of peroxisome proliferator-activated receptor γ during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBP β , C/EBP δ and glucocorticoids. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4128-36.
- Xu H.E., Lambert M.H., Montana V.G., Parks D.J., Blanchard S.G., Brown P.J., Sternbach D.D., Lehmann J.M., Wisely G.B., Wilson T.M., Kliexer S.A., Milburn M.V. (1999). Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol. Cell.* **3**, 397-403.
- Xue J.C., Schwarz E.J., Chawla A., Lazar M.A. (1996). Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPAR γ . *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1567-1575.
- Yamaguchi S., Murata Y., Nagaya T., Hayashi Y., Ohmori S., Nimura Y., Seo H. (1999). Glucocorticoids increase retinoid-X receptor alpha (RXR α) expression and enhance thyroid hormone action in primary rat hepatocytes. *J. Mol. Endocrinol.* **22**, 81-90.
- Yamauchi T., Waki H., Kamon J., Murakami K., Motojima K., Komeda K., Miki H., Kubota N., Terauchi Y., Tsuchida A., Tsuboyama-Kasaoka N., Yamauchi N., Ide T., Hori W., Kato S., Fukayama M., Akanuma Y., Ezaki O., Itai A., Nagai R., Kimura S., Tobe K., Kagechika H., Shudo K., Kadowaki T. (2001). Inhibition of RXR and PPAR γ ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* **108**, 1001-1013.
- Yang N., Schüle R., Mangelsdorf D.J., Evans R.M. (1991). Characterization of DNA binding and retinoic acid binding properties of retinoic acid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 3559-3563.
- Yang Z.-N., Davis G.J., Hurley T.D., Stone C.L., Li T.K., Bosron W.F. (1994). Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenases for retinol oxidation and retinal reduction. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **18**, 587-591.

- Yao T.P., Seagraves W.A., Oro A.E., McKeown M., Evans R.M. (1992). *Drosophila ultraspiracle* modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3559-3563.
- Yen C.J., Beamer B.A., Negri C., Silver K., Brown K.A., Yarnall D.P., Burns D.K., Roth J., Shuldiner A.R. (1997). Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**, 270-274.
- Yen P.M., Sugawara A., Chin W.W. (1992). Triiodothyronine (T₃) differentially affects T₃-receptor/retinoic acid and T₃-receptor/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. *J. Biol. Chem.* **267**, 23448-23252.
- Ylikomi T., Bocquel M.T., Berry M., Gronemeyer H., Chambon P. (1992). Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J.* **11**, 3681-3694.
- Yu V.C., Deslert C., Anderson B., Holloway J.M., Devary O.V., Näär A.M., Kim S.Y., Bouitin J.M., Glass C.K., Rosenfeld M.G. (1991). RXR β : a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D receptor to their cognate response elements. *Cell* **67**, 1251-1266.
- Zelent A., Krust A., Petkovich M., Kastner P., Chambon P. (1989). Cloning of murine α and β retinoic acid receptors and a novel receptor γ predominantly expressed in skin. *Nature* **339**, 714-717.
- Zhang X.K., Wills K.N., Husmann M., Hermann T., Pfahl M. (1991). Novel pathway for thyroid hormone receptor action through interaction with jun and fos oncogene activities. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 6016-6025.
- Zhao D., McCaffery P., Ivins K.J., Neve R.L., Hogan P., Chin W.W., Dräger U.C. (1996). Molecular identification of a major retinoic acid synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **240**, 15-22.
- Zhu Y., Alvares K., Huang Q., Rao M.S., Reddy J.K. (1993). Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *J. Biol. Chem.* **268**, 26817-26820.

RESUME : Actuellement, les recherches en nutrition s'orientent de plus en plus vers l'étude des nutriments capables de moduler l'expression génique. Dans ce contexte, l'action cellulaire des acides gras s'exerce par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires, les PPARs (récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes) qui appartiennent, comme les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR), à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ce sont des facteurs de transcription qui jouent un rôle clé dans la régulation de gènes impliqués dans les programmes de prolifération et de différenciation cellulaire.

L'objectif de notre travail était d'étudier la fonctionnalité de la vitamine A dans deux situations nutritionnelles proches :

- la mise en place d'un surpoids d'origine alimentaire sur un modèle expérimental de rats.
- la phase dynamique de prise de poids d'origine alimentaire lors d'une obésité installée chez l'homme par une étude biomédicale.

Nous avons mesuré l'expression des récepteurs nucléaires activés par les acides gras (PPAR), la vitamine A (RAR) et les hormones thyroïdiennes (TR) dans le foie et le tissu adipeux blanc de rats et dans le tissu sous cutané chez l'homme.

Nos résultats montrent une hyper-expression des PPARs et une hypo-expression des RARs et des TRs dans les tissus étudiés. Ce nouveau profil d'expression des récepteurs nucléaires pourrait constituer l'un des phénomènes adaptatifs précoces qui entraîne les modifications de plasticité du tissu adipeux lors de la mise en place de l'obésité.

**Study of the vitamin A functionality in a context of weight gain induced
by food intake : experimental and biomedical approaches**

ABSTRACT : Actually, orientations in nutritional researches are towards the study of nutrients modulating gene expression. In this context, the cellular action of fatty acids is mediated by nuclear receptors, PPAR (peroxisome proliferator –activated receptor) that belongs, as the retinoic acid receptor (RAR), to the superfamily of nuclear hormone receptors. These transcription factors play a key role in regulating gene implicated in cellular proliferation and differentiation.

The aim of this work was the study the vitamin A functionality in an experimental model of over-weight rat and in obese patients.

We measured the expression of PPAR, RAR and triiodothyronine receptors (TR) in rat's liver and adipose tissue and in human adipose tissue.

Our results show an increase expression of PPARs and a decrease expression of RAR and TR. This new pattern of expression of nuclear receptors could be an important event in the early body adaptive mechanisms promoting the adipose tissue plasticity and leading to the onset of obesity.

DISCIPLINE : Sciences du vivant, Géosciences, Sciences de l'Environnement

MOTS CLES : Récepteurs nucléaires - Vitamine A - RAR - PPAR - Acides gras - Obésité - Prise de poids - Tissu adipeux -

Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire, Av des Facultés, 33405 Talence Cedex, France