

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé de Marseille  
Université de la Méditerranée Aix-Marseille II  
Campus Santé Timone Marseille  
UMR INSERM U476/INRA 1260 :  
« Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques »

Thèse présentée par

**Myriam MIMOUN**

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de la Méditerranée  
Spécialité : NUTRITION

**STATUT EN ACIDES GRAS POLYINSATURÉS ET  
BÉNÉFICES D'UNE NUTRITHÉRAPIE À BASE DE  
GLYCÉROPHOSPHOLIPIDES ENRICHIS EN ACIDE  
DOCOSAHEXAÉNOÏQUE CHEZ UN MODÈLE MURIN DE  
MUCOVISCIDOSE**

Jury :

Pr Michel LAGARDE

Rapporteur

Pr Jean-Michel MAIXENT

Rapporteur

Dr Claire CERINI

Examineur

Pr Teresinha LEAL

Examineur

Pr Denis RACCAH

Président

Dr Martine ARMAND

Directrice de thèse

## REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés à l'unité mixte de recherche INSERM U476/INRA 1260 : Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques.

Ces travaux n'auraient pas pu être réalisés sans le soutien financier de l'association « Vaincre La Mucoviscidose »

Je souhaite remercier,

Le Pr. Denis Raccah de me faire l'honneur de présider le jury.

Les Prs. Michel Lagarde et Jean-Michel Maixent, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et d'y avoir consacré de leur temps.

Le Dr. Teresinha Leal, d'avoir été présente et disponible, bien qu'à distance, jouant ainsi un rôle important dans le bon déroulement de ce travail.

Le Dr. Claire Cerini, pour l'écoute et les conseils au cours de sa participation à mon comité de thèse.

Je tiens à remercier également le Dr. Martine ARMAND, qui m'a accompagnée et guidée tout au long de cette thèse. On a toujours eu la franchise de se parler, et grâce à ces échanges nous avons atteint l'objectif fixé.

Merci d'avoir partagé ces années avec moi, de m'avoir accordé du temps et de l'énergie.

Merci à Denis Lairon et Marie-Jo Amiot-Carlin, directeurs successifs de l'unité mixte de recherche pour m'avoir accueilli au sein de l'unité et permis d'y effectuer ces années de recherche.

Merci à Thierry COSTE,

Pour cette collaboration Belgique-France si efficace, et pour prendre le temps de répondre à des questions par mail d'une thésarde angoissée même à des heures improbables.

Merci à Annie et Dominique pour leur aide et leur soutien.

Merci aux thésards, anciens thésards, et autres membres de ma joyeuse équipe solidaire,  
Merci pour les échanges instructifs, pour les coups de main parfois, merci pour n'avoir pas été que des collègues de travail, pour les apéros après le labo, pour les pauses cafés, à Béa, Cyrielle, Clem, Minimouss, Maya, Flo, Matt Maill, Romain, Erwan, Marion, Barb, Manue, Julie, Alessandra, Messaline, Julien, Damien, Ziad, Olfa, Méryl.

Merci aux techniciens disponibles et de grand secours Vick, Claudine, Marco et Paule.

Merci aux secrétaires si efficaces dans les cas d'urgences !

Merci enfin à tous les autres membres du laboratoire, que j'ai connu de près ou de loin, qui eux aussi ont contribué à mon travail et/ou à mon bien-être dans ces années de thèse.

A mes parents,

Je vous dédie ce mémoire car sans vous il n'existerait pas.

Vous m'avez donné les moyens d'arriver jusque là,

Je vous ai inquiété, je vous ai sollicité, je vous ai fait partager mon enthousiasme autant que mon stress et vous avez toujours été là, toujours à l'écoute, toujours patients.

Merci pour tout.

A ma famille,

Sylvie, Philippe, Noémie, Isaac, Tania,

Evelyne, Frank, Samuel, Rachel, Emma, Tamar, Inone, Elinor, Hadassa,

Simon, Sarah, Yona, Ouriel, Owen, Sassone,

Dina, Adam, Jonas, Elie, Emmanuel, Rachel, Ruth,

Merci pour les conseils et pour le soutien.

Merci à vous tous d'avoir été aussi présents et de m'avoir entouré tout au long de ces années.

Merci à Mikaël, mon mari,

Avec ton amour tu m'as aidé dans la période la plus difficile, la dernière année de ma thèse, Tu m'as redonné motivation, courage et envie de terminer ce projet pour construire un avenir.

Tu es à mes côtés tous les jours, ta famille s'est jointe à la mienne,

J'ai reçu grâce à toi un soutien inestimable.

## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### **1- Travaux effectués dans le cadre de la thèse**

#### Articles originaux

Mimoun M, Coste TC, Lebacq J, Lebecque P, Wallemacq P, Leal T, Armand M. Increased tissue arachidonic acid and reduced linoleic acid in a mouse model of cystic fibrosis are reversed by supplemental glycerophospholipids enriched in docosahexaenoic acid. *J Nutr*, 2009, 139 :2358-2364.

#### Résumés publiés dans le cadre de congrès

Coste TC, Mimoun M, Lebacq J, Lebecque P, Wallemacq P, Armand M, Leal T. Evolution du statut en acides gras polyinsaturés dans différents tissus chez la souris homozygote  $\Delta F508$ . *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 2006, 20 suppl.2, P077, S138.

#### Communications affichées

Mimoun M, Coste TC, Lebacq J, Wallemacq P, Armand M, Leal T. Influence de l'évolution du statut en acides gras polyinsaturés chez la souris  $\Delta F508/\Delta F508$ . 7<sup>ème</sup> colloque des Jeunes Chercheurs, Vaincre la Mucoviscidose, 6-7 Avril 2006, Paris.

Mimoun M, Coste TC, Lebacq J, Wallemacq P, Armand M, Leal T. Polyunsaturated fatty acid status in  $\Delta F508$  CF mice: is it a relevant model for PUFA nutritional intervention study in cystic fibrosis? 3<sup>rd</sup> European Nutrigenomics Conference, NUGO week , 12-15 Septembre 2006, Oxford, UK.

Coste TC, Mimoun M, Lebacq J, Lebecque P, Wallemacq P, Armand M, Leal T. Evolution du statut en acides gras polyinsaturés dans différents tissus chez la souris homozygote  $\Delta F508$ . 6<sup>ème</sup> Journées Francophones de Nutrition, 29 Novembre-1<sup>er</sup> Décembre 2006, Nice, France.

Mimoun M, Coste TC, Lebacq J, Lebecque P, Wallemacq P, Armand M, Leal T. Effet d'une supplémentation en PL-DHA sur un modèle de souris homozygote  $\Delta F508$ . 8<sup>ème</sup> colloque des Jeunes Chercheurs, Vaincre La Mucoviscidose, 16 Mars 2007, Paris.

Mimoun M. Effect of DHA-enriched phospholipids supplementation on the polyunsaturated fatty acids status in  $\Delta F508$  mouse model. Colloque des Jeunes Chercheurs de l'école doctorale, EDSVS, Aix-Marseille II, 21-22 Juin 2007, Marseille.

#### Communications orales

Mimoun M, Coste TC, Lebacq J, Lebecque P, Wallemacq P, Armand M, Leal T. Effect of docosahexaenoic acid-enriched phospholipids (PL-DHA) supplementation in  $\Delta F508$  mouse (communication orale et affichée). 1<sup>st</sup> European CF Young Investigator Meeting, sponsorisé par l'ECFS, 29-31 Août 2007, Lille, France.

## 2- Autres contributions

### Articles originaux

Favé G, Oliver P, Mimoun M, Millet V, Miralles O, Ridet A, Gleize B, Pico C, Palou A, Coste TC, Armand M. Nutritional quality of human milk from mediterranean lactating women: a preliminary approach towards personalised nutrition. From Nutrigenomics to personalised nutrition. *Genes and Nutrition*, 2007, 2:72-75.

### Résumés publiés dans le cadre de congrès

Garcia C, Millet V, Pitel S, Mimoun M, Ridet A, Coste TC, Armand M. Lipid composition of human milk from mediterranean lactating women: interest of polyunsaturated fatty acids vectors and plasmalogen? *FASEB Journal*, 2007; 21:A688.

### Communications affichées

Mimoun M, Oliver P, Favé G, Millet V, Miralles O, Ridet A, Gleize B, Pico C, Palou A, Coste TC, Armand M. Human milk lipidomic and proteomic: a preliminary comparison of milk quality between women living in Marseille and in Balearic Islands. Second European Nutrigenomics Conference, 10-14 Septembre 2005, Toscane (Italie).

Armand M, Gaget JY, Mimoun M, Ridet A, Pieroni G, Coste TC. Efficiency of different PUFA vectors on the improvement of DHA levels in mare milk. Second European Nutrigenomics Conference, 10-14 Septembre 2005, Toscane (Italie).

Favé G, Oliver P, Mimoun M, Millet V, Miralles O, Ridet A, Gleize B, Pico C, Palou A, Coste TC, Armand M. Nutritional quality of human milk from mediterranean lactating women: a preliminary approach towards personalised nutrition. From Nutrigenomics to personalised nutrition, 3rd International Nutrigenomics Conference, 2-4 Novembre 2005, Palma de Mallorca (Espagne).

Favé G, Mimoun M, Millet V, Oliver P, Ridet A, Gleize B, Miralles O, Pico C, Palou A, Coste TC, Armand M. Qualité nutritionnelle des laits maternels de femmes méditerranéennes : approches en lipidomique et protéomique. 2<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Nutrition, Faculté de Pharmacie, campus Timone, 17-19 Novembre 2005.

Garcia C, Millet V, Pitel S, Mimoun M, Ridet A, Coste TC, Armand M. Lipid composition of human milk from mediterranean lactating women: interest of polyunsaturated fatty acids vectors and plasmalogen? *Experimental Biology*, April 28-May 2 2007, Washington DC, USA.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>9</b>
<b>TABLES DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>12</b>
<b>FIGURES.....</b>	<b>12</b>
<b>TABLEAUX .....</b>	<b>14</b>
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>17</b>
<b>I LES LIPIDES .....</b>	<b>17</b>
I.1 CLASSIFICATION DES LIPIDES .....	17
I.2 DIGESTION ET ABSORPTION DES LIPIDES CHEZ L'HOMME .....	18
I.2.1 <i>Digestion</i> .....	18
I.2.2 <i>Absorption et transport</i> .....	21
<b>II LES ACIDES GRAS .....</b>	<b>24</b>
II.1 LES ACIDES GRAS SATURÉS.....	24
II.2 LES ACIDES GRAS INSATURÉS .....	25
II.2.1 <i>Définition et nomenclature</i> .....	25
II.2.2 <i>Biosynthèse des acides gras insaturés</i> .....	27
II.2.3 <i>Les voies n-6 et n-3 : conversion et rétroconversion</i> .....	28
II.2.4 <i>Les acides gras polyinsaturés essentiels</i> .....	29
II.2.5 <i>Importance de certains dérivés à longue chaîne d'AGPI</i> .....	30
II.2.6 <i>Recommandations nutritionnelles et sources d'acides gras polyinsaturés</i> .....	31
<b>III LA MUCOVISCIDOSE.....</b>	<b>35</b>
III.1 DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES .....	35
III.2 DU GENE A LA PROTEINE CFTR.....	36
III.3 DESCRIPTION DES MANIFESTATIONS PHYSIOLOGIQUES DE LA MUCOVISCIDOSE.....	40
III.4 DIAGNOSTIC, PRISE EN CHARGE ET PERSPECTIVES DE TRAITEMENT DE LA MUCOVISCIDOSE .....	44
III.4.1 <i>Diagnostic</i> .....	44
III.4.2 <i>Prise en charge actuelle</i> .....	45
III.4.3 <i>Perspectives de traitement</i> .....	46
<b>IV ACIDES GRAS POLYINSATURES ET MUCOVISCIDOSE .....</b>	<b>47</b>
IV.1 STATUT EN ACIDES GRAS POLYINSATURES CHEZ LE SUJET CF .....	47
IV.2 STATUT EN ACIDES GRAS POLYINSATURES CHEZ LE MODELE MURIN DE MUCOVISCIDOSE.....	51
IV.3 SUPPLEMENTATION EN ACIDES GRAS POLYINSATURES .....	52
IV.3.1 <i>Etudes de supplémentation effectuées dans le cadre de la mucoviscidose</i> .....	52
IV.3.2 <i>Un vecteur de supplémentation particulièrement efficace, les GPL-DHA®</i> .....	55
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL DE RECHERCHE .....</b>	<b>57</b>
<b>APPROCHE SUR MODELE MURIN.....</b>	<b>60</b>
<b>I MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>60</b>
I.1 ANIMAUX .....	60
I.1.1 <i>Modèle murin</i> .....	60
I.1.2 <i>Régimes alimentaires</i> .....	60
I.1.3 <i>Groupes</i> .....	62
I.2 COMPOSITION EN ACIDES GRAS MEMBRANAIRES DE DIFFERENTS TISSUS .....	63
I.2.1 <i>Préparation des homogénats et des membranes cellulaires</i> .....	63
I.2.2 <i>Extraction des lipides</i> .....	64
I.2.3 <i>Méthylation des acides gras</i> .....	64
I.2.4 <i>Analyse chromatographique des acides gras méthylés en phase gazeuse</i> .....	65
I.2.5 <i>Analyse statistique des profils en acides gras</i> .....	65

<b>II</b>	<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>66</b>
II.1	ETUDE 1 : BENEFICES DE LA SUPPLEMENTATION EN GPL-DHA® SUR LE STATUT EN AGPI CHEZ LA SOURIS F508DEL .....	66
II.1.1	<i>Impact au niveau des tissus cibles de la mucoviscidose.....</i>	66
II.1.2	<i>Tissus non supposés affectés par la mucoviscidose.....</i>	71
II.2	ETUDE 2 : EVOLUTION DU STATUT EN AGPI AU COURS DU TEMPS CHEZ LA SOURIS F508DEL .....	73
II.2.1	<i>Effets du facteur temps sur le statut en AGPI des tissus affectés par la mucoviscidose.....</i>	73
II.2.2	<i>Effets du facteur temps sur l'évolution du profil en AGPI des tissus supposés non affectés par la mucoviscidose.....</i>	77
II.3	ETUDE 3 : EVOLUTION DU STATUT EN AGPI EN FONCTION DU REGIME DE BASE CHEZ LA SOURIS F508DEL .....	78
II.3.1	<i>Intestin proximal .....</i>	78
II.3.2	<i>Intestin distal.....</i>	79
	<b>APPROCHE SUR MODELE CELLULAIRE INTESTINAL.....</b>	<b>82</b>
<b>I</b>	<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>82</b>
I.1	CELLULES.....	82
I.1.1	<i>Modèle cellulaire .....</i>	82
I.1.2	<i>Entretien et mise en culture.....</i>	83
I.1.3	<i>Conditions testées.....</i>	84
I.1.4	<i>Préparation des liposomes de GPL-DHA®.....</i>	84
I.1.5	<i>Analyse lipidique des cellules.....</i>	85
I.1.6	<i>Test de différenciation cellulaire.....</i>	85
I.1.7	<i>Dosage des protéines totales.....</i>	86
I.2	CARACTÉRISATION DU SÉRUM DE VEAU FŒTAL.....	87
I.2.1	<i>Extraction et séparation des différentes espèces lipidiques .....</i>	87
I.2.2	<i>Quantification des différentes espèces lipidiques.....</i>	88
I.3	EVALUATION DE L'EFFET DE LA SUPPLEMENTATION EN GPL-DHA® SUR LE TRANSPORT DU CHOLESTEROL ET DES ACIDES GRAS .....	89
I.3.1	<i>Préparation des micelles.....</i>	90
I.3.2	<i>Préparation des liposomes.....</i>	91
I.3.3	<i>Conditions d'incubation.....</i>	92
I.3.4	<i>Analyse statistique des données de l'étude cellulaire .....</i>	92
<b>II</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>93</b>
II.1	EFFET DU GPL-DHA SUR L'ABSORPTION LIPIDIQUE .....	93
II.1.1	<i>Paramètres cellulaires .....</i>	93
II.1.2	<i>Effet des GPL-DHA sur l'absorption du cholestérol et des acides gras .....</i>	94
II.2	FACTEURS DE VARIATION DE L'ABSORPTION DU CHOLESTEROL ET DES AG <i>IN VITRO</i> .....	95
II.2.1	<i>Variation de l'absorption des acides gras en fonction de la structure lipidique d'apport.....</i>	96
II.2.2	<i>Variation de l'absorption du cholestérol en fonction de la structure lipidique d'apport.....</i>	97
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>98</b>
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>104</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>105</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

### **A**

AA : acide arachidonique  
ABC-A1 : ATP-Binding cassette transporter A1  
ADN : Acide DesoxyriboNucléique  
AGE : acides gras essentiels  
AGL : acides gras libres  
AGLC : acides gras à longue chaîne  
AGMI : acides gras monoinsaturés  
AGPI : acides gras polyinsaturés  
ALA : acide  $\alpha$ -linoléinique  
AMPc : Adenosine MonoPhosphate cyclique  
ARN : Acide RiboNucléique  
ASBT : apical sodium dependent bile acid transporter  
ASL : Application Santé des Lipides  
ATP : adenosine triphosphate

### **B**

BF3 : Boron TriFluoride  
BSDL : bile-salt dependant lipase  
BSSL : bile-salt stimulated lipase

### **C**

CCM : Chromatographie sur Couche Mince  
CEH : carboxyl ester hydrolase  
CEL : carboxyl ester lipase  
CE : cholestérol esterifié  
CF : cystic fibrosis ou mucoviscidose  
CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator  
CL : cholestérol libre  
CMC : concentration micellaire critique  
CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

## **D**

DG : diglycérides

DGLA : acide di-homo gamma linoléique

DHA : acide docosahexaénoïque

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DO : Densité Optique

DPA : acide docosapentaénoïque

## **E**

ENaC : Epithelial Na<sup>+</sup> Channel

EPA : acide eicosapentaénoïque

## **F**

FABP(pm) : (plasma membrane) fatty acid-binding protein

FAT/CD36 : fatty acid translocase

FATP4 : fatty acid transporter protein 4

## **G**

GLA : acide gamma linoléique

GLUT : Glucose transporter

GPL-DHA : Glycérophospholipides enrichis en acide docosahexaénoïque

## **H**

4-HHE : 4-hydroxyhexéanal

4-HNE : 4-hydroxynonéanal

## **L**

LA : acide linoléique

LTB : LeukoTriene B

LysoPC : Lysophosphatidylcholine

LysoPE : Lysophosphatidylethanolamine

LysoPL : lysophospholipide

LysoPS : Lysophosphatidylsérine.

## **M**

MG : monoglycérides

## **N**

NF- $\kappa$ B : Nuclear factor  $\kappa$ B

NPC1L1 : Newman-Pick C1 Like 1 protein

## **O**

ORCC : Outwardly Rectifying Chloride Channel ou canal rectifiant dans le sens sortant

## **P**

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PL : phospholipides

PLRP : phospholipase related protein

PPAR : peroxysome proliferator of activated receptors

PTL : pancreatic triglyceride lipase

## **R**

ROS : radicaux libres oxygénés

## **S**

SGLT1 : Sodium-GLucose coTransporter 1

SR-B1 : Scavenger Receptor Class B1

SVF : Sérum de Veau Foetal

## **T**

TG : triglycérides

## **U**

UDCA : Ursodeoxycholic acid

## **V**

VLM : Vaincre La Mucoviscidose

# TABLES DES ILLUSTRATIONS

## FIGURES

Figure 1 : Classification des lipides basée sur leur capacité à interagir avec l'eau (Carey & Small, 1970) .....	17
Figure 2: Les différentes étapes conduisant à la biodisponibilité des acides gras (Armand, 2008).....	18
Figure 3: Schéma d'un entérocyte.....	22
Figure 4 : Captation des molécules lipophiles à travers la bordure en brosse de l'entérocyte d'après Iqbal et Hussain, 2009 .....	23
Figure 5 : Exemple d'un acide gras saturé, l'acide palmitique (ou hexadécanoïque).....	24
Figure 6: Voies de synthèse des acides linoléique et $\alpha$ -linoléique (Wallis <i>et al.</i> , 2002) .....	27
Figure 7: Voies de biosynthèse des acides polyinsaturés n-6 et n-3 chez l'homme .....	28
Figure 8 : Evolution de l'âge moyen de survie des patients atteints de mucoviscidose (Davis, 2006).....	36
Figure 9: Du gène à la protéine CFTR (Girodon-Boulandet & Costa, 2005) .....	37
Figure 10 : Les différentes classes de mutations (Coste, 2005b) .....	39
Figure 11 : Proportion relative en LA, AA, DHA (exprimée en % des acides gras totaux), et ratio n-6/n-3 dans les phospholipides membranaires du duodenum-jejunum, de l'iléon, du pancréas et des poumons des souris sauvages ou CF avec ou sans supplémentation. ....	68
Figure 12 : Rapport DHA/AA dans les phospholipides membranaires des tissus affectés par la mucoviscidose .....	70
Figure 13 : Proportion relative en LA, AA, DHA (exprimée en % des acides gras totaux), et rapport n-6/n-3 dans les homogénats de foie, de cœur et de rein des souris sauvages ou CF avec ou sans supplémentation .....	71
Figure 14: Proportion relative en LA, AA, DHA (exprimée en % des acides gras totaux), et rapport n-6/n-3 dans les phospholipides membranaires de foie, de cœur et de rein des souris sauvages ou CF avec ou sans supplémentation .....	72
Figure 15: Rapport DHA/AA dans les phospholipides membranaires des tissus supposés non affectés par la mucoviscidose.....	73
Figure 16 : Evolution des teneurs d'AA (A) et de DHA (B) dans le duodénum-jéjunum (homogénat) au cours du temps .....	74
Figure 17 : Evolution du rapport DHA/AA dans le duodénum-jéjunum (homogénat) au cours du temps .....	74
Figure 18 : Evolution des teneurs d'AA (A) et de DHA (B) dans le duodénum-jéjunum (phospholipides membranaires) au cours du temps .....	75
Figure 19 : Evolution du rapport DHA/AA dans le duodénum-jéjunum (phospholipides membranaires) au cours du temps.....	75
Figure 20 : Evolution des teneurs d'AA (A) et de DHA (B) dans l'iléon (phospholipides membranaires) au cours du temps.....	76
Figure 21 : Evolution du rapport DHA/AA dans l'iléon (phospholipides membranaires) au cours du temps.....	77
Figure 23 : Comparaison des proportions relatives en AGPI (exprimée en % des acides gras totaux) et du rapport n-6/n-3 dans les PL membranaires du duodénum-jéjunum des souris F508del nourries avec du peptamen (CF PEPT) ou avec un régime standard + movicol (CF MOV) âgées de 6 (A) ou de 12 (B) mois. ....	79
Figure 24 : Comparaison des proportions relatives en AGPI (exprimée en % des acides gras totaux) et du rapport n-6/n-3 dans l'homogénat d'iléon des souris F508del nourries avec du	

peptamen (CF PEPT) ou avec un régime standard + movicol (CF MOV) âgées de 6 (A) ou de 12 (B) mois.....	80
Figure 25 : Comparaison des proportions relatives en AGPI (exprimée en % des acides gras totaux) et du rapport n-6/n-3 dans les PL membranaires d'iléon des souris F508del nourries avec du peptamen (CF PEPT) ou avec un régime standard + movicol (CF MOV) âgées de 6 (A) ou de 12 (B) mois .....	81
Figure 26 : Mesure de la résistance transépithéliale (en $\Omega/\text{cm}^2$ ) et de l'activité d'enzymes marqueurs de la différenciation cellulaire (U.S.I./mg de protéine) dans les cellules témoins (T) et enrichis en DHA (D). (n=3 puits par condition) .....	93
Figure 27 : Quantité d'acides gras absorbés sous forme de micelles (nmol d'acide oléique/mg de protéines) par les cellules témoins (T) et enrichies en DHA (D) (n=3 par condition). .....	94
Figure 28 : Quantité de cholestérol absorbé sous forme de micelles (en nmol de cholestérol/mg de protéines) par les cellules témoins (T) et enrichies en DHA (D) (n=3 par condition). .....	95
Figure 29 : Rendement de l'absorption de l'acide oléique apporté sous forme de différentes structures lipidiques (valeurs relatives calculées par rapport à la valeur de référence représentée par les micelles classiques mise à 100%).....	96
Figure 30: Rendement de l'absorption du cholestérol apporté sous forme de différentes structures lipidiques (valeurs relatives calculées par rapport à la valeur de référence représentée par les micelles classiques mise à 100%).....	97

## TABLEAUX

Tableau 1 : Les principales familles d'acides gras insaturés .....	25
Tableau 2 : Principaux acides gras mono- et polyinsaturés (AGMI et AGPI).....	26
Tableau 3 : Taux de conversion de l'ALA en EPA et DHA suivant le sexe et l'âge (exprimé en %) (Pawlosky <i>et al.</i> , 2001; Brenna, 2002; Burdge & Wootton, 2003).....	29
Tableau 4 : Résumé des apports nutritionnels conseillés en acides gras en France chez l'homme adulte (Martin, 2001) .....	32
Tableau 5 : Recommandations nationales et internationales en acides gras polyinsaturés pour un adulte en g/j ou en % apport énergétique total (AET).....	32
Tableau 6 : Teneur en acide linoléique et $\alpha$ -linoléique d'huiles végétales et d'autres aliments (Ciqual 2002).....	33
Tableau 7 : Teneur en acide eicosapentaénoïque et acide docosahexaénoïque dans quelques produits de la mer (Données USDA-CIQUAL) (Coste, 2005a) .....	34
Tableau 8 : Epidémiologie de la mucoviscidose .....	35
Tableau 9 : Principales altérations des acides gras n-6 et n-3 observées chez les patients CF (Al-Turkmani <i>et al.</i> , 2007; Coste <i>et al.</i> , 2007).....	48
Tableau 10: Modèles murins utilisés pour l'étude de la mucoviscidose (Guilbault <i>et al.</i> , 2007) .....	51
Tableau 11: Essais de suppléments sur des patients CF (Coste <i>et al.</i> , 2007).....	54
Tableau 12: Composition en acides gras des différents régimes (standard, Peptamen Junior et GPL-DHA <sup>®</sup> ) (exprimée en pourcent des acides gras totaux).....	62
Tableau 13 : Protocole expérimental des études effectuées .....	62
Tableau 14: Statut en certains acides gras polyinsaturés dans la fraction homogénat du duodenum-jejunum, de l'iléon, du pancréas et des poumons des souris sauvages ou CF avec ou sans supplémentation.....	67
Tableau 15 : Taille moyenne des particules de liposomes GPL-DHA .....	85
Tableau 16: Taille moyenne des particules présentes dans les deux types de micelles .....	91
Tableau 17: Taille moyenne des particules présentes dans LPC, LLPC-O, LLPC-S, LLPE .	92

## AVANT-PROPOS

La mucoviscidose est une maladie autosomique récessive qui se caractérise par des altérations ioniques, causées par une protéine membranaire défectueuse ou inexistante la CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) et associées à des perturbations métaboliques au niveau de plusieurs organes. À ce jour, aucun traitement ne permet de guérir de la mucoviscidose. Les greffes d'organes restent un espoir mais posent des problèmes de rejet. La recherche a permis au cours de ces dernières années de mettre en place une prise en charge adaptée et d'augmenter ainsi considérablement l'espérance de vie en traitant certains symptômes aggravants de la maladie.

Parmi les symptômes observés chez les patients atteints de mucoviscidose, nous nous sommes intéressés à la perturbation des acides gras polyinsaturés (AGPI) des familles n-3 et n-6. Plusieurs hypothèses ont été émises concernant l'origine de ce déséquilibre, une malnutrition, une digestion et/ou une absorption altérée, une augmentation de la  $\beta$ -oxydation ou de la peroxydation lipidique, une production massive de molécules inflammatoires dont ils sont les précurseurs, ou encore un renouvellement rapide des lipides membranaires. Quelle que soit la ou les causes, une diminution de leur biodisponibilité aura des répercussions importantes sur l'état général du patient car ces deux familles d'AGPI sont issues d'acides gras essentiels et que les dérivés à longue chaîne qui en découlent interviennent à différents niveaux de la vie cellulaire.

En effet, au niveau membranaire, la proportion d'AGPI à longue chaîne contenus dans les phospholipides va moduler la fluidité membranaire ; de plus ils peuvent dans certaines voies d'activation cellulaire jouer le rôle de second messager. Au niveau inflammatoire, certains AGPI n-6 et n-3 sont précurseurs de molécules pro et anti-inflammatoires (éicosanoïdes, lipoxines, résolvines, neuroprotectines, docosatrienes). Ils interviennent également dans la régulation de la transcription génique à travers une action sur des récepteurs nucléaires PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptors).

Dans une introduction générale, nous définirons succinctement les différentes classes majoritaires des lipides alimentaires et les étapes conduisant à leur biodisponibilité, puis nous focaliserons ensuite notre attention sur les différents types d'acides gras. Nous présenterons enfin la maladie appelée mucoviscidose en mettant notamment en avant le lien avec les AGPI.

Les travaux présentés dans ce mémoire sont centrés sur la recherche des bénéfices d'un vecteur particulier en un AGPI n-3 d'intérêt, l'acide docosahexaénoïque, dans le contexte de la mucoviscidose à travers deux approches : une approche originale par supplémentation nutritionnelle réalisée chez un modèle murin présentant la mutation la plus répandue chez les patients atteints de mucoviscidose, et une approche sur un modèle cellulaire intestinal humain afin d'étudier de façon plus approfondie l'intérêt du supplément sur la fonctionnalité entérocytaire, à savoir sur les capacités d'absorption des nutriments lipidiques.




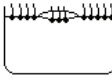

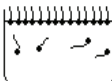

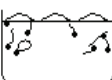

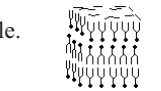

# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

## I Les lipides

### I.1 Classification des lipides

Les lipides sont des molécules insolubles dans l'eau qui sont à la fois fournis par l'alimentation (35-50% de l'apport énergétique total) et biosynthétisés par l'organisme. Ils sont majoritairement représentés par les triglycérides (TG), les phospholipides (PL), le cholestérol libre (CL) ou estérifié (CE), et les acides gras libres (AGL). Ces nutriments assurent différentes fonctions importantes chez l'homme: couverture des besoins énergétiques ( $\beta$ -oxydation), renouvellement des cellules de l'organisme (constituants des membranes cellulaires), synthèse des éicosanoïdes (métabolites importants dans les processus de vasodilatation, vasoconstriction et inflammatoire), acylation de certaines protéines (palmitoylation et myristoylation). Les différentes espèces lipidiques peuvent être classées selon leur interaction avec le milieu aqueux ce qui va refléter à la fois leur rôle, leur structure et leur organisation au sein de l'organisme (Figure 1).

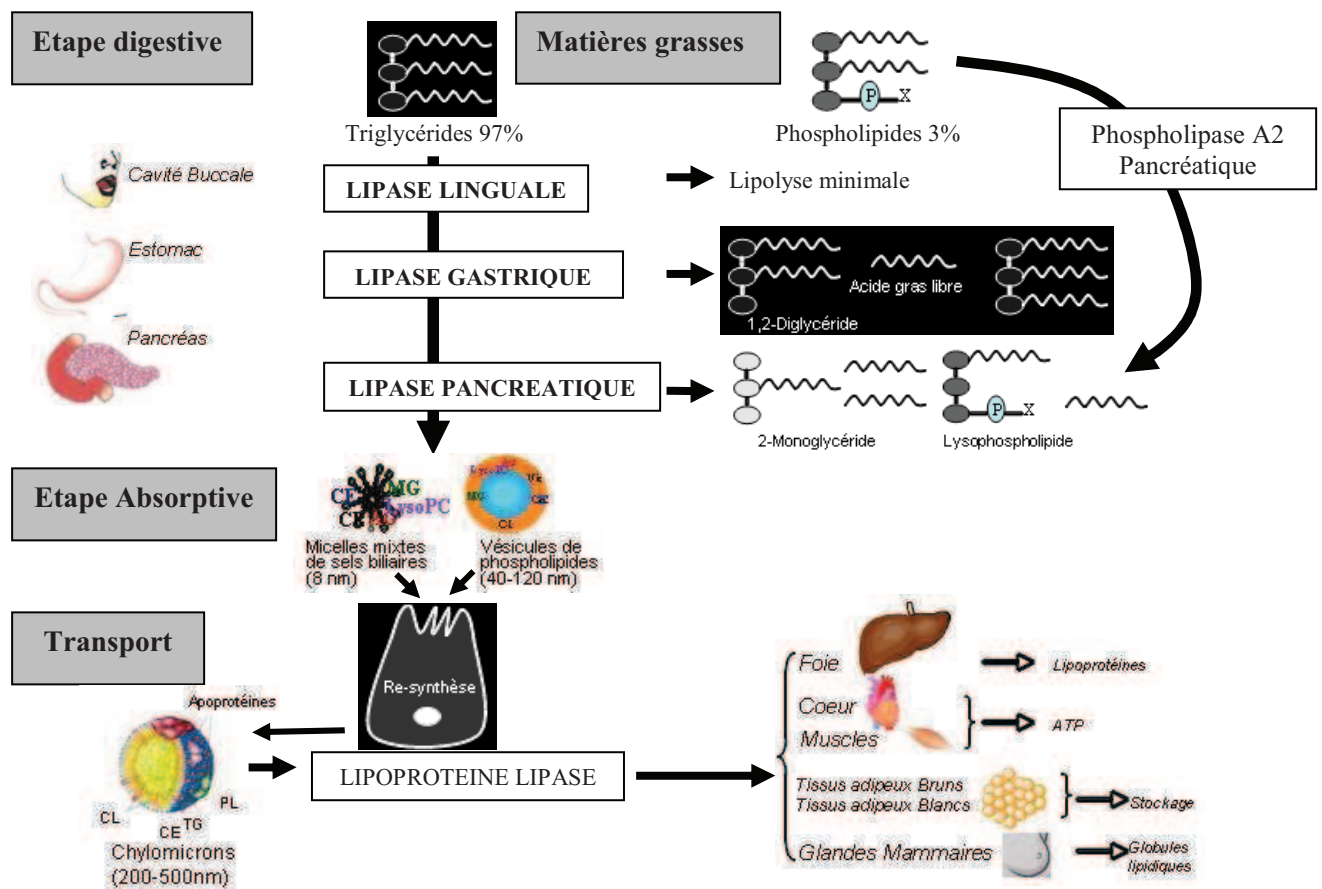
Figure 1 : Classification des lipides basée sur leur capacité à interagir avec l'eau (Carey & Small, 1970)

CLASSE	INTERACTION EN SURFACE OU DANS LE VOLUME DE LA PHASE AQUEUSE	EXEMPLES
<b>Lipides non-polaires</b>	 Ne se répand pas pour former une monocouche. Insoluble dans le volume de la phase aqueuse.	Carotène, squalène, cholestérol oléate, huile de paraffine, TG
<b>Lipides polaires</b>		
I. Insolubles faiblement amphiphiles	 Forme une monocouche stable. Insoluble dans le volume de la phase aqueuse.	Cholestérol, Diglycérides (DG), Acides gras à longue chaîne (AGLC) protonée, vitamines liposolubles
II. Insolubles amphiphiles	 Forme une monocouche stable. Cristaux liquides.	PL, Monoglycérides (MG), monoethers, acides gras ionisés
III. Solubles amphiphiles		
A) Avec mésomorphisme lyotropique	 Forme une monocouche instable. Solution micellaire >CMC.	Sels sodium des AGLC, détergents, lysophosphatidylcholine (lysoPC)
 → C.L. → Micelle		
B) Sans mésomorphisme lyotropique	 Forme une monocouche instable. Solution micellaire >CMC.	Sels biliaires, alcools biliaires sulfatés, saponines.
 → Micelle		
	 Micelle (coeur aliphatique)	
	 Micelle (coeur aromatique)	

## I.2 Digestion et absorption des lipides chez l'homme

Pour être biodisponibles et donc utilisables par les cellules de l'organisme, les lipides alimentaires doivent être hydrolysés en molécules de plus petite taille (digestion) afin de passer la barrière intestinale (absorption) et de se retrouver dans la circulation sanguine (transport) (Figure 2).

Figure 2: Les différentes étapes conduisant à la biodisponibilité des acides gras (Armand, 2008).



### I.2.1 Digestion

La digestion des lipides alimentaires, constituées majoritairement de triglycérides (97%, 50 à 100 g /j) mais aussi de phospholipides (4 à 8 g/j), résulte chez l'homme adulte sain de l'action successive de différentes lipases du tractus digestif (Tso, 1994) combinée à des phénomènes physicochimiques puisque les lipases solubles dans l'eau doivent agir au niveau d'un substrat insoluble dans l'eau ce qui nécessite la mise en place d'une interface lipides/eau (Armand *et al.*, 1994; Armand *et al.*, 1996a; Armand *et al.*, 1999; Armand, 2008).

### I.2.1.1 Etape buccale

La lipase linguale, sécrétée par les glandes de Von Ebner présentes au niveau de la *papillae circumvallate* (Hamosh & Burns, 1977; Hamosh, 1990), hydrolyse spécifiquement la liaison ester portée par le troisième carbone du squelette glycérol des triglycérides (position sn-3) (Hamosh, 1990). Cette lipolyse conduit à la libération de quelques molécules d'acides gras (de l'ordre de quelques nanomoles), et joue un rôle quantitatif peu important dans la digestion des triglycérides. Le rôle de cette lipase se situerait principalement à un autre niveau ; en effet, des travaux récents montrent que la libération de cette faible quantité d'acides gras sous l'action de la lipase linguale, leur solubilisation, leur transport puis leur détection par des lipidorécepteurs (tels que CD36) (Fukuwatari *et al.*, 1997) permettrait une augmentation des sécrétions du tractus digestif et une mobilisation des lipides stockés par l'entérocyte visant à optimiser les étapes suivantes de digestion et d'absorption (Laugerette *et al.*, 2005; Mattes, 2005).

### I.2.1.2 Etape gastrique

Etant donnée le faible rendement de lipolyse par la lipase linguale, on peut considérer que le vrai point de départ de la digestion des triglycérides alimentaires se situe plutôt au niveau de l'estomac où se trouve la lipase gastrique (Abrams *et al.*, 1988). Cette lipase est dite « acide » car elle est active à un pH compris entre 3 et 6 (pH optimal à 5,4), et est sécrétée directement sous forme active dans le suc gastrique par les cellules principales de la muqueuse fundique (Hamosh, 1990). De même que la lipase linguale, elle va catalyser préférentiellement la coupure de la liaison ester en position sn-3 des triglycérides mais avec un rendement nettement supérieur. En plus de cette stéréospécificité, la lipase gastrique va libérer de façon plus efficace, dans un ordre décroissant, les acides gras à chaîne courte puis ceux à chaîne moyenne, et enfin ceux à chaîne longue. La majorité des produits de lipolyse via la lipase gastrique sont principalement des diglycérides, quelques molécules de monoglycérides et des acides gras libres. Ces produits tensioactifs, de concert avec la motricité gastrique, vont soit favoriser le processus d'émulsification des lipides (organisation des lipides sous forme de globules mesurant 2 à 50 µm) (Armand *et al.*, 1994), soit permettre le réarrangement des globules issus d'émulsions préformées (Armand *et al.*, 1999). Par ailleurs, en fonction de leur nature, les acides gras libérés lors de cette lipolyse vont agir à différents niveaux (Hamosh, 1990; Armand, 2008): stimuler la sécrétion de cholécystokinine ce qui ralentira la vidange

gastrique et activera la sécrétion d'enzymes digestives pancréatiques, favoriser l'action de la lipase pancréatique lors de l'étape suivante de digestion. La phase gastrique est responsable de la digestion de 10 à 40% des triglycérides alimentaires ingérés chez le sujet sain en fonction des propriétés des globules lipidiques (Carriere *et al.*, 1993; Armand *et al.*, 1994; Armand *et al.*, 1996a; Armand *et al.*, 1999), et constitue également un préalable indispensable pour la digestion intestinale (Bernback *et al.*, 1990; Borel *et al.*, 1994). Dans le cas des sujets souffrant d'insuffisance pancréatique transitoire (nouveau-nés à terme ou prématurés) ou irréversible (pancréatite chronique, mucoviscidose), le rôle de la lipase gastrique est encore plus important car elle représente la seule lipase digestive correctement sécrétée *in situ* permettant d'hydrolyser les triglycérides (Roulet *et al.*, 1980; Abrams *et al.*, 1984; Hamosh, 1990; Armand *et al.*, 1996b; Armand *et al.*, 2004; Armand, 2007).

### I.2.1.3 Etape intestinale

Les globules lipidiques sont évacués dans l'intestin proximal via le pylore et vont rentrer en contact avec la bile, déversée par la vésicule biliaire, et la sécrétion pancréatique. Le pH du milieu devient proche de la neutralité (environ 6,5) (Abrams *et al.*, 1984), les globules lipidiques sont stabilisés par des micelles de sels biliaires (Fillery-Travis *et al.*, 1995) qui recouvrent leur surface et permettent une action optimale des lipases pancréatiques (Borgstroem, 1964).

Dans la partie proximale de l'intestin, la lipolyse se poursuit grâce à l'action de plusieurs lipases pancréatiques (Armand, 2007; Armand, 2008) :

- La lipase pancréatique classique (ou Pancreatic Triglyceride Lipase, PTL),
- PLRP1 et PLRP2 (Lipases pancréatiques apparentées 1 et 2) qui présentent des similarités de structure avec la PTL avec cependant des différences au niveau des séquences,
- La carboxyl ester lipase (CEL) également nommée carboxyl ester hydrolase (CEH), bile-salt dependant lipase (BSDL), bile-salt stimulated lipase (BSSL) ou encore bile-salt activated lipase,
- La phospholipase A2.

L'action de la PTL nécessite la présence d'un cofacteur protéique, la colipase, grâce à laquelle la lipase se fixera à l'interface lipides/milieu aqueux recouverte de sels biliaires. Une

fois fixée, elle va catalyser la coupure des liaisons esters en position sn-1 et sn-3 des triglycérides.

Malgré ses similitudes structurelles avec la PTL, la PLRP1 est incapable de digérer les triglycérides et son rôle exact est encore inconnu (Crenon *et al.*, 1998). La PLRP2, par contre, hydrolyse les triglycérides mais beaucoup plus lentement que la lipase classique (De Caro *et al.*, 2004; Berton *et al.*, 2009) ; elle peut également hydrolyser les liaisons esters des phospholipides (sn-1) et des galactolipides (Jayne *et al.*, 2002; Whitcomb & Lowe, 2007). La CEL a la capacité d'agir sur les liaisons esters de différents substrats : les triglycérides, les diglycérides, les esters de cholestérol et de vitamines, les phospholipides et lysophospholipides, les céramides issus de la digestion de la sphingomyéline par la sphingomyélinase intestinale, et les galactolipides (Armand, 2007; Armand, 2008).

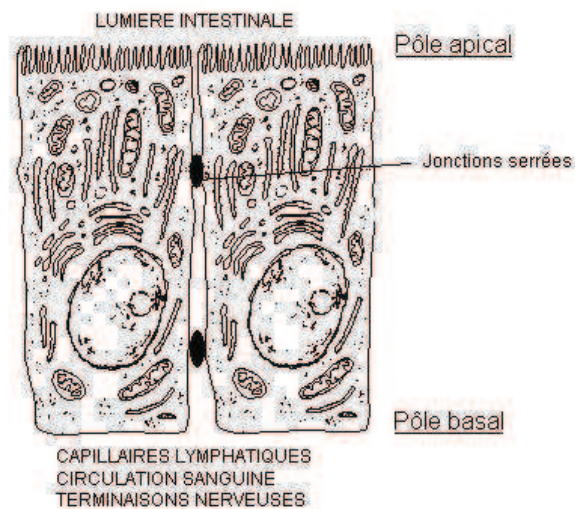
La phospholipase A2 catalyse de façon spécifique la coupure des liaisons esters en sn-2 des phospholipides (Armand, 2007).

Au final, si le processus de digestion s'est bien déroulé, les produits de lipolyse majoritairement présents au niveau de la lumière intestinale sont des acides gras libres, des 2-monoglycérides et des lysophospholipides, avec des proportions variables de cholestérol libre et estérifié (Carriere *et al.*, 1993; Armand *et al.*, 1996a; Armand *et al.*, 1999). Ces produits restent insolubles dans l'eau et doivent être solubilisés sous forme de micelles mixtes de sels biliaires (8 à 35 nm) (Danielsson, 1963) et de vésicules unilamellaires de phospholipides ou liposomes (40 à 120 nm) (Porter & Saunders, 1971; Hernell *et al.*, 1990). Ces deux types de structures, dont l'importance spécifique n'est toujours pas connue, coexistent dans la lumière intestinale chez l'homme (Hernell *et al.*, 1990) (Figure 2).

### I.2.2 Absorption et transport

Micelles mixtes de sels biliaires et vésicules unilamellaires concentrent les produits de lipolyse d'un facteur 100 à 1000 et les véhiculent à proximité de la paroi intestinale (Tso, 1994). Cette paroi est constituée par des cellules spécifiques, les entérocytes, qui présentent un pôle apical avec une bordure en brosse caractéristique du côté de la lumière intestinale, et un pôle basolatéral qui est en contact avec des capillaires lymphatiques, sanguins et des terminaisons nerveuses. Ces cellules polarisées sont reliées entre elles par des jonctions serrées conférant plus d'étanchéité à la membrane intestinale (Figure 3), (Groschwitz & Hogan, 2009).

Figure 3: Schéma d'un entérocyte



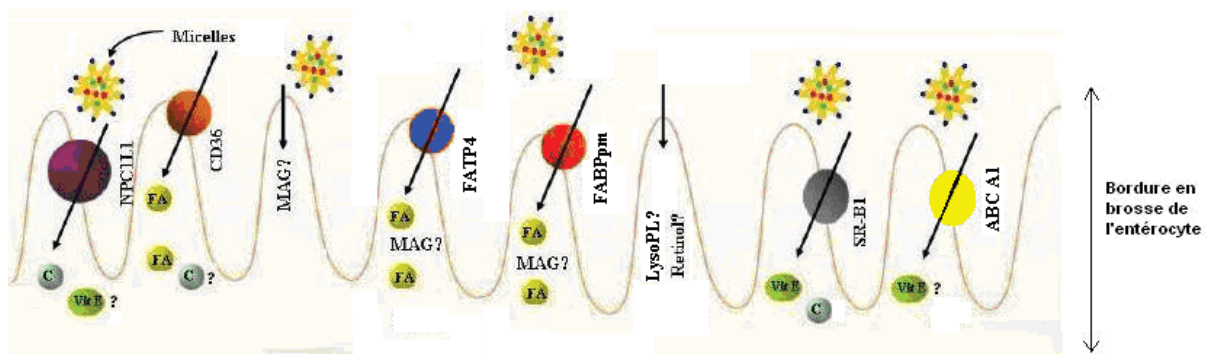
A proximité du pôle apical on observe, accolée à la membrane plasmique constituée d'une bicouche de phospholipides, un environnement particulier, la couche d'eau non agitée. Il s'agit d'une zone aqueuse à renouvellement lent due à la présence de glycoprotéines hydrophiles constitutives du mucus et du glycocalyx (Thomson *et al.*, 2001). Des pompes à protons, localisées au niveau de la membrane apicale des entérocytes, génèrent dans cette zone un gradient de pH et créent un microenvironnement « acide » (pH 5-6) (Shiau *et al.*, 1985). Quand le pH local devient inférieur au pKa des acides gras ces derniers se protonent ce qui va provoquer la dissociation des micelles mixtes de sels biliaires et la translocation des produits de lipolyse vers la bordure en brosse de l'entérocyte (Verkade & Tso, 2001) La captation se fera soit par diffusion passive (acides gras libres principalement) à travers la bicouche de phospholipides de la membrane plasmique (Flip-Flop) (Hamilton, 2003 ; Kamp et Hamilton, 2007) soit par transport facilité via des protéines spécifiques (Stremmel, 1988). Les sels biliaires libérés retournent vers la lumière intestinale et sont réabsorbés majoritairement par transport actif grâce à ASBT (apical sodium dependent bile acid transporter), dans l'iléon terminal (cycle entéro-hépatique) (Thomas *et al.*, 2006).

Des revues récentes ont recensé les différentes protéines de transport de molécules lipophiles dont le rôle a été confirmé ou est en cours d'investigation (Levy *et al.*, 2007; Petit *et al.*, 2007; Iqbal & Hussain, 2009) et sont résumées en Figure 4.

Plusieurs transporteurs semblent impliqués dans la captation des acides gras : FABPpm (plasmic membrane fatty acid-binding protein) (Ho & Storch, 2001), FAT/CD36 (Fatty acid translocase) et FATP4 (Fatty acid transporter protein 4) (Abumrad, 2005; Petit *et al.*, 2007; Iqbal & Hussain, 2009). FABPpm et FATP pourraient aussi être responsables de la captation

des 2-monoglycériles (Ho & Storch, 2001). L'entrée du cholestérol dans l'entérocyte est médiée par SR-B1 (Scavenger Receptor Class B1) (Levy *et al.*, 2007; Haikal *et al.*, 2008; Iqbal & Hussain, 2009), NPC1L1 (Newman-Pick C1 Like 1 protein) (Altmann *et al.*, 2004), et potentiellement par CD36 (Levy *et al.*, 2007; Nassir *et al.*, 2007). SRB1, NPC1L1 et ABC-A1 (ATP-Binding cassette transporter A1) semblent aussi intervenir dans le transport de la vitamine E (Reboul *et al.*, 2006; Narushima *et al.*, 2008; Reboul *et al.*, 2009). Le mécanisme d'entrée des lysophospholipides et du rétinol est encore mal connu.

Figure 4 : Captation des molécules lipophiles à travers la bordure en brosse de l'entérocyte d'après Iqbal et Hussain, 2009



Au sein de la membrane plasmique, il existe des microdomaines riches en sphingolipides, en cholestérol et comprenant certaines protéines membranaires. Ces sortes d'îlots peuvent se déplacer latéralement au sein de la membrane à la manière d'un radeau, c'est pourquoi ils sont nommés « radeaux lipidiques » (lipid rafts en anglais). Ces structures particulières forment une sorte de plateforme de fixation de certaines protéines, permettant leur co-localisation et leur interaction. De part cette propriété les « rafts » jouerait un rôle dans la transduction du signal (Brown & London, 1998), dans les interactions avec des pathogènes (Taieb *et al.*, 2004; Danielsen & Hansen, 2008), ou encore dans la modulation de l'absorption intestinale (Garmy *et al.*, 2005).

Une fois dans l'entérocyte, les nutriments lipidiques sont transportés vers les différents organites par différentes protéines cytosoliques comme par exemple la I et L-FABP pour les acides gras, la L-FABP pour lysophospholipides et les 2-monoglycériles, la sterol carrier protein 2 pour le cholestérol (Storch & Xu, 2009). Les acides gras à chaîne longue et monoglycériles seront reconditionnés en triglycériles grâce à la voie des 2-monoglycériles

et au complexe enzymatique « Triglycerides Synthetase », les phospholipides seront reformés soit directement après ré-acylation des lysophospholipides soit via la voie de Kennedy, le cholestérol et les vitamines liposolubles A et E seront ré-estérifiées, et ils participeront à la formation des chylomicrons qui seront ensuite excrétés dans la circulation lymphatique, avant de rejoindre la circulation sanguine (Tso, 1994; Black, 2007; Mansbach & Gorelick, 2007). Les acides gras à courte et moyenne chaîne vont diffuser jusqu'au pôle basolatéral et rejoindre directement la veine porte (Tso, 1994).

## II Les acides gras

Les acides gras sont les constituants majeurs des lipides. Ce sont des acides carboxyliques composés d'une succession de liaisons carbone-carbone plus ou moins saturés en molécules d'hydrogène. C'est cette chaîne carbonée qui confère aux acides gras leur caractère hydrophobe.

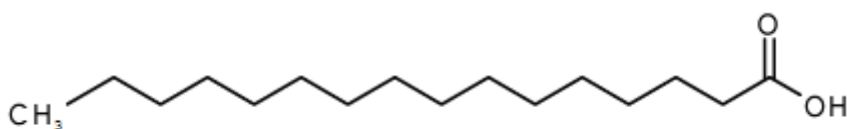
La longueur de cette chaîne est variable (généralement un nombre pair). On distingue les acides gras à chaîne courte (< 8 carbones (C)), moyenne (entre 8 et 12 C), longue (entre 14 et 18 C) ou très longue ( $\geq 20$  C). Les acides gras dans l'alimentation sont principalement présents sous forme estérifiée dans les triglycérides (TG), esters de cholestérol (CE) et phospholipides (PL).

### II.1 Les acides gras saturés

Un acide gras saturé est un acide gras dans lequel toutes les liaisons entre les carbones sont simples et où chaque carbone est totalement saturé en hydrogène. Les acides gras saturés peuvent être d'origine animale ou végétale.

Chaque acide gras saturé possède en général deux noms : un nom usuel qui rappelle souvent son origine (acide palmitique qu'on retrouve dans l'huile de palme) et un nom scientifique décrivant sa structure et issu de la nomenclature chimique (Figure 5).

Figure 5 : Exemple d'un acide gras saturé, l'acide palmitique (ou hexadécanoïque)





En biochimie, la nomenclature la plus courante consiste à écrire « Cx : 0 » où :

- Cx indique qu'il y a « x » atomes de carbone;
- 0 indique qu'il y a zéro double liaison carbone-carbone et par conséquent, que tous les carbones sont saturés en hydrogène

Les acides gras saturés sont synthétisés à partir de l'acétyl Co A avec consommation d'ATP.

## II.2 Les acides gras insaturés

### II.2.1 Définition et nomenclature

Un acide gras insaturé est un acide gras qui comporte une ou plusieurs doubles liaisons (C=C) au sein de sa chaîne aliphatique.

Une nomenclature simple des acides gras insaturés consiste à écrire le nombre de carbones composant la chaîne aliphatique, le nombre de double liaison, et la position de la première double liaison comptée à partir du groupement méthyle terminal.

Exemple : Le C18:2 n-6, l'acide linoléique possède 18 carbones au sein de sa chaîne aliphatique, deux doubles liaisons et la première double liaison est portée par le 6<sup>e</sup> carbone en partant du groupement méthyle terminal.

On parle d'acides gras monoinsaturés (AGMI) lorsqu'il n'y a qu'une seule double liaison et des acides gras polyinsaturés (AGPI) lorsqu'il y en a plusieurs. Il existe 4 familles principales d'acides gras insaturés (Tableau 1).

Tableau 1 : Les principales familles d'acides gras insaturés

<b>Famille</b>	<b>Précurseur</b>
<b>n-3</b>	<b>acide <math>\alpha</math>-linoléique (ALA) C18:3 n-3</b>
<b>n-6</b>	<b>acide linoléique (LA) C18:2 n-6</b>
<b>n-7</b>	<b>acide palmitoléique C16:1 n-7</b>
<b>n-9</b>	<b>acide oléique C18:1 n-9</b>

A partir des précurseurs et grâce à l'action d'élongases (allongeant la chaîne par ajout de 2 carbones) et de désaturases (incorporant une double liaison supplémentaire), l'organisme va pouvoir produire plusieurs dérivés insaturés à longue chaîne (Tableau 2).

Une autre nomenclature se base sur l'action de ces désaturases en indiquant par le symbole  $\Delta$  la ou les places de la ou des doubles liaisons introduites, repérées à partir du groupe

carboxyle. Ces doubles liaisons sont de type cis, et dans le cas d'un acide gras polyinsaturé, deux doubles liaisons sont séparées par un groupement méthylène (CH<sub>2</sub>).

Tableau 2 : Principaux acides gras mono- et polyinsaturés (AGMI et AGPI)

Formule simplifiée	Appellation scientifique	Appellation usuelle
C14:1 n-9	Acide $\Delta$ 9-tétradécénoïque	Acide myristoléique
C16:1 n-7	Acide $\Delta$ 9-hexadécénoïque	Acide palmitoléique
C18:1 n-7	Acide $\Delta$ 11-octadécénoïque	Acide vaccénique
C18:1 n-9	Acide $\Delta$ 9-octadécénoïque	Acide oléique
C18:2 n-6	Acide $\Delta$ 9,12-octadécadiénoïque	Acide linoléique
C18:3 n-3	Acide $\Delta$ 9,12,15-octadécatriénoïque	Acide $\alpha$ -linoléique
C20:3 n-6	Acide $\Delta$ 5,8,11-eicosatriénoïque	Acide dihomogamma-linoléique
C20:4 n-6	Acide $\Delta$ 5,8,11,14-eicosatétraénoïque	Acide arachidonique
C20:5 n-3	Acide $\Delta$ 5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque	Acide eicosapentaénoïque
C22:5 n-3	Acide $\Delta$ 7,10,13,16,19-docosapentaénoïque	Acide docosapentaénoïque
C22:6 n-3	Acide $\Delta$ 4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque	Acide docosahexaénoïque
C24:1 n-9	Acide $\Delta$ 15-tétracosaoïque	Acide nervonique

La spécificité des acides gras insaturés tient à la présence de doubles liaisons et de leurs positions. Dans une double liaison entre deux atomes de carbone, chacun des atomes va mettre en commun un électron. Les deux électrons partagés forment un doublet liant qui confère une grande stabilité mais également une grande rigidité à la molécule.

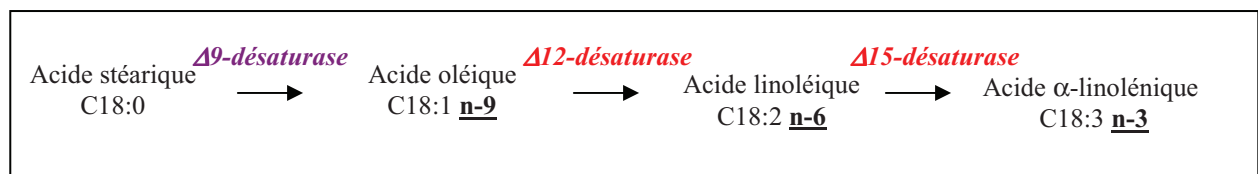
Ce doublet va être une cible potentielle pour les radicaux libres ou espèce réactive oxygénée (ROS). Les ROS sont des molécules qui comportent un électron qui ne participe à aucune liaison et confère de ce fait une grande instabilité et une grande réactivité chimique. Ils vont se fixer sur la molécule et former un acide gras peroxydé. Plus un acide gras est insaturé plus il sera oxydable. Cette peroxydation lipidique sera responsable d'une réduction de la qualité organoleptique, et peut entraîner la formation de divers composés plus ou moins délétères. Par exemple, le 4-hydroxynonéal (4-HNE) et le 4-hydroxyhexenal (4-HHE) sont des aldéhydes cytotoxiques issus de l'oxydation des acides gras polyinsaturés des familles n-6 et n-3 (Guichardant *et al.*, 2006), respectivement. Il existe cependant des antioxydants comme la vitamine E qui vont capter le dioxygène à la place de l'AGPI et ainsi le protéger de l'oxydation (Leger, 2000).

## II.2.2 Biosynthèse des acides gras insaturés

L'acide oléique (C18:1 n-9), et l'acide palmitoléique (C16:1 n-7) sont respectivement les précurseurs des acides gras polyinsaturés des familles n-9 et n-7. Ils sont synthétisés à partir des acides gras saturés correspondants, à savoir l'acide stéarique et l'acide palmitique, sous l'action d'une  $\Delta 9$  désaturase.

La synthèse des précurseurs des AGPI n-6 et n-3 nécessite également l'action de désaturases ( $\Delta 12$  et  $\Delta 15$  désaturases) (Figure 6).

Figure 6: Voies de synthèse des acides linoléique et  $\alpha$ -linoléinique (Wallis *et al.*, 2002)

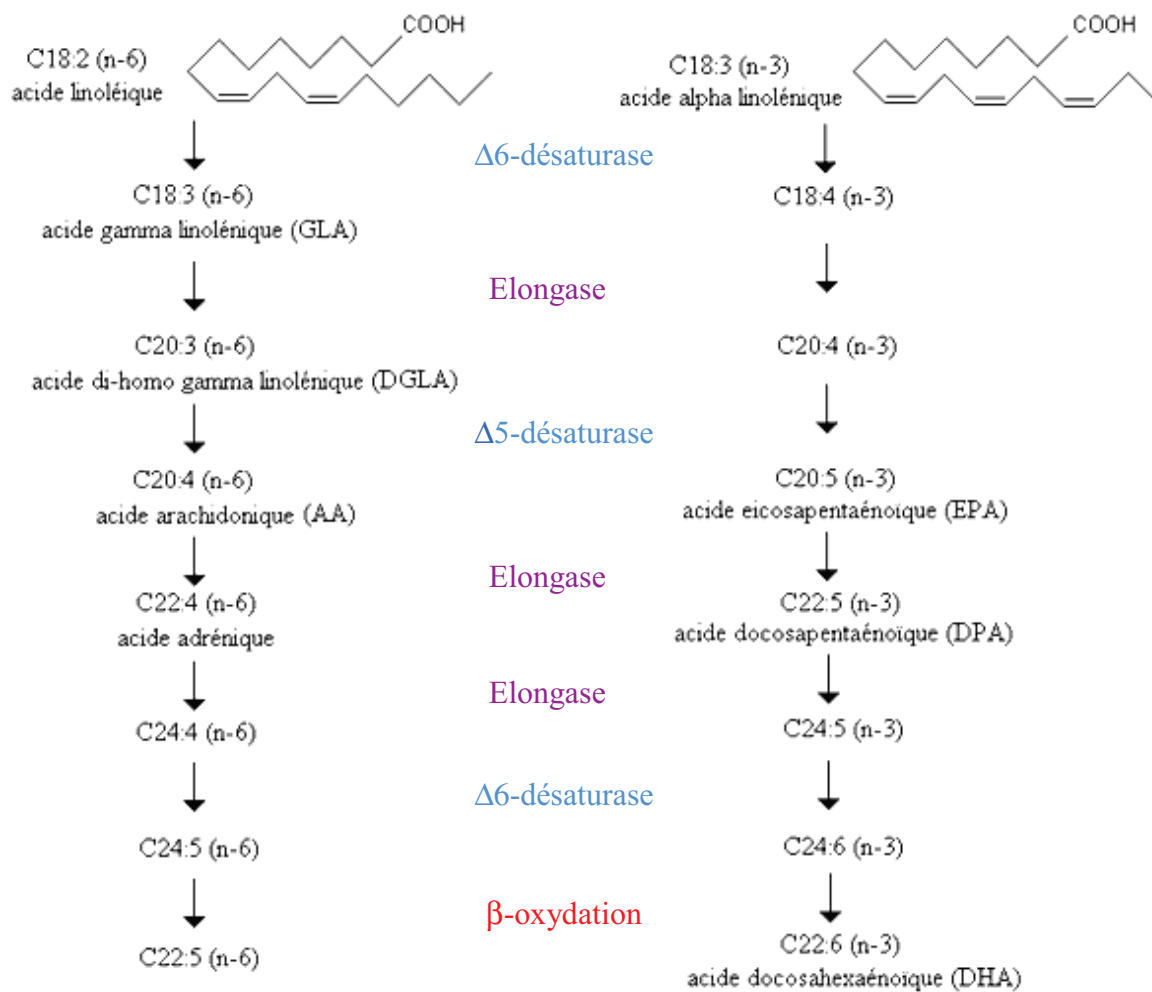


La  $\Delta 9$  désaturase est présente chez l'homme (Strittmatter *et al.*, 1974) contrairement aux  $\Delta 12$  et  $\Delta 15$  désaturases présentes seulement chez les végétaux et certains invertébrés (Wallis *et al.*, 2002). Chez l'homme, les acides gras précurseurs des voies n-6 et n-3 doivent donc être apportés par l'alimentation.

Les voies de biosynthèse des dérivés n-6 et n-3 à partir des précurseurs utilisent les mêmes enzymes d'élongation et de désaturation, ce qui crée une compétition entre les deux familles (Figure 7) (Voss *et al.*, 1991; Sprecher *et al.*, 1995; Luthria *et al.*, 1996). Cette compétition s'observe principalement au niveau de l'étape de désaturation en position  $\Delta 6$  des deux précurseurs. En effet, la  $\Delta 6$  désaturase a une meilleure affinité pour les acides gras les plus insaturés donc pour l'ALA (n-3) par rapport à LA (n-6), cependant une surabondance de LA dans le régime peut ralentir la synthèse des dérivés à longue chaîne de la famille des n-3 et inversement (Horrobin, 1993; Lecerf, 2007).

La biosynthèse des dérivés polyinsaturés n-6 et n-3 a lieu principalement au niveau du réticulum endoplasmique de la cellule, cependant la  $\beta$ -oxydation des dérivés à très longue chaîne se déroule dans les peroxyosomes.

Figure 7: Voies de biosynthèse des acides polyinsaturés n-6 et n-3 chez l'homme



### II.2.3 Les voies n-6 et n-3 : conversion et rétroconversion

Il a été montré que s'il n'y avait pas de compétition enzymatique entre les deux familles d'acides gras polyinsaturés, l'homme serait capable de transformer 1 g d'ALA en 0,3 g d'EPA et 0,1 g de DHA (Crawford *et al.*, 1987). La présence de cette compétition enzymatique diminue fortement le rendement de conversion de l'ALA et l'homme ne serait capable de synthétiser que 0,14 g d'EPA à partir d'1 g d'ALA (McKeigue, 1994) soit un rendement de 14%. Mais les valeurs réelles sont encore plus faibles puisque la conversion de l'ALA *in vivo* ne formerait que 0,2 à 6 % d'EPA et entre 0,02 et 0,05% de DHA dans la plupart des cas (Salem *et al.*, 1999; Pawlosky *et al.*, 2001; Brenna, 2002; Cunnane, 2003; Burdge, 2006) et jusqu'à 4% de DHA dans certaines études (Emken *et al.*, 1994).

Outre l'impact des conditions nutritionnelles (un apport élevé en LA inhibe par compétition de substrat la biotransformation de l'ALA), cette capacité de conversion est variable selon une multitude de paramètres :

- le sexe et l'âge (plus efficace chez la femme en âge de procréer et diminue avec l'âge) (Tableau 3)
- les conditions physiologiques (faible activité des désaturases chez le prématuré par rapport à ses besoins) (Hoffman *et al.*, 1993)
- les besoins en DHA (plus efficace chez la femme enceinte ou allaitante) (Williams & Burdge, 2006)
- les conditions pathologiques (enzyme insulino-sensible non activée en cas d'insulinopénie, déficit chez le sujet dénutri)
- l'espèce animale (absente chez les félidés et les poissons carnivores) (Bandyopadhyay *et al.*, 1982; Pawlosky *et al.*, 1994).

**Tableau 3** : Taux de conversion de l'ALA en EPA et DHA suivant le sexe et l'âge (exprimé en %) (Pawlosky *et al.*, 2001; Brenna, 2002; Burdge & Wootton, 2003)

	<b>EPA</b>	<b>DHA</b>
<b>Femme jeune</b>	<b>21</b>	<b>9</b>
<b>Homme jeune</b>	<b>8</b>	<b>~1</b>
<b>Homme âgé</b>	<b>2,8</b>	<b>~1</b>

Le DHA synthétisé, ou apporté par l'alimentation, a la capacité de se rétro-converter en EPA comme l'on montré plusieurs études dans lesquelles une supplémentation nutritionnelle en DHA va augmenter non seulement le taux de DHA mais également le taux d'EPA (Christophe *et al.*, 1992; Henderson *et al.*, 1994; Katz *et al.*, 1996).

Cependant, le taux de rétroconversion est plus difficile à estimer car, selon les études, la quantité, le type et la durée de supplémentation en DHA diffèrent ainsi que la condition du sujet (sexe, âge, statut hormonal) (Hagve & Christophersen, 1986; Voss *et al.*, 1992; Conquer & Holub, 1997).

#### II.2.4 Les acides gras polyinsaturés essentiels

L'observation de maladies de carences chez l'homme et l'animal, résultant d'un régime inapproprié, a permis de supposer que certains acides gras étaient essentiels pour le bon fonctionnement de l'organisme.

Pour la famille des acides gras polyinsaturés n-6, il a été observé qu'en soumettant des jeunes rats à un régime dépourvu en lipides, ceux-ci présentaient une croissance ralentie puis arrêtée, une desquamation de l'épiderme accompagnée d'alopecie et d'une perte d'eau trans-épidermique importante, la stérilité chez les mâles, des difficultés à mettre bas pour les femelles (avec mortalité périnatale) et une fragilité du système sanguin avec des hémorragies. L'ajout d'acide linoléique au régime lipidoprive prévenait ou guérissait ces symptômes et a donc démontré le caractère essentiel de l'acide linoléique (Burr & Burr, 1929). Ces observations ont été confirmées un peu plus tard chez des nourrissons, en effet ces derniers présentaient un gain de poids journalier diminué, une peau sèche et squameuse, des lésions eczémateuses et une chute de cheveux lorsque leur régime alimentaire était très pauvre en acide linoléique. Les symptômes étaient corrigés par un apport d'acide linoléique ou d'acide arachidonique (Hansen *et al.*, 1958).

En ce qui concerne les acides gras polyinsaturés n-3, leur caractère « essentiel » a été observé plus tardivement. Une fillette ayant reçu pendant trois mois une alimentation parentérale totale très pauvre en acide  $\alpha$ -linoléique présentait une faiblesse généralisée, une inaptitude à marcher et une vision trouble. Un apport en acide  $\alpha$ -linoléique a permis de corriger le syndrome neurologique (Holman *et al.*, 1982).

Depuis cette époque, on a défini les précurseurs des deux familles comme des acides gras essentiels.

## II.2.5 Importance de certains dérivés à longue chaîne d'AGPI

Certains acides gras polyinsaturés à très longue chaîne sont particulièrement primordiaux car ils assurent différentes fonctions (Coste *et al.*, 2004) :

- L'AA (C20:4 n-6) et le DHA (C22:6 n-3) sont préférentiellement incorporés en position sn-2 des phospholipides membranaires. Le nombre élevé de doubles liaisons leur confère une certaine flexibilité et ils peuvent ainsi occuper un espace moléculaire plus important. Cette propriété va permettre d'augmenter la fluidité de la membrane et de modifier ainsi les propriétés physico-chimiques des membranes cellulaires. La fluidité membranaire est importante car elle conditionne l'activité des protéines transmembranaires comme les canaux ioniques et les récepteurs membranaires (Djemli-Shipkolye *et al.*, 2003).

- Des études de supplémentation d'EPA (C20:5 n-3) et de DHA in vivo (Fan *et al.*, 2003) et in vitro (Schley *et al.*, 2007) ont montré des effets de ces acides gras sur la composition en

lipides (diminution des sphingolipides, augmentation des phosphatidyl choline) mais également sur la composition en acides gras des radeaux lipidiques présents au sein de la bicouche membranaire des cellules (Calder & Yaqoob, 2007).

- L'acide di-homo gamma linoléique (DGLA, C20:3 n-6), l'AA et l'EPA sont respectivement les précurseurs des familles 1, 2 et 3 des eïcosanoïdes. Ces trois acides gras sont transformés en prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes, et leucotriènes par la voie des cyclo-oxygénases et celle des lipoxygénases, respectivement. Ces molécules interviennent dans différentes voies comme l'inflammation, l'agrégation plaquettaire et l'hémodynamique (Smith *et al.*, 1991; Lagarde *et al.*, 1997; Vericel *et al.*, 1999).

Les actions de l'EPA et de l'AA étant complémentaires et leurs voies métaboliques utilisant les mêmes enzymes il s'en suit qu'une supplémentation en EPA, entraîne, par compétition, une inhibition de la synthèse de des métabolites issus de l'AA et une réduction de leurs effets inflammatoire et thrombotique (Lagarde & Vericel, 2004).

- L'EPA et le DHA sont également à l'origine de la biosynthèse de molécules anti-inflammatoires à travers la biosynthèse de résolvines E pour l'EPA et de résolvines D et protectines D pour le DHA (Serhan *et al.*, 2004).

- Enfin, les acides gras polyinsaturés ainsi que leurs dérivés (eïco- et docosanoïdes) sont des ligands de plusieurs facteurs de transcription nucléaire comme les PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) (Krey *et al.*, 1997; Grimaldi, 2001), le NF-κB (Nuclear Factor-κB) (Lee *et al.*, 2004) ou encore HNF4α (Hepatic Nuclear Factor) (Swagell *et al.*, 2007). Ces facteurs de transcription ont ensuite un rôle important de régulation dans différentes voies métaboliques : oxydation cellulaire, lipogenèse, croissance et apoptose cellulaire, synthèse de cytokines (Grimaldi, 2001).

Ces acides gras polyinsaturés à longue chaîne ne sont pas considérés comme « essentiels », mais leur action sur des mécanismes importants au niveau cellulaire les rend néanmoins indispensables.

## II.2.6 Recommandations nutritionnelles et sources d'acides gras polyinsaturés

Les deux précurseurs des acides gras polyinsaturés n-6 et n-3 ne pouvant être synthétisés *de novo* par l'homme et les animaux, un apport minimal et régulier par l'alimentation est donc nécessaire. Cependant, pour limiter la compétition entre les deux voies métaboliques, des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras polyinsaturés ont été fixés pour la

population française à partir des données expérimentales, épidémiologiques et cliniques (Tableau 4).

Tableau 4 : Résumé des apports nutritionnels conseillés en acides gras en France chez l'homme adulte (Martin, 2001)

<b>Pour l'homme adulte</b>	<b>Lipides*</b>	<b>AGS</b>	<b>AGMI</b>	<b>LA</b>	<b>ALA</b>	<b>AGPI-LC (n-6+n-3)</b>	<b>Dont DHA</b>
<b>g/J</b>	81	19,5	49	10	2	0,5	0,12
<b>% AET</b>	33%	8%	20%	4%	0,8%	0,2%	0,05%

\*ensemble des acides gras (hors cholestérol)

Cependant, les recommandations nutritionnelles sont une notion très largement discutée, elles varient d'un pays à l'autre et d'une organisation à l'autre (Tableau 5).

Tableau 5 : Recommandations nationales et internationales en acides gras polyinsaturés pour un adulte en g/j ou en % apport énergétique total (AET)

	<b>LA (n-6)</b>	<b>ALA (n-3)</b>	<b>AGPI-LC (n-3)</b>	<b>n-6/n-3</b>
<b>ANC (Recommandations Françaises) (Martin, 2001)</b>	10	2	0,5 (dont 0,12 DHA)	5
<b>Eurodiet (Recommandations européennes) (Eurodiet, 2001)</b>	4-8% AET	2	0,2	/
<b>Australie/Nouvelle Zélande (2006) (<a href="http://www.nhmrc.gov.au">http://www.nhmrc.gov.au</a>)</b>	8-13	0,8-1,3	0,41-0,61	/
<b>USDA DRI (Recommandations américaines) (Trumbo, 2002)</b>	5-10% AET	0,6-1,2% AET	/	/
<b>ISSFAL 2004 (Recommandations mondiales) (<a href="http://www.issfal.org.uk">http://www.issfal.org.uk</a>)</b>	2% AET	0,7% AET	0,5 (min 0,22 DHA)	2
<b>FAO/WHO (Recommandations mondiales) (Elmadfa &amp; Kornsteiner, 2009)</b>	2	>0,5	/	5-10

Malgré les différences entre les seuils de recommandations, la tendance générale est à l'augmentation d'acides gras n-3 par rapport à celle des n-6. Cependant, ces recommandations sont difficiles à appliquer sur le terrain puisque l'alimentation actuelle est trop riche en certaines huiles végétales qui apportent majoritairement de l'acide linoléique. Ainsi, le rapport LA/ALA est en moyenne dans l'alimentation de 11/1 (mais s'élève souvent jusqu'à 20/1), ce qui entraîne une compétition pour la biosynthèse des AGPI à longue chaîne



au niveau de la  $\Delta 6$  désaturase aux détriments des acides gras n-3. Ce fort rapport semblerait impliqué dans le développement de l'obésité ; en effet un déséquilibre en faveur des acides gras n-6 durant la grossesse et/ou l'allaitement aurait une action sur les adipocytes de l'enfant et pourrait entraîner une prédisposition à son obésité future (Ailhaud & Guesnet, 2004).

Tableau 6 : Teneur en acide linoléique et  $\alpha$ -linoléique d'huiles végétales et d'autres aliments (Ciquel 2002)

Sources alimentaires	Teneur en g pour 100 g	
	Acide linoléique (LA)	Acide $\alpha$ -linoléique (ALA)
<b>Huile d'olive</b>	12,9	0,85
<b>Huile d'arachide</b>	30,5	0
<b>Huile de colza</b>	21,2	9,6
<b>Huile de noix</b>	56,7	12,3
<b>Huile de pépins de raisin</b>	67,3	0,3
<b>Huile de tournesol</b>	64,1	0,05
<b>Beurre doux</b>	1,16	0,46
<b>Margarines végétales</b>	15-20	0-2
<b>Laits/Yaourts</b>	0,07-0,17	0,02-0,07
<b>Fromages</b>	0,26-0,62	0,27-0,7
<b>Légumes</b>	0,012-0,15	0,040-0,86
<b>Légumineuses</b>	0,072-2,59	0,027-0,99
<b>Fruits secs</b>	0,44-38,09	Traces-9,08
<b>Œufs</b>	0,95-1,59	0,03-0,08
<b>Viandes</b>	0,1-1,99	0,02-0,36
<b>Poissons</b>	0,029-0,59	0,05-0,43

Les précurseurs des acides gras polyinsaturés se trouvent principalement dans les huiles végétales mais dans des proportions très variables, et ainsi un choix judicieux dans ces huiles peut permettre de réduire notre consommation de LA et d'augmenter celle en ALA. Le LA se retrouve, par exemple, en grande quantité dans les huiles de pépins de raisin et de tournesol (de 64,1 à 67,3 g pour 100 g) mais en quantité plus faible dans l'huile d'olive (12,9%). De même le ALA est retrouvé en quantité faible ou inexistante dans les huiles d'arachide et de pépins de raisins (0 à 0,3%) mais en quantité bien plus importante dans les huiles de colza, de noix, de soja, de caméline et de lin (respectivement 9,2%, 12,3%, 7,8%, 38%, 22,8%) (Kris-Etherton *et al.*, 2000). Les précurseurs des n-6 et n-3 sont aussi présents, mais dans des quantités plus faibles, dans les beurres et margarines, les produits laitiers et fromages, les légumes, les légumineuses, les fruits secs, les œufs, les viandes et les poissons (Tableau 6).

En ce qui concerne les dérivés à longue et très longue chaîne, pour la famille des n-6, les sources principales sont la viande, la volaille et les œufs, alors que les n-3 sont plutôt présents au niveau des poissons et fruits de mer (Astorg *et al.*, 2004). Cependant les teneurs en acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la famille n-3 sont très variables dans les différents produits marins (Tableau 7) nécessitant une consommation entre 3 g/j de caviar à 900 g/j de cuisses de grenouilles/bulot pour atteindre l'ANC en DHA, fixé à 120 mg/j pour l'adulte sain par l'AFSSA.

Tableau 7 : Teneur en acide eicosapentaénoïque et acide docosahexaénoïque dans quelques produits de la mer (Données USDA-CIQUAL) (Coste, 2005a)

Sources alimentaires		Teneur en g pour 100 g	
		Acide eicosapentaénoïque (EPA)	Acide docosahexaénoïque (DHA)
Poissons gras (>5% lipides)	Thon albacore	0,037	0,18
	Saumon rose	0,42	0,59
	Hareng	2,04	0,68
	Thon bleu	0,28	0,89
	Maquereau	0,51-0,9	0,93-1,401
	Saumon élevage	0,32	1,12
	Saumon sauvage	0,62	1,29
Poissons maigres à semi-gras (<5%lipides)	Carpe	0,19	0,10
	Sole	0,03	0,16
	Cabillaud	0,07	0,19
	Truite	0,20	0,53
Autres produits marins	Cuisse de grenouille/Bulot	0,014/0,004	0,020/0,006
	Crevettes	0,21	0,16
	Huître d'élevage	0,18	0,20
	Huître sauvage	0,27	0,29
	Caviar	2,74	3,80

On peut noter certaines différences en fonction des conditions de vie (sauvage/élevage) et des sous espèces. Ce dernier facteur semble le plus important car le saumon rose présente des teneurs en DHA très différentes du saumon d'élevage ou sauvage ; de même le thon albacore montre un profil en EPA et DHA nettement plus faible que le thon bleu.

Cependant la consommation de certains produits marins est à limiter malgré leurs teneurs en EPA et DHA car ils sont riches en méthylmercure, un composé toxique lié aux acides aminés des tissus musculaires de ces poissons et fruits de mer qui s'accumule tout au long de la chaîne alimentaire. Le méthylmercure ne peut pas être éliminé par lavage ou lorsque ces

aliments sont cuisinés (friture, cuisson, fumage, rôtissage). Il est principalement présent chez les poissons de taille importante comme le requin (1,33 $\mu$ g Hg/g), l'espadon (0,95 $\mu$ g Hg/g) ou le thon albacore (0,5 $\mu$ g Hg/g) (Mahaffey, 2004). D'autres composés toxiques, comme les dioxines et biphényles polychlorés (BPC) sont présents à fortes doses dans les poissons comme le hareng, et le saumon sauvage ou d'élevage (Koletzko *et al.*, 2007). D'où l'intérêt d'utiliser pour certaines population dont le besoin en DHA est très élevé (nouveau-né, femmes enceintes ou allaitantes) des compléments alimentaires à base d'huile de micro-algues composés de triglycérides riches en DHA (Martek, USA), ou de phospholipides aviaires enrichis (ASL, France).

### III La Mucoviscidose

#### III.1 Données épidémiologiques

La mucoviscidose (Cystic Fibrosis en anglais) est la plus fréquente des maladies autosomiques récessives graves dans la population caucasienne, où elle touche environ 1 enfant sur 2500 naissances et dans lesquels 1 sujet sur 25 est hétérozygote (Tableau 8).

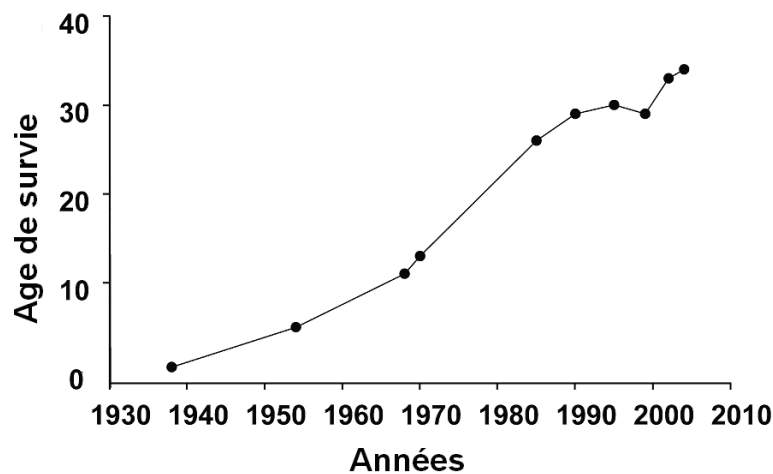
Tableau 8 : Epidémiologie de la mucoviscidose

<b>Population</b>	<b>Incidence à la naissance</b>	<b>Fréquence des hétérozygotes</b>
<b>Caucasiens</b>	1 / 2500	1 / 25
<b>Moyen Orient</b>	1 / 4400	1 / 33
<b>Hispaniques</b>	1 / 8500	1 / 46
<b>Noirs américains/Africains</b>	1 / 20000	1 / 70
<b>Asiatiques</b>	1 / 32400	1 / 90

En France, un bébé par jour naît atteint de la maladie. On estime le nombre de patients, en France, à 6000 enfants ou jeunes adultes (site web Vaincre La Mucoviscidose <http://www.vaincrelamuco.org/>). La fréquence de la maladie varie selon les groupes ethniques : elle est plus fréquente dans les populations d'origine nord-européenne et moins fréquente dans les autres populations. Toutefois, on trouve un nombre significatif d'individus affectés par la maladie dans le sud de l'Europe, parmi la population juive ashkénaze et parmi la population noire américaine (Tsui & Buchwald, 1991).

Grâce à une meilleure prise en charge des symptômes et de leur évolution, la survie des sujets atteints de la mucoviscidose s'est considérablement améliorée depuis 1938 (Davis, 2006). Autrefois, l'espérance de vie des enfants atteints ne dépassait pas 7 ans. Aujourd'hui, un bébé qui naît avec la maladie peut espérer vivre jusqu'à 42 ans. Néanmoins, l'âge moyen de décès est de 24 ans (Figure 8).

Figure 8 : Evolution de l'âge moyen de survie des patients atteints de mucoviscidose (Davis, 2006)



### III.2 Du gène à la protéine CFTR

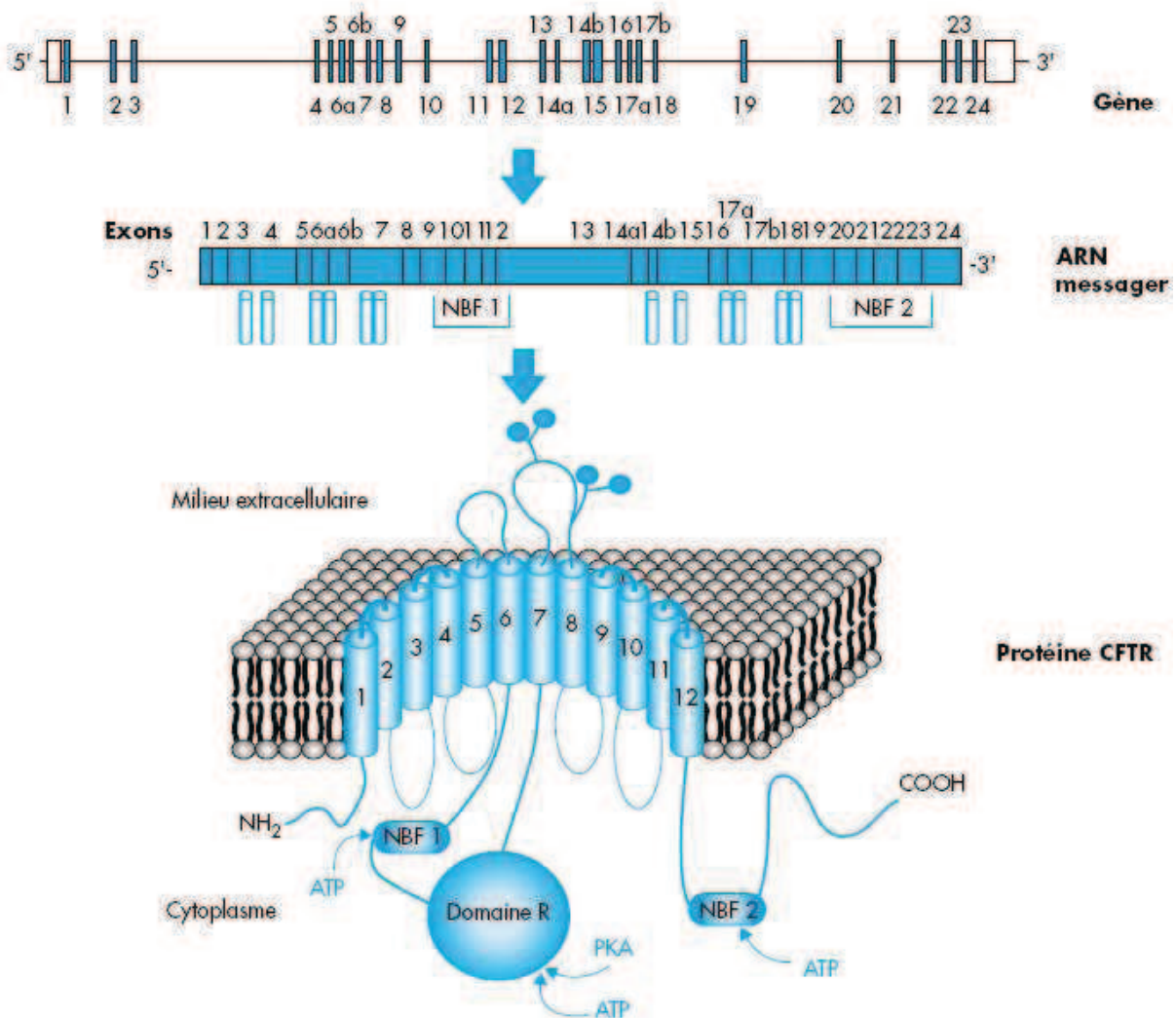
Le caractère héréditaire de la mucoviscidose est établi de longue date, et dès le début des années 80, plusieurs grandes équipes ont travaillé sur l'identification du gène responsable de la maladie.

Les progrès réalisés en génétique fondamentale et notamment les travaux des équipes de B.J. Wainwright et J. Riordan ont permis la localisation du gène *cftr* sur le bras long du chromosome 7, situé en position 7q31. Le gène a été ensuite cloné et séquencé grâce à une démarche alors originale de génétique inverse ou clonage positionnel (Wainwright *et al.*, 1985; Riordan *et al.*, 1989). Il s'agit d'un long gène morcelé en 27 exons (Figure 9) répartis sur un territoire génomique de 250 Kb. L'ARN (Acide RiboNucléique) messenger est long de 6,5 Kb et code pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator).

Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire intégrale de 1480 acides aminés pour un poids moléculaire de 170kD et à 5 domaines traversant la bicouche membranaire lipidique de part en part. Les différents domaines de la protéine sont définis selon ses séquences intra- et

extra-cytoplasmiques : deux parties symétriques répétées, contenant chacune des séquences transmembranaires suivies d'une région intracytoplasmique possédant des séquences pour la fixation de l'ATP (domaines **NBF1** et **NBF2**, pour Nucleotide-Binding Fold). Ces deux domaines sont reliés par un domaine médian cytoplasmique, le **domaine R** (Figure 9) (Riordan & Chang, 1992). Avec ses deux domaines de liaison à l'ATP et ses six hélices transmembranaires la protéine CFTR s'apparente à la famille de transporteurs membranaires ABC (ATP Binding Cassette).

Figure 9: Du gène à la protéine CFTR (Girodon-Boulandet & Costa, 2005)



À ce jour, près de 1500 mutations, réparties tout le long du gène *cftr*, ont été recensées par un consortium international ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr)).

Une expression ou une fonctionnalité défectueuse de la protéine CFTR entraîne plusieurs manifestations physiologiques car elle joue un rôle essentiel dans l'équilibre ionique des cellules où elle est exprimée.

En effet, elle possède une activité intrinsèque de canal ionique perméable à divers anions, dont le chlorure qui est le plus abondant dans les liquides physiologiques. Le transport du chlore s'effectue selon un gradient électrochimique et grâce à l'hydrolyse de l'ATP. L'AMPC (adénosine monophosphate cyclique) intracellulaire, second messenger d'une multitude d'hormones ayant un récepteur membranaire, constitue le principal régulateur physiologique connu du canal CFTR, capable d'activer la conductance du chlorure (Sato & Sato, 1984; Quinton, 1990). On parle alors du CFTR comme le canal chlorure AMPC-dépendant.

De plus, il a été également démontré que le CFTR exerce un rôle régulateur sur d'autres canaux ioniques. L'ORCC (*Outwardly Rectifying Chloride Channel* ou canal rectifiant dans le sens sortant), un canal ionique bien distinct du CFTR, est défectueux chez les patients atteints de mucoviscidose (Schwiebert *et al.*, 1995). Une hyperactivité de l'ENaC (Epithelial Na<sup>+</sup> Channel), le canal sodium de localisation membranaire apicale, sensible à l'amiloride (Stutts *et al.*, 1995), a été démontrée dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. Cette hyperactivité a été corrélée avec l'absence de la protéine CFTR. D'autres fonctions de la protéine CFTR sont encore en cours d'investigation.

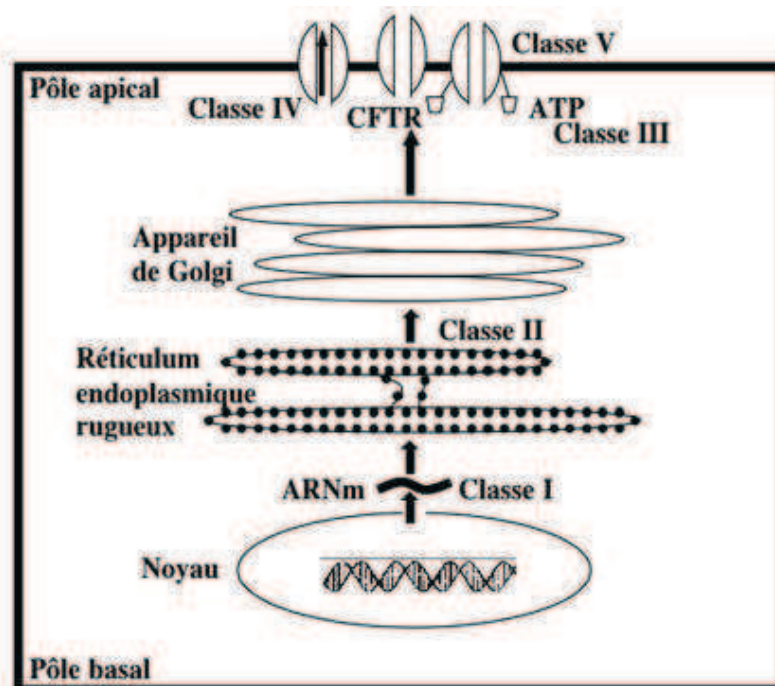
Bien que le CFTR soit présent dans quelques tissus non-épithéliaux comme le cœur, certains neurones du système nerveux central et les lymphocytes, son expression est principalement limitée aux épithéliums. Sa localisation est exclusivement restreinte au domaine apical de la membrane cellulaire et aux endosomes. La protéine CFTR est exprimée au niveau de la portion tubulaire excrétrice des glandes sudoripares, des cryptes intestinales, des ductules du pancréas exocrine, des canaux hépatiques, de la vésicule biliaire, des glandes salivaires, des canaux déférents dans le tractus génital mâle. Dans l'arbre respiratoire, le CFTR s'exprime dans de nombreuses cellules bronchiques (cellules ciliées, cellules de canaux collecteurs glandulaires et cellules glandulaires séreuses), bronchiolaires (cellules de Clara et cellules ciliées) ou alvéolaires (pneumocytes de type II). Un rôle important du CFTR a été récemment rapporté au niveau du cœur (Duan, 2009) ainsi qu'au niveau des reins (Jouret & Devuyst, 2009).

Tous les types de mutations ont été retrouvés : mutations non-sens, mutations altérant l'épissage, micro-insertions et microdélétions décalant le cadre de lecture, mutations faux-sens et remaniements de grande taille (délétions, insertions, duplications).

Les modifications au niveau du génotype vont se répercuter sur l'expression et la fonction de la protéine CFTR. Six classes de mutations sont ainsi distinguées (Figure 10):

- Classe I, mutations non sens ou décalant le cadre de lecture avec transcription d'un ARNm instable ou tronqué aboutissant à la non-expression de la protéine CFTR.
- Classe II, mutations altérant le processus de maturation cellulaire de la protéine et résultant en une dégradation prématurée de la protéine avant son adressage à la membrane.
- Classe III, mutations dans les domaines de fixation pour l'ATP ou dans le domaine de régulation conduisant à un canal chlorure ayant un défaut de régulation.
- Classe IV, mutations dans les domaines transmembranaires perturbant la perméabilité de CFTR et altérant la conduction des ions chlorure.
- Classe V, mutations conduisant à une diminution de l'expression de protéines CFTR fonctionnelles à la membrane suite à un épissage anormal ou alternatif de l'ARNm.
- Classe VI, turn-over plus rapide de CFTR à la membrane

Figure 10 : Les différentes classes de mutations (Coste, 2005b)



La mutation F508del, décrite dès 1989, qui correspond à la perte d'un résidu phénylalanine en position 508 de la protéine, est retrouvée en France, globalement, sur 67 % des chromosomes mutés chez les patients atteints de mucoviscidose (Estivill *et al.*, 1997). Ainsi, environ 45 % des malades portent cette mutation à l'état homozygote. Les autres patients

sont pour la plupart hétérozygotes composites, c'est-à-dire porteurs de deux mutations différentes. Cette mutation est retrouvée dans près de deux tiers des cas avec des variations importantes selon les populations étudiées ; ainsi on retrouve un gradient de répartition suivant une direction nord-ouest/sud-est en Europe, avec par exemple 88% de F508del au Danemark, 81% en Bretagne et 50% en Italie. Seules quatre autres mutations, hors F508del, représentent plus de 1% des cas, il s'agit de G542X, G551D, N1303K et W1282X (Cystic fibrosis Mutation Database Statistics). Toutes les autres mutations sont rares, voire exceptionnelles, uniquement retrouvées au sein d'une seule famille.

La mutation F508del fait partie de la classe II car la délétion de ses trois bases en position 508 est indispensable au bon repliement de la protéine CFTR. Actuellement, on considère que cette mutation fait aussi partie de la classe III. En effet, suite à des manœuvres diverses aboutissant à corriger l'adressage de cette protéine mutée à la membrane apicale, on lui reconnaît une certaine fonctionnalité bien que très réduite (Dalemans *et al.*, 1991).

En général, on considère que les mutations de classe I à III sont des mutations sévères, souvent associées à des manifestations cliniques graves. Par contre, les mutations de classe IV à VI sont considérées comme légères. En effet, la mutation A455E, typique de la classe V et deuxième plus fréquente mutation du gène *cftr* dans la population hollandaise, est associée à des manifestations cliniques beaucoup moins graves.

### III.3 Description des manifestations physiologiques de la mucoviscidose

Les déséquilibres ioniques engendrés par le dysfonctionnement de la protéine CFTR vont affecter plus ou moins sévèrement différents organes comme les glandes sudoripares, les poumons, les intestins, le pancréas, le foie et l'appareil reproducteur, provoquant différents troubles voire des lésions irréversibles.

En 1953, une modification de la composition ionique de la sueur a été décrite (Di Sant'Agnesse *et al.*, 1953) due à une réabsorption réduite, voire absente, des ions chlorure, dans la portion tubulaire excrétrice de la glande sudoripare des sujets atteints de mucoviscidose (Quinton & Bijman, 1983). Cette observation a donné lieu à un test de la sueur encore utilisé à l'heure actuelle dans le procédé de dépistage de la mucoviscidose.

L'affection pulmonaire et ses complications sont les causes létales prédominantes de la mucoviscidose. Dans les poumons, la lumière des voies aériennes est bordée par un film



liquidien de 10 à 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Ce film se compose d'un mélange de sécrétions provenant des cellules épithéliales de surface et des glandes sous muqueuses. Ce film appelé communément mucus comprend des glycoprotéines et des phospholipides de type surfactant associés à de l'eau et des électrolytes. Ce mucus sert à piéger les particules exogènes présentes dans l'air inspiré (bactéries, virus, poussières...) et ses propriétés physico-chimiques permettent sa mobilisation par le réseau ciliaire de surface pour évacuer les particules piégées, ce processus est appelée « clairance muco-ciliaire ». Ce fluide est composé de deux couches : une couche hydrique profonde, sur la surface apicale, dont l'épaisseur correspond à la longueur des cils (peu visqueux) ; et une couche superficielle (épais et muqueux), qui glisse sur la couche hydrique profonde pour permettre la clairance.

Dans la mucoviscidose, les anomalies électrophysiologiques multiples touchant essentiellement la sécrétion de chlorure et l'entrée de sodium dans la cellule vont provoquer une augmentation de la réabsorption d'eau (Liedtke, 1992). Cela va favoriser l'épaississement des sécrétions muqueuses et donc l'amincissement de la couche hydrique profonde. Le mucus est de ce fait beaucoup plus dense, le battement coordonné des cils est ralenti, et cela entraîne une diminution de la clairance muco-ciliaire (Knowles *et al.*, 1983) (Griese, 1999).

Outre l'obstruction des voies respiratoires, la stagnation du mucus épaissi dans les voies respiratoires sera un environnement particulièrement propice au développement bactérien et infectieux. Cette situation entraînera une inflammation chronique des bronches avec surinfection bactérienne fréquente (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) (Doggett, 1969; Doggett & Harrison, 1972; Hoiby, 1988), des difficultés à expirer et des expectorations purulentes permanentes, des abcès voire des kystes pulmonaires. La fibrose post-inflammatoire aboutit à une insuffisance respiratoire majeure. Il résulte souvent une déformation des doigts et des ongles témoignant d'une dilatation des bronches (Nakamura *et al.*, 2002).

La morbidité causée par la mucoviscidose est le plus souvent liée aux conséquences pulmonaires mais également à une insuffisance pancréatique exocrine dont le retentissement digestif compromet l'état nutritionnel (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2000). En effet, au niveau pancréatique, la diminution de la sécrétion de chlorure entraîne une détérioration de la production de bicarbonate, et finalement une incapacité à hydrater et à alcaliniser de façon adéquate les sécrétions protéiques concentrées des cellules acineuses (Ishiguro *et al.*, 2007). Ce matériel de nature protéique s'épaissit et obstrue les canaux, provoquant la détérioration

des cellules acineuses puis l'installation d'une fibrose. La destruction de la fonction pancréatique exocrine est d'ailleurs un des premiers symptômes qui a été observé (Andersen, 1938) et c'est la raison pour laquelle la mucoviscidose est aussi appelée fibrose kystique du pancréas. Le manque de sécrétion d'ions bicarbonate, par le pancréas mais aussi par la muqueuse duodénale, se traduit par une incapacité à neutraliser l'acide du chyme gastrique déversé dans le duodénum (Borowitz *et al.*, 2006). Le pH intraduodéal post prandial est de 4-5 (Robinson *et al.*, 1990), ce qui ne constitue pas un pH optimal pour l'action des diverses enzymes pancréatiques encore sécrétées en faible quantité ou apportées par compléments enzymatiques. L'acidité du pH intra-duodéal aura aussi pour conséquence la précipitation des sels biliaires avec incapacité de conserver une structure de micelles (Regan *et al.*, 1979). Il s'ensuivra une digestion réduite des macronutriments, avec un effet plus marqué pour les lipides, se traduisant par une malabsorption plus ou moins importante selon les patients (stéatorrhée de 9 à 50 g/j) (Farrell *et al.*, 1985). Dans 90% des cas on observe des manifestations digestives traduisant une insuffisance pancréatique majeure (Sinaasappel *et al.*, 2002).

La maladie se manifeste parfois dans les premiers mois de vie par une obstruction du tube digestif au niveau intestinal. En effet, chez 15% des nouveaux-nés atteints de mucoviscidose on observe un iléus méconial (Mushtaq *et al.*, 1998). Les glandes intestinales sécrètent un mucus normalement destiné à tapisser la paroi intestinale et à la protéger du chyme acide provenant de l'estomac ; à cause des déséquilibres ioniques récurrents dans la maladie, ce mucus va s'épaissir de façon similaire à ce qui est observé dans les poumons. Cet épaississement va rendre la paroi intestinale moins perméable, va ralentir la progression du chyme rendant la digestion et l'absorption à ce niveau moins efficace, puis va donner lieu à des occlusions intestinales (Eggermont & De Boeck, 1991; Kopelman, 1991). Les enfants, les adolescents et les adultes présentent un ileus stercoral, un équivalent d'iléus méconial qui apparaît plus tardivement et se caractérise par des obstructions intestinales répétées (Azmy & Ziervogel, 1983).

Les affections hépatiques sont présentes très tôt dans l'apparition des symptômes de la mucoviscidose à cause des dysfonctionnements de la protéine CFTR des cellules épithéliales biliaires. En effet, la bile va subir le même sort que les autres sécrétions énoncées précédemment, c'est-à-dire s'épaissir à cause du déséquilibre ionique. Les canaux biliaires vont s'obstruer pouvant causer à terme une cirrhose biliaire et une hépatomégalie. Il existe

aussi une stéatose hépatique liée à un défaut de sécrétion des lipoprotéines (Dodge & Turck, 2006).

Cependant les autres symptômes de la mucoviscidose associés à ceux de la défaillance hépatique vont lentement aggraver l'état du patient avec notamment des complications comme l'hypertension dans la veine porte, les hémorragies digestives et l'insuffisance hépatocellulaire (Debray *et al.*, 1999; Colombo *et al.*, 2006).

Les progrès scientifiques, depuis la découverte jusqu'aux premiers traitements, ont permis d'augmenter la survie des individus atteints de mucoviscidose, et de ce fait la fertilité masculine et féminine devient une problématique de plus en plus importante. Au niveau des fonctions génitales, les observations sont différentes en fonction du sexe. En effet, 98% des hommes atteints de la mucoviscidose présentent une atrophie, un développement anormal ou tardif du canal déférent et des vésicules séminales entraînant une azoospermie (une absence totale de spermatozoïdes dans le sperme) ou oligospermie sévère (moins de 5 millions de spermatozoïdes par ml) (Denning *et al.*, 1968; Kaplan *et al.*, 1968). La composition du sperme chez le patient CF est elle aussi modifiée et comprend plus d'acide citrique (pH plus faible), de phosphatase acide et moins de fructose, par rapport aux teneurs d'un individu sain (Holsclaw *et al.*, 1971).

Chez la femme, on ne relève pas d'anomalie morphologique qui pourrait l'empêcher de procréer, pourtant 3 à 15% des grossesses chez des patientes atteintes de mucoviscidose sont obtenues après assistance médicale à la procréation (Edenborough *et al.*, 2000; Gillet *et al.*, 2002; Odegaard *et al.*, 2002). Cette hypofertilité est due d'une part à un épaissement de la glaire produite par les glandes du canal cervical (Edenborough, 2001), et d'autre part à l'existence de cycles anovulatoires dont la cause principale serait le déséquilibre nutritionnel (Johannesson *et al.*, 1998).

Le diabète associé à la mucoviscidose (cystic fibrosis related diabete en anglais) est une autre complication qui survient suite à l'augmentation de l'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose. Le phénotype est intermédiaire entre le diabète de type I et II, avec au début une augmentation de la glycémie post-prandiale qui évolue vers un déficit en insuline. La prévalence varie avec l'âge du patient entre 5 et 50%. Il serait lié à la dégradation du pancréas exocrine et à la corticothérapie (Costa *et al.*, 2005).

Le traitement proposé dépendra de l'état du patient, l'insulinothérapie permet de ré-équilibrer le diabète et reste la solution la plus efficace cependant cela alourdit le traitement déjà important dans la mucoviscidose. De ce fait, des recommandations nutritionnelles personnalisées seront privilégiées dès l'apparition de troubles même mineurs de la tolérance glucidique (Moran *et al.*, 2009).

### III.4 Diagnostic, prise en charge et perspectives de traitement de la mucoviscidose

A l'heure actuelle on ne guérit pas la mucoviscidose. Dans la plupart des cas, la maladie est très invalidante, évoluant inexorablement vers une insuffisance respiratoire mortelle qui survient à un âge variable.

#### III.4.1 Diagnostic

Un diagnostic prénatal peut être proposé dans le cas où l'un des parents est atteint ou porteur du gène ; ou encore si l'on observe des anomalies échographiques, en particulier une masse abdominale hyper-échogène. Il peut être réalisé par ponction de trophoblastes dans la partie trans-abdominale à 10 semaines de grossesse et recherche d'anomalies génétiques par PCR. Cette méthode permet une réponse très rapide (10 jours environ) mais comporte des risques importants pour le fœtus. L'amniocentèse permet de réduire les risques, elle est proposée après 10 semaines de grossesse, et le délai de diagnostic est plus long car les cellules extraites doivent être mises en culture afin de réaliser les études de génétique moléculaire.

En ce qui concerne le diagnostic postnatal, il est réalisé principalement à travers deux approches : le test de la sueur et l'étude génétique. La quantité en millimoles de chlorure par litre de sueur est mesurée. Un taux inférieur à 30 mmol/L est considéré comme normal, un taux supérieur à 60 mmol/L établit le diagnostic de mucoviscidose, un taux intermédiaire ne permet pas de donner une réponse. Il faudra donc refaire le test et l'accompagner d'une étude génétique. L'analyse génétique consistera à la recherche de mutations responsables de la maladie en commençant par les mutations les plus fréquentes et en tenant compte de l'origine ethnique de l'individu. D'autres tests peuvent également être effectués comme le dosage de la concentration fécale d'enzymes pancréatiques endogènes, notamment l'élastase (Schuler *et al.*, 2004; Farrell *et al.*, 2008).

### III.4.2 Prise en charge actuelle

Concrètement dès le diagnostic effectué, la prise en charge des différents symptômes s'organisent autour de quatre aspects (Haute autorité de santé, 2006, [www.has-sante.fr](http://www.has-sante.fr))

- La prise en charge respiratoire repose sur la kinésithérapie respiratoire, l'aérosolthérapie (administration de mucolytiques, bronchodilatateurs RhDNase, antibiotiques, corticoïdes inhalés) (Reynaud-Gaubert, 1999; Bradley *et al.*, 2006), l'antibiothérapie pour pallier aux infections bactériennes diverses (Spencer, 1997; Saiman, 2004).

- Une prise en charge nutritionnelle qui passe par un régime alimentaire devant apporter 120 à 150% des apports énergétiques conseillés pour un individu sain et présentant la particularité d'être riche en lipides, permettant un apport correct en AGE, avec supplémentation en vitamines liposolubles (Dodge & Turck, 2006). Dans les cas où l'apport alimentaire ne peut être atteint (manque d'appétence, fatigue, périodes d'infections) une assistance nutritionnelle artificielle est mise en place via l'utilisation d'émulsions entérales administrées par voie orale, tube naso-gastrique ou gastrostomie (Sinaasappel *et al.*, 2002; Dodge & Turck, 2006). Parallèlement, des compléments enzymatiques à base de poudre de pancréas de porc gastroprotégée ou d'enzymes recombinantes (Beverley *et al.*, 1987; Stead *et al.*, 1987; De Boeck *et al.*, 1998; Durie *et al.*, 1998), des compléments oraux d'acide biliaire comme l'UDCA (Colombo *et al.*, 1983) (Colombo *et al.*, 1983), et des anti-acide permettant de réduire la sécrétion d'acide chlorhydrique gastrique et d'obtenir un pH intra-duodéal neutre (Ng & Jones, 2003) sont utilisés afin d'améliorer la digestion et l'absorption,

- Une éducation thérapeutique et des conseils de mode de vie afin que les patients connaissent la maladie et apprennent à gérer traitements et facteurs aggravants.

- La prévention c'est-à-dire le respect d'un calendrier de vaccinations antigrippale, antipneumococcique, antihépatite A.

En plus des différentes possibilités de traitement au quotidien, une solution qui augmente de façon considérable l'espérance et la qualité de vie des individus atteints, reste la greffe. En effet, malgré les problèmes du manque de donneur et du pourcentage de rejet, la greffe des

poumons (Aratari *et al.*, 2008) et/ou de foie (Noble-Jamieson *et al.*, 1996) reste un réel espoir.

### III.4.3 Perspectives de traitement

Malgré cette prise en charge performante, la recherche est constante pour trouver une issue à cette maladie, atténuer les symptômes et/ou améliorer les traitements actuels.

Au niveau fondamental, les recherches sont essentiellement axées sur deux types d'approches :

- La thérapie génique qui consiste à introduire sous la forme de vecteurs des copies saines du gène *cftr* dans les cellules du patient. Les premiers essais étaient réalisés avec des vecteurs viraux posant souvent des problèmes d'immunogénicité. Pour pallier à ce problème, une autre piste de recherche a émergé depuis quelques années. Elle consiste à la mise au point de vecteurs synthétiques (Griesenbach *et al.*, 2006).

- La thérapie cellulaire qui consiste à utiliser des cellules souches (cellules capables de se différencier en différents types de cellules matures) dans le but soit de les modifier ex-vivo pour les réimplanter in-vivo (cellules souches d'origine adulte), soit de les utiliser pour reconstituer l'épithélium pulmonaire endommagé ou détruit (cellules souches embryonnaires) (Spencer & Jaffe, 2004; Davies, 2006).

D'autres études visent à caractériser des modèles murins pour étudier plus en détails la physiopathologie et l'efficacité de traitements, ou à en mettre en place de nouveaux modèles plus adaptés comme le modèle porcin (Rogers *et al.*, 2008). Au niveau digestif, les travaux de recherche portent principalement sur l'optimisation des compléments enzymatiques à travers la production d'une lipase gastrique recombinante (Roberts, 1989), la recherche d'une lipase pancréatique active à pH acide (Colin *et al.*, 2008) ou de lipases bactériennes ayant un large pH d'action et résistantes à l'action des protéases digestives (Munck, 2003), ou encore l'amélioration de suppléments déjà existants (Armand, 2007). Des nouvelles pistes thérapeutiques sont aussi explorées comme la thérapie à l'oxygène (Elphick & Mallory, 2009), l'utilisation de fluidifiant du mucus (Puchelle *et al.*, 1995) ou de molécules capables de stimuler le transport des ions Cl<sup>-</sup> (Lubamba *et al.*, 2008).

## IV Acides gras polyinsaturés et mucoviscidose

### IV.1 Statut en acides gras polyinsaturés chez le sujet CF

Dès 1962, une perturbation du métabolisme des acides gras essentiels a été rapportée dans le sérum de patients atteints de mucoviscidose (Rivers & Hassam, 1975). Depuis, plusieurs études ont été menées dans le but de caractériser le statut en acides gras des familles n-6 et n-3 et d'en observer les variations entre patients CF et individus sains. En effet, un bon équilibre en acides gras polyinsaturés essentiels ou conditionnellement indispensables est très important car ces acides gras interviennent dans de nombreux mécanismes, et une perturbation de ce type a très probablement des conséquences sur la dégradation de l'état du patient et sur sa longévité. Les analyses ont, pour la plupart, été menées sur des échantillons de sang (lipides du sérum ou plasma, phospholipides érythrocytaires) et seulement quelques études ont porté sur des échantillons tissulaires provenant de biopsie, comme reviewé récemment (Coste *et al.*, 2007).

Les données sur le statut en AGPI des sujets CF divergent suivant les études ce qui peut être associé à une absence de standardisation des approches. En effet, selon les études, on note qu'un faible nombre d'échantillons a été analysés (Rosenlund *et al.*, 1974; Christophe *et al.*, 1992; Christophe *et al.*, 1994), que les contrôles n'ont souvent pas le même âge que les patients CF (Underwood *et al.*, 1972), que les analyses sont effectuées sur des composants sanguins différents (Caren & Corbo, 1966; Hubbard & Dunn, 1980) ou sur des fractions lipidiques variables (phospholipides, esters de cholestérol, triglycérides ou acides gras libres), ou encore que les techniques d'analyse du profil en acides gras sont plus ou moins résolutive : chromatographie en phase gazeuse à capillaire (Biggemann *et al.*, 1988) ou à colonne (Underwood *et al.*, 1972), couplée ou non avec de la spectrométrie de masse (Pacetti *et al.*, 2004). Par ailleurs, même au niveau des acides gras analysés, chaque auteur a sa propre approche. Certains vont se focaliser uniquement sur l'évolution de l'acide linoléique (Kuo *et al.*, 1962) ou de l'ensemble des acides gras n-6 (McEvoy, 1975), alors que d'autres s'intéressent à la fois aux acides gras n-6 et n-3 (notamment le DHA), publiant des données plus complètes (Farrell *et al.*, 1977). Enfin les symptômes, le profil génétique ou le statut nutritionnel des sujets CF ne sont pas systématiquement précisés ce qui rend plus difficile l'interprétation des différentes données.

Malgré cette variabilité, des caractéristiques majoritaires se dégagent comme l'existence avérée d'un profil perturbé chez 75 % des patients avec des altérations d'un acide gras

donné, d'une famille d'acides gras n-6 ou n-3 ou de façon spécifique sur les acides gras polyinsaturés à très longue chaîne n-6 et n-3 (Tableau 9).

**Tableau 9 :** Principales altérations des acides gras n-6 et n-3 observées chez les patients CF (Al-Turkmani *et al.*, 2007; Coste *et al.*, 2007)

	Serum/Plasma					Membrane érythrocytes	Lavage broncho-alvéolaire	Tissu nasal	Tissus postmortem **
	Total	PL	CE	TG	AGL				
<b>LA (n-6)</b>	↓*	↓	↓	↓	↓	↓	↑***	↓	↓
<b>DHA (n-3)</b>	↓ / ⇔	↓	↓ / ⇔	variable	⇔	⇔	non détecté***	↓	↓
<b>AA (n-6)</b>	↓ / ⇔	↓ / ⇔	⇔	↓	⇔	⇔ / ↑	↑***	↑	⇔
<b>AGPI</b>	↓ / ⇔	↓	↓	↓	↓	↓ / ⇔		↓	

\*Les flèches indiquent la variation observée dans la majorité des études. \*\* tissu adipeux, cœur, foie, poumons, reins

\*\*\* (Meyer *et al.*, 2000)

La plupart des études s'accordent sur le fait que le taux d'acide linoléique, le précurseur des acides gras n-6, est significativement plus faible chez la plupart des patients CF. Le taux de LA apparaît diminué de 10% à plus de 50% par rapport aux contrôles et cette diminution est observée à la fois au niveau sanguin et tissulaire (Kuo *et al.*, 1962; Underwood *et al.*, 1972; Thompson, 1989; Freedman *et al.*, 2004).

D'autre part, les patients présentent des taux d'acide arachidonique plus importants au niveau de lavage broncho-alvéolaire (Gilljam *et al.*, 1986) et au niveau tissulaire (Freedman *et al.*, 2004) ; il est à noter cependant que les données sont plutôt contradictoires au niveau des taux plasmatiques et érythrocytaires d'AA qui apparaissent diminués ou inchangés (Christophe *et al.*, 1994), voire augmentés (Strandvik *et al.*, 2001). Par ailleurs, si on s'intéresse à la famille n-3, seul l'acide docosahexaénoïque semble présenter un profil particulier chez les patients CF. Le DHA est en effet diminué, en particulier au niveau des phospholipides plasmatiques (Strandvik *et al.*, 2001) ainsi que dans les fractions tissulaires des sujets CF (Freedman *et al.*, 2004).

Certains rapports et produits entre acides gras sont parfois calculés car ils sont le reflet du fonctionnement d'une ou de plusieurs étapes du métabolisme des AGPI (Coste *et al.*, 2008). Récemment, le produit LA x DHA a été proposé comme marqueur dans le diagnostic des CF (Batal *et al.*, 2007). Calculé à partir du profil lipidique plasmatique, il permettrait de façon efficace de différencier les patients CF (valeur calculée  $\leq 40$ ) des contrôles.



Au sein des n-6, le ratio entre l'AA et son précurseur immédiat, le DGLA, permet de mettre en exergue l'étape de désaturation qui existe entre ces deux acides gras, et donc le bon fonctionnement de la  $\Delta 5$  désaturase. De façon intéressante le rapport AA/DGLA se révèle être 20 à 50% plus faible chez les patients CF ce qui suggère que l'activité de leur désaturase pourrait être diminuée (Caren & Corbo, 1966; Lloyd-Still *et al.*, 1981; Biggemann *et al.*, 1988) ou que l'AA est très rapidement mobilisé pour la biosynthèse de molécules pro-inflammatoires (Coste *et al.*, 2008).

Le rapport AA/DHA permet d'apprécier la compétition entre les deux voies métaboliques n-6 et n-3. De plus ces acides gras (AA et DHA) sont tous les deux impliqués dans l'inflammation, l'AA permettant la synthèse de molécules pro-inflammatoires (leukotriènes série 4, prostaglandines série 2), et le DHA celle de molécules anti-inflammatoires (résolvines D, docosatriènes, neuroprotectines). Leur ratio va ainsi également donner une indication sur la prédisposition du sujet CF à pouvoir produire des molécules pro- ou anti-inflammatoires. L'équipe de Freedman a publié en 2004 une étude où sont présentés les ratios AA/DHA. Il apparaît que les ratios médians des patients CF sont environ deux fois plus importants que ceux des contrôles au niveau d'échantillons issus de biopsies de tissus rectaux et de muqueuse nasale (Freedman *et al.*, 2004). Cette observation pourrait donc confirmer la théorie d'un statut pro-inflammatoire chez le patient CF.

À la lumière de ces informations, une combinaison de plusieurs phénomènes peut être proposée pour expliquer les anomalies du métabolisme des acides gras essentiels ou/et de leurs métabolites à longues chaînes polyinsaturés :

- Un défaut d'apport alimentaires en acides linoléique et linolénique faisant suite à un besoin plus important que le sujet sain (Hubbard & Mangrum, 1982; Pencharz *et al.*, 1989) et à une faible consommation de lipides (Buchdahl *et al.*, 1989). Cependant cette hypothèse est écartée par une étude menée sur une cohorte de patients recevant une nutrition adaptée et ne présentant pas de malabsorption lipidique, mais présentant malgré tout un déficit en LA (Roulet *et al.*, 1997). Ainsi, la malnutrition apparaît comme un facteur aggravant mais n'est pas responsable de la déficience en LA.
- Une mauvaise digestion et/ou absorption des lipides pourrait également être mise en cause étant donné l'insuffisance au niveau du pancréas exocrine qui est plus ou moins présente chez les patients CF. Une étude montre d'ailleurs que les patients présentant une malabsorption ont un déficit plus sévère en LA (Farrell *et al.*, 1985).

- Une augmentation de la  $\beta$ -oxydation des AGPI (Shapiro, 1989) ; en effet, l'organisme d'un individu atteint est en constant besoin d'énergie pour alimenter ses voies métaboliques mais également lutter contre les multiples agressions causées par la maladie, ce qui va augmenter le catabolisme des acides gras y compris les AGPI afin de fournir de l'énergie nécessaire à l'organisme du patient (Parsons *et al.*, 1988).
- Une augmentation de la production d'écicosanoïdes favorisant un statut pro-inflammatoire (Strandvik *et al.*, 1996). En effet, l'acide linoléique peut être excessivement utilisé pour la production d'acide arachidonique à l'origine de molécules pro-inflammatoires, d'où la baisse du taux de LA. Cette hypothèse pourrait être liée à l'inflammation exacerbée présente chez les sujets CF (Strandvik *et al.*, 1996).
- Une augmentation de la peroxydation des AGPI (Durieu *et al.*, 2007)
- Un renouvellement particulièrement rapide des lipides membranaires pourrait constituer une explication possible du faible taux de DHA au niveau des membranes cellulaires. En effet ce phénomène a été observé *in vitro* sur des érythrocytes de patients ayant la mucoviscidose (Rogiers *et al.*, 1984). Or, les acides gras polyinsaturés à longue chaîne sont nécessaires au maintien de la fluidité des membranes plasmiques, et l'organisme va donc puiser dans ses réserves et consommer notamment du DHA.
- Une dysfonction intrinsèque dans l'utilisation des acides gras essentiels au niveau des cellules épithéliales suite à la mutation  $\Delta F508$  de la CFTR (Bhura-Bandali *et al.*, 2000). Ainsi, l'hypothèse d'une activité désaturase-élongase augmentée pour la voie des n-6 peut également être impliquée dans ce faible taux de LA et une production exacerbée de AA chez les patients atteint de mucoviscidose.

Par ailleurs, le statut en acides gras polyinsaturés pourrait être directement lié avec le fonctionnement du canal chlorure CFTR, cause principale de la maladie. En effet, le mode de fonctionnement de cette protéine est assez complexe. Son cycle enzymatique implique des changements de conformation et on peut supposer que son activité de transport ionique, dépendante de l'énergie fournit par l'ATP, soit aussi dépendante de son environnement lipidique et en particulier de la composition membranaire en acides gras polyinsaturés. En effet il a déjà été montré dans d'autres circonstances, qu'il existe une corrélation entre les proportions membranaires en acides gras polyinsaturés n-6 et n-3 et l'activité de la Na,K-ATPase (Gerbi & Maixent, 1999; Djemli-Shipkolye *et al.*, 2003). Or cette protéine est une protéine membranaire intégrale comme la protéine CFTR. Cette hypothèse accentue la

nécessité d'approfondir l'étude des acides gras polyinsaturés dans le cadre de la mucoviscidose et de mettre en place des solutions afin de pallier au déséquilibre

#### IV.2 Statut en acides gras polyinsaturés chez le modèle murin de mucoviscidose

L'existence d'un déséquilibre en acides gras polyinsaturés et son impact, ont conduit à rechercher différentes stratégies visant à rétablir la situation, et ont nécessité la mise en place d'études sur modèles animaux. Ces études ont été principalement réalisées sur modèles murins, modifiés génétiquement pour être utilisés dans le cadre de la mucoviscidose. A l'heure actuelle on compte 11 modèles murins génétiquement modifiés (Tableau 10).

Tableau 10: Modèles murins utilisés pour l'étude de la mucoviscidose (Guilbault *et al.*, 2007)

<b>Appellation</b>	<b>Mutation</b>
$cftr^{tm1UNC}$	Substitution dans l'exon 10 (codon stop) ; Pas d'ARNm CFTR détectable
$cftr^{tm1HGU}$	Insertion (mutagénèse dirigée) dans l'exon 10 ; 10% d'ARNm CFTR WT
$cftr^{tm1CAM}$	Substitution dans l'exon 10 (codon stop) ; Pas d'ARNm CFTR détectable
$cftr^{tm1BAY}$	Duplication de l'exon 3 ; < 2% d'ARNm CFTR WT
$cftr^{tm3BAY}$	Substitution dans l'exon 2 (codon stop) ; Pas d'ARNm CFTR détectable
$cftr^{tm1HSC}$	Perturbation de l'exon 1 ; Pas d'ARNm CFTR détectable
$cftr^{tm1EUR}$	Insertion de la mutation F508del dans l'exon 10 par "hit and run" ARNm de CFTR muté présent à des niveaux d'expression normaux
$cftr^{tm2CAM}$	Substitution F508del dans l'exon 10 ; ARNm de CFTR muté présent à des niveaux d'expression équivalent à 30% des niveaux WT
$cftr^{tm1KTH}$	Substitution F508del dans l'exon 10 ; ARNm de CFTR muté ; Faible expression dans l'intestin
$cftr^{tm1G551D}$	Substitution G551D dans l'exon 11 ; ARNm de CFTR muté présent à des niveaux d'expression équivalent à 53% des niveaux WT
$cftr^{tm2HGU}$	Insertion de la mutation G480C dans l'exon 10 par "hit and run" ARNm de CFTR muté présent à des niveaux d'expression normaux

Pour mener des études d'investigation du statut en acides gras et éventuellement des études de supplémentation, le choix du modèle murin est extrêmement délicat car de multiples paramètres sont à prendre en considération comme par exemple la viabilité du modèle, facteur indispensable pour des approches nutritionnelles à moyen et long terme, la présence

du même déséquilibre au niveau des acides gras que celui observé chez les patients atteints de mucoviscidose, et la concordance des mutations existantes chez l'homme avec celles des souris. Parallèlement à cela, il existe assez peu d'études ayant exploré le statut en acides gras polyinsaturés de ces différents modèles.

En 1999, L'équipe de Freedman a décrit un déséquilibre majeur des acides gras polyinsaturés, semblables à celui observé chez le patient, dans un modèle de souris *cftr*<sup>-/-</sup> (*cftr*<sup>tm1UNC</sup>) avec un fond génétique mixte. Ils observent un taux plus important de l'acide arachidonique avec en parallèle un taux plus faible de l'acide docosahexaénoïque dans les tissus affectés par la mucoviscidose (intestin distal, poumons, pancréas) des souris mutées âgées d'un mois (Freedman *et al.*, 1999).

Cependant la même équipe a mené une étude sur le même modèle mais avec des souris ayant un fond génétique C57Bl/6J et n'ont pas retrouvé les mêmes perturbations au niveau des acides arachidonique et docosahexaénoïque (Beharry *et al.*, 2007). Le fond génétique du modèle utilisé est donc un paramètre important qui va moduler les manifestations physiologiques et métaboliques (Rozmahel *et al.*, 1996).

Ce déséquilibre entre acide arachidonique et docosahexaénoïque n'a pas non plus été confirmé dans les tissus des modèles de souris *cftr*<sup>-/-</sup> (*cftr*<sup>tm1UNC</sup>) de fond génétique mixte âgées d'un mois, et de celles F508del/F508del (*cftr*<sup>tm1EUR</sup>) âgées de 3 mois (Werner *et al.*, 2004). Ici le modèle utilisé est différent mais l'âge, ainsi que le régime alimentaire, pourraient également être des paramètres à prendre en compte.

Malgré ces données contradictoires, et les multiples limites de ces modèles, ils sont néanmoins indispensables car ils fournissent un complément aux études chez l'homme et permettent de tester de nouveaux traitements et d'en adapter les posologies.

### IV.3 Supplémentation en acides gras polyinsaturés

#### IV.3.1 Etudes de supplémentation effectuées dans le cadre de la mucoviscidose

Chez l'individu atteint de la mucoviscidose nous avons passé en revue les différentes altérations existant au niveau du statut en acides gras polyinsaturés, et la supplémentation en acides gras polyinsaturés reste un espoir d'amélioration de leur état physiologique.

La problématique actuelle est d'optimiser cette supplémentation en choisissant le type d'acide gras à compléter, la forme adéquate pour une biodisponibilité efficace à une dose limitant l'oxydation lipidique et qui soit acceptable pour un patient ayant déjà par ailleurs de multiples traitements.

En 1999, l'équipe de Freedman a renforcé l'intérêt d'une supplémentation en un acide gras polyinsaturé n-3, l'acide docosahexaénoïque, en montrant sur des souris déficientes qu'une supplémentation en DHA, sous forme libre ou estérifiée, permet non seulement de rétablir l'équilibre membranaire des taux d'AA et de DHA mais aussi de corriger quelques manifestations tissulaires pathologiques par réduction de l'accumulation de granules de zymogène au pôle apical des cellules acineuses, réduction des villosités intestinales, hypertrophiées chez la souris CF, à une taille comparable à celle des WT (Freedman *et al.*, 1999). Les fonctions pancréatique, iléale et hépatique sont améliorées, et l'inflammation pulmonaire suite à l'infection par *Pseudomonas aeruginosa* est diminuée. Dans cette étude, différentes doses de DHA (0,5 ; 2 ; 10 et 40 mg par jour) ont été testées sur une période de 7 jours. Toutefois, la dose efficace (40 mg de DHA pour une souris de 20-25 g soit 1,6 g/kg) demeure trop élevée et est difficilement extrapolable à l'homme (pour un homme de 80kg cela correspondrait à une dose d'environ 130g de DHA par jour !). D'autre part, une supplémentation avec de fortes doses d'acides gras de la famille n-3, de l'ordre de plusieurs grammes, augmentent le stress oxydatif et le besoin en antioxydants des érythrocytes humains (Palozza *et al.*, 1996). Par contre, une supplémentation avec de petites doses, inférieures à 200 mg, diminuent le stress oxydatif chez l'homme en induisant notamment une augmentation de l' $\alpha$ - et du  $\gamma$ -tocophérol ayant des propriétés anti-oxydantes (Vericel *et al.*, 1999).

À ce jour une dizaine d'études de supplémentation en n-3 ont été réalisées chez des patients atteints de mucoviscidose avec des doses et sources d'acides gras n-3 différentes. Des suppléments d'acide eicosapentaénoïque (EPA) et/ou de DHA sous forme de triglycérides provenant d'huiles de poisson et d'algues ou sous forme d'éthyl ester ont été administrés à raison de 0,3 à 5g par jour. La comparaison de ces différentes études est délicate car outre les différences existant au niveau du supplément, l'âge des patients et la durée de supplémentation diffèrent également (Tableau 11).

Tableau 11: Essais de suppléments sur des patients CF (Coste *et al.*, 2007)

Durée	EPA	DHA	Age des patients (années)	n	Effets biochimiques	Effets cliniques	Réf
4	0,37g	0,33g <sup>a</sup>	7-20	9	↑EPA, ↑DHA dans PL et CE	Non recherchés	(Christophe <i>et al.</i> , 1992)
32	1,28g	0,93g	0,8-24	30	↑DHA, ↓AA dans RBC ; ↓IgG ↓α-1 antitrypsine dans sérum	↑ de la fonction pulmonaire et ↓ durée d'antibiothérapie	(De Vizia <i>et al.</i> , 2003)
6	2,70g	NS	12-26	9	↑ chimio-tactisme des neutrophiles à LTB4	↑ de la fonction pulmonaire	(Lawrence & Sorrell, 1993)
6	44mkj	24mkj	6-16	14	↓LTB4 dans le sérum	Pas d'effet sur la fonction pulmonaire	(Kurlandsky <i>et al.</i> , 1994)
6	3,20g	2,20g	Moy 12,2	12	↑EPA, ↑DHA dans plasma et RBC	Non recherchés	(Henderson <i>et al.</i> , 1994)
4	27mkj	41mkj	10-37	18	↑EPA, ↑DHA dans plasma	Pas d'effet sur la fonction pulmonaire	(Katz <i>et al.</i> , 1996)
52 <sup>b</sup>	1,80-2,70g	1,20-1,80g	6-16	5	Non recherchés	Pas d'effet sur la fonction pulmonaire	(Thies, 1997)
6	/	70mkj	18-43	4	↑DHA dans plasma, RBC et biopsie de la muqueuse duodénale	Pas d'effet sur la fonction pulmonaire <sup>c</sup>	(Jumpsen <i>et al.</i> , 2006)
24	/	50mkj	8-20	20	↑DHA dans plasma, RBC et biopsie rectale ↓AA dans les lipides sanguins	Pas d'effet sur la fonction pulmonaire	(Lloyd-Still <i>et al.</i> , 2006)
24	0,20-0,60g	0,10-0,30g	Moy 18	17	↑EPA, ↓AA dans les PL des neutrophiles ; ↓ratio LTB4/LTB5	Pas d'effet sur la fonction pulmonaire	(Panchaud <i>et al.</i> , 2006)

<sup>a</sup> calculé à partir des données originales ; <sup>b</sup> 6 semaines avec EPA/6 semaines sans EPA en alternance ; <sup>c</sup> évalué après 3 semaines de traitement. CE = cholesteryl ester ; mkj = mg/kg/j ; NS = non spécifié ; PL = phospholipides ; RBC = red blood cells (érythrocytes). LTB4, LTB5= Leukotriènes B4 et B5.

Il en ressort qu'une supplémentation en DHA et/ou EPA se révèle donc être efficace pour modifier le statut en acides gras en diminuant les taux en AA et en augmentant les taux de DHA et EPA dans les phospholipides plasmatiques et les esters de cholestérol, dans les membranes erythrocytaires, dans les phospholipides des neutrophiles et dans les biopsies rectales ou duodénales. Certaines de ces études s'accompagnent aussi d'une réduction du statut pro-inflammatoire (baisse de la production de LTB4 par l'AA) grâce à l'action anti-inflammatoire jouée par les n-3 (production de LTB5 par l'EPA), voire d'améliorations de la fonction pulmonaire ; en effet, une augmentation de FEV1 (volume expiratoire maximum), de FVC (capacité vitale forcée) et du score de Shwachman, pouvant aller jusqu'à une réduction du nombre de jours d'antibiothérapie, ont été obtenues (Shwachman & Kulczycki, 1958; Lawrence & Sorrell, 1993; De Vizia *et al.*, 2003). Il faut toutefois signaler que de tels apports en n-3 doivent être utilisés avec précautions car ils augmentent les risques de peroxydation (Strandvik, 2004) et doivent s'accompagner d'une prise adéquate d'antioxydants alimentaires (Palozza *et al.*, 1996).

#### IV.3.2 Un vecteur de supplémentation particulièrement efficace, les GPL-DHA®

Il existe à l'heure actuelle plusieurs vecteurs de supplémentation en DHA. En effet, on peut administrer du DHA sous forme d'éthyl esters, de monoglycérides, de triglycérides ou encore de phospholipides. Le choix de la vectorisation est un élément essentiel car le type de vecteur utilisé influencera ensuite la digestion, l'absorption et le devenir du supplément choisi.

Les études d'absorption intestinale des acides gras polyinsaturés n-3 à longue chaîne chez l'homme montrent que l'EPA et le DHA seraient absorbés de façon équivalente qu'ils soient apportés sous forme d'esters éthyliques ou sous forme de triglycérides (Nordoy *et al.*, 1991) et cela malgré leurs faibles taux d'hydrolyse par la lipase pancréatique *in vitro* (Krokan *et al.*, 1993).

Très peu d'études se sont intéressées à la biodisponibilité des acides gras polyinsaturés n-3 à longue chaîne apportés sous forme de phospholipides. Dans une étude menée chez le prématuré, l'absorption du DHA a été améliorée de 12% quand celui-ci est apporté sous forme de phospholipides par rapport à celui apporté par le lait maternel sous forme de triglycérides (Carnielli *et al.*, 1998). La prise de phospholipides riches en acides gras n-3 permet de rétablir la teneur en DHA des structures nerveuses chez des souris déficientes en acides gras n-3 (Carrie *et al.*, 2000), d'enrichir en DHA les membranes cardiaques de rats (Gerbi *et al.*, 2004), et s'avère un vecteur de prédilection pour apporter le DHA

spécifiquement vers le cerveau (Bernoud *et al.*, 1999). De plus, le vecteur phospholipide ne semble pas être uniquement efficace pour l'apport des acides gras n-3. En effet, la supplémentation de l'alimentation de jeunes babouins en AA montre une accrétion de l'AA dans le cerveau environ 2 fois plus importante lorsque l'AA était apporté sous forme de phospholipides que sous forme de triglycérides (Wijendran *et al.*, 2002). Dans cette étude, il a été également observé une augmentation du C22:4 n-6 issu de l'AA plus importante avec le supplément sous forme de phospholipides, ce qui suggère que le phospholipide est un substrat métabolique plus actif. Enfin, l'équipe de Valenzuela réalise en 2005 une étude comparative sur la vectorisation du DHA dans laquelle les formes monoglycéride (acide gras en sn-2) et phospholipides apparaissent clairement comme étant les plus efficaces pour une meilleure accrétion du DHA dans les érythrocytes, le tissu hépatique et adipeux, par comparaison avec la forme triglycérides et acides gras libres (Valenzuela *et al.*, 2005). Le vecteur phospholipide semble donc être un bon candidat comme vecteur des acides gras n-3 dont les bénéfices ont déjà été démontrés. Une étude de supplémentation en DHA sous forme de phospholipide pourrait permettre une meilleure incorporation du DHA directement dans les phospholipides membranaires des tissus affectés par la mucoviscidose (Lemaitre-Delaunay *et al.*, 1999).

Une supplémentation en GPL-DHA<sup>®</sup> (glycérophospholipides d'origine aviaire enrichis en DHA) effectuée dans le cadre d'une recherche fondamentale chez le rat diabétique, a montré des effets bénéfiques indéniables sur la prévention de la neuropathie diabétique (Coste *et al.*, 2003). Ces effets ont pu être mis en évidence sur certains paramètres physiopathologiques, tels que la vitesse de conduction nerveuse et le flux sanguin endoneural, et sur l'activité enzymatique de la Na,K-ATPase, après 8 semaines de supplémentation (Coste *et al.*, 2003). Dans cette étude, la dose efficace correspondait à 60 mg de DHA/kg/j, soit une dose journalière de 12 mg environ. D'autres études de supplémentation sous forme de GPL-DHA<sup>®</sup>, réalisées au sein de notre laboratoire, ont montré que ce supplément permettait non seulement une accrétion du DHA notamment au niveau de la membrane des érythrocytes, mais ne provoquait pas de chute du taux d'acide arachidonique, et était efficace même à faible dose journalière chez le rat (12 mg) (Coste *et al.*, 2003; Gleize *et al.*, 2004), chez les senior (150 mg) (Payet *et al.*, 2004) ou chez le sportif (Payet *et al.*, 2003).



## OBJECTIFS DU TRAVAIL DE RECHERCHE

Un déséquilibre en AGPI a été rapporté chez la souris *cfr*<sup>-/-</sup> (Freedman *et al.* 1999). Ce déséquilibre, principalement caractérisé par une augmentation de l'acide arachidonique et une diminution de l'acide docosahexaénoïque, a été montré chez des animaux âgés d'un mois, dans plusieurs organes affectés par la mucoviscidose. Ce même type de perturbation a été confirmé dans des biopsies nasales et rectales de patients (Freedman *et al.* 2004), avec en plus une diminution de l'acide linoléique (Farrell *et al.*, 1985), conduisant à un fort déséquilibre au niveau du rapport n-6/n-3 pouvant engendrer des répercussions non négligeables sur les manifestations physiologiques de la maladie. La similitude des données obtenues dans des tissus de patients et chez la souris *cfr*<sup>-/-</sup> indique que le modèle murin de mucoviscidose est un outil privilégié pour comprendre les mécanismes impliqués dans les anomalies du métabolisme des AGPI. Cependant différents facteurs semblent intervenir dans la mise en place de ces perturbations comme le fond génétique, l'âge, le type de mutation, le régime alimentaire de base (Werner *et al.*, 2004; Coste *et al.*, 2006; Beharry *et al.*, 2007).

D'autre part, une nutrithérapie à base de DHA est efficace pour restaurer les taux de AA et DHA et/ou améliorer la fonction intestinale, pancréatique, pulmonaire et hépatique chez le modèle murin (Freedman *et al.*, 1999, Beharry *et al.*, 2007) ; une synthèse bibliographique indique aussi des effets bénéfiques d'une supplémentation à base d'EPA et de DHA ou de DHA seul chez le patient (Cawood *et al.* 2005, Coste *et al.*, 2007). Cependant, la problématique de toutes ces études réside dans le fait que les effets bénéfiques sont obtenus suite à l'utilisation de très fortes doses d'AGPI, susceptibles d'entraîner une augmentation du stress oxydatif. De plus, la biodisponibilité du DHA au niveau des tissus est dépendante de la forme sous laquelle cet acide gras est apporté dans l'alimentation (acides gras libres, éthyl esters, triglycérides, phospholipides) (Valenzuela *et al.*, 2005). Des travaux précédemment conduits dans notre laboratoire ont mis l'accent sur l'intérêt des glycérophospholipides d'origine aviaire enrichis en DHA (GPL-DHA®) pour augmenter significativement le taux de DHA dans l'organisme et engendrer des améliorations physiologiques (amélioration de la conduction nerveuse chez des rats diabétique de type 1 atteint de neuropathie, augmentation de l'acuité visuelle chez les seniors, amélioration des capacités respiratoires chez le sportif) suite à l'administration d'une dose proche des recommandations nutritionnelles (Coste *et al.*, 2003; Payet *et al.*, 2003; Payet *et al.*, 2004).

Sur la base de ces données, l'objectif principal de ce travail de thèse était d'étudier les bénéfices d'une nutrithérapie en GPL-DHA® à travers deux approches, l'une à l'aide d'un modèle expérimental murin homozygote pour la mutation  $\Delta F508$  et donc porteuse de la mutation la plus fréquente chez les patients atteints de mucoviscidose, et la seconde avec un modèle cellulaire intestinal.

Dans le cadre de l'approche sur modèle murin nous avons fait l'hypothèse que ce modèle était hautement susceptible de présenter les mêmes altérations du métabolisme en AGPI que le patient présentant la mutation  $\Delta F508$  notamment au niveau d'organes affectés par la maladie (intestin, pancréas, poumons) par comparaison avec des organes supposés indemnes (foie, cœur, rein). Toutefois, nous avons aussi tenu compte de l'impact probable de facteurs confondants comme le facteur temps et le type de régime alimentaire de base déjà soulevés par certaines études (Werner *et al.*, 2004 ; Beharry *et al.*, 2007). Trois études ont ainsi été conduites afin de répondre à des questions bien spécifiques :

- l'étude 1 avait pour objectif de rechercher les effets bénéfiques d'une supplémentation en DHA sous forme de GPL à dose extrapolable aux apports nutritionnels conseillés chez l'homme sain. Cette étude nous a aussi renseignés sur les types de désordres en AGPI réellement existants dans notre modèle  $F508del$ .

- l'étude 2 devait nous aider à répondre à la question suivante : existe t-il une détérioration plus marquée du métabolisme des AGPI au cours du temps, à savoir chez des souris âgées de 6 ou 12 mois, par comparaison avec celles âgées de 3 mois ?

- l'étude 3 était focalisée sur l'impact possible du type de régime alimentaire de base administré à des souris âgées de 6 ou 12 mois, alimentation liquide entérale versus granulés standards, au niveau du métabolisme des AGPI.

Dans le cadre de l'approche cellulaire, notre démarche était d'obtenir des informations sur les bénéfices possibles d'un enrichissement en DHA des phospholipides de la membrane plasmique sur la fonctionnalité de cellules intestinales humaines. Le choix du type cellulaire a été orchestré par le fait que le taux de DHA pourrait être impliqué dans les capacités absorbatives des entérocytes, notamment par augmentation de la fluidité membranaire et l'expression de certains gènes codant pour des protéines d'intérêt (Grimaldi, 2001; Djemli-Shipkolye *et al.*, 2003), qu'il s'est avéré que la teneur en DHA diminue fortement au cours du temps dans l'intestin de notre modèle murin connu pour présenter des troubles sévères au niveau de cet organe, troubles pouvant aussi exister chez les patients (Eggermont & De

Boeck, 1991; Mushtaq *et al.*, 1998). Il est cependant important de noter, que le modèle cellulaire utilisé, clone TC7 issu de la lignée CaCo-2, présentait une limite dans la compréhension de la fonctionnalité des cellules intestinales du patient atteint de mucoviscidose dans la mesure où il s'agit d'une lignée cancéreuse de côlon humain exprimant une CFTR ne présentant pas la mutation  $\Delta F508$ .

Pour faciliter la lecture de ce mémoire, les chapitres relatifs aux « Matériel et Méthodes » et « Résultats » sont traités à la suite pour chacune des deux approches.

# APPROCHE SUR MODELE MURIN

## I Matériel et Méthodes

### I.1 Animaux

#### I.1.1 Modèle murin

Les études ont été réalisées chez la souris transgénique homozygote pour la mutation  $\Delta F508$  (CFTR<sup>tm1EUR</sup>), modèle présentant la mutation la plus courante chez les patients CF. Ces animaux transgéniques ont été générés à partir des cellules souches embryonnaires par le remplacement, dans l'exon 10, de l'allèle sauvage par l'allèle muté  $\Delta F508$ , selon la méthode de mutagenèse dite "hit and run". Cette technique présente comme avantage le maintien de la structure des introns du gène (van Doorninck *et al.*, 1995). Les souris témoins possèdent le même fond génétique (129/FVB) que les souris transgéniques. Ces animaux transgéniques ont été gracieusement fournis au Dr Teresinha Leal par le Professeur Scholte de l'Université Erasmus aux Pays Bas. Les études ont été approuvées par le Comité d'Ethique Animalière de l'Université Catholique de Louvain (UCL, Bruxelles, Belgique).

La continuité de l'élevage est assurée par le croisement de couples hétérozygotes et implique la nécessité d'un génotypage systématique. L'identification génotypique est réalisée par PCR à partir d'un prélèvement de queue à la 3<sup>ème</sup> semaine dans le Laboratoire de Biologie Moléculaire du Dr J.L. Vaerman (UCL). Notre modèle de souris est connu pour présenter des troubles au niveau de l'intestin, organe composé de deux zones anatomiquement distinctes, la partie duodéno-jéjunale (intestin proximal) et la partie iléale (intestin distal).

Nous avons eu accès à ces modèles par le biais d'une collaboration avec l'équipe de recherche des Prs Leal et Wallmacq de l'UCL qui s'est concrétisée par un projet de recherche commun financé par l'association Vaincre La Mucoviscidose (financement VLM 2005-2008).

#### I.1.2 Régimes alimentaires

La nourriture standard spécifique pour souris (granulés) apporte 4,2 g de lipides pour 100 g (rats & mice breeding, CARFIL, Oud-Turnhout, Belgique).

Afin de prévenir le développement d'iléus méconial, un symptôme de la mucoviscidose létal pour notre modèle de souris transgéniques  $\Delta F508$ , du Peptamen Junior<sup>®</sup> (formulation à usage oral ou entéral riche en triglycérides à chaînes moyennes, Nestlé Belgilux, Bruxelles, Belgique) a été utilisé comme nourriture exclusive des souris CF dans certaines de nos études en remplacement de la nourriture standard. Cette préparation a été spécialement conçue pour faciliter la digestion et l'absorption des nutriments chez les enfants dès 1 an ayant une diminution de leurs capacités digestives anatomiques ou fonctionnelles et est fréquemment prescrit chez les sujets CF. De plus il contient approximativement la même quantité de lipides que la nourriture standard (4 g de lipides pour 100 g). Puis, afin d'étudier un éventuel effet du type de régime de base sur l'évolution du statut en acides gras polyinsaturés, nous avons opté pour une autre stratégie de prévention de l'iléus méconial en utilisant un accélérateur de transit, le Movicol<sup>®</sup> (Norgine Pharma, Rueil-Malmaison, France), additionné à l'eau de boisson des souris CF recevant des granulés standards.

Dans les groupes supplémentés, nous avons utilisé des phospholipides d'origine aviaire spécifiquement enrichis en DHA (GPL-DHA<sup>®</sup>) mis au point par G. Pieroni au sein du laboratoire INSERM U476 à Marseille et maintenant commercialisée par la société ASL (Application Santé des Lipides, Bioparc Vichy, Hauterive). Ils sont obtenus à partir de poudre de jaune d'œuf enrichie en DHA par la méthode d'enrichissement indirect, qui fait intervenir un enrichissement de l'alimentation des poules en huile de poisson (Bernard, 1995). Le DHA se trouve principalement dans les phospholipides de cette poudre et constitue le principe actif (GPL-DHA<sup>®</sup>). Une étape de purification de ces phospholipides a été réalisée et a permis d'obtenir une solution alcoolique concentrée (97,5% de PL, 2% de TG, 0,5% de cholestérol). La supplémentation a été administrée sous la forme de liposomes par gavage quotidien. Cette formulation est préparée régulièrement afin d'éviter des phénomènes d'oxydation des acides gras. Pour la préparation des liposomes, l'éthanol est évaporé et les phospholipides sont mis en suspension dans l'eau. Ceci résulte en une proportion eau/phospholipides de l'ordre de 60/40. Les interventions de supplémentation sont faites après le sevrage à l'âge d'un mois et demi pendant une période de six semaines. La dose journalière de DHA apportée dans les études de supplémentation correspond à 60 mg de DHA par kilogramme de poids corporel soit 1,1-1,4 mg de DHA pour une souris de 18-23g, ce qui correspond à une dose relativement faible par comparaison avec les quelques études de supplémentation en DHA conduites chez des souris cftr +/- (Freedman et al., 1999, Beharry et

al., 2007). Cette quantité d'apport a été adaptée de la dose minimale efficace déterminée dans une étude de supplémentation menée chez le rat diabétique (Coste *et al.*, 2003).

Le profil en acides gras des différents régimes utilisés est décrit dans le Tableau 12.

**Tableau 12:** Composition en acides gras des différents régimes (standard, Peptamen Junior et GPL-DHA<sup>®</sup>) (exprimée en pourcent des acides gras totaux).

<b>Acides Gras</b>	<b>Régime standard</b>	<b>Peptamen Junior</b>	<b>GPL-DHA<sup>®</sup></b>
<b>C8 :0</b>	0	15,8	0
<b>C10 :0</b>	0	15,48	0
<b>C12 :0</b>	0,67	0,22	0
<b>C14 :0</b>	0,23	0,61	0,26
<b>C16:0</b>	16,61	9,32	31,14
<b>C16:1</b>	0,43	0,13	1,17
<b>C18:0</b>	2,79	4,19	13,45
<b>C18:1 n-9</b>	17,28	14,77	27,18
<b>C18:2 n-6 (LA)</b>	54,09	33,27	14,04
<b>C18:3n-6</b>	0,01	0,18	0
<b>C18:3n-3 (ALA)</b>	5,37	3,7	0,13
<b>C20:1 n-9</b>	0,53	0,12	0
<b>C20:4 n-6 (AA)</b>	0	0	2,54
<b>C20 :5 n-3</b>	0	0	0,51
<b>C22:4 n-6</b>	0	0,14	0
<b>C22 :5 n-3</b>	0	0	0,29
<b>C22:6 n-3 (DHA)</b>	0	0	6,38

### I.1.3 Groupes

**Tableau 13 :** Protocole expérimental des études effectuées

<b>Groupe, âge de sacrifice, régime</b>	<b>Etudes effectuées</b>	<b>Etude 1</b>	<b>Etude 2</b>	<b>Etude 3</b>
	<b>WT, 3 mois, peptamen</b>			
<b>CF, 3 mois, peptamen</b>				
<b>WT, 3 mois, peptamen + GPL-DHA</b>				
<b>CF, 3 mois, peptamen + GPL-DHA</b>				
<b>WT, 6 mois, rég. standard</b>				
<b>WT, 12 mois, rég. standard</b>				
<b>CF, 6 mois, peptamen</b>				
<b>CF, 12 mois, peptamen</b>				
<b>CF, 6 mois, rég. standard + Movicol<sup>®</sup></b>				
<b>CF, 12 mois, rég. standard + Movicol<sup>®</sup></b>				

Trois études ont été réalisées chez des souris homozygotes F508del (CF) par comparaison avec leurs analogues sauvages (WT) (Tableau 13). Conformément à notre objectif et aux différentes questions posées, il s'agissait d'étudier l'évolution du statut en AGPI au niveau de

différents organes suite à une supplémentation en GPL-DHA (étude 1), en fonction du temps (étude 2) et du type de régime alimentaire de base (étude 3).

## I.2 Composition en acides gras membranaires de différents tissus

L'étude de la composition en acides gras de la membrane cellulaire requiert l'emploi de différentes techniques :

- La préparation d'un homogénat tissulaire,
- La préparation de membranes cellulaires,
- L'extraction des lipides membranaires,
- La méthylation des acides gras des lipides membranaires,
- L'analyse chromatographique des acides gras méthylés en phase gazeuse,
- L'analyse statistique des résultats obtenus.

### I.2.1 Préparation des homogénats et des membranes cellulaires

La préparation des homogénats et des membranes cellulaires est effectuée à partir de prélèvements tissulaires des souris.

Les souris sont anesthésiées et des prélèvements tissulaires provenant de différents organes sont réalisés, parmi eux les poumons, l'intestin proximal et distal, le pancréas, qui sont supposés être les plus affectés dans la mucoviscidose ; mais également le foie, l'estomac, le rein, la rate, le cœur et le cerveau normalement indemnes. Ces tissus sont rincés avec du sérum physiologique froid, congelés rapidement dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'au moment des analyses.

Les prélèvements tissulaires sont homogénéisés à l'aide d'un Potter dans un volume de 2 à 5mL d'une solution hypotonique Tris-HCl 10mM à pH 7,4.

Cette opération est suivie de plusieurs étapes de centrifugations différentielles : La première à 1500g pendant 5 minutes à 4°C fera culoter les débris tissulaires grossiers homogénéisé par le Potter et constituera la fraction homogénat ; le surnageant est ensuite centrifugé à 7500g pendant 15 min à 4°C, lors de cette étape on va récupérer dans le culot les organites cellulaires ; enfin le surnageant de cette seconde centrifugation va être centrifugé à 100000g (ultracentrifugeuse Beckman Rotor TLX 100) pendant une heure pour pouvoir récupérer la fraction contenant les membranes cellulaires présentes dans le culot. Les trois culots sont repris dans 1 à 2 mL de Tris-HCl et conservées à -80°C.

### I.2.2 Extraction des lipides

Les fractions récoltées sont mises en présence d'un mélange méthanol/chloroforme (2:1) et placées sous agitation magnétique pendant 30 min. Des étapes successives d'extraction lipidique sont réalisées par séparation des phases à l'aide d'un mélange eau pure/chloroforme (1:1) (Bligh & Dyer, 1959). La phase contenant le chloroforme est ensuite évaporée sous azote afin de récupérer un extrait lipidique sec.

Pour les lipides de la fraction contenant les membranes cellulaires, une étape préalable de chromatographie sur couche mince est réalisée sur plaque de silice (5 x 7,5 cm, support en aluminium, gel de silice 60F254, Merck), en présence de HEA (Hexane/Ether/Acide acétique ; 80/20/1 ; v/v/v) afin de vérifier l'absence de contamination des échantillons en lipides non membranaires, tels que les triglycérides. La révélation est faite par immersion de la plaque dans une solution d'acide phosphomolybdique puis chauffage à 180°C. Si le test est concluant, le reste de l'échantillon peut alors être méthylé.

### I.2.3 Méthylation des acides gras

L'extrait sec est solubilisé dans un mélange méthanol/BF<sub>3</sub>-méthanol (1:1) et placé dans un bain marie à 100°C pendant 45 min afin de permettre la méthylation des acides gras (Ohta *et al.*, 1990). Après refroidissement, l'efficacité de la réaction de méthylation (présence d'esters méthyliques, absence de TG, AGL) est vérifiée par une chromatographie sur couche mince sur plaque de silice (5 x 7,5 cm, support en aluminium, gel de silice 60F254, Merck), en présence de HEA (Hexane/Ether/Acide acétique ; 80/20/1 ; v/v/v), et la révélation est faite par immersion dans une solution d'acide phosphomolybdique puis chauffage à 180°C.

Si tous les lipides ne sont pas méthylés, on incube à nouveau au bain-marie à 100°C jusqu'à méthylation complète.

Deux étapes successives d'extraction lipidique sont réalisées par séparation des phases à l'aide d'un mélange eau pure/hexane (1:1). La phase contenant l'hexane est ensuite évaporée sous azote et l'extrait lipidique sec contenant les esters méthyliques est remis en suspension dans l'hexane à la concentration adéquate pour l'analyse chromatographique en phase gazeuse (1 à 10 mg d'esters méthyliques/mL d'hexane).



#### I.2.4 Analyse chromatographique des acides gras méthylés en phase gazeuse

Les esters méthyliques d'acides gras sont analysés par chromatographie en phase gazeuse sur un Autosystem XL Perkin Elmer équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et le logiciel Turbochrom (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France).

L'analyse de la composition en acide gras est effectuée avec une colonne capillaire OMEGAWAX 250 (Supelco-Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) d'une longueur de 30 mètres et de diamètre interne de 0,25  $\mu\text{m}$ . L'hydrogène est utilisé comme gaz vecteur à une pression de 8 psi. La température initiale dans la chambre d'injection est de 60°C (débit de 1,22 mL/min) et elle augmente progressivement de 20°C/min jusqu'à atteindre 160°C puis de 2°C/min jusqu'à atteindre 215°C (débit de 0,63 mL/min) afin d'obtenir une séparation optimale des pics.

Le flux d'hydrogène, entraîne la migration des acides gras méthylés à travers la colonne chromatographique. L'hexane, n'ayant pas d'affinité pour la phase stationnaire, migre plus rapidement tandis que les acides gras méthylés migrent plus tardivement, en fonction de leur temps de rétention. Les acides gras sont identifiés grâce à l'utilisation de standards (Polyunsaturated Fatty Acid Mix No. 2 from Animal source, Polyunsaturated Fatty Acid Mix No. 3 from Menhaden Oil ; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France).

Le détecteur à ionisation de flamme permet au gaz vecteur de s'enflammer entre deux électrodes générant ainsi un courant constant lorsque le gaz vecteur est pur (ligne de base). La présence d'un acide gras méthylé dans le gaz vecteur modifie l'intensité du courant lors de la combustion se traduisant sous la forme d'un pic dont l'aire est proportionnelle à la concentration.

L'analyse chromatographique permet ainsi l'identification des différents acides gras présents dans l'échantillon et la détermination de leur proportion relative.

#### I.2.5 Analyse statistique des profils en acides gras

Les résultats sont présentés en moyennes  $\pm$  S.E.M. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test non-paramétrique de Mann-Withney (Statview pour windows version 5.0), Les différences avec un  $P$  inférieur à 0,05 sont considérées comme significatives, et les différences avec un  $P$  inférieur ou égal à 0,1 sont considérées comme une tendance.

## II Résultats

Les quelques études répertoriées dans la littérature concernant le profil en AGPI des organes de souris CF ont été effectuées à partir d'homogénats de tissus (Freedman et al., 1999 ; Werner et al., 2004 ; Beharry et al., 2007). Nous avons donc analysé les homogénats afin d'avoir un point de comparaison avec ces données déjà publiées. Cependant les profils en acides gras obtenus à partir des homogénats représentent l'ensemble des classes lipidiques de chaque tissu (les triglycérides, les acides gras libres et ceux libérés dans le cytosol après action de la phospholipase A2 intra-cellulaire, les esters de cholestérol, les phospholipides de la membrane des cellules et ceux de la membrane des organelles). Nous nous sommes donc également intéressés à l'analyse du profil en acides gras des phospholipides des membranes plasmiques des cellules afin d'obtenir des informations plus directement liées à la fluidité membranaire et donc à la fonctionnalité cellulaire.

### II.1 Etude 1 : Bénéfices de la supplémentation en GPL-DHA® sur le statut en AGPI chez la souris F508del

Cette étude nous a permis de comparer le statut en AGPI des souris CF avec celles sauvages toutes nourries avec du peptamen junior, et de définir l'impact de la supplémentation en faible dose de DHA sur ce statut. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans The Journal of Nutrition (Mimoun *et al.*, 2009 ; article mis en annexe du mémoire) et de ce fait nous irons à l'essentiel dans la présentation des résultats.

#### II.1.1 Impact au niveau des tissus cibles de la mucoviscidose

Si nous comparons tout d'abord le profil en AGPI des tissus pris dans leur globalité entre souris CF et WT non traités aux GPL-DHA (Tableau 14), nous constatons que le déséquilibre en AGPI n-6 est partiellement retrouvé chez notre souris F508del, à travers un taux de LA plus faible dans l'iléon (11%,  $P = 0,10$ , tendance) et dans le pancréas (17%,  $P < 0,05$ ), et un taux bien significativement supérieur du AA dans l'intestin proximal (37%), l'iléon (32%) et le pancréas (41%). On note aussi que le DGLA, précurseur direct de l'acide arachidonique, est également présent en proportion significativement plus importante chez les souris CF comparées aux WT dans la partie duodenum-jejunum et dans le pancréas mais pas dans

l'iléon. Aucun déséquilibre particulier n'est visible au niveau des poumons, mis à part un taux de LA qui semble plus faible (9%).

**Tableau 14:** Statut en certains acides gras polyinsaturés dans la fraction homogénat du duodenum-jejenum, de l'iléon, du pancréas et des poumons des souris sauvages ou CF avec ou sans supplémentation.

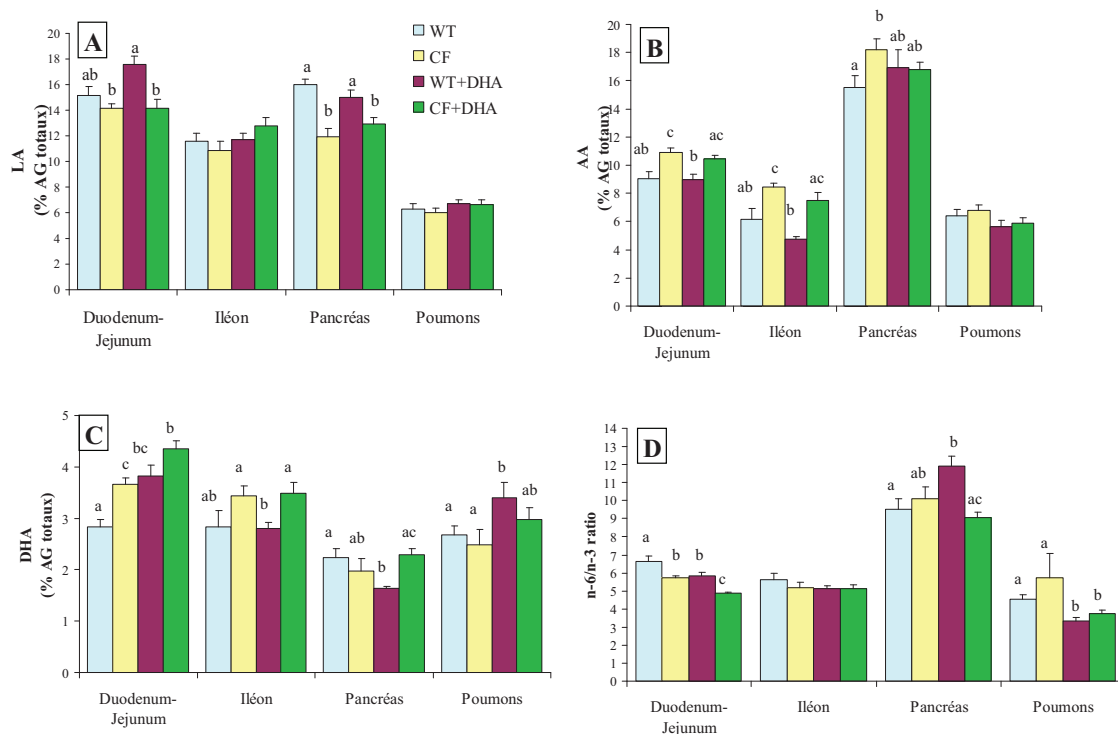
<b>Duod-Jej</b>	<b>WT</b>	<b>WT+DHA</b>	<b>CF</b>	<b>CF+DHA</b>
<b>LA</b>	14,64 ± 0,82	14,87 ± 0,76	13,65 ± 0,47	13,64 ± 0,63
<b>DGLA</b>	1,13 ± 0,13b	1,41 ± 0,15a,b	1,67 ± 0,08a	1,44 ± 0,13a,b
<b>AA</b>	<b>7,09 ± 0,53b</b>	<b>7,88 ± 0,71a,b</b>	<b>9,74 ± 0,40a</b>	<b>8,59 ± 0,48a,b</b>
<b>DHA</b>	<b>2,39 ± 0,23b</b>	<b>3,53 ± 0,33a</b>	<b>3,48 ± 0,14a</b>	<b>3,81 ± 0,25a</b>
<b>n-6/n-3</b>	6,74 ± 0,27a	5,14 ± 0,19b,c	5,65 ± 0,13b	4,96 ± 0,07c
<b>DHA/AA</b>	0,34 ± 0,01b	0,45 ± 0,02a	0,36 ± 0,01b	0,44 ± 0,01a
<b>Iléon</b>	<b>WT</b>	<b>WT+DHA</b>	<b>CF</b>	<b>CF+DHA</b>
<b>LA</b>	<b>13,42 ± 0,68a,b</b>	<b>13,78 ± 0,68a,b</b>	<b>11,89 ± 0,61b</b>	<b>13,94 ± 0,56a</b>
<b>DGLA</b>	1,71 ± 0,19a	1,73 ± 0,08a	1,52 ± 0,17a,b	1,15 ± 0,19b
<b>AA</b>	<b>5,78 ± 0,61b</b>	<b>5,50 ± 0,25b</b>	<b>7,62 ± 0,57a</b>	<b>5,11 ± 0,67b</b>
<b>DHA</b>	2,39 ± 0,33	2,88 ± 0,20	3,10 ± 0,25	2,42 ± 0,34
<b>n-6/n-3</b>	6,79 ± 0,57	5,71 ± 0,37	5,51 ± 0,32	6,31 ± 0,50
<b>DHA/AA</b>	0,41 ± 0,02b	0,52 ± 0,03a	0,41 ± 0,01b	0,47 ± 0,01a
<b>Pancréas</b>	<b>WT</b>	<b>WT+DHA</b>	<b>CF</b>	<b>CF+DHA</b>
<b>LA</b>	<b>13,8 ± 0,72a</b>	<b>15,07 ± 0,43a</b>	<b>11,53 ± 0,28b</b>	<b>11,95 ± 0,37b</b>
<b>DGLA</b>	0,95 ± 0,07a	1,04 ± 0,05a	1,57 ± 0,11b	1,37 ± 0,14b
<b>AA</b>	<b>13,06 ± 1,23a</b>	<b>16,92 ± 1,07a,b</b>	<b>18,4 ± 0,47b</b>	<b>14,18 ± 0,79a</b>
<b>DHA</b>	2,07 ± 0,24a,b,c	1,66 ± 0,06b	1,86 ± 0,09a,b,c	2,02 ± 0,12c
<b>n-6/n-3</b>	9,02 ± 0,48a,c	11,65 ± 0,68b,c	10,30 ± 0,42c	8,57 ± 0,23a
<b>DHA/AA</b>	0,16 ± 0,01a	0,10 ± 0,01b	0,10 ± 0,01b	0,14 ± 0,01a
<b>Poumons</b>	<b>WT</b>	<b>WT+DHA</b>	<b>CF</b>	<b>CF+DHA</b>
<b>LA</b>	<b>6,68 ± 0,42a,b</b>	<b>7,22 ± 0,29a</b>	<b>6,09 ± 0,19b</b>	<b>7,18 ± 0,46a</b>
<b>DGLA</b>	1,16 ± 0,09	1,07 ± 0,10	1,09 ± 0,05	0,95 ± 0,08
<b>AA</b>	7,47 ± 0,76	6,90 ± 0,67	8,22 ± 0,33	6,85 ± 0,56
<b>DHA</b>	2,95 ± 0,30	3,35 ± 0,29	2,62 ± 0,13	3,02 ± 0,29
<b>n-6/n-3</b>	4,70 ± 0,33a,b	4,06 ± 0,23b	5,20 ± 0,13a	4,50 ± 0,32a,b
<b>DHA/AA</b>	0,40 ± 0,03a	0,49 ± 0,02b	0,32 ± 0,01c	0,44 ± 0,01a

WT : souris sauvages ; CF : souris homozygotes F508del ; WT + DHA ou CF + DHA : souris sauvages ou homozygotes F508del supplémentées avec des GPL-DHA à la dose de 60 mg/kg pendant 6 semaines ; LA=acide linoléique, DGLA=acide di-homo gamma linoléique, EPA= acide eicosapentaénoïque, AA= acide arachidonique, DHA=acide docosahexaénoïque.

Les groupes de souris ne partageant pas au moins une lettre en commun sont significativement différents,  $P < 0,05$ . n = 6 ou 7

Par contre, aucun déséquilibre en AGPI n-3, n'est mis en évidence chez notre modèle de souris CF. En effet, les taux d'ALA sont très faibles dans tous les tissus (0,43-0,57% dans l'intestin, 0,18-0,13% dans le pancréas, 0,13-0,18% dans les poumons) et ne varient pas entre souris CF et WT, et surtout les taux de DHA sont proches voire significativement supérieurs (intestin proximal) à ceux retrouvés chez la souris sauvage. Ainsi, aucune déficience en DHA n'est observée chez notre souris CF.

**Figure 11 :** Proportion relative en LA, AA, DHA (exprimée en % des acides gras totaux), et ratio n-6/n-3 dans les phospholipides membranaires du duodenum-jejunum, de l'iléon, du pancréas et des poumons des souris sauvages ou CF avec ou sans supplémentation.



WT : souris sauvages ; CF : souris homozygotes F508del ; WT+DHA ou CF+DHA : souris sauvages ou homozygotes F508del supplémentées avec des GPL-DHA à la dose de 60 mg/kg pendant 6 semaines ; n = 6 ou 7

AG=acides gras, LA=acide linoléique, EPA= acide eicosapentaénoïque, AA= acide arachidonique, DHA=acide docosahexaénoïque.

Les groupes de souris ne partageant pas au moins une lettre en commun sont significativement différents,  $P < 0,05$ .

Le profil en AGPI des phospholipides membranaires (Figure 11) confirme ces conclusions en montrant un taux plus bas du LA notamment au niveau du pancréas (25%,  $P < 0,05$ ), un taux significativement supérieur du AA (21% dans l'intestin proximal, 39% dans l'iléon, 19%

dans le pancréas) et du DGLA (intestin proximal et pancréas), et des taux de DHA comparables voire plus élevés (31% dans l'intestin proximal ( $P < 0,05$ ), 22% dans l'iléon ( $P = 0,10$ )), chez notre souris F508del comparées au souris WT.

En fonction des organes, la baisse de LA, l'augmentation de DGLA et d'AA, et la stabilité voire l'augmentation des taux de DHA, ou le non changement des taux de tous ces AGPI (poumons) vont conduire à des rapports d'acides gras n-6/n-3 similaires (iléon, pancréas, poumons) ou significativement plus bas (duodénum-jéjunum) chez notre souris CF comparativement à la souris WT (Tableau 14 ; Figure 11). Le rapport DHA/AA a aussi été calculé des familles n-6 et n-3. Ce rapport est relativement proche entre les deux types de souris sauf dans le pancréas et les poumons (homogénat uniquement) où ce rapport est significativement plus faible chez la souris CF due à une forte concentration d'AA (Tableau 14, Figure 12).

Après traitement avec des GPL-DHA pendant 6 semaines, on observe plusieurs changements marqués au niveau des taux en AGPI mais qui sont différents selon le tissu et le phénotype de l'animal.

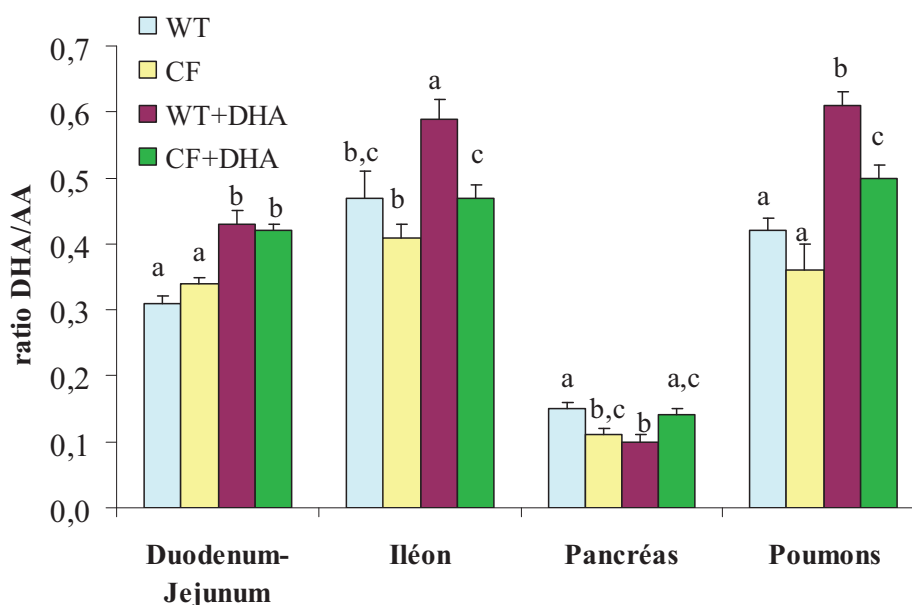
Si l'on considère les tissus dans leur globalité (Tableau 14), la supplémentation en GPL-DHA va avoir un effet sur les acides gras polyinsaturés de la voie n-6 mais uniquement chez les souris CF. En effet, les GPL-DHA permettent de rétablir significativement les taux de LA au niveau de la partie distale de l'intestin et des poumons, mais pas dans le pancréas. La supplémentation permet aussi de réduire les taux d'AA exagérément élevés, jusqu'à des valeurs proches de la souris WT non supplémentée, dans l'intestin proximal (12,5%,  $P = 0,10$ ), dans l'iléon (34%,  $P < 0,05$ ) et dans le pancréas (23%,  $P < 0,05$ ). En parallèle, les taux de DGLA tendent à diminuer dans l'intestin ( $P = 0,10$ ). En ce qui concerne la voie de n-3, il est à noter que, mis à part dans le duodénum-jéjunum et uniquement pour la souris WT, la supplémentation en GPL-DHA ne semble pas augmenter significativement la proportion relative en DHA dans l'homogénat des tissus analysés.

En ce qui concerne les phospholipides membranaires (Figure 11), la teneur en LA n'est pas modifiée par l'apport de GPL-DHA (Figure 11A), mais celle en AA semble diminuer dans différents organes notamment dans le pancréas (8%,  $P = 0,10$ ) et les poumons (18%,  $P = 0,10$ ) de la souris CF pour se rapprocher des valeurs de la souris WT non supplémentée (Figure 11B). La supplémentation conduit à une augmentation significative du taux de DHA dans le duodénum-jéjunum des souris CF (18%) et WT (35%) et dans les poumons des souris

WT (28%) (Figure 11C). Le taux de DHA ne varie pas dans l'iléon, chez les deux types de souris, et dans le pancréas des souris CF, mais diminue significativement dans le pancréas des les souris WT (26%).

L'administration de GPL-DHA est suivie d'une diminution significative du rapport acides gras n-6/n-3 dans les phospholipides membranaires chez les souris WT et CF (Figure 11D), respectivement, au niveau de l'intestin proximal (13 et 14%) et des poumons (26 et 13%). Ce rapport tend à diminuer également dans le pancréas des souris CF (11%). Cette diminution est principalement liée soit à une forte augmentation du taux de DHA (intestin proximal), soit à une combinaison de la baisse d'AA et une augmentation de DHA. Le rapport DHA/AA est aussi modifié suite au traitement, et augmente, dans des proportions plus ou moins importantes, chez les souris CF et WT, respectivement, de façon significative dans l'intestin proximal (26 et 38%), dans l'intestin distal (13 et 28%), et dans les poumons (31 et 44%), et tend à augmenter dans le pancréas mais chez les souris CF uniquement ( $P = 0,6$  ; + 26%) (Figure 12).

**Figure 12 :** Rapport DHA/AA dans les phospholipides membranaires des tissus affectés par la mucoviscidose



WT : souris sauvages ; CF : souris homozygotes F508del ; WT+DHA ou CF+DHA : souris sauvages ou homozygotes F508del supplémentées avec des GPL-DHA à la dose de 60 mg/kg pendant 6 semaines ; n = 6 ou 7

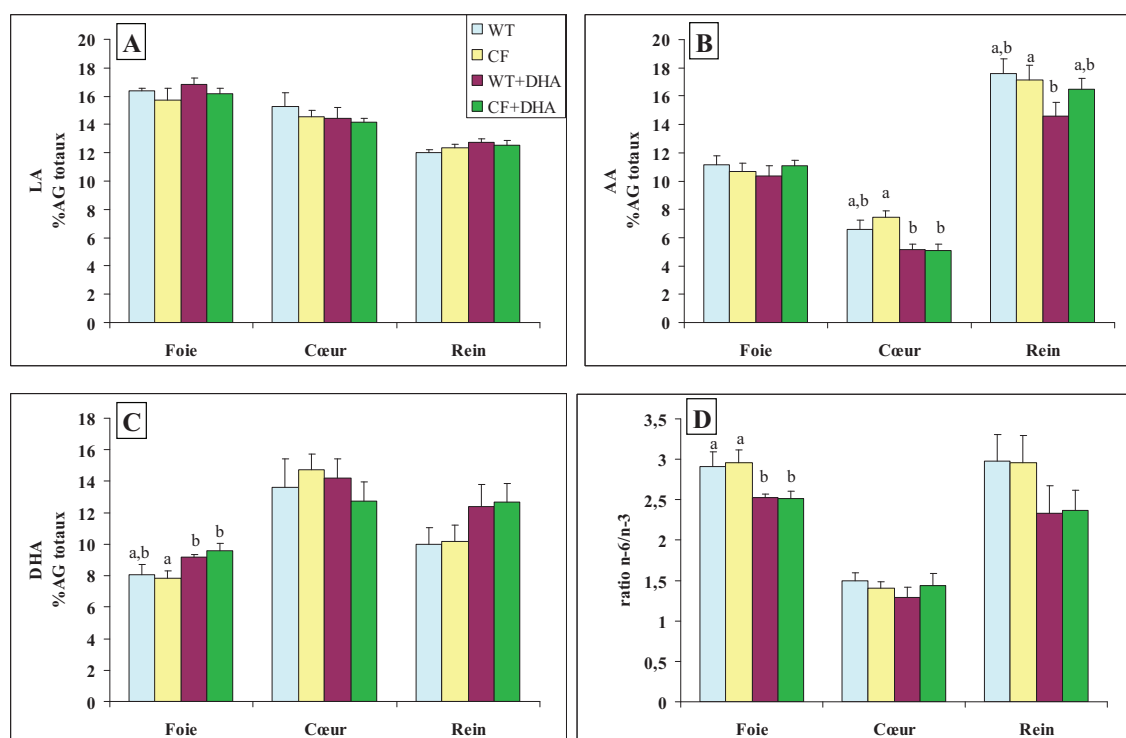
AA= acide arachidonique, DHA=acide docosahexaénoïque.

Les groupes de souris ne partageant pas au moins une lettre en commun sont significativement différents,  $P < 0,05$ .

## II.1.2 Tissus non supposés affectés par la mucoviscidose

Aucune altération significative majeure du statut en AGPI n'a été mise en évidence chez nos souris CF dans les organes non supposés affectés par la mucoviscidose, c'est à dire le foie, le cœur et les reins au niveau des lipides totaux tissulaires (Figure 13) comme au niveau des phospholipides membranaires (Figure 14)

**Figure 13 :** Proportion relative en LA, AA, DHA (exprimée en % des acides gras totaux), et rapport n-6/n-3 dans les homogénats de foie, de cœur et de rein des souris sauvages ou CF avec ou sans supplémentation



WT : souris sauvages ; CF : souris homozygotes F508del ; WT+DHA ou CF+DHA : souris sauvages ou homozygotes F508del supplémentées avec des GPL-DHA à la dose de 60 mg/kg pendant 6 semaines ; n = 6 ou 7

AG=acides gras, LA=acide linoléique, EPA= acide eicosapentaénoïque, AA= acide arachidonique, DHA=acide docosahexaénoïque.

Les groupes de souris ne partageant pas au moins une lettre en commun sont significativement différents,  $P < 0,05$ .

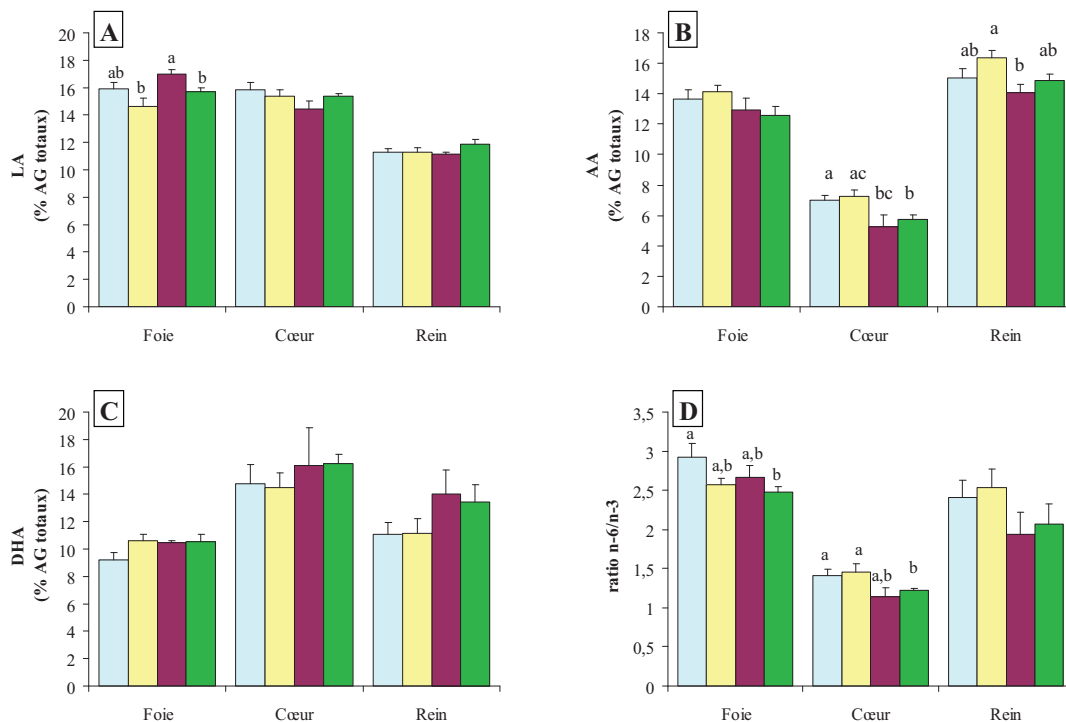
Le traitement par les GPL-DHA va tout de même avoir un impact. Les effets majeurs observés sont :

- une diminution de l'AA chez les souris CF et WT, respectivement, au niveau tissulaire comme membranaire significative dans le cœur (32-21 et 24-25%, Figures 13 et 14), dans les

phospholipides hépatiques (11 et 5%, Figure 14) et des reins (10 et 6,5%,  $P = 0,07$ , Figure 14).

- une augmentation significative du DHA au niveau du tissu hépatique, mais pas au niveau des phospholipides membranaires, chez la souris CF (23%) avec une tendance chez la souris WT. Il semble que le DHA augmente aussi au niveau des phospholipides membranaires du cœur et des reins, mais le nombre d'animaux utilisés ne permet pas d'atteindre des seuils de significativité.

**Figure 14:** Proportion relative en LA, AA, DHA (exprimée en % des acides gras totaux), et rapport n-6/n-3 dans les phospholipides membranaires de foie, de cœur et de rein des souris sauvages ou CF avec ou sans supplémentation



WT : souris sauvages ; CF : souris homozygotes F508del ; WT+DHA ou CF+DHA : souris sauvages ou homozygotes F508del supplémentées avec des GPL-DHA à la dose de 60 mg/kg pendant 6 semaines ; n = 6 ou 7

AG=acides gras, LA=acide linoléique, EPA= acide eicosapentaénoïque, AA= acide arachidonique, DHA=acide docosahexaénoïque.

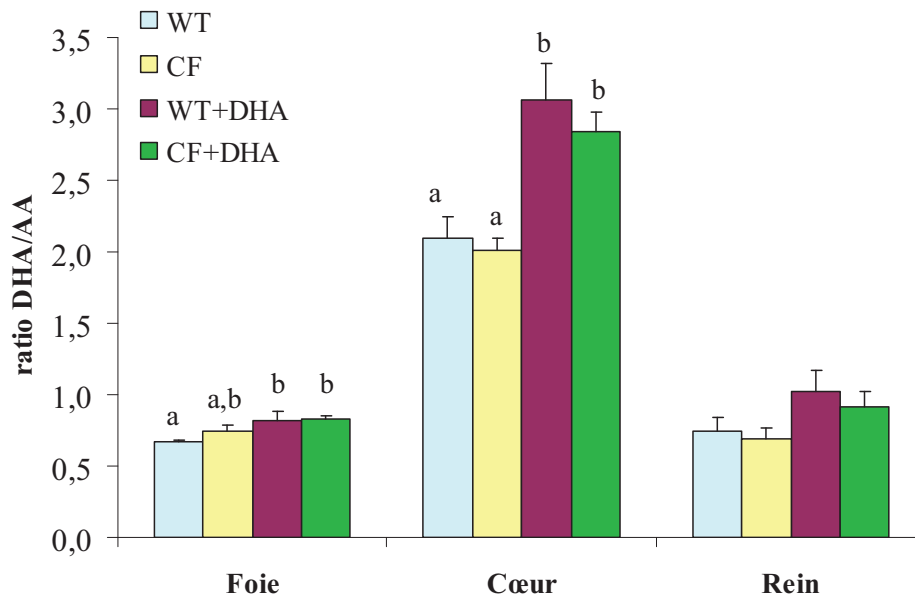
Les groupes de souris ne partageant pas au moins une lettre en commun sont significativement différents,  $P < 0,05$ .

Ces deux effets majeurs se traduisent par une diminution significative du rapport n-6/n-3 au niveau du tissu hépatique (15% chez CF et 13% chez WT), des phospholipides membranaires du cœur (16% et 19%) et des reins (18,5 et 19,5%), et une augmentation significative du



rapport DHA/AA dans le foie (11% avec  $P= 0,06$ , et 19%), le cœur (41 et 46%), et les reins (32 et 36%,  $P= 0,10$ ) (Figure 15)

**Figure 15:** Rapport DHA/AA dans les phospholipides membranaires des tissus supposés non affectés par la mucoviscidose.



WT : souris sauvages ; CF : souris homozygotes F508del ; WT+DHA ou CF+DHA : souris sauvages ou homozygotes F508del supplémentées avec des GPL-DHA à la dose de 60 mg/kg pendant 6 semaines ; n = 6 ou 7

AA= acide arachidonique, DHA=acide docosahexaénoïque.

Les groupes de souris ne partageant pas au moins une lettre en commun sont significativement différents,  $P < 0,05$ .

## II.2 Etude 2 : Evolution du statut en AGPI au cours du temps chez la souris F508del

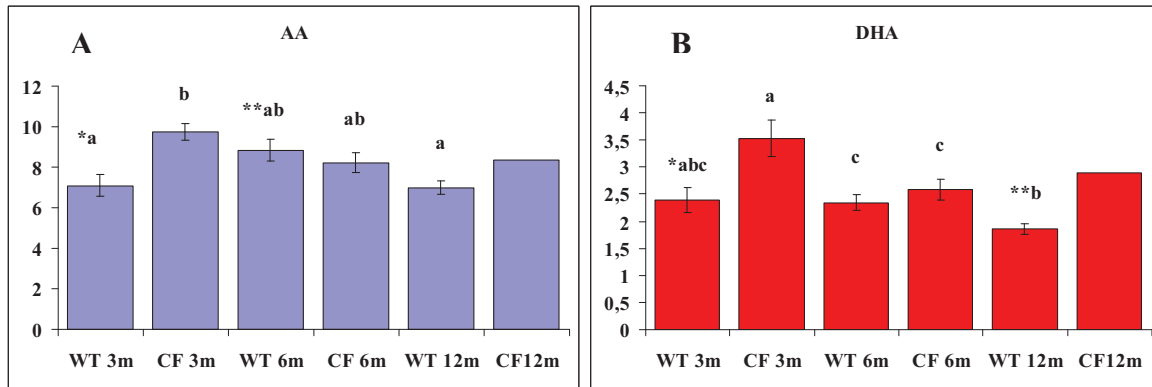
La déficience en DHA décrite dans la littérature n'étant pas retrouvée chez nos souris F508del âgées de 3 mois, nous décidons d'étudier le profil en AGPI des souris à l'âge de 6 et 12 mois dans l'hypothèse d'une apparition d'un déficit en DHA au cours du temps.

### II.2.1 Effets du facteur temps sur le statut en AGPI des tissus affectés par la mucoviscidose

En ce qui concerne le duodénum-jéjunum, les observations sont différentes entre la fraction homogénat et la fraction membranaire.

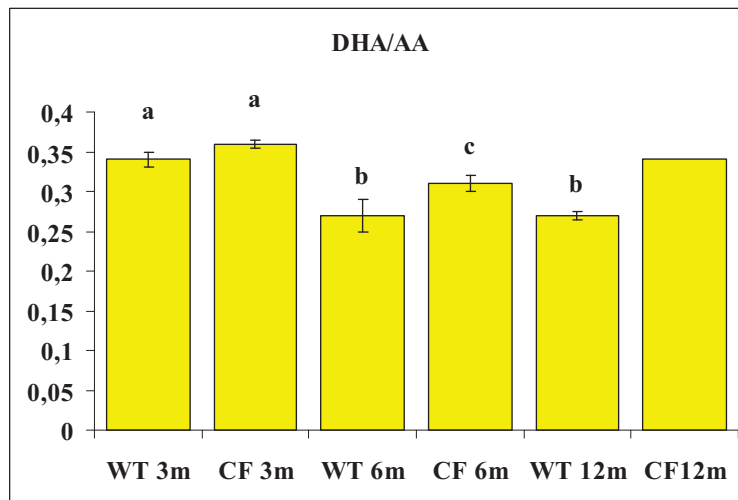
Au niveau du tissu global, on observe que les taux d'AA et de DHA, plus importants chez les souris CF par rapport aux WT à 3 mois, sont équivalents dans les deux groupes à 6 mois, et semble augmenter chez les CF par rapport aux WT à 12 mois (Figure 16).

**Figure 16 :** Evolution des teneurs d'AA (A) et de DHA (B) dans le duodénum-jéjunum (homogénat) au cours du temps



Les groupes de souris ne partageant pas au moins une lettre en commun sont significativement différents,  $P < 0,05$ . AA=acide arachidonique ;DHA=acide docosahexaénoïque. WT 3m (n=4) ou CF 3m (n=6) = souris sauvages ou F508del âgées de 3mois nourries au Peptamen Junior, WT 6m (n=9) ou 12m (n=17) = souris sauvages à 6 et 12 mois nourries au régime standard, CF 6m (n=5) ou 12m (n=2) = souris F508del à 6 et 12 mois nourries au Peptamen Junior. CF 12 mois est à considérer comme une tendance car le n est trop faible pour permettre une analyse statistique.

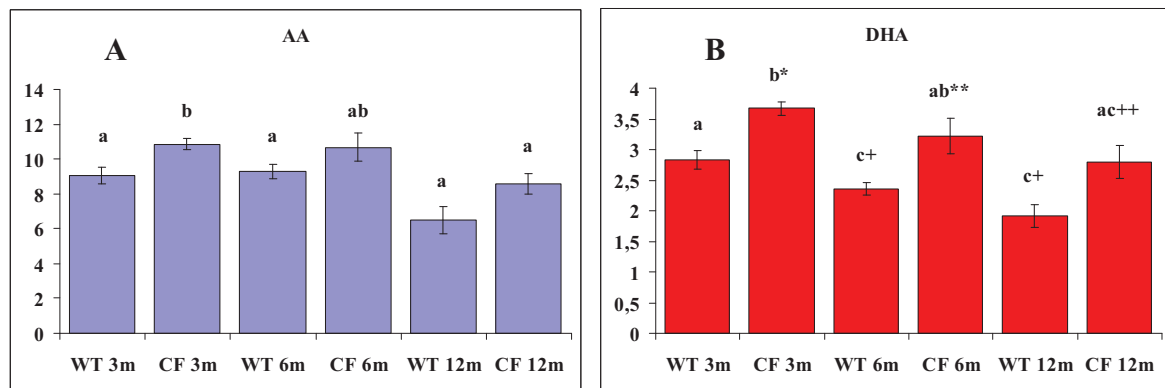
**Figure 17 :** Evolution du rapport DHA/AA dans le duodénum-jéjunum (homogénat) au cours du temps



Les groupes de souris ne partageant pas au moins une lettre en commun sont significativement différents,  $P < 0,05$ . AA=acide arachidonique ;DHA=acide docosahexaénoïque. WT 3m (n=4) ou CF 3m (n=6) = souris sauvages ou F508del âgées de 3mois nourries au Peptamen Junior, WT 6m (n=9) ou 12m (n=17) = souris sauvages à 6 et 12 mois nourries au régime standard, CF 6m (n=5) ou 12m (n=2) = souris F508del à 6 et 12 mois nourries au Peptamen Junior. CF 12 mois est à considérer comme une tendance car le n est trop faible pour permettre une analyse statistique.

Le rapport DHA/AA était similaire entre les deux groupes à 3 mois, puis il devient significativement supérieur chez les CF par rapport aux WT à 6 mois (15%), et tend à l'être également à 12 mois (Figure 17).

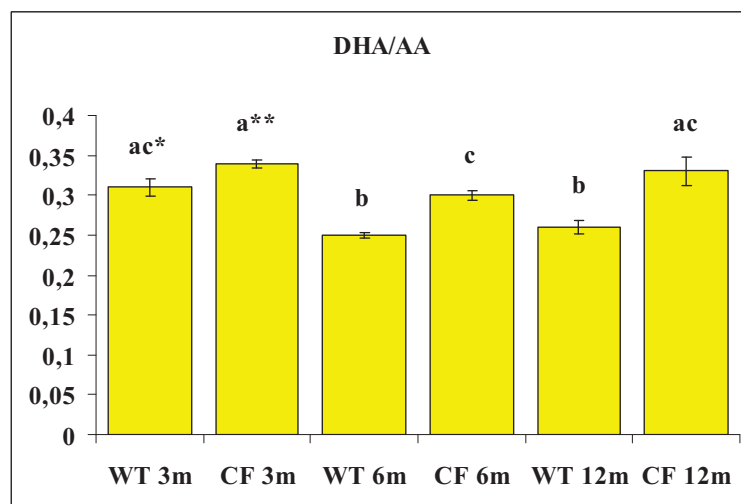
**Figure 18 :** Evolution des teneurs d'AA (A) et de DHA (B) dans le duodénum-jéjunum (phospholipides membranaires) au cours du temps



Les groupes de souris ne partageant pas au moins une lettre en commun sont significativement différents,  $P < 0,05$  ; ceux qui ne partagent pas le même nombre de \* ou de + ont un  $0,05 < P < 0,1$

AA=acide arachidonique ;DHA=acide docosahexaénoïque. WT 3m (n=4) ou CF 3m (n=6) = souris sauvages ou F508del âgées de 3mois nourries au Peptamen Junior, WT 6m (n=8) ou 12m (n=16) = souris sauvages à 6 et 12 mois nourries au régime standard, CF 6m (n=5) ou 12m (n=3) = souris F508del à 6 et 12 mois nourries au Peptamen Junior

**Figure 19 :** Evolution du rapport DHA/AA dans le duodénum-jéjunum (phospholipides membranaires) au cours du temps.



Les groupes de souris ne partageant pas au moins une lettre en commun sont significativement différents,  $P < 0,05$  ; ceux qui ne partagent pas le même nombre de \* ou de + ont un  $0,05 < P < 0,10$

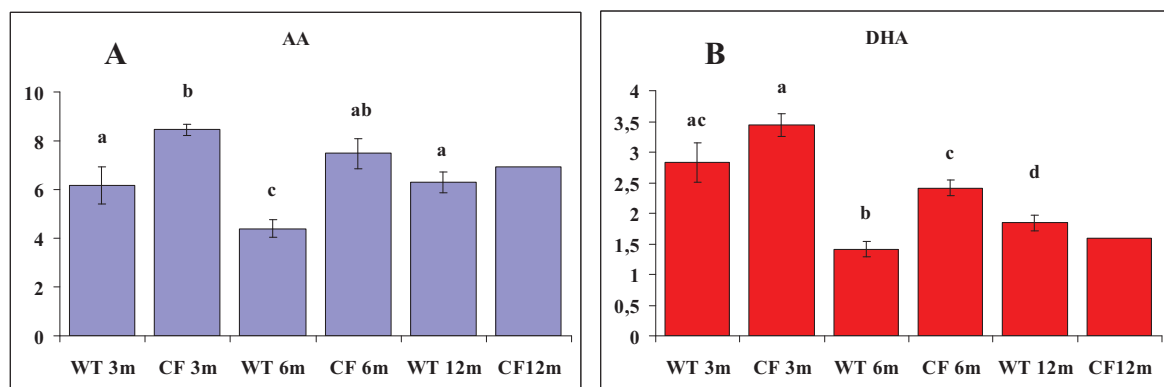
AA=acide arachidonique ;DHA=acide docosahexaénoïque. WT 3m (n=4) ou CF 3m (n=6) = souris sauvages ou F508del âgées de 3mois nourries au Peptamen Junior, WT 6m (n=8) ou 12m (n=16) = souris sauvages à 6 et 12 mois nourries au régime standard, CF 6m (n=5) ou 12m (n=3) = souris F508del à 6 et 12 mois nourries au Peptamen Junior

En ce qui concerne les phospholipides membranaires du duodénum-jéjunum, les taux d'AA et de DHA était également significativement supérieur chez les souris CF par rapport aux souris WT à 3 mois. Pour l'AA, à 6 et à 12 mois, l'écart entre les deux groupes n'est plus significatif (Figure 18 A). Par contre, le taux de DHA est toujours plus important chez les souris CF que les souris WT de façon significative à 6 mois (37%,  $P = 0,005$ ) et tend à l'être à 12 mois (28%,  $P = 0,057$ ) (Figure 18 B).

Le rapport DHA/AA similaire entre les deux groupes à 3 mois, devient significativement supérieur chez les CF par rapport aux WT à 6 mois et à 12 mois (Figure 19).

Dans l'iléon, tissu le plus affecté chez notre modèle murin, on observe également des changements au cours du temps. Ils sont similaires dans les deux fractions analysées, et pour cette raison nous ne présenterons que les figures correspondant aux phospholipides membranaires pour ce tissu (Figures 20 et 21). Comme à 3 mois, les taux d'AA et de DHA sont significativement plus importants chez les souris CF par rapport aux WT à 6 mois (70 et 71%, respectivement). À 12 mois, l'AA tendrait à être encore supérieur chez les CF par rapport aux WT, par contre le DHA tendrait à diminuer de façon importante chez les CF et à être inférieur aux WT.

**Figure 20 :** Evolution des teneurs d'AA (A) et de DHA (B) dans l'iléon (phospholipides membranaires) au cours du temps

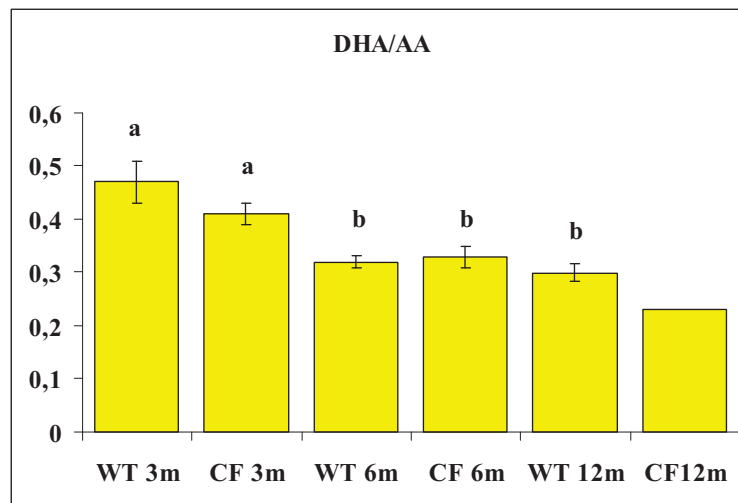


Les groupes de souris ne partageant pas au moins une lettre en commun sont significativement différents,  $P < 0,05$ .

AA=acide arachidonique ;DHA=acide docosahexaénoïque. WT (n=5) ou CF 3m (n=7) = souris sauvages ou F508del à 3mois nourries au Peptamen Junior, WT 6m (n=15) ou 12m (n=18) = souris sauvages à 6 et 12 mois nourries au régime standard, CF 6m (n=5) ou 12m (n=2) = souris F508del à 6 et 12 mois nourries au Peptamen Junior.

CF 12 mois est à considérer comme une tendance car le n est trop faible pour permettre une analyse statistique.

Figure 21 : Evolution du rapport DHA/AA dans l'iléon (phospholipides membranaires) au cours du temps.



Les groupes de souris ne partageant pas au moins une lettre en commun sont significativement différents,  $P < 0,05$ .

AA=acide arachidonique ;DHA=acide docosahexaénoïque. WT (n=5) ou CF 3m (n=7) = souris sauvages ou F508del à 3mois nourries au Peptamen Junior, WT 6m (n=15) ou 12m (n=18) = souris sauvages à 6 et 12 mois nourries au régime standard, CF 6m (n=5) ou 12m (n=2) = souris F508del à 6 et 12 mois nourries au Peptamen Junior.

CF 12 mois est à considérer comme une tendance car le n est trop faible pour permettre une analyse statistique.

Le rapport DHA/AA dans l'iléon diminue au cours du temps mais cette évolution est commune aux deux groupes analysés. A 12 mois, cette diminution tendrait à être plus prononcée chez les CF par rapport aux WT.

## II.2.2 Effets du facteur temps sur l'évolution du profil en AGPI des tissus supposés non affectés par la mucoviscidose

En ce qui concerne le tissu hépatique, la teneur en AA augmente au cours du temps identiquement chez les souris CF et sauvages (valeurs variant de 10-15 à 13-16% des acides gras totaux), alors que la teneur en DHA reste pratiquement stable (autour de 8-9 et 9-10%), qu'il s'agisse de l'homogénat ou des phospholipides membranaires, respectivement.

Le cœur est un tissu qui présente un haut taux de DHA (14 à 17% des acides gras totaux) et des teneurs en AA variant de 6 à 7%. Ces teneurs évoluent peu au cours du temps chez la souris CF et sauvage, que l'on considère le tissu dans son ensemble ou les phospholipides membranaires. Les rapports n-6/n-3 y sont les moins élevés (environ 1,50) et les rapports DHA/AA les plus hauts (2-2,5).

Les reins quant à eux présentent une teneur en AA de l'ordre de 14-17% des acides gras totaux, et de 10-12 % en DHA qu'il s'agisse de l'homogénat ou des phospholipides membranaires. Les valeurs sont là aussi relativement proches entre les souris sauvages et les souris CF et ne subissent pas de grandes fluctuations au cours du temps.

### II.3 Etude 3 : Evolution du statut en AGPI en fonction du régime de base chez la souris F508del

Pour rappel, les souris CF de l'étude de supplémentation ont été nourries au peptamen junior® afin de prévenir un ileus méconial fatal chez ce modèle murin et augmenter leur chance de survie. Cette émulsion commercialisée contient la même quantité de lipides qu'un régime standard mais une composition en acides gras différente (Tableau 1Tableau 12 page 62).

Afin de savoir si cette alimentation particulière a eu un impact fort sur l'évolution du statut en AGPI chez notre souris CF, nous avons mené une étude dans laquelle nous avons remplacé le peptamen par des granulés standards et nous avons rajouté un laxatif (Movicol®) dans l'eau de boisson des souris CF pour prévenir l'obstruction intestinale et augmenter nos chances de pouvoir étudier des souris sur le long terme c'est à dire à l'âge de 6 mois et de 12 mois. Les souris sauvages ont été nourries avec des granulés standards.

Notre modèle étant connu pour présenter des troubles au niveau de l'intestin, les résultats présentés ci-après sont focalisées sur cet organe.

#### II.3.1 Intestin proximal

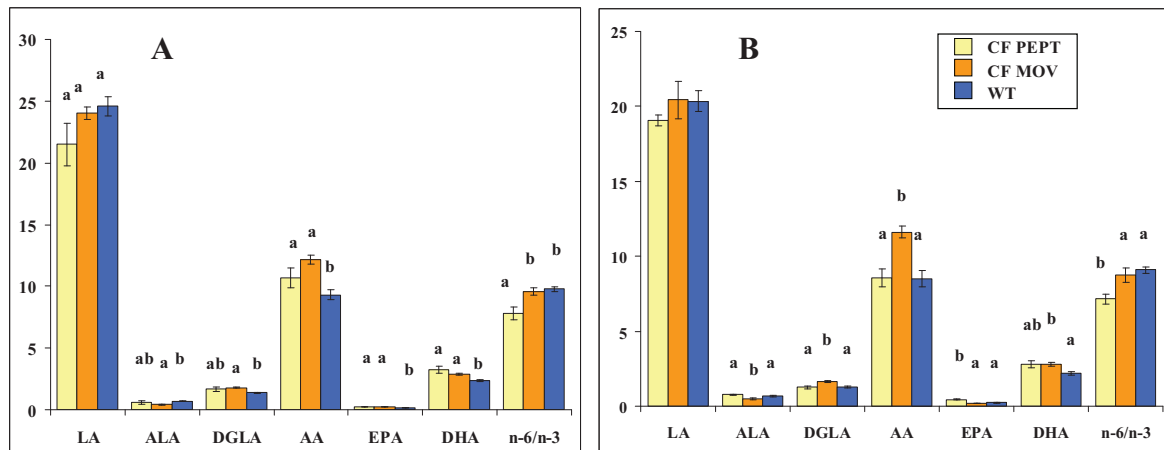
Les variations dans le statut en AGPI étant similaires dans l'homogénat et les phospholipides membranaires de l'intestin proximal, nous ne présenterons que les données concernant les phospholipides.

À 6 mois et à 12 mois, les teneurs en LA ne présentent aucune variation entre les groupes. Au niveau du DGLA et de l'AA, les teneurs observées pour les souris CF nourries au peptamen (CF PEPT) ne sont pas significativement différentes à 6 mois de celles observées pour les souris WT, par contre les souris CF nourries au Movicol (CF MOV) présentent des taux significativement supérieurs (30% à 6 mois ; 30 et 37%, respectivement à 12 mois) (Figure 23).

En ce qui concerne l'EPA et le DHA, les deux groupes CF présentent des valeurs significativement supérieures aux souris témoins à 6 mois (Figure 23A). A 12 mois, on ne note pas de variation significative entre les CF MOV et les WT pour les teneurs en EPA et par contre seules les souris CF MOV ont des taux de DHA significativement supérieurs aux WT (Figure 23B).

A 6 mois comme à 12 mois, on observe également une baisse du rapport n-6/n-3 chez les CF PEPT (provoqué notamment par un LA plus bas même si non significatif) par rapport aux WT, mais pas chez les CF MOV.

**Figure 22 :** Comparaison des proportions relatives en AGPI (exprimée en % des acides gras totaux) et du rapport n-6/n-3 dans les PL membranaires du duodénum-jéjunum des souris F508del nourries avec du peptamen (CF PEPT) ou avec un régime standard + movicol (CF MOV) âgées de 6 (A) ou de 12 (B) mois.



Les groupes de souris ne partageant pas au moins une lettre en commun sont significativement différents,  $P < 0,05$ .

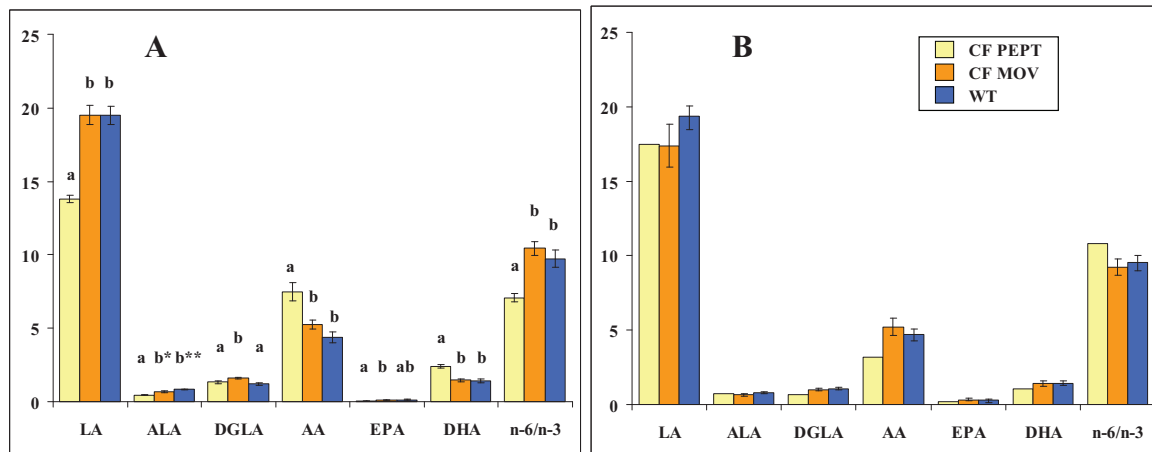
LA=acide linoléique, ALA= acide  $\alpha$ -linoléique, DGLA= acide dihomog- $\gamma$ -linoléique, AA= acide arachidonique, EPA= acide eicosapentaénoïque, DHA=acide docosahexaénoïque.

Souris âgées de 6 mois : CF PEPT n= 5, CF MOV n= 9, WT n=8. Souris âgées de 12 mois : CF PEPT n= 3, CF MOV n= 11, WT n=16.

### II.3.2 Intestin distal

Au niveau de l'intestin distal on observe des résultats quelque peu différents dans les homogénats (Figure 24) et les phospholipides membranaires (Figure 25).

**Figure 23 :** Comparaison des proportions relatives en AGPI (exprimée en % des acides gras totaux) et du rapport n-6/n-3 dans l'homogénat d'iléon des souris F508del nourries avec du peptamen (CF PEPT) ou avec un régime standard + movicol (CF MOV) âgées de 6 (A) ou de 12 (B) mois



Les groupes de souris ne partageant pas au moins une lettre en commun sont significativement différents,  $P < 0,05$  ; ceux qui ne partagent pas le même nombre d'astérisque ont un  $P$  compris entre 0,05 et 0,10. Souris âgées de 6 mois : CF PEPT n= 6, CF MOV n= 10, WT n=14. Souris âgées de 12 mois : CF PEPT n= 3, CF MOV n= 15, WT n=18.

LA=acide linoléique, ALA= acide  $\alpha$ -linoléique, DGLA= acide dihomog $\gamma$ -linoléique, AA= acide arachidonique, EPA= acide eicosapentaénoïque, DHA=acide docosahexaénoïque.

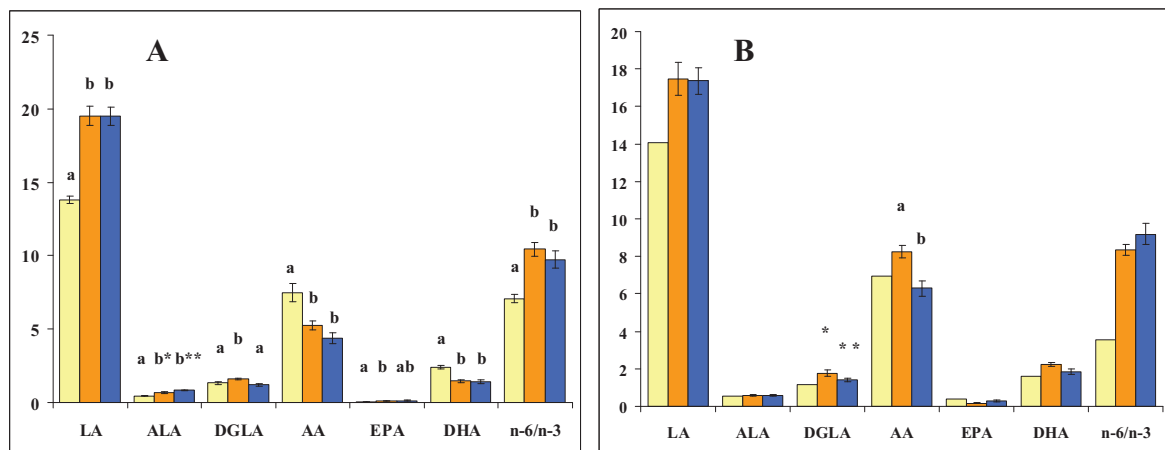
CF PEPT 12 mois est à considérer comme une tendance car le n est trop faible pour permettre une analyse statistique.

À 6 mois, le taux de LA est significativement plus faible chez les CF PEPT par rapport aux souris WT mais pas chez les CF MOV, à la fois dans les homogénats et les phospholipides membranaires. Dans les homogénats, on observe un taux plus important de LA chez les CF MOV par rapport aux WT (tendance  $P=0,06$ ). Le DGLA ne présente aucune variation dans les homogénats, par contre dans les membranes, on peut voir que les CF sous peptamen ne présentent aucune différence avec les témoins alors que les CF sous régime standard ont des taux de DGLA significativement supérieurs. Le taux de l'AA est augmenté chez les CF sous peptamen mais pas chez les CF sous régime classique (tendance pour l'homogénat et significativité pour les phospholipides) par rapport aux souris témoins. En ce qui concerne les n-3, l'ALA est significativement plus basse que soit la fraction d'iléon analysée chez les souris CF PEPT par rapport aux WT, et tend soit à être plus élevée (homogénat) ou plus basse (phospholipides) chez les souris CF MOV par rapport aux WT. Les CF nourris au peptamen présentent un taux significativement plus élevé en DHA par rapport aux WT mais aussi aux souris CF ayant reçu le régime standard dans l'iléon entier (73% et 91% respectivement) comme dans la fraction phospholipidique (71 et 65% respectivement).



Par rapport aux WT, le ratio n-6/n-3 est significativement plus bas chez les CF nourries au peptamen, du fait d'un taux nettement plus faible en LA et d'un taux plus élevé en DHA, mais pas chez les CF ayant reçu un régime standard.

**Figure 24 :** Comparaison des proportions relatives en AGPI (exprimée en % des acides gras totaux) et du rapport n-6/n-3 dans les PL membranaires d'iléon des souris F508del nourries avec du peptamen (CF PEPT) ou avec un régime standard + movicol (CF MOV) âgées de 6 (A) ou de 12 (B) mois



Les groupes de souris ne partageant pas au moins une lettre en commun sont significativement différents,  $P < 0,05$  ; ceux qui ne partagent pas le même nombre d'astérisque ont un  $P$  compris entre 0,05 et 0,10. Souris âgées de 6 mois : CF PEPT n= 5, CF MOV n= 9, WT n=15. Souris âgées de 12 mois : CF PEPT n= 2, CF MOV n= 11, WT n=18.

LA=acide linoléique, ALA= acide  $\alpha$ -linoléique, DGLA= acide dihomog $\gamma$ -linoléique, AA= acide arachidonique, EPA= acide eicosapentaénoïque, DHA=acide docosahexaénoïque.

CF PEPT 12 mois est à considérer comme une tendance car le n est trop faible pour permettre une analyse statistique.

A 12 mois aucune variation significative n'est observée dans l'homogénat, seule une tendance des CF PEPT à présenter un rapport n-6/n-3 supérieur aux deux autres groupes (Figure 24B). Au niveau des phospholipides, le LA présente des teneurs similaires dans les groupes WT et CF MOV et tend à être plus faible chez les CF PEPT. En ce qui concerne les AGPI n-6 à plus grande chaîne, les souris CF nourries au régime standard présentent des valeurs supérieures aux WT en DGLA (25% ; tendance  $p=0,0532$ ) et en AA (31% ;  $p=0,0053$ ). Au sein des acides gras n-3, pas de modifications entre les différents groupes pour les teneurs d'ALA, d'EPA et de DHA.

Les différentes tendances à la baisse observées pour le LA, le DGLA et l'AA pour les souris nourries au peptamen entraîne un rapport n-6/n-3 nettement inférieur aux deux autres groupes de souris nourries au régime standard (le nombre d'animaux dans ce groupe n'est cependant pas suffisant pour en évaluer la significativité).

## APPROCHE SUR MODELE CELLULAIRE INTESTINAL

Une des hypothèses de la déficience en acides gras essentiels présente chez les patients atteints de mucoviscidose était une mauvaise absorption des lipides au niveau intestinal. Le GPL-DHA administré aux souris a permis l'accrétion du DHA et l'augmentation du rapport DHA/AA dans les membranes cellulaires en particulier au niveau intestinal. Cette accrétion peut avoir une conséquence sur la fluidité membranaire et la question posée était de savoir si une répercussion pouvait être observée sur l'absorption de certains nutriments.

### I Matériel et Méthodes

#### I.1 Cellules

##### I.1.1 Modèle cellulaire

Pour notre étude, nous avons choisi la lignée cellulaire Caco-2. Ces cellules ont été isolées en 1977 à partir d'un adénocarcinome colique humain (Fogh *et al.*, 1977). Dans des conditions standard de culture et une fois la confluence atteinte, ces cellules miment le processus de différenciation crypto-villositaire observé *in vivo* dans les entérocytes (Pinto *et al.*, 1983). Le domaine apical est caractérisé par la présence d'une bordure en brosse similaire à celle observée dans les entérocytes matures du sommet des villosités de l'intestin grêle. Il s'agit donc d'un modèle intéressant pour l'étude du fonctionnement des entérocytes et dans le transport des lipides alimentaires en ce qui nous concerne. L'utilisation de Caco-2 a été précédemment validée pour l'étude de différents transports comme celui du cholestérol et des acides gras (Trotter *et al.*, 1996; Play *et al.*, 2003). Plusieurs protéines impliquées dans les transports au niveau membranaire ont été identifiées sur les cellules Caco-2 : SGLT1, GLUT 1, 2, 3 et 5 pour le transport du glucose ; CFTR pour le transport des ions chlorures ; NPC1L1, SR-B1 et ABC-A1 pour le transport du cholestérol; FAT, L-FABP pour le transport des acides gras (Le Beyec *et al.*, 1997; Sambuy *et al.*, 2005; Sane *et al.*, 2006; Haikal *et al.*, 2008; Sandoval *et al.*, 2008).

Notre laboratoire dispose de trois clones purs de la lignée Caco-2 : TC7, PD7 et PF11, gracieusement fournis par M. Rousset (UMR INSERM U872, Paris). Dans le cadre de notre

étude, nous avons utilisé le clone TC7 (Chantret *et al.*, 1994). Le choix de ce clone repose sur plusieurs critères, dont :

- une résistance trans-épithéliale faible et une activité phosphatase alcaline élevée (Zucco *et al.*, 2005);
- une bonne viabilité cellulaire en présence de taurocholate malgré son caractère détergent (Salvini *et al.*, 2002);
- une plus faible consommation de glucose se traduisant par l'expression des mêmes transporteurs que les entérocytes sains (SGLT1, GLUT2, GLUT5) et l'absence, une fois différencié, de ceux de phénotypes cancéreux (GLUT3 et GLUT1) (Mahraoui *et al.*, 1994).

Cependant, ce modèle présente certaines limites, comme sa faible capacité de sécrétion des lipides ou l'absence de certains transporteurs tels que CD36.

### I.1.2 Entretien et mise en culture

Toutes les manipulations se font sous une hotte à flux laminaire (BHA 48, Faster) en condition stérile.

Pour l'entretien en phase de croissance, les cellules sont cultivées dans des flasques en plastique de 25 cm<sup>2</sup> (TPP, Polylabo) dans un milieu dit « complet » et qui est constitué de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant 25 mM de glucose (Gibco BRL), supplémenté avec 20 % de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé à la chaleur (30 min, +56 °C), 1 % d'une solution commerciale d'acides aminés non essentiels (Gibco BRL) et 1 % d'une préparation d'antibiotiques contenant 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules sont cultivées à +37 °C, en atmosphère humide, dans une étuve à air- CO<sub>2</sub> (90% air- 10% CO<sub>2</sub>). Le milieu de culture complet est remplacé tous les 2 jours.

Le tapis cellulaire atteint 80 % de confluence en 7 jours et il est alors dissocié par une solution de trypsine-EDTA (0,25 % trypsine, 1 mM EDTA) (Gibco BRL). Les cellules sont alors réensemencées dans de nouvelles flasques (pour entretien) à une densité de 0,25 x 10<sup>6</sup> cellules par flasque ou mises en culture dans d'autres conditions (pour expérimentation).

Pour mimer le transport entérocytaire, nous devons travailler sur des cellules Caco 2 polarisées, afin qu'elles aient une morphologie et un fonctionnement similaire à ceux d'un

entérocyte différencié. Pour cela nous avonsensemencé les cellules Caco 2 TC7 dans des « inserts » sur des filtres transparents en PET de 23,1 mm de diamètre et 1  $\mu\text{m}$  de porosité. Ces « inserts » sont placés dans des plaques à 6 puits (Becton Dickinson). Pour les expérimentations, les cellules sontensemencées à une densité de  $0,25 \times 10^6$  par insert. L'utilisation de filtres permet un accès différentiel aux deux pôles de la cellule. Le pôle apical en contact avec ce qui représente la lumière intestinale et le pôle basolatéral en contact avec ce qui représente le compartiment plasmatique. La première semaine, les cellules sont cultivées avec du milieu complet (1 ml en apical et 2 ml en basolatéral) puis en l'absence de SVF en apical pour les deux semaines suivantes afin d'induire la différenciation en permettant une configuration proche des conditions physiologiques. Les cellules sont utilisées après 21 jours de culture, c'est-à-dire lorsque qu'elles sont jointives et polarisées.

### I.1.3 Conditions testées

Dans cette étude nous avons testé deux conditions :

- T : cellules Caco2 clone TC7 sans aucun traitement (témoins)
- D : cellules Caco2 clone TC7 ayant reçu des liposomes GPL-DHA<sup>®</sup> (100  $\mu\text{M}$  soit 32,8  $\mu\text{g}$  de DHA par puits) à partir du 7<sup>e</sup> jour de culture dans le compartiment apical (mimant ce qui arrive au niveau de la lumière intestinale)

### I.1.4 Préparation des liposomes de GPL-DHA<sup>®</sup>

Les phospholipides (GPL-DHA<sup>®</sup>) ont été mis en solution sous forme de liposomes. Au film sec des phospholipides obtenu par séchage sous flux d'azote, on ajoute du PBS (phosphate buffered saline) 10 mM pour arriver à une solution de phospholipides à 10 mg/mL. La solution obtenue est alors soniquée cinq fois pendant deux minutes avec une minute d'intervalle jusqu'à l'obtention d'une solution opalescente. Enfin, on filtre la solution sur un filtre de porosité de 0,22  $\mu\text{m}$ . Les liposomes sont conservés à + 4°C le temps de l'expérimentation.

Une analyse granulométrique des liposomes GPL-DHA a été réalisée sur Zetasizer Nano ZS (Malvern) qui permet une mesure précise des particules comprises entre 0,6 nm et 6  $\mu\text{m}$ . Les mesures ont été effectuées en triplicate pour trois concentrations différentes (Tableau 15).

Tableau 15 : Taille moyenne des particules de liposomes GPL-DHA

	Tailles moyenne des particules	Répartition
Liposomes <i>Non dilué</i>	179,8 nm	90,4 %
	36,5 nm	9,6 %
Liposomes <i>Dilution 1</i>	193,6 nm	92,7 %
	31,95 nm	7,3 %
Liposomes <i>Dilution 2</i>	155,3 nm	96,5 %
	23,06 nm	3,5 %

### I.1.5 Analyse lipidique des cellules

Pour chacune des études un puits de chaque condition expérimentale a été réservé à l'analyse lipidique. Pour ce faire nous avons extrait les lipides par la méthode de Folch modifiée par Hernell (Folch *et al.*, 1957; Hernell *et al.*, 1990). À un volume de culot cellulaire est ajouté vingt volumes de méthanol/chloroforme (2/1). Après agitation au vortex une solution aqueuse (NaCl 150 mM, 2% Acide Acétique, pH = 3) est additionné au mélange à raison de 20% du volume total. Après centrifugation (20 min, 2000 rpm, 20°C), la phase inférieure (contenant le chloroforme) est récupérée et évaporée sous azote afin d'obtenir un extrait lipidique sec qui est ensuite pesé, méthylié, et analysé de la même façon que dans l'étude animale pour analyser le profil en acides gras.

### I.1.6 Test de différenciation cellulaire

Plusieurs tests sont réalisés afin de vérifier que les cellules sont bien organisées en tapis cellulaire et qu'elles ont bien atteint le stade de différenciation au 21<sup>e</sup> jour de culture.

#### I.1.6.1 Mesure de la résistance transépithéliale

Elle est réalisée à l'aide d'un VoltOhmmètre Millicell-ERS<sup>®</sup> (Millipore) auquel est branchée une double électrode que l'on place de part et d'autre de l'insert pour avoir ainsi accès aux deux compartiments (apical et basolatéral). Avant chaque expérimentation les puits et le compartiment « basolatéral » sont rincés et remplis avec du PBS en quantité suffisante pour que les pointes des électrodes soient immergées. Une fois le système stabilisé (environ 15 minutes), on effectue trois mesures de résistance pour chaque puits, et une mesure sur un puits vide (sans cellules) en parallèle. A chacune des mesures de résistance effectuées sur les

puits contenant des cellules on retranche la mesure effectuée sur le puits vide et on multiplie ensuite la valeur obtenue par l'aire du puits, on fait la moyenne pour chaque puits, et ensuite la moyenne pour chaque condition.

#### I.1.6.2 Activité d'enzymes marqueurs de la différenciation cellulaire

##### I.1.6.2.1 La phosphatase alcaline

C'est une enzyme présente chez les cellules différenciées. On va mesurer son activité par dosage enzymatique (Phosphatase alcaline DEA (Diéthanolamine), Biolabo) et en se référant à une solution standard de p-nitrophénol à 10 mM (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). En milieu alcalin, les phosphatases alcalines catalysent l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate en p-nitrophénol (coloré) et phosphate. La vitesse d'apparition du p-nitrophénol et donc la variation de l'absorbance à 405 nm est proportionnelle à l'activité phosphatase alcaline de l'échantillon. L'échantillon cellulaire est mis en milieu alcalin et en présence de p-nitrophénylphosphate et l'absorbance est mesurée à 405 nm toutes les minutes pendant 7 minutes.

##### I.1.6.2.2 La saccharase isomaltase,

Une autre enzyme marqueur de la différenciation des cellules, la saccharase isomaltase, est dosée selon le même principe que précédemment. En effet cette enzyme possède une activité saccharase et catalyse de ce fait l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose. La vitesse d'apparition du glucose est proportionnelle à l'activité de la saccharase-isomaltase de l'échantillon. L'échantillon cellulaire est donc mis en présence de saccharose et incubé à 37°C pendant une heure, puis le glucose libéré est quantifié par dosage enzymatique (GOD-PAP, Biolabo, Maizy, France) à plusieurs temps différents (Dahlqvist, 1968).

#### I.1.7 Dosage des protéines totales

L'ensemencement est réalisé de façon à mettre la même quantité de cellules dans chaque puits, cependant la supplémentation et les conditions de culture peuvent modifier la forme, la taille ou encore la croissance des cellules. Aussi pour pouvoir comparer nos différentes

analyses nous effectuons un dosage des protéines totales pour chaque condition et nos données sont exprimées en mg de protéines totales.

La quantité de protéines cellulaires est déterminée par dosage enzymatique (BCA Protein Assay, Pierce, Rockford, U.S.A.). Les protéines en milieu basique et en présence de cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) forment un complexe et des ions  $\text{Cu}^+$ . Les ions cuivre ainsi produits réagissent avec l'acide 2-bicinchoninique (BCA) pour donner un complexe coloré visible à 540 nm. La quantité de protéines est alors déterminée d'après une courbe étalon d'albumine effectuée en parallèle.

## I.2 Caractérisation du sérum de veau fœtal

Le sérum de veau fœtal constitue l'apport initial en lipides de nos cultures cellulaires, il est donc très important de le caractériser pour évaluer les quantités de lipides et le type d'acides gras apportés par ce sérum par comparaison avec les GPL-DHA administrés en supplémentation.

L'étude de la composition lipidique du sérum de veau fœtal requiert l'emploi de différentes techniques :

- l'extraction des lipides,
- la quantification des différentes espèces lipidiques,
- la séparation des différentes espèces lipidiques par chromatographie sur couche mince,
- la méthylation des acides gras

### I.2.1 Extraction et séparation des différentes espèces lipidiques

La caractérisation lipidique du sérum de veau fœtal est réalisée après extraction lipidique par la méthode de Folch modifiée par Hernell (Folch *et al.*, 1957; Hernell *et al.*, 1990) comme indiqué en I.1.5.

Les différents types de lipides présents (TG, AGL, PL) sont ensuite séparés par CCM en utilisant des plaques de silice  $\text{SiO}_2$  (20x20 cm, Polygram Sil G, Macherey-Nagel) et un mélange de solvants approprié (Chloroforme/Méthanol/Acide Acétique ; 98/2/0.1 ; v/v/v) (Bitman & Wood, 1981). Après migration, la révélation des lipides se fait en pulvérisant sur la plaque une solution de TNS (6-p-Toluidino-2-NaphthaleneSulfonic acid) puis les spots

correspondants aux différentes espèces lipidiques présentes sont identifiés sous lampe UV et grattés.

Les profils en acides gras, des lipides totaux et des différentes fractions lipidiques obtenues par CCM, sont établis par chromatographie en phase gazeuse après méthylation des acides gras (même méthode que celle utilisée dans l'étude animale).

## I.2.2 Quantification des différentes espèces lipidiques

### I.2.2.1 Concentration en triglycérides

Les lipides secs sont solubilisés dans une quantité déterminée d'isopropanol puis les triglycérides sont quantifiés par dosage enzymatique (Triglycérides GPO-PAP, Roche Diagnostic) à l'aide d'une solution standard de glycérol (Sigma) d'une concentration de 2,5mg/ml équivalent trioléine. Les triglycérides sont hydrolysés en glycérol libre et acides gras libres après l'action de la lipoprotéine lipase. Le glycérol libre est phosphorylé en présence d'ATP par l'action de la glycérol kinase en glycérol-1-phosphate. Celui-ci va alors être oxydé par l'action de la glycérol-1-phosphate oxydase en dihydroxyacetone phosphate et en eau oxygénée. L'eau oxygénée sous l'action de la peroxydase va alors produire un composé coloré visible à 540 nm. La quantité de glycérol libéré est alors déterminée d'après une courbe étalon effectuée en parallèle. La quantité de glycérol libre dans le sérum est également déterminée à T0 (Free glycerol reagent, Sigma), et la quantité de triglycérides présents dans l'échantillon correspond à la différence entre la valeur déterminée après action de la lipoprotéine lipase et la quantité de glycérol libre dans le sérum à T0.

### I.2.2.2 Concentration en cholestérol

Les lipides secs sont solubilisés dans une quantité déterminée d'isopropanol puis le cholestérol est quantifié par dosage enzymatique (Cholestérol CHOD-PAP, Roche Diagnostic) à l'aide d'une solution standard de cholestérol (Boehringer Mannheim) d'une concentration de 1 mg/ml.

La cholestérol estérase libère le cholestérol présent sous forme estérifié, puis l'oxydation des molécules de cholestérol par la cholestérol oxydase libère de l'eau oxygénée nécessaire pour



la formation d'un composé coloré visible à 470 nm. La quantité de cholestérol est alors déterminée d'après une courbe étalon effectuée en parallèle.

#### I.2.2.3 Concentration en acides gras libres

Les lipides secs sont solubilisés dans une quantité déterminée d'isopropanol puis les acides gras non estérifiés sont quantifiés par dosage enzymatique (NEFA Randox, UK).

Les acides gras libres sont transformés par l'acyl-CoA synthétase en acyl-CoA. Ceux-ci seront alors oxydés par l'acyl-CoA oxydase pour former du 2,3 trans-enoyl-CoA et de l'eau oxygénée. L'eau oxygénée sous l'action de la peroxydase va alors produire un composé coloré visible à 550 nm. La quantité d'acides gras non estérifiés est alors déterminée d'après une courbe étalon effectuée en parallèle à partir de doses croissantes d'acide oléique.

#### I.2.2.4 Concentration en phospholipides

Les phospholipides sont quantifiés par un dosage indirect du phosphore présent dans l'échantillon, à partir de l'extrait lipidique.

Une étape préalable de minéralisation est effectuée pour libérer les groupements phosphate contenus dans les phospholipides. Pour cela, on incube les extraits lipidiques pendant 30 minutes dans un bain de sable préchauffé à 280°C en présence d'acide perchlorique à 60%. Une fois l'étape de minéralisation achevée, le phosphore inorganique ainsi libéré est ensuite dosé selon la méthode de Bartlett (Bartlett, 1959), qui permet par une série de réactions chimiques d'obtenir un composé coloré visible à 700 nm.

La quantité de phosphore est alors déterminée d'après une courbe étalon effectuée en parallèle. Il faut appliquer un facteur correctif de 25,4 à la quantité de phosphore trouvée pour obtenir la quantité de phospholipides présents dans les échantillons (cela correspond au rapport moyen entre le poids moléculaire d'un phospholipide et le poids atomique du phosphore).

### I.3 Evaluation de l'effet de la supplémentation en GPL-DHA® sur le transport du cholestérol et des acides gras

Nous avons suivi un protocole déjà mis en place au laboratoire et consistant à suivre l'absorption de l'acide oléique et du cholestérol solubilisés sous forme de micelles de sels

biliaires en utilisant des traceurs radioactifs (Salvini *et al.*, 2002). Cependant l'utilisation de ce type de micelles n'est pas très proche de ce qui se déroule réellement dans le tube digestif où l'on trouve deux principales structures : des micelles mixtes de sels biliaires mais aussi des liposomes. De plus, dans la lumière intestinale, une partie des phospholipides a été hydrolysée et des lysophospholipides sont présents au sein de ces structures. Nous avons donc choisi de tester les micelles de sels biliaires classiquement utilisées au sein du laboratoire, mais aussi des micelles mixtes de sels biliaires contenant des lysophosphatidylcholine, et différents types de liposomes en utilisant des données sur la composition du contenu duodéal post-prandial obtenues chez l'homme (Armand *et al.*, 1996a).

### I.3.1 Préparation des micelles

Les micelles sont préparées la veille de leur utilisation sur les cellules pour qu'elles aient le temps de se stabiliser.

Les micelles « classiques » sont obtenues à partir d'une solution composée de 0,1 mM de cholestérol, 2,0 mM de phosphatidyl choline (PC), 0,03 mM de monoglyceride (MG) et 0,5 mM d'oléate de Na solubilisés dans du chloroforme/méthanol (2/1). Pour obtenir des micelles plus proches de la « physiologie » nous avons remplacé les 2 mM de PC par 0,5 mM de PC et 1,5 mM de lyso-PC.

Nous effectuons un double marquage de cette solution en rajoutant du cholestérol tritié (1,2(N)-<sup>3</sup>H cholestérol ; GE Healthcare Europe (Amersham) ; 4,17GBq/mg) et de l'acide oléique marqué au C<sup>14</sup> (Oleic acid [1-<sup>14</sup>C] ; Perkin Elmer Life sciences, Boston, USA ; 6,74MBq/mg), puis le chloroforme/méthanol est éliminé par évaporation sous azote. On ajoute ensuite le taurocholate de sodium (5 mM) solubilisé dans du DMEM contenant 25 mM de glucose (Gibco BRL) non coloré et la solution est agitée toute la nuit jusqu'à ce qu'elle soit limpide. La solution obtenue est filtrée sur des membranes VivaSpin 20 (Vivascience Sartorius group). Deux échantillons de 10 et 20 µl sont prélevés avant et après filtration afin de déterminer le rendement de la filtration et la radioactivité spécifique des micelles filtrées.

Une analyse granulométrique des deux types de micelles « froides » (analogues à celles utilisées dans les études de transport mais ne contenant pas de radioactivité), a été réalisée sur Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) qui permet une mesure précise des particules comprises entre 0,6 nm et 6 µm. Les mesures ont été effectuées en triplicate pour trois concentrations différentes (Tableau 16).

Tableau 16: Taille moyenne des particules présentes dans les deux types de micelles

	Tailles moyenne des particules	Répartition
Micelles <i>Non dilué</i>	9,998 nm	58,9 %
	110,5 nm	41,1 %
Micelles <i>Dilution 1</i>	10,88 nm	59,9 %
	157,5 nm	40,1 %
Micelles <i>Dilution 2</i>	18,12 nm	57,1 %
	118,7 nm	42,9 %
Micelles-LPC <i>Non dilué</i>	6,114 nm	67,4 %
	169,7 nm	32,6 %
Micelles-LPC <i>Dilution 1</i>	6,675 nm	68,6 %
	222,3 nm	41,4 %
Micelles-LPC <i>Dilution 2</i>	7,337 nm	62,5 %
	268,7 nm	37,4 %

### I.3.2 Préparation des liposomes

Plusieurs types de liposomes ont été testés : liposomes composés de phosphatidylcholine (PC), d'un mélange de PC et de lysophospholipides issus de PC (LysophosphatidylCholine Oléique (LPC-O), LysophosphatidylCholine Stéarique (LPC-S)) ou de phosphatidyléthanolamine (LPE). Les structures sont respectivement nommées LPC, LLPC-O, LLPC-S et LLPE.

Les liposomes sont obtenus à partir d'une solution composée de 0,32 mM de cholestérol, 2,37 mM de PC (ou 0,59 mM de PC + 1,78 mM de lysophospholipide), 7,49 mM de monoglyceride (MG), 9,98 mM d'oléate de Na solubilisés dans du chloroforme/méthanol (2/1).

Un double marquage (Chol-H<sup>3</sup> et AG C<sup>14</sup>) est également réalisé. Les lipides sont séchés puis repris dans du DMEM contenant 25 mM de glucose (Gibco BRL) non coloré, puis les liposomes sont réalisés selon le même protocole utilisé pour préparer les liposomes de GPL-DHA donnés aux cellules Caco-2 en supplémentation. Deux échantillons de 10 et 20 µl sont prélevés afin de déterminer la radioactivité spécifique des liposomes.

Une solution de taurocholate de sodium est préparée en parallèle dans du DMEM non coloré. Une analyse granulométrique de liposomes à froid, a été réalisée sur Zetasizer Nano ZS (Malvern) qui permet une mesure précise des particules comprises entre 0,6nm et 6µm. Les mesures ont été effectuées en triplicate pour trois concentrations différentes (Tableau 17)

**Tableau 17:** Taille moyenne des particules présentes dans LPC, LLPC-O, LLPC-S, LLPE

	Tailles moyenne des particules	Répartition		Tailles moyenne des particules	Répartition
LPC <i>Non dilué</i>	352,5 nm	100 %	LLPC-S <i>Non dilué</i>	396 nm	100 %
LPC <i>Dilution 1</i>	411,9 nm	100 %	LLPC-S <i>Dilution 1</i>	478,4 nm	100%
LPC <i>Dilution 2</i>	320 nm	100%	LLPC-S <i>Dilution 2</i>	357,2 nm	100 %
LLPC-O <i>Non dilué</i>	610,6 nm	100 %	LLPE <i>Non dilué</i>	450,9 nm	100%
LLPC-O <i>Dilution 1</i>	632,9 nm	100 %	LLPE <i>Dilution 1</i>	557,1 nm	100 %
LLPC-O <i>Dilution 2</i>	675,5 nm	100%	LLPE <i>Dilution 2</i>	440,7 nm	100%

### I.3.3 Conditions d'incubation

La veille des tests d'absorption de cholestérol et d'acides gras, les cellules reçoivent du milieu complet (avec glucose 25 mM) sans sérum avec juste 1% d'AANE, 1% d'antibiotiques de part et d'autre du filtre (côté apical et basolatéral) et 0,2% d'albumine délipidée côté basolatéral. L'apport de cholestérol et d'acides gras aux cellules se réalise par incubation des différentes structures au pôle apical pendant 3h. Les milieux apicaux et basolatéraux sont ensuite prélevés, les tapis cellulaires sont rincés avec du PBS et les lipides sont extraits par un mélange d'hexane/isopropanol (3/2 ; v/v) pour chaque filtre (incubation avec 2 x 1mL, 2 x 10 min). La radioactivité des différents prélèvements est mesurée à l'aide d'un produit de scintillation (10 mL Emulsifier Safe) avec un compteur Packard (1600 TR, Meriden, CT).

L'absorption mesurée correspond à la radioactivité du milieu basolatéral à laquelle est ajoutée la radioactivité présente dans les cellules.

### I.3.4 Analyse statistique des données de l'étude cellulaire

Les études cellulaires posent parfois des problèmes de reproductibilité non pas à l'intérieur de la même étude mais entre expérimentations répétées dans le temps. Dans ce dernier cas, nous n'avons pas toujours obtenu les mêmes valeurs brutes mais par contre les mêmes amplitudes de variations entre les différentes structures lipidiques testées. Les résultats concernant une

expérimentation réalisée en triplicate sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les résultats issus de plusieurs expérimentations (conduites chacune en triplicate) sont présentés en valeurs relatives calculées à partir des valeurs brutes et en prenant pour référence la structure « micelles classiques » (la plus utilisée dans les études d'absorption), dont les valeurs ont été rapportées à 100%. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test non-paramétrique de Mann-Whitney (Statview pour windows version 5.0), Les différences avec un  $P$  inférieur à 0,05 sont considérées comme significatives.

## II Résultats

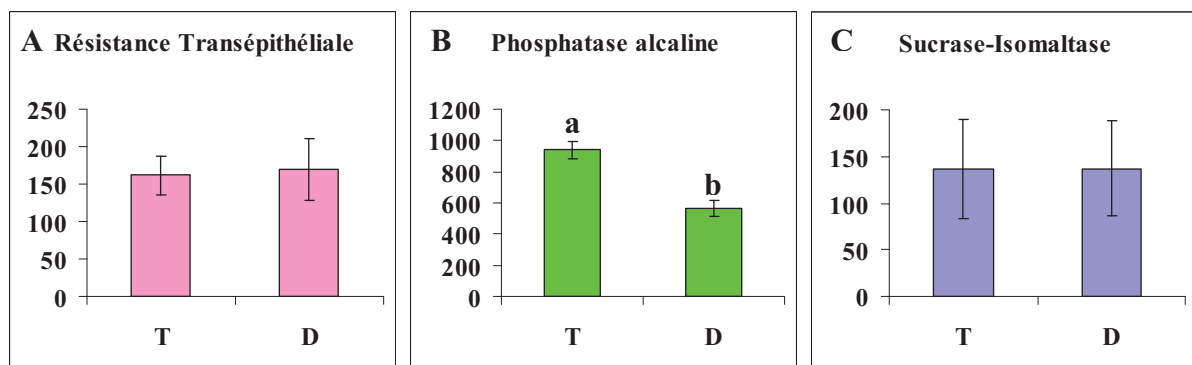
### II.1 Effet du GPL-DHA sur l'absorption lipidique

Nous avons réalisé trois études successives pour tester l'effet de l'enrichissement des phospholipides membranaires des cellules TC7 en DHA, suite à la supplémentation en GPL-DHA, sur l'absorption du cholestérol et des acides gras.

#### II.1.1 Paramètres cellulaires

##### II.1.1.1 Influence du traitement effectué sur la différenciation cellulaire ?

Figure 25 : Mesure de la résistance transépithéliale (en  $\Omega/\text{cm}^2$ ) et de l'activité d'enzymes marqueurs de la différenciation cellulaire (U.S.I./mg de protéine) dans les cellules témoins (T) et enrichis en DHA (D). (n=3 puits par condition)



Les différents paramètres mesurés ne varient pas entre les cellules supplémentées (D) et les cellules témoins (T) sauf la phosphatase alcaline dont l'activité est significativement plus faible dans la condition D (Figure 26B).

### II.1.1.2 Quantification de l'enrichissement en DHA des cellules

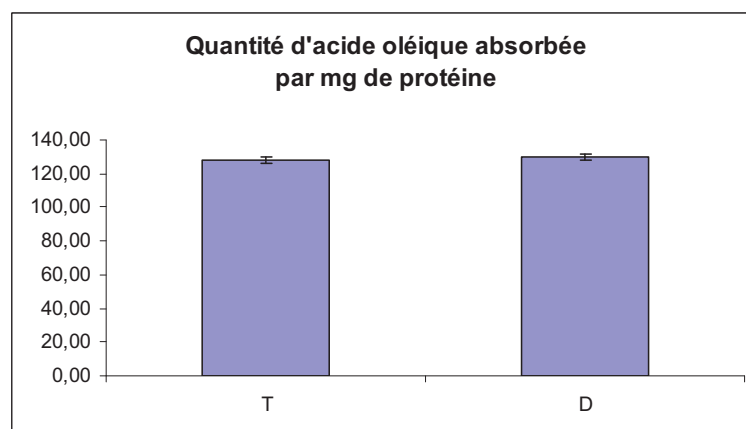
Le sérum de veau fœtal utilisé pour cultiver les cellules contient 0,86 mg de lipides par mL dans lesquels sont répartis 36,5% de triglycérides, 18,2% de phospholipides, 44,8% de cholestérol et 0,5% d'acides gras libres. L'apport en DHA du sérum est de 1,6% des acides gras totaux. Les acides gras sont portés par les TG, les PL et les AGL soit 55,2% des lipides totaux. Le sérum étant apporté à 20% dans le compartiment apical donc 200µL, la quantité de DHA apportée par le sérum est de 1,52 µg (soit 4,6 % de la dose apportée par les GPL-DHA).

L'analyse du profil en acides gras des membranes cellulaires à 21j montrent que la supplémentation en GPL-DHA a entraîné une augmentation du DHA dans les cellules d'un facteur 1,6 par rapport aux cellules témoins (mg DHA/mg prot: T= 4,7 ; D=7,52).

### II.1.2 Effet des GPL-DHA sur l'absorption du cholestérol et des acides gras

#### II.1.2.1 Effet des GPL-DHA sur l'absorption des acides gras

Figure 26 : Quantité d'acides gras absorbés sous forme de micelles (nmol d'acide oléique/mg de protéines) par les cellules témoins (T) et enrichies en DHA (D) (n=3 par condition).

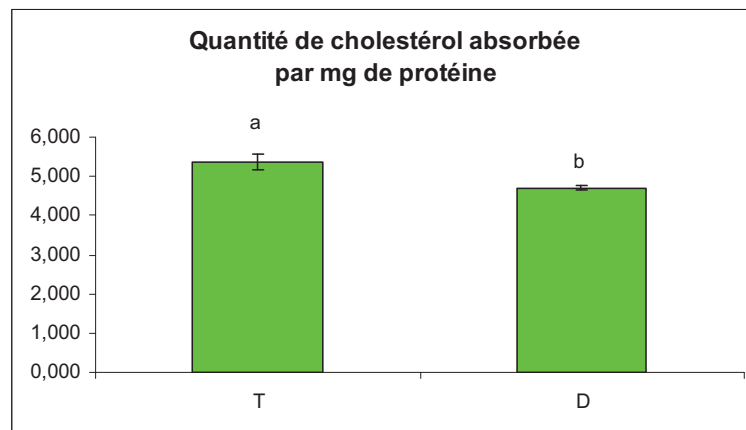


Nous constatons que le fait d'avoir enrichi les phospholipides membranaires des cellules TC7 en DHA n'a pas d'influence sur les capacités d'absorption des acides gras libres apportés par des micelles classiques (Figure 27). Le même résultat est obtenu avec des micelles de sels

biliaires contenant des lysophosphatidylcholines, et différents types de liposomes (données non présentées).

### II.1.2.2 Effet des GPL-DHA sur l'absorption du cholestérol

Figure 27 : Quantité de cholestérol absorbé sous forme de micelles (en nmol de cholestérol/mg de protéines) par les cellules témoins (T) et enrichies en DHA (D) (n=3 par condition).



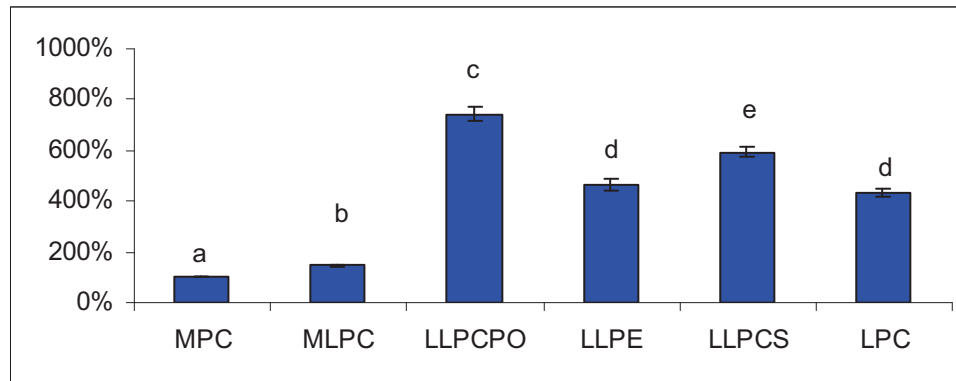
On constate que l'enrichissement des cellules TC7 en DHA (D) conduit à une faible diminution (12,7%), bien que significative, du taux d'absorption du cholestérol via les micelles classiques par comparaison aux cellules témoins (T) (Figure 28). Mais aucune différence n'est observée lorsque le cholestérol est apporté sous forme de micelles de sels biliaires contenant des lysophosphatidylcholines ou sous forme de liposomes (données non présentées).

## II.2 Facteurs de variation de l'absorption du cholestérol et des AG *in vitro*

L'enrichissement significatif en DHA des cellules TC7 n'a pas eu d'impact sur leur capacité d'absorption des acides gras libres et du cholestérol à partir de différentes structures, mais les structures en elles-mêmes se sont avérées conduire à des taux d'absorption différents des nutriments lipidiques véhiculés par elles. Ces taux d'absorption sont exprimés en valeurs relatives calculées à partir d'une valeur de référence obtenue avec les micelles de sels biliaires classiques qui a été rapportée à 100.

## II.2.1 Variation de l'absorption des acides gras en fonction de la structure lipidique d'apport

**Figure 28 :** Rendement de l'absorption de l'acide oléique apporté sous forme de différentes structures lipidiques (valeurs relatives calculées par rapport à la valeur de référence représentée par les micelles classiques mise à 100%)



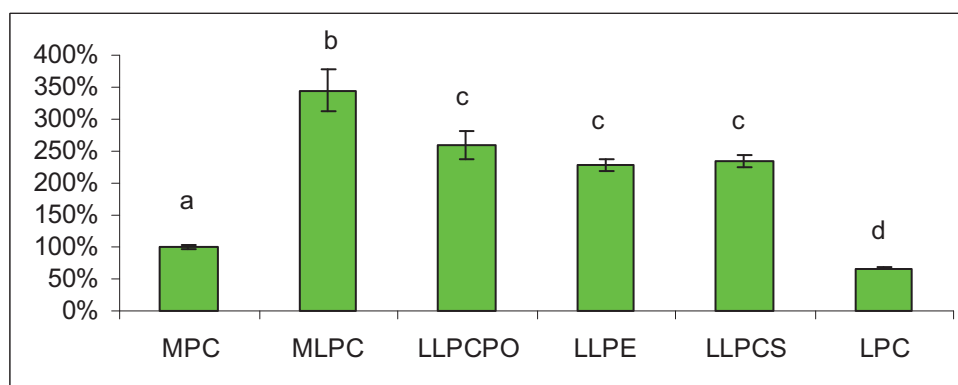
MPC, micelles de sels biliaires contenant des phosphatidylcholines (n = 9) ; MLPC, micelles de sels biliaires contenant des phosphatidylcholines et des lyso-phosphatidylcholines (n = 6) ; LLPCPO, liposomes contenant des lyso-PCPO (n = 9) ; LLPE, liposomes contenant des lyso-phosphatidyléthanolamines (n = 3) ; LLPCS, liposomes contenant des lyso-PCS (n = 3) ; LPC, liposomes ne contenant pas de lysophospholipides (n = 3). Les structures présentant des différences significatives,  $P < 0,05$ , porte des lettres différentes.

En ce qui concerne l'absorption des acides gras, une importante différence existe entre un apport sous forme de micelles (MPC et MLPC) et un apport sous forme de liposomes (LLPCPO, LLPE, LLPCS, LPC). En effet, l'absorption de l'acide oléique à partir de micelles de sels biliaires contenant ou pas des lysophosphatidylcholines est 4 à 7 fois moins efficace ( $P < 0,05$ ) qu'à partir de liposomes (Figure 29). Il est également à noter que la présence de lysophosphatidylcholine, mais pas celle de lysophosphatidylethanolamine, semble favoriser une meilleure absorption. Effectivement, l'absorption de l'acide oléique véhiculé par des micelles de sels biliaires contenant des lysophosphatidylcholines est supérieure d'environ 50% à celles des micelles de sels biliaires contenant des phosphatidylcholines; par ailleurs les structures liposomales ne contenant pas de lysophosphatidylcholines sont les moins efficaces au sein des liposomes. Enfin, le type de lysophospholipides module lui aussi le rendement de cette absorption, les liposomes riches en lysophosphatidylcholine oléique étant les plus efficaces.



## II.2.2 Variation de l'absorption du cholestérol en fonction de la structure lipidique d'apport

**Figure 29:** Rendement de l'absorption du cholestérol apporté sous forme de différentes structures lipidiques (valeurs relatives calculées par rapport à la valeur de référence représentée par les micelles classiques mise à 100%)



MPC, micelles de sels biliaires contenant des phosphatidylcholines (n = 9) ; MLPC, micelles de sels biliaires contenant des phosphatidylcholines et des lyso-phosphatidylcholines (n = 6) ; LLPCPO, liposomes contenant des lyso-PCPO (n = 9) ; LLPE, liposomes contenant des lyso-phosphatidyléthanolamines (n = 3) ; LLPCS, liposomes contenant des lyso-PCS (n = 3) ; LPC, liposomes ne contenant pas de lysophospholipides (n = 3). Les structures présentant des différences significatives,  $P < 0,05$ , porte des lettres différentes.

Le rendement d'absorption du cholestérol est lui aussi très variable en fonction du type de structure permettant sa solubilisation, micelles de sels biliaires (MPC ou MLPC) ou liposomes (LLPCPO, LLPE, LLPCS, LPC) ; mais contrairement au acides gras, le cholestérol est mieux absorbé sous forme de micelles mixtes de sels biliaires contenant des lysophosphatidylcholines (MLPC). En effet, si on compare les structures contenant des lysophospholipides et celles qui n'en contiennent pas, les MLPC ont un rendement supérieur à tous les liposomes contenant des lysophospholipides, et les LPC ont un rendement inférieur à celui observé avec les micelles sans lysoPL (Figure 30).

La présence de lysophospholipides apparaît comme un facteur déterminant dans le rendement de l'absorption du cholestérol puisque les liposomes et micelles contenant des lysophospholipides permettent un rendement d'absorption 2 à 2,5 fois plus efficace que les liposomes et micelles ne contenant pas de lysophospholipides. Par contre le type de lysophospholipides ne semble pas avoir d'impact car aucune variation significative n'est observée entre les 3 structures de liposomes contenant des lysophospholipides différents.

## DISCUSSION

Les mécanismes par lesquels une altération des acides gras polyinsaturés s'instaure dans le cas de la mucoviscidose n'ont pas encore été élucidés. Une des premières étapes permettant de répondre à la question est d'identifier les changements qui apparaissent au niveau des organes cibles de la maladie tels que l'intestin, le pancréas et les poumons. Nous nous sommes ainsi focalisés sur la caractérisation du statut en AGPI de différents organes chez un modèle murin porteur de la mutation la plus fréquente dans la mucoviscidose, F508del, et de ce fait susceptible de présenter les mêmes types de perturbations trouvées chez l'homme, notamment un déséquilibre de la balance AA et DHA (Freedman *et al.*, 2004). Notre second objectif était de tester l'hypothèse selon laquelle une supplémentation en DHA apportée à faible dose sous forme de GlycéroPhospholipides serait capable de corriger le rapport n-6/n-3 (Payet *et al.*, 2004).

Plusieurs aspects originaux et intéressants ont été mis en évidence à l'issue de notre approche animale.

Tout d'abord, malgré une alimentation de base apportant des acides gras essentiels en quantité suffisante, nos souris F508del âgées de 3 mois développent une déficience en acide linoléique au niveau des organes connus pour être affectés par la maladie (intestin, pancréas, poumons). Parallèlement, des taux élevés d'acides dihomog- $\gamma$ -linoléique et arachidonique sont retrouvés au niveau de ces mêmes tissus. Nous mettons ainsi en évidence une augmentation du flux de la voie de biosynthèse des acides gras n-6 dont le but est probablement d'assurer une production suffisante d'acide arachidonique pour répondre aux besoins cellulaires en cet acide gras pour la production de métabolites impliqués dans le processus inflammatoire. Ceci pourrait expliquer un emballement du processus inflammatoire qui a déjà été rapporté dans notre modèle murin (Meyer *et al.*, 2009) et qui est typiquement observé chez les patients atteints de mucoviscidose même en dehors des épisodes infectieux (Van Biervliet *et al.*, 2007; Bastonero *et al.*, 2009). Ce trait métabolique a précédemment été observé en partie chez la souris cfr -/- au niveau intestinal (iléon) (Freedman *et al.*, 1999) et pancréatique (Freedman *et al.*, 1999; Ollero *et al.*, 2006), et dans des cellules épithéliales pancréatiques de patients atteints de mucoviscidose (Bhura-Bandali *et al.*, 2000) ou pulmonaires n'exprimant pas CFTR (Al-Turkmani *et al.*, 2008). Des connections biochimiques entre la protéine CFTR défectueuse et les anomalies du métabolisme des AGPI

n-6 observées dans les tissus affectés par la maladie suggérées par certains auteurs (Andersson *et al.*, 2008) restent encore à éclaircir du fait qu'on observe des changements mineurs dans les tissus habituellement non affectés par la maladie, comme le cœur et les reins, et ce malgré le rôle important récemment décrit de CFTR dans ces organes (Duan, 2009; Jouret & Devuyst, 2009).

Si nous confirmons l'existence d'une perturbation dans le métabolisme de l'acide arachidonique qui est donc produit en excès comme chez l'homme (Strandvik *et al.*, 2001) dans notre modèle F508del, nous ne mettons pas par contre en évidence de déficience en DHA alors que cela a été décrit chez la souris cftr -/- (Freedman *et al.*, 1999) et l'homme (Freedman *et al.*, 2004; Al-Turkmani *et al.*, 2007; Coste *et al.*, 2007). Néanmoins, des taux normaux, voire quelque peu supérieurs, en DHA ont aussi été rapportés (Werner *et al.* 2004) chez la souris cftr -/- âgée de 1 ou de 3 mois ainsi que chez la souris F508del âgée de 3 mois. Ces divergences observées entre les différentes études peuvent être liées à plusieurs facteurs confondants tels que l'âge, le régime alimentaire de base, et le fond génétique. En ce qui concerne l'âge, les quelques études portant chez la souris mucoviscidose n'ont jamais été conduites chez des animaux d'âge supérieur à 3 mois (Freedman *et al.*, 1999; Werner *et al.*, 2004; Beharry *et al.*, 2007) probablement à cause de la difficulté à les garder en vie sur le long terme. Nous avons formulé l'hypothèse qu'une installation franche d'une déficience en DHA dépendait de l'évolution de la maladie, comme chez l'homme, et nous avons ainsi exploré le statut en acides gras polyinsaturés chez notre modèle murin à 6 et 12 mois. Nous montrons une diminution de la teneur en DHA uniquement au niveau d'un tissu cible, l'intestin, et plus particulièrement l'intestin distal, dès 6 mois dans le modèle de souris homozygote  $\Delta$ F508 (Coste *et al.*, 2006) alors que ce déficit n'est pas apparent à 3 mois (Werner *et al.*, 2004; Coste *et al.*, 2006), avec une déficience réelle (c'est à dire par comparaison avec des souris témoins analogues) à 12 mois. La teneur en acide arachidonique reste quant à elle toujours plus élevée chez notre modèle murin au cours du temps comparativement à des témoins analogues. D'autre part le régime alimentaire peut interférer sur les taux d'AGPI tissulaires (Werner *et al.*, 2004; Cottart *et al.*, 2007). En effet les souris F508del âgées de 3 mois de notre première étude ont été nourries exclusivement dès le sevrage avec une alimentation liquide (Peptamen Junior) afin de prévenir les problèmes d'obstruction intestinale, fréquents chez ce modèle, et de réduire les taux de mortalité. Cette émulsion artificielle qui a été conçue pour les besoins des sujets souffrant de mucoviscidose est riche en acides gras à chaînes moyennes, qui sont préférentiellement utilisables pour la  $\beta$ -oxydation, et en précurseurs des familles n- 6 et n- 3. Ce type d'alimentation administrée

pendant 1 mois et demi peut empêcher la déficience en AGPI de s'installer pendant les trois premiers mois dans notre modèle, ce qui pourrait expliquer une non déficience en DHA; par la suite l'évolution de la maladie et un besoin plus important en AGPI, pourraient rendre ce type d'alimentation insuffisant pour éviter une déficience en acides gras polyinsaturés à longues chaînes de la famille n-3, notamment en DHA, dans certains organes affectés par la mucoviscidose comme l'intestin, mais pas dans les autres organes, dans notre modèle. Alors que cette déficience s'amorce sous Peptamen Junior au niveau iléal à 6-12 mois, les souris F508del nourries avec une alimentation standard pendant 6 ou 12 mois ne montrent pas de déficience du DHA au cours du temps au niveau intestinal; d'autre part ces souris présentent des taux d'acide arachidonique plus élevés. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que le régime standard, comparativement à Peptamen, apporte plus d'acide linoléique, précurseur de l'acide arachidonique dont la biosynthèse apparaît comme accentuée chez notre modèle de souris CF, et aussi plus d'acide linoléique, précurseur du DHA. Il apparaît clairement que l'âge des animaux et le type de régime de base sont des paramètres fondamentaux dans des études visant à mieux comprendre les altérations du métabolisme des AGPI dans un modèle de mucoviscidose ; les futures études devraient être conduites chez des animaux suffisamment âgés pour une installation avancée des désordres métaboliques et recevant des régimes autres que ceux couramment utilisés. Un troisième facteur important à prendre aussi en considération est le fond génétique (Scholte *et al.*, 2004; Guilbault *et al.*, 2007) ; en effet les discordances observées entre le statut en AGPI des souris cfr -/- de Freedman (Freedman *et al.*, 1999) (AA élevé, DHA diminué) et celles de Werner (Werner *et al.*, 2004) (pas de modification en AA ni DHA) peuvent s'expliquer par l'utilisation de souris KO porteuses d'un fond génétique différent. Pareillement, nos données contradictoires avec l'étude de Werner (Werner *et al.*, 2004) du fait que nous mettons en évidence une perturbation du métabolisme des acides gras n-6 alors qu'eux trouvent des valeurs normales, pourraient s'expliquer par une modification du fond génétique de nos souris F508del par rapport aux leurs ; seul un génotypage plus poussé des deux souches de souris F508del pourrait permettre de mettre en évidence les changements apparus au fur et à mesure des différentes reproductions.

Un second point fort qui se dégage de notre approche concerne l'impact d'un apport en DHA à faible dose, au maximum 1,4 mg/j, pendant 6 semaines sous forme de glycérophospholipides d'origine aviaire, sur l'amélioration du statut en AGPI. Il s'avère que les GPL-DHA exercent de façon intéressante différents bénéfices, un effet commun à

pratiquement tous les organes qui est une augmentation du rapport DHA/AA, et des effets plus spécifiques en fonction des tissus (augmentation en LA, baisse du AA, augmentation en DHA, diminution du rapport n-6/n-3).

En fait, le GPL-DHA a permis de corriger une dérégulation de la voie métabolique des acides gras n-6 en restaurant les taux d'acide linoléique dans certains organes affectés par la mucoviscidose (intestin poumons) et en diminuant la biosynthèse de l'acide arachidonique dans les organes présentant des taux élevés. Les taux de LA n'ayant pas été modifiés chez les souris sauvages, cela suggère que la supplémentation effectuée per se permet de corriger un déséquilibre spécifique lié à la perte de la fonction CFTR mais seulement dans certains tissus cibles de la maladie. Le DHA apporté a corrigé l'augmentation de l'AA dérivé du LA chez les souris CF les ramenant à des taux semblables à ceux observés chez les souris sauvages, peut être via l'augmentation de l'expression de la lipocortine qui diminue la libération d'acide arachidonique par inhibition de la phospholipase A2 (Rojas *et al.*, 2003) et aussi par rétro-inhibition de la  $\Delta 5$ désaturase (Cho *et al.*, 1999) qui permet la formation de l'AA. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la supplémentation en GPL-DHA a permis une augmentation du ratio DHA/AA dans les phospholipides membranaires.

Il a déjà été montré qu'un apport en DHA sous forme d'acides gras libres ou estérifiés à des souris KO cfr normalise le déséquilibre des taux d'AA et de DHA et/ou reverse les changements morphologiques liés à la maladie au niveau des cellules pancréatiques et pulmonaires, mais seulement pour des fortes doses allant de 10 à 40 mg/jour/souris, des doses de 0,5 à 2 mg n'étant pas efficaces (Freedman *et al.*, 1999; Beharry *et al.*, 2007). Ces fortes doses utilisées ne sont pas compatibles avec une application chez l'homme du fait d'un risque potentiel élevé d'augmentation du stress oxydant (Vericel *et al.*, 2003). Par contre, la correction du déséquilibre de la voie des n-6 avec de faibles doses de DHA apportés par des glycérophospholipides (1,4 mg par jour au maximum) fait apparaître les GPL-DHA comme un supplément à haut potentiel thérapeutique dans le cadre de la mucoviscidose capable de diminuer la réponse inflammatoire chronique via une diminution de la production d'éicosanoïdes, médiateurs inflammatoires dérivés de l'acide arachidonique. S'ajoute à ces bénéfices thérapeutiques, celui d'un risque moins élevé d'augmentation du stress oxydant et l'avantage de ne pas surcharger la médication déjà lourde des patients CF.

L'intestin grêle est un des organes touchés par la mucoviscidose chez l'homme, et spécifiquement dans notre modèle murin chez lequel il présente des taux relativement élevés en DHA en basal et après supplémentation en GPL-DHA, laissant supposer que le DHA est

particulièrement important pour une bonne fonctionnalité des entérocytes. Nous avons ainsi fait l'hypothèse qu'un enrichissement en DHA des phospholipides de la membrane plasmique des entérocytes, à un niveau similaire de ce que l'on peut trouver dans l'intestin de notre modèle murin, pouvait avoir un impact fort sur le bon fonctionnement cellulaire, notamment les capacités absorbatives. Un défaut d'absorption des nutriments lipidiques chez le sujet atteint de mucoviscidose étant décrit dans la littérature (Farrell *et al.*, 1985), nous avons choisi de tester plus spécifiquement l'efficacité d'absorption du cholestérol et des acides gras libres (en prenant l'acide oléique) par le clone TC 7 de la lignée cellulaire Caco-2 qui est le plus à même de mimer un entérocyte humain (Pinto *et al.*, 1983; Trotter *et al.*, 1996; Play *et al.*, 2003). Pour être absorbés correctement par l'entérocyte, le cholestérol et les acides gras libres doivent être solubilisés dans au moins deux types de structures qui coexistent dans la lumière intestinale de l'homme, des micelles mixtes de sels biliaires et des vésicules de phospholipides ou liposomes (Hernell *et al.*, 1990; Tso, 1994; Armand *et al.*, 1996a). Une des difficultés de cette approche *in vitro*, était de bien choisir la composition de ces structures afin de travailler dans des conditions les plus proches de la physiologie, tout en générant des résultats pouvant être comparés avec ce qui a déjà été publié. Notre choix s'est donc porté sur l'utilisation de structures appelées micelles mixtes de sels biliaires classiquement utilisées au laboratoire (Salvini *et al.*, 2002; Play *et al.*, 2003; Haikal *et al.*, 2008) bien que ne comportant pas de lysophospholipides. Nous avons aussi décidé de travailler avec des structures dont la composition était proche autant que faire se peut des structures retrouvées dans la lumière intestinale chez l'homme en postprandial (Armand *et al.*, 1996a), à savoir des micelles mixtes de sels biliaires contenant des concentrations « physiologiques » de sels biliaires (TC Na), de phospholipides, de cholestérol, d'acides gras libres et de monoglycérides, et des vésicules de phospholipides de même concentrations physiologiques en acides gras libres, monoglycérides, cholestérol et phospholipides mais présentant des espèces et des proportions de lysophospholipides différentes. Le rapport phospholipides/lysophospholipides a été choisi sachant que dans la lumière intestinale les phospholipides présents sont hydrolysés à 75% notamment par la phospholipase A 2 pancréatique (Armand *et al.*, 1996a). Les informations essentielles obtenues grâce à notre approche cellulaire sont que l'enrichissement en DHA obtenu grâce aux GPL-DHA permet d'atteindre des taux physiologiques trouvés dans notre modèle murin de mucoviscidose, mais cela ne conduit pas à une modification des capacités d'absorption du cholestérol ni de l'acide oléique par les entérocytes, et ce quel que soit le type de structures utilisé pour véhiculer le cholestérol et les acides gras libres. Ces résultats sont à interpréter avec précaution dans le contexte de la mucoviscidose car un bémol important existe dans cette

approche ; en effet les cellules intestinales utilisées expriment une protéine CFTR normale (Sambuy *et al.*, 2005), et de ce fait un éventuel défaut de fonctionnement lié à une CFTR mutée qui pourrait être corrigé par un enrichissement en DHA n'est pas visible. Par contre, le type de structure responsable de la solubilisation des nutriments lipidiques s'avère être un paramètre fondamental pour contrôler l'efficacité d'absorption. En effet, les micelles mixtes de sels biliaires représentent des structures idéales pour une bonne absorption du cholestérol (Woollett *et al.*, 2006), et ce d'autant plus qu'elles contiennent des lysophospholipides (Homan & Hamelehle, 1998), ce qui a déjà été décrit dans la littérature. L'action de la phospholipase A2 luminale améliore de façon très importante l'absorption du cholestérol contenu dans des micelles mixtes de sels biliaires en hydrolysant une partie des phosphatidylcholines s'y trouvant (Homan & Hamelehle, 1998). Un des mécanismes avancé pour expliquer que l'absorption du cholestérol sous forme de micelles mixtes de sels biliaires est très augmenter en présence de lysophosphatidylcholines, alors que les phosphatidylcholines représentent un frein non négligeable, est purement d'ordre physicochimique, la désorption du cholestérol c'est à dire son passage des micelles vers la bordure en brosse de l'entérocyte étant limitant en présence de PC mais très nettement favorisé en présence de LPC (Homan & Hamelehle, 1998). Par contre ce phénomène ne gêne en rien l'absorption des acides gras libres véhiculés par les micelles mixtes de sels biliaires (Homan & Hamelehle, 1998), ce que nous confirmons. L'efficacité des structures liposomales dans l'absorption des nutriments lipidiques est beaucoup moins connue car beaucoup moins explorée que celle des micelles de sels biliaires, bien que supposée importante (Porter & Saunders, 1971). Nous mettons en évidence de façon originale que les liposomes normalement formés lors de la digestion des lipides dans la lumière intestinale sont des structures idéales plutôt pour l'absorption des acides gras libres. Pour être absorbés, ces derniers peuvent traverser la membrane de la bordure en brosse des entérocytes de façon passive (« flip-flop ») (Hamilton, 2003) ou via des protéines de transport membranaires comme FABPpm, FATP4 ou CD36 (Abumrad, 2005; Petit *et al.*, 2007; Iqbal & Hussain, 2009). CD36 n'étant pas exprimée chez les cellules Caco2 clone TC7, il reste une action possible de FABPpm ou de FATP4, ces deux protéines de 40 kDa et 60 kDa lient avec une grande affinité les acides gras à chaîne longue (Petit *et al.*, 2007). FABPpm se lie également avec les lyso-PL, les monoglycérides et le cholestérol (Stremmel, 1988). Une meilleure absorption des AGL via des structures contenant des lysoPL peut être due à cette affinité particulière aux lysoPL par la protéine de transport (Glatz & van der Vusse, 1990).

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre modèle murin présentant la mutation la plus fréquente dans la mucoviscidose s'avère être un modèle de prédilection pour étudier les mécanismes impliqués dans la perturbation du métabolisme des AGPI de la famille n-6, et pour tester des traitements dont la finalité serait de corriger une biosynthèse exacerbée d'acide arachidonique et de limiter un emballement du processus inflammatoire par la synthèse d'éicosanoïdes à partir de cet acide gras. Un des traitements efficace semble être une nutrithérapie à base d'acide à très longue chaîne de la famille n-3, l'acide docosahexaénoïque, efficace à faible dose, à condition d'être administré sous forme de glycérophospholipides, ce qui permettra de limiter les risques d'oxydation. Cette forme d'apport revêt plusieurs autres avantages exploitables en terme de nutrithérapie pour le patient atteint de mucoviscidose : un vecteur de nature phospholipidique est plus efficace pour l'accrétion des membranes en DHA comparativement à des triglycérides ou des esters éthyliques (Valenzuela *et al.*, 2005), et l'apport d'une dose de DHA proche des recommandations nutritionnelles sous forme de GPL-DHA a déjà donné des résultats très concluants pour le rééquilibrage des taux de DHA et d'acide arachidonique chez des sujets sains (Payet *et al.*, 2003; Payet *et al.*, 2004). Des recherches plus poussées des bénéfices de ce type de nutrithérapie sur, par exemple, la régulation du processus inflammatoire via la transformation du DHA en résolvines D et protectines D, sur la protection de l'organisme contre les infections répétées à *Pseudomonas aeruginosa*, et sur l'amélioration des capacités respiratoires, sont autant de pistes qui permettront de définir des bases solides pour faire progresser la prise en charge nutritionnelle des patients.

D'autre part, la recherche de l'impact des structures intestinales responsables de la solubilisation des nutriments lipidiques sur l'expression de certains gènes codant pour des récepteurs membranaires impliqués dans l'absorption permettra de mieux appréhender leur intérêt spécifique, chose qui n'est toujours pas clairement élucidée, dans l'absorption du cholestérol et des acides gras libres. Une recherche plus large par micro-arrays pourrait permettre de mettre en évidence des régulations de voies métaboliques insoupçonnées, comme cela a très récemment publié pour TC7 mais uniquement avec des structures de micelles mixtes de sels biliaires postprandiales versus péri-prandiales (Beaslas *et al.*, 2008).



## BIBLIOGRAPHIE

- Abrams CK, Hamosh M, Hubbard VS, Dutta SK & Hamosh P (1984) Lingual lipase in cystic fibrosis. Quantitation of enzyme activity in the upper small intestine of patients with exocrine pancreatic insufficiency. *J Clin Invest* **73**, 374-382.
- Abrams CK, Hamosh M, Lee TC, Ansher AF, Collen MJ, Lewis JH, Benjamin SB & Hamosh P (1988) Gastric lipase: localization in the human stomach. *Gastroenterology* **95**, 1460-1464.
- Abumrad NA (2005) CD36 may determine our desire for dietary fats. *J Clin Invest* **115**, 2965-2967.
- Ailhaud G & Guesnet P (2004) Fatty acid composition of fats is an early determinant of childhood obesity: a short review and an opinion. *Obes Rev* **5**, 21-26.
- Al-Turkmani MR, Andersson C, Alturkmani R, Katrangi W, Cluette-Brown JE, Freedman SD & Laposata M (2008) A mechanism accounting for the low cellular level of linoleic acid in cystic fibrosis and its reversal by DHA. *J Lipid Res* **49**, 1946-1954.
- Al-Turkmani MR, Freedman SD & Laposata M (2007) Fatty acid alterations and n-3 fatty acid supplementation in cystic fibrosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **77**, 309-318.
- Altmann SW, Davis HR, Jr., Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N & Graziano MP (2004) Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* **303**, 1201-1204.
- Andersen DH (1938) Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. *Am J Dis Child* **56**, 344-399.
- Andersson C, Al-Turkmani MR, Savaille JE, Alturkmani R, Katrangi W, Cluette-Brown JE, Zaman MM, Laposata M & Freedman SD (2008) Cell culture models demonstrate that CFTR dysfunction leads to defective fatty acid composition and metabolism. *J Lipid Res* **49**, 1692-1700.
- Aratari MT, Venuta F, De Giacomo T, Rendina EA, Anile M, Diso D, Francioni F, Quattrucci S, Rolla M, Pugliese F, Liparulo V, Di Stasio M, Ricella C, Tsagkaropoulos S, Ferretti G & Coloni GF (2008) Lung transplantation for cystic fibrosis: ten years of experience. *Transplant Proc* **40**, 2001-2002.
- Armand M (2007) Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **10**, 156-164.
- Armand M (2008) Digestibilité des matières grasses chez l'homme. *Sciences des Aliments* **28**, 84-98.
- Armand M, Borel P, Dubois C, Senft M, Peyrot J, Salducci J, Lafont H & Lairon D (1994) Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. *Am J Physiol* **266**, G372-381.
- Armand M, Borel P, Pasquier B, Dubois C, Senft M, Andre M, Peyrot J, Salducci J & Lairon D (1996a) Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *Am J Physiol* **271**, G172-183.
- Armand M, Hamosh M, Mehta NR, Angelus PA, Philpott JR, Henderson TR, Dwyer NK, Lairon D & Hamosh P (1996b) Effect of human milk or formula on gastric function and fat digestion in the premature infant. *Pediatr Res* **40**, 429-437.
- Armand M, Hamosh M, Philpott JR, Resnik AK, Rosenstein BJ, Hamosh A, Perman JA & Hamosh P (2004) Gastric function in children with cystic fibrosis: effect of diet on gastric lipase levels and fat digestion. *Pediatr Res* **55**, 457-465.

- Armand M, Pasquier B, Andre M, Borel P, Senft M, Peyrot J, Salducci J, Portugal H, Jaussan V & Lairon D (1999) Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *Am J Clin Nutr* **70**, 1096-1106.
- Astorg P, Arnault N, Czernichow S, Noisette N, Galan P & Hercberg S (2004) Dietary intakes and food sources of n-6 and n-3 PUFA in French adult men and women. *Lipids* **39**, 527-535.
- Azmy AF & Ziervogel MA (1983) Meconium ileus equivalent in children with cystic fibrosis. *Z Kinderchir* **38**, 253-255.
- Bandyopadhyay GK, Dutta J & Ghosh S (1982) Preferential oxidation of linolenic acid compared to linoleic acid in the liver of catfish (*Heteropneustes fossilis* and *Clarias batrachus*). *Lipids* **17**, 733-740.
- Bartlett GR (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* **234**, 466-468.
- Bastonero S, Le Priol Y, Armand M, Bernard CS, Reynaud-Gaubert M, Olive D, Parzy D, de Bentzmann S, Capo C & Mege JL (2009) New microbicidal functions of tracheal glands: defective anti-infectious response to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *PLoS One* **4**, e5357.
- Batal I, Ericoussi MB, Cluette-Brown JE, O'Sullivan BP, Freedman SD, Savaille JE & Laposata M (2007) Potential utility of plasma fatty acid analysis in the diagnosis of cystic fibrosis. *Clin Chem* **53**, 78-84.
- Beaslas O, Torreilles F, Casellas P, Simon D, Fabre G, Lacasa M, Delers F, Chambaz J, Rousset M & Carriere V (2008) Transcriptome response of enterocytes to dietary lipids: impact on cell architecture, signaling, and metabolism genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**, G942-952.
- Beharry S, Ackerley C, Corey M, Kent G, Heng YM, Christensen H, Luk C, Yantiss RK, Nasser IA, Zaman M, Freedman SD & Durie PR (2007) Long-term docosahexaenoic acid therapy in a congenic murine model of cystic fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G839-848.
- Bernard C (1995) Préparation de glycérophospholipides enrichis en acide docosahexaénoïque. Etude de leurs effets chez le lapin néozélandais hypercholestérolémique.
- Bernback S, Blackberg L & Hernell O (1990) The complete digestion of human milk triacylglycerol in vitro requires gastric lipase, pancreatic colipase-dependent lipase, and bile salt-stimulated lipase. *J Clin Invest* **85**, 1221-1226.
- Bernoud N, Fenart L, Moliere P, Dehouck MP, Lagarde M, Cecchelli R & Lecerf J (1999) Preferential transfer of 2-docosahexaenoyl-1-lysophosphatidylcholine through an in vitro blood-brain barrier over unesterified docosahexaenoic acid. *J Neurochem* **72**, 338-345.
- Berton A, Sebban-Kreuzer C, Rouvellac S, Lopez C & Crenon I (2009) Individual and combined action of pancreatic lipase and pancreatic lipase-related proteins 1 and 2 on native versus homogenized milk fat globules. *Mol Nutr Food Res*.
- Beverley DW, Kelleher J, MacDonald A, Littlewood JM, Robinson T & Walters MP (1987) Comparison of four pancreatic extracts in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* **62**, 564-568.
- Bhura-Bandali FN, Suh M, Man SF & Clandinin MT (2000) The deltaF508 mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator alters control of essential fatty acid utilization in epithelial cells. *J Nutr* **130**, 2870-2875.
- Biggemann B, Laryea MD, Schuster A, Griese M, Reinhardt D & Bremer HJ (1988) Status of plasma and erythrocyte fatty acids and vitamin A and E in young children with cystic fibrosis. *Scand J Gastroenterol Suppl* **143**, 135-141.
- Bitman J & Wood LD (1981) Quantitative densitometry *in situ* of lipids separated by thin layer chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **4**, 1023-1034.

- Black DD (2007) Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G519-524.
- Bligh EG & Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917.
- Borel P, Armand M, Pasquier B, Senft M, Dutot G, Melin C, Lafont H & Lairon D (1994) Digestion and absorption of tube-feeding emulsions with different droplet sizes and compositions in the rat. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **18**, 534-543.
- Borgstroem B (1964) Influence of Bile Salt, pH, and Time on the Action of Pancreatic Lipase; Physiological Implications. *J Lipid Res* **5**, 522-531.
- Borowitz D, Goss CH, Limauro S, Konstan MW, Blake K, Casey S, Quittner AL & Murray FT (2006) Study of a novel pancreatic enzyme replacement therapy in pancreatic insufficient subjects with cystic fibrosis. *J Pediatr* **149**, 658-662.
- Bradley JM, Moran FM & Elborn JS (2006) Evidence for physical therapies (airway clearance and physical training) in cystic fibrosis: an overview of five Cochrane systematic reviews. *Respir Med* **100**, 191-201.
- Brenna JT (2002) Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **5**, 127-132.
- Brown DA & London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 111-136.
- Buchdahl RM, Fulleylove C, Marchant JL, Warner JO & Brueton MJ (1989) Energy and nutrient intakes in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* **64**, 373-378.
- Burdge GC (2006) Metabolism of alpha-linolenic acid in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **75**, 161-168.
- Burdge GC & Wootton SA (2003) Conversion of alpha-linolenic acid to palmitic, palmitoleic, stearic and oleic acids in men and women. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **69**, 283-290.
- Burr GO & Burr MM (1929) A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J Biol Chem* **82**, 345-367.
- Calder PC & Yaqoob P (2007) Lipid rafts--composition, characterization, and controversies. *J Nutr* **137**, 545-547.
- Caren R & Corbo L (1966) Plasma fatty acids in pancreatic cystic fibrosis and liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* **26**, 470-477.
- Carey MC & Small DM (1970) The characteristics of mixed micellar solutions with particular reference to bile. *Am J Med* **49**, 590-608.
- Carnielli VP, Verlato G, Pederzini F, Luijendijk I, Boerlage A, Pedrotti D & Sauer PJ (1998) Intestinal absorption of long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants fed breast milk or formula. *Am J Clin Nutr* **67**, 97-103.
- Carrie I, Clement M, de Javel D, Frances H & Bourre JM (2000) Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *J Lipid Res* **41**, 473-480.
- Carriere F, Laugier R, Barrowman JA, Douchet I, Priymenko N & Verger R (1993) Gastric and pancreatic lipase levels during a test meal in dogs. *Scand J Gastroenterol* **28**, 443-454.
- Chantret I, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Brot-Laroche E, Zweibaum A & Rousset M (1994) Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J Cell Sci* **107 ( Pt 1)**, 213-225.
- Cho HP, Nakamura M & Clarke SD (1999) Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. *J Biol Chem* **274**, 37335-37339.

- Christophe A, Robberecht E, De Baets F & Franckx H (1992) Increase of long chain omega-3 fatty acids in the major serum lipid classes of patients with cystic fibrosis. *Ann Nutr Metab* **36**, 304-312.
- Christophe A, Robberecht E, Franckx H, De Baets F & van de Pas M (1994) Effect of administration of gamma-linolenic acid on the fatty acid composition of serum phospholipids and cholesteryl esters in patients with cystic fibrosis. *Ann Nutr Metab* **38**, 40-47.
- Colin DY, Deprez-Beauclair P, Allouche M, Brasseur R & Kerfelec B (2008) Exploring the active site cavity of human pancreatic lipase. *Biochem Biophys Res Commun* **370**, 394-398.
- Colombo C, Roda A, Roda E, Piceni Sereni L, Maspero D, Giunta AM & Barbara L (1983) Evaluation of an oral ursodeoxycholic acid load in the assessment of bile acid malabsorption in cystic fibrosis. *Dig Dis Sci* **28**, 306-311.
- Colombo C, Russo MC, Zazzeron L & Romano G (2006) Liver disease in cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **43 Suppl 1**, S49-55.
- Conquer JA & Holub BJ (1997) Dietary docosahexaenoic acid as a source of eicosapentaenoic acid in vegetarians and omnivores. *Lipids* **32**, 341-345.
- Costa M, Potvin S, Berthiaume Y, Gauthier L, Jeanneret A, Lavoie A, Levesque R, Chiasson J & Rabasa-Lhoret R (2005) Diabetes: a major co-morbidity of cystic fibrosis. *Diabetes Metab* **31**, 221-232.
- Coste TC (2005a) Les aliments riches en oméga 3. *46e Journées Nationales de Diététiques et de Nutrition*.
- Coste TC (2005b) Oméga 3 et mucoviscidose. *46e journées nationales de diététique et de nutrition*.
- Coste TC, Armand M, Lebacq J, Lebecque P, Wallemacq P & Leal T (2007) An overview of monitoring and supplementation of omega 3 fatty acids in cystic fibrosis. *Clin Biochem* **40**, 511-520.
- Coste TC, Deumer G, Reyhler G, Lebecque P, Wallemacq P & Leal T (2008) Influence of pancreatic status and sex on polyunsaturated fatty acid profiles in cystic fibrosis. *Clin Chem* **54**, 388-395.
- Coste TC, Gerbi A, Vague P, Maixent JM, Pieroni G & Raccach D (2004) Peripheral diabetic neuropathy and polyunsaturated fatty acid supplementations: natural sources or biotechnological needs? *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **50**, 845-853.
- Coste TC, Gerbi A, Vague P, Pieroni G & Raccach D (2003) Neuroprotective effect of docosahexaenoic acid-enriched phospholipids in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* **52**, 2578-2585.
- Coste TC, Mimoun M, Lebacq J, Lebecque P, Wallemacq P, Armand M & Leal T (2006) Evolution du statut en acides gras polyinsaturés dans différents tissus chez la souris homozygote dF508. *Nutrition clinique et métabolisme* **20 suppl.2**, P077.
- Cottart CH, Bonvin E, Rey C, Wendum D, Bernaudin JF, Dumont S, Lasnier E, Debray D, Clement A, Housset C & Bonora M (2007) Impact of nutrition on phenotype in CFTR-deficient mice. *Pediatr Res* **62**, 528-532.
- Crawford MA, Ward P & Lennon EA (1987) Platelet fatty acid metabolisms and their functions. *Bibl Nutr Dieta*, 58-68.
- Crenon I, Foglizzo E, Kerfelec B, Verine A, Pignol D, Hermoso J, Bonicel J & Chapus C (1998) Pancreatic lipase-related protein type I: a specialized lipase or an inactive enzyme. *Protein Eng* **11**, 135-142.
- Cunnane SC (2003) Problems with essential fatty acids: time for a new paradigm? *Prog Lipid Res* **42**, 544-568.
- Dahlqvist A (1968) Assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem* **22**, 99-107.

- Dalemans W, Barbry P, Champigny G, Jallat S, Dott K, Dreyer D, Crystal RG, Pavirani A, Lecocq JP & Lazdunski M (1991) Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature* **354**, 526-528.
- Danielsen EM & Hansen GH (2008) Lipid raft organization and function in the small intestinal brush border. *J Physiol Biochem* **64**, 377-382.
- Danielsson H (1963) Influence of bile acids on digestion and absorption of lipids. *Am J Clin Nutr* **12**, 214-219.
- Davies JC (2006) Gene and cell therapy for cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* **7 Suppl 1**, S163-165.
- Davis PB (2006) Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* **173**, 475-482.
- De Boeck K, Delbeke I, Eggermont E, Veereman-Wauters G & Ghooos Y (1998) Lipid digestion in cystic fibrosis: comparison of conventional and high-lipase enzyme therapy using the mixed-triglyceride breath test. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **26**, 408-411.
- De Caro J, Sias B, Grandval P, Ferrato F, Halimi H, Carriere F & De Caro A (2004) Characterization of pancreatic lipase-related protein 2 isolated from human pancreatic juice. *Biochim Biophys Acta* **1701**, 89-99.
- De Vizia B, Raia V, Spano C, Pavlidis C, Coruzzo A & Alessio M (2003) Effect of an 8-month treatment with omega-3 fatty acids (eicosapentaenoic and docosahexaenoic) in patients with cystic fibrosis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **27**, 52-57.
- Debray D, Lykavieris P, Gauthier F, Dousset B, Sardet A, Munck A, Laselve H & Bernard O (1999) Outcome of cystic fibrosis-associated liver cirrhosis: management of portal hypertension. *J Hepatol* **31**, 77-83.
- Denning CR, Sommers SC & Quigley HJ, Jr. (1968) Infertility in male patients with cystic fibrosis. *Pediatrics* **41**, 7-17.
- Di Sant'Agnese P, Darling RC, Perara GA & Shea E (1953) Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *AMA Am J Dis Child* **86**, 618-619; discussion, 619.
- Djemli-Shipkolye A, Raccach D, Pieroni G, Vague P, Coste TC & Gerbi A (2003) Differential effect of omega3 PUFA supplementations on Na,K-ATPase and Mg-ATPase activities: possible role of the membrane omega6/omega3 ratio. *J Membr Biol* **191**, 37-47.
- Dodge JA & Turck D (2006) Cystic fibrosis: nutritional consequences and management. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **20**, 531-546.
- Doggett RG (1969) Incidence of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* from clinical sources. *Appl Microbiol* **18**, 936-937.
- Doggett RG & Harrison GM (1972) *Pseudomonas aeruginosa*: immune status in patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* **6**, 628-635.
- Duan D (2009) Phenomics of cardiac chloride channels: the systematic study of chloride channel function in the heart. *J Physiol* **587**, 2163-2177.
- Durie P, Kalnins D & Ellis L (1998) Uses and abuses of enzyme therapy in cystic fibrosis. *J R Soc Med* **91 Suppl 34**, 2-13.
- Durieu I, Vericel E, Guichardant D, Roth H, Steghens JP, Draï J, Josserand RN, Fontaine E, Lagarde M & Bellon G (2007) Fatty acids platelets and oxidative markers following intravenous n-3 fatty acids administration in cystic fibrosis: An open pilot observational study. *J Cyst Fibros* **6**, 320-326.
- Edenborough FP (2001) Women with cystic fibrosis and their potential for reproduction. *Thorax* **56**, 649-655.
- Edenborough FP, Mackenzie WE & Stableforth DE (2000) The outcome of 72 pregnancies in 55 women with cystic fibrosis in the United Kingdom 1977-1996. *Bjog* **107**, 254-261.

- Eggermont E & De Boeck K (1991) Small-intestinal abnormalities in cystic fibrosis patients. *Eur J Pediatr* **150**, 824-828.
- Elmadfa I & Kornsteiner M (2009) Fats and fatty acid requirements for adults. *Ann Nutr Metab* **55**, 56-75.
- Elphick HE & Mallory G (2009) Oxygen therapy for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003884.
- Emken EA, Adlof RO & Gulley RM (1994) Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochim Biophys Acta* **1213**, 277-288.
- Estivill X, Bancells C & Ramos C (1997) Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat* **10**, 135-154.
- Eurodiet (2001) Eurodiet reports and proceedings. *Public Health Nutr* **4**, 265-435.
- Fan YY, McMurray DN, Ly LH & Chapkin RS (2003) Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids remodel mouse T-cell lipid rafts. *J Nutr* **133**, 1913-1920.
- Farrell PM, Bieri JG, Fratantoni JF, Wood RE & di Sant'Agnes PA (1977) The occurrence and effects of human vitamin E deficiency. A study in patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* **60**, 233-241.
- Farrell PM, Mischler EH, Engle MJ, Brown DJ & Lau SM (1985) Fatty acid abnormalities in cystic fibrosis. *Pediatr Res* **19**, 104-109.
- Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, Legrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ & Campbell PW, 3rd (2008) Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* **153**, S4-S14.
- Fillery-Travis AJ, Foster LH & Robins MM (1995) Stability of emulsions stabilised by two physiological surfactants: L-alpha-phosphatidylcholine and sodium taurocholate. *Biophys Chem* **54**, 253-260.
- Fogh J, Fogh JM & Orfeo T (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **59**, 221-226.
- Folch J, Lees M & Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509.
- Freedman SD, Blanco PG, Zaman MM, Shea JC, Ollero M, Hopper IK, Weed DA, Gelrud A, Regan MM, Laposata M, Alvarez JG & O'Sullivan BP (2004) Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *N Engl J Med* **350**, 560-569.
- Freedman SD, Katz MH, Parker EM, Laposata M, Urman MY & Alvarez JG (1999) A membrane lipid imbalance plays a role in the phenotypic expression of cystic fibrosis in *cftr(-/-)* mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13995-14000.
- Fukuwatari T, Kawada T, Tsuruta M, Hiraoka T, Iwanaga T, Sugimoto E & Fushiki T (1997) Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett* **414**, 461-464.
- Garmy N, Taieb N, Yahi N & Fantini J (2005) Interaction of cholesterol with sphingosine: physicochemical characterization and impact on intestinal absorption. *J Lipid Res* **46**, 36-45.
- Gerbi A, Bernard M, Gleize B, Coste TC, Maixent JM, Lan C, Paganelli F & Pieroni G (2004) Dose dependent accretion of docosahexaenoic acid (DHA) in cardiac membranes of rats fed egg yolk powder enriched in DHA. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **50**, 855-860.
- Gerbi A & Maixent JM (1999) Fatty acid-induced modulation of ouabain responsiveness of rat Na, K-ATPase isoforms. *J Membr Biol* **168**, 19-27.

- Gillet D, de Braekeleer M, Bellis G & Durieu I (2002) Cystic fibrosis and pregnancy. Report from French data (1980-1999). *Bjog* **109**, 912-918.
- Gilljam H, Strandvik B, Ellin A & Wiman LG (1986) Increased mole fraction of arachidonic acid in bronchial phospholipids in patients with cystic fibrosis. *Scand J Clin Lab Invest* **46**, 511-518.
- Girodon-Boulandet E & Costa C (2005) Génétique de la mucoviscidose. *mt pédiatrie* **8**, 126-134.
- Glatz JF & van der Vusse GJ (1990) Cellular fatty acid-binding proteins: current concepts and future directions. *Mol Cell Biochem* **98**, 237-251.
- Gleize B, Payet M, Esmail MH, Pieroni G & Coste TC (2004) Docosaehaenoic acid-enriched egg phospholipids supplementation induces accretion of arachidonic acid in rat blood lipids. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **50**, 861-867.
- Griese M (1999) Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* **13**, 1455-1476.
- Griesenbach U, Geddes DM & Alton EW (2006) Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. *Gene Ther* **13**, 1061-1067.
- Grimaldi PA (2001) Fatty acid regulation of gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **4**, 433-437.
- Groschwitz KR & Hogan SP (2009) Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* **124**, 3-20; quiz 21-22.
- Guichardant M, Bacot S, Moliere P & Lagarde M (2006) Hydroxy-alkenals from the peroxidation of n-3 and n-6 fatty acids and urinary metabolites. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **75**, 179-182.
- Guilbault C, Saeed Z, Downey GP & Radzioch D (2007) Cystic fibrosis mouse models. *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**, 1-7.
- Hagve TA & Christophersen BO (1986) Evidence for peroxisomal retroconversion of adrenic acid (22:4(n-6)) and docosaehaenoic acids (22:6(n-3)) in isolated liver cells. *Biochim Biophys Acta* **875**, 165-173.
- Haikal Z, Play B, Landrier JF, Giraud A, Ghiringhelli O, Lairon D & Jourdeuil-Rahmani D (2008) NPC1L1 and SR-BI are involved in intestinal cholesterol absorption from small-size lipid donors. *Lipids* **43**, 401-408.
- Hamilton JA (2003) Fast flip-flop of cholesterol and fatty acids in membranes: implications for membrane transport proteins. *Curr Opin Lipidol* **14**, 263-271.
- Hamosh M (1990) Lingual and gastric lipases. *Nutrition* **6**, 421-428.
- Hamosh M & Burns WA (1977) Lipolytic activity of human lingual glands (Ebner). *Lab Invest* **37**, 603-608.
- Hansen AE, Haggard ME, Boelsche AN, Adam DJ & Wiese HF (1958) Essential fatty acids in infant nutrition. III. Clinical manifestations of linoleic acid deficiency. *J Nutr* **66**, 565-576.
- Henderson WR, Jr., Astley SJ, McCready MM, Kushmerick P, Casey S, Becker JW & Ramsey BW (1994) Oral absorption of omega-3 fatty acids in patients with cystic fibrosis who have pancreatic insufficiency and in healthy control subjects. *J Pediatr* **124**, 400-408.
- Hernell O, Stiggers JE & Carey MC (1990) Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 2. Phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat digestion in healthy adult human beings. *Biochemistry* **29**, 2041-2056.
- Ho SY & Storch J (2001) Common mechanisms of monoacylglycerol and fatty acid uptake by human intestinal Caco-2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C1106-1117.

- Hoffman DR, Birch EE, Birch DG & Uauy RD (1993) Effects of supplementation with omega 3 long-chain polyunsaturated fatty acids on retinal and cortical development in premature infants. *Am J Clin Nutr* **57**, 807S-812S.
- Hoiby N (1988) Hemophilus influenzae, Staphylococcus aureus, Pseudomonas cepacia, and Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis. *Chest* **94**, 97S-103S.
- Holman RT, Johnson SB & Hatch TF (1982) A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *Am J Clin Nutr* **35**, 617-623.
- Holsclaw DS, Perlmutter AD, Jockin H & Shwachman H (1971) Genital abnormalities in male patients with cystic fibrosis. *J Urol* **106**, 568-574.
- Homan R & Hamelehle KL (1998) Phospholipase A2 relieves phosphatidylcholine inhibition of micellar cholesterol absorption and transport by human intestinal cell line Caco-2. *J Lipid Res* **39**, 1197-1209.
- Horrobin DF (1993) Fatty acid metabolism in health and disease: the role of delta-6-desaturase. *Am J Clin Nutr* **57**, 732S-736S; discussion 736S-737S.
- Hubbard VS & Dunn GD (1980) Fatty acid composition of erythrocyte phospholipids from patients with cystic fibrosis. *Clin Chim Acta* **102**, 115-118.
- Hubbard VS & Mangrum PJ (1982) Energy intake and nutrition counseling in cystic fibrosis. *J Am Diet Assoc* **80**, 127-131.
- Iqbal J & Hussain M (2009) Intestinal Lipid Absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Ishiguro H, Steward M & Naruse S (2007) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and SLC26 transporters in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion by pancreatic duct cells. *Sheng Li Xue Bao* **59**, 465-476.
- Jayne S, Kerfelec B, Foglizzo E, Granon S, Hermoso J, Chapus C & Crenon I (2002) Activation of horse PLRP2 by bile salts does not require colipase. *Biochemistry* **41**, 8422-8428.
- Johannesson M, Landgren BM, Csemiczky G, Hjelte L & Gottlieb C (1998) Female patients with cystic fibrosis suffer from reproductive endocrinological disorders despite good clinical status. *Hum Reprod* **13**, 2092-2097.
- Jouret F & Devuyst O (2009) CFTR and defective endocytosis: new insights in the renal phenotype of cystic fibrosis. *Pflugers Arch* **457**, 1227-1236.
- Kaplan E, Shwachman H, Perlmutter AD, Rule A, Khaw KT & Holsclaw DS (1968) Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med* **279**, 65-69.
- Katz DP, Manner T, Furst P & Askanazi J (1996) The use of an intravenous fish oil emulsion enriched with omega-3 fatty acids in patients with cystic fibrosis. *Nutrition* **12**, 334-339.
- Knowles MR, Stutts MJ, Spock A, Fischer N, Gatzky JT & Boucher RC (1983) Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* **221**, 1067-1070.
- Koletzko B, Cetin I & Brenna JT (2007) Dietary fat intakes for pregnant and lactating women. *Br J Nutr* **98**, 873-877.
- Kopelman H (1991) Cystic fibrosis. 6. Gastrointestinal and nutritional aspects. *Thorax* **46**, 261-267.
- Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG & 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.
- Kris-Etherton PM, Taylor DS, Yu-Poth S, Huth P, Moriarty K, Fishell V, Hargrove RL, Zhao G & Etherton TD (2000) Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am J Clin Nutr* **71**, 179S-188S.
- Krokan HE, Bjerve KS & Mork E (1993) The enteral bioavailability of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid is as good from ethyl esters as from glyceryl esters in spite



- of lower hydrolytic rates by pancreatic lipase in vitro. *Biochim Biophys Acta* **1168**, 59-67.
- Kuo PT, Huang NN & Bassett DR (1962) The fatty acid composition of the serum chylomicrons and adipose tissue of children with cystic fibrosis of the pancreas. *J Pediatr* **60**, 394-403.
- Kurlandsky LE, Bennink MR, Webb PM, Ulrich PJ & Baer LJ (1994) The absorption and effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids on serum leukotriene B4 in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **18**, 211-217.
- Lagarde M, Lemaitre D, Calzada C & Vericel E (1997) Involvement of lipid peroxidation in platelet signalling. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **57**, 489-491.
- Lagarde M & Vericel E (2004) Effets et métabolismes spécifiques des acides gras  $\omega$ 3 Oléagineux, Corps Gras, Lipides **11**, 55-57.
- Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, Montmayeur JP & Besnard P (2005) CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest* **115**, 3177-3184.
- Lawrence R & Sorrell T (1993) Eicosapentaenoic acid in cystic fibrosis: evidence of a pathogenetic role for leukotriene B4. *Lancet* **342**, 465-469.
- Le Beyec J, Delers F, Jourdan F, Schreider C, Chambaz J, Cardot P & Pincon-Raymond M (1997) A complete epithelial organization of Caco-2 cells induces I-FABP and potentializes apolipoprotein gene expression. *Exp Cell Res* **236**, 311-320.
- Lecerf J-M (2007) Produits de la pêche et acides gras oméga 3. Intérêt en prévention cardiovasculaire. *Phytothérapie Hors série*, HS14-HS21.
- Lee JY, Zhao L, Youn HS, Weatherill AR, Tapping R, Feng L, Lee WH, Fitzgerald KA & Hwang DH (2004) Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *J Biol Chem* **279**, 16971-16979.
- Leger C (2000) [Vitamin E and cardiovascular prevention]. *Ann Biol Clin (Paris)* **58**, 527-540.
- Lemaitre-Delaunay D, Pachiardi C, Laville M, Pousin J, Armstrong M & Lagarde M (1999) Blood compartmental metabolism of docosahexaenoic acid (DHA) in humans after ingestion of a single dose of [(13)C]DHA in phosphatidylcholine. *J Lipid Res* **40**, 1867-1874.
- Levy E, Spahis S, Sinnott D, Peretti N, Maupas-Schwalm F, Delvin E, Lambert M & Lavoie MA (2007) Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr Opin Lipidol* **18**, 310-318.
- Liedtke CM (1992) Electrolyte transport in the epithelium of pulmonary segments of normal and cystic fibrosis lung. *Faseb J* **6**, 3076-3084.
- Lloyd-Still JD, Johnson SB & Holman RT (1981) Essential fatty acid status in cystic fibrosis and the effects of safflower oil supplementation. *Am J Clin Nutr* **34**, 1-7.
- Lloyd-Still JD, Powers CA, Hoffman DR, Boyd-Trull K, Lester LA, Benisek DC & Arterburn LM (2006) Bioavailability and safety of a high dose of docosahexaenoic acid triacylglycerol of algal origin in cystic fibrosis patients: a randomized, controlled study. *Nutrition* **22**, 36-46.
- Lubamba B, Lecourt H, Lebacq J, Lebecque P, De Jonge H, Wallemacq P & Leal T (2008) Preclinical evidence that sildenafil and vardenafil activate chloride transport in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **177**, 506-515.
- Luthria DL, Mohammed BS & Sprecher H (1996) Regulation of the biosynthesis of 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* **271**, 16020-16025.

- Mahaffey KR (2004) Fish and shellfish as dietary sources of methylmercury and the omega-3 fatty acids, eicosahexaenoic acid and docosahexaenoic acid: risks and benefits. *Environ Res* **95**, 414-428.
- Mahraoui L, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A, Rousset M & Brot-Laroche E (1994) Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *Biochem J* **298 Pt 3**, 629-633.
- Mansbach CM, 2nd & Gorelick F (2007) Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G645-650.
- Martin A (2001) *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*, 3e ed. Paris: Tec et Doc Lavoisier.
- Mattes RD (2005) Fat taste and lipid metabolism in humans. *Physiol Behav* **86**, 691-697.
- McEvoy FA (1975) Letter: Essential fatty acids and cystic fibrosis. *Lancet* **2**, 236.
- McKeigue P (1994) Diets for secondary prevention of coronary heart disease: can linolenic acid substitute for oily fish? *Lancet* **343**, 1445.
- Meyer KC, Sharma A, Brown R, Weatherly M, Moya FR, Lewandoski J & Zimmerman JJ (2000) Function and composition of pulmonary surfactant and surfactant-derived fatty acid profiles are altered in young adults with cystic fibrosis. *Chest* **118**, 164-174.
- Meyer M, Huaux F, Gavilanes X, van den Brule S, Lebecque P, Lo Re S, Lison D, Scholte B, Wallemacq P & Leal T (2009) Azithromycin reduces exaggerated cytokine production by m1 alveolar macrophages in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **41**, 590-602.
- Moran A, Pekow P, Grover P, Zorn M, Slovis B, Pilewski J, Tullis E, Liou TG & Allen H (2009) Insulin therapy to improve BMI in cystic fibrosis-related diabetes without fasting hyperglycemia: results of the cystic fibrosis related diabetes therapy trial. *Diabetes Care* **32**, 1783-1788.
- Munck A (2003) [Digestive symptoms in cystic fibrosis]. *Arch Pediatr* **10 Suppl 2**, 333s-337s.
- Mushtaq I, Wright VM, Drake DP, Mearns MB & Wood CB (1998) Meconium ileus secondary to cystic fibrosis. The East London experience. *Pediatr Surg Int* **13**, 365-369.
- Nakamura CT, Ng GY, Paton JY, Keens TG, Witmer JC, Bautista-Bolduc D & Woo MS (2002) Correlation between digital clubbing and pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **33**, 332-338.
- Narushima K, Takada T, Yamanashi Y & Suzuki H (2008) Niemann-pick C1-like 1 mediates alpha-tocopherol transport. *Mol Pharmacol* **74**, 42-49.
- Nassir F, Wilson B, Han X, Gross RW & Abumrad NA (2007) CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J Biol Chem* **282**, 19493-19501.
- Ng SM & Jones AP (2003) Drug therapies for reducing gastric acidity in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003424.
- Noble-Jamieson G, Barnes N, Jamieson N, Friend P & Calne R (1996) Liver transplantation for hepatic cirrhosis in cystic fibrosis. *J R Soc Med* **89 Suppl 27**, 31-37.
- Nordoy A, Barstad L, Connor WE & Hatcher L (1991) Absorption of the n-3 eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as ethyl esters and triglycerides by humans. *Am J Clin Nutr* **53**, 1185-1190.
- Odegaard I, Stray-Pedersen B, Hallberg K, Haanaes OC, Storrosten OT & Johannesson M (2002) Prevalence and outcome of pregnancies in Norwegian and Swedish women with cystic fibrosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* **81**, 693-697.

- Ohta A, Mayo MC, Kramer N & Lands WE (1990) Rapid analysis of fatty acids in plasma lipids. *Lipids* **25**, 742-747.
- Ollero M, Laposata M, Zaman MM, Blanco PG, Andersson C, Zeind J, Urman Y, Kent G, Alvarez JG & Freedman SD (2006) Evidence of increased flux to n-6 docosapentaenoic acid in phospholipids of pancreas from cfr-/- knockout mice. *Metabolism* **55**, 1192-1200.
- Pacetti D, Malavolta M, Bocci F, Boselli E & Frega NG (2004) High-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometric analysis and quantification of phosphatidylcholine molecular species in the serum of cystic fibrosis subjects supplemented with docosahexaenoic acid. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**, 2395-2400.
- Palozza P, Sgarlata E, Luberto C, Piccioni E, Anti M, Marra G, Armelao F, Franceschelli P & Bartoli GM (1996) n-3 fatty acids induce oxidative modifications in human erythrocytes depending on dose and duration of dietary supplementation. *Am J Clin Nutr* **64**, 297-304.
- Panchaud A, Sauty A, Kernen Y, Decosterd LA, Buclin T, Boulat O, Hug C, Pilet M & Roulet M (2006) Biological effects of a dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in cystic fibrosis patients: a randomized, crossover placebo-controlled trial. *Clin Nutr* **25**, 418-427.
- Parsons HG, O'Loughlin EV, Forbes D, Cooper D & Gall DG (1988) Supplemental calories improve essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patients. *Pediatr Res* **24**, 353-356.
- Pawlosky R, Barnes A & Salem N, Jr. (1994) Essential fatty acid metabolism in the feline: relationship between liver and brain production of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* **35**, 2032-2040.
- Pawlosky RJ, Hibbeln JR, Novotny JA & Salem N, Jr. (2001) Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. *J Lipid Res* **42**, 1257-1265.
- Payet M, Esmail MH, Polichetti E, Le Brun G, Adjemout L, Donnarel G, Portugal H & Pieroni G (2004) Docosahexaenoic acid-enriched egg consumption induces accretion of arachidonic acid in erythrocytes of elderly patients. *Br J Nutr* **91**, 789-796.
- Payet M, Gleize B, Cara L, Savin B, Gastaldi M, Planells R & Pieroni G (2003) DHA et performance physique. In *Congrès national scientifique de la Société Française de la Médecine du Sport*. Toulouse.
- Pencharz PB, Berall G, Corey M, Durie P & Vaisman N (1989) Energy intake in cystic fibrosis. *Nutr Rev* **47**, 31-32.
- Petit V, Niot I, Poirier H & Besnard P (2007) Absorption intestinale des acides gras : faits et incertitudes (Fatty acids intestinal absorption: facts and uncertainties). *Nutrition clinique et métabolisme* **21**, 38-45.
- Pinto M, Robine-Léon S, Appay MD, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assman P, Haffen K, Fogh J & Zweibaum A (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* **47**, 323-330.
- Play B, Salvini S, Haikal Z, Charbonnier M, Harbis A, Roussel M, Lairon D & Jourdeuil-Rahmani D (2003) Glucose and galactose regulate intestinal absorption of cholesterol. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 446-451.
- Porter HP & Saunders DR (1971) Isolation of the aqueous phase of human intestinal contents during the digestion of a fatty meal. *Gastroenterology* **60**, 997-1007.
- Puchelle E, de Bentzmann S & Zahm JM (1995) Physical and functional properties of airway secretions in cystic fibrosis--therapeutic approaches. *Respiration* **62 Suppl 1**, 2-12.

- Quinton PM (1990) Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport. *Faseb J* **4**, 2709-2717.
- Quinton PM & Bijman J (1983) Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* **308**, 1185-1189.
- Reboul E, Klein A, Bietrix F, Gleize B, Malezet-Desmoulins C, Schneider M, Margotat A, Lagrost L, Collet X & Borel P (2006) Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *J Biol Chem* **281**, 4739-4745.
- Reboul E, Tromprier D, Moussa M, Klein A, Landrier JF, Chimini G & Borel P (2009) ATP-binding cassette transporter A1 is significantly involved in the intestinal absorption of alpha- and gamma-tocopherol but not in that of retinyl palmitate in mice. *Am J Clin Nutr* **89**, 177-184.
- Regan PT, Malagelada JR, Dimagno EP & Go VL (1979) Reduced intraluminal bile acid concentrations and fat maldigestion in pancreatic insufficiency: correction by treatment. *Gastroenterology* **77**, 285-289.
- Reynaud-Gaubert M (1999) [Respiratory disease in cystic fibrosis: from physiopathology to therapy. Kinesitherapy and pulmonary transplantation excluded]. *Rev Mal Respir* **16**, 495-509.
- Riordan JR & Chang XB (1992) CFTR, a channel with the structure of a transporter. *Biochim Biophys Acta* **1101**, 221-222.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL & et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-1073.
- Rivers JP & Hassam AG (1975) Defective essential-fatty-acid metabolism in cystic fibrosis. *Lancet* **2**, 642-643.
- Roberts IM (1989) Enzyme therapy for malabsorption in exocrine pancreatic insufficiency. *Pancreas* **4**, 496-503.
- Robinson PJ, Smith AL & Sly PD (1990) Duodenal pH in cystic fibrosis and its relationship to fat malabsorption. *Dig Dis Sci* **35**, 1299-1304.
- Rogers CS, Abraham WM, Brogden KA, Engelhardt JF, Fisher JT, McCray PB, Jr., McLennan G, Meyerholz DK, Namati E, Ostedgaard LS, Prather RS, Sabater JR, Stoltz DA, Zabner J & Welsh MJ (2008) The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**, L240-263.
- Rogiers V, Dab I, Michotte Y, Vercruyse A, Crokaert R & Vis HL (1984) Abnormal fatty acid turnover in the phospholipids of the red blood cell membranes of cystic fibrosis patients (in vitro study). *Pediatr Res* **18**, 704-709.
- Rojas CV, Martinez JI, Flores I, Hoffman DR & Uauy R (2003) Gene expression analysis in human fetal retinal explants treated with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 3170-3177.
- Rosenlund ML, Kim HK & Kritchevsky D (1974) Essential fatty acids in cystic fibrosis. *Nature* **251**, 719.
- Roulet M, Frascarolo P, Rappaz I & Pilet M (1997) Essential fatty acid deficiency in well nourished young cystic fibrosis patients. *Eur J Pediatr* **156**, 952-956.
- Roulet M, Weber AM, Paradis Y, Roy CC, Chartrand L, Lasalle R & Morin CL (1980) Gastric emptying and lingual lipase activity in cystic fibrosis. *Pediatr Res* **14**, 1360-1362.
- Rozmahel R, Wilschanski M, Matin A, Plyte S, Oliver M, Auerbach W, Moore A, Forstner J, Durie P, Nadeau J, Bear C & Tsui LC (1996) Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. *Nat Genet* **12**, 280-287.

- Saiman L (2004) The use of macrolide antibiotics in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* **10**, 515-523.
- Salem N, Jr., Pawlosky R, Wegher B & Hibbeln J (1999) In vivo conversion of linoleic acid to arachidonic acid in human adults. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **60**, 407-410.
- Salvini S, Charbonnier M, Defoort C, Alquier C & Lairon D (2002) Functional characterization of three clones of the human intestinal Caco-2 cell line for dietary lipid processing. *Br J Nutr* **87**, 211-217.
- Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A & Zucco F (2005) The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* **21**, 1-26.
- Sandoval A, Fraisl P, Arias-Barrau E, Dirusso CC, Singer D, Sealls W & Black PN (2008) Fatty acid transport and activation and the expression patterns of genes involved in fatty acid trafficking. *Arch Biochem Biophys* **477**, 363-371.
- Sane AT, Sinnett D, Delvin E, Bendayan M, Marcil V, Menard D, Beaulieu JF & Levy E (2006) Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res* **47**, 2112-2120.
- Sato K & Sato F (1984) Defective beta adrenergic response of cystic fibrosis sweat glands in vivo and in vitro. *J Clin Invest* **73**, 1763-1771.
- Schley PD, Brindley DN & Field CJ (2007) (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J Nutr* **137**, 548-553.
- Scholte BJ, Davidson DJ, Wilke M & De Jonge HR (2004) Animal models of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **3 Suppl 2**, 183-190.
- Schuler D, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, Ballmann M, Dechaux M, Edelman A, Hug M, Leal T, Lebacq J, Lebecque P, Lenoir G, Stanke F, Wallemacq P, Tummler B & Knowles MR (2004) Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurements. *J Cyst Fibros* **3 Suppl 2**, 151-155.
- Schwiebert EM, Gruenert DC, Guggino WB & Stanton BA (1995) G protein G alpha i-2 inhibits outwardly rectifying chloride channels in human airway epithelial cells. *Am J Physiol* **269**, C451-456.
- Serhan CN, Gotlinger K, Hong S & Arita M (2004) Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **73**, 155-172.
- Sermet-Gaudelus I, Poisson-Salomon AS, Colomb V, Brusset MC, Mosser F, Berrier F & Ricour C (2000) Simple pediatric nutritional risk score to identify children at risk of malnutrition. *Am J Clin Nutr* **72**, 64-70.
- Shapiro BL (1989) Evidence for a mitochondrial lesion in cystic fibrosis. *Life Sci* **44**, 1327-1334.
- Shiau YF, Fernandez P, Jackson MJ & McMonagle S (1985) Mechanisms maintaining a low-pH microclimate in the intestine. *Am J Physiol* **248**, G608-617.
- Shwachman H & Kulczycki LL (1958) Long-term study of one hundred five patients with cystic fibrosis; studies made over a five- to fourteen-year period. *AMA J Dis Child* **96**, 6-15.
- Sinaasappel M, Stern M, Littlewood J, Wolfe S, Steinkamp G, Heijerman HG, Robberecht E & Doring G (2002) Nutrition in patients with cystic fibrosis: a European Consensus. *J Cyst Fibros* **1**, 51-75.
- Smith WL, Marnett LJ & DeWitt DL (1991) Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol Ther* **49**, 153-179.

- Spencer DA (1997) Nebulised bronchodilators, antibiotics and rhDNase for children with cystic fibrosis. *Thorax* **52 Suppl 2**, S89-91.
- Spencer H & Jaffe A (2004) The potential for stem cell therapy in cystic fibrosis. *J R Soc Med* **97 Suppl 44**, 52-56.
- Sprecher HW, Baykousheva SP, Luthria DL & Mohammed BS (1995) Differences in the regulation of biosynthesis of 20- versus 22-carbon polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **52**, 99-101.
- Stead RJ, Skypala I, Hodson ME & Batten JC (1987) Enteric coated microspheres of pancreatin in the treatment of cystic fibrosis: comparison with a standard enteric coated preparation. *Thorax* **42**, 533-537.
- Storch J & Xu Z (2009) Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 671-678.
- Strandvik B (2004) Fatty acid metabolism in cystic fibrosis. *N Engl J Med* **350**, 605-607.
- Strandvik B, Gronowitz E, Enlund F, Martinsson T & Wahlstrom J (2001) Essential fatty acid deficiency in relation to genotype in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* **139**, 650-655.
- Strandvik B, Svensson E & Seyberth HW (1996) Prostanoid biosynthesis in patients with cystic fibrosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **55**, 419-425.
- Stremmel W (1988) Uptake of fatty acids by jejunal mucosal cells is mediated by a fatty acid binding membrane protein. *J Clin Invest* **82**, 2001-2010.
- Strittmatter P, Spatz L, Corcoran D, Rogers MJ, Setlow B & Redline R (1974) Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**, 4565-4569.
- Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC & Boucher RC (1995) CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* **269**, 847-850.
- Swagell CD, Henly DC & Morris CP (2007) Regulation of human hepatocyte gene expression by fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* **362**, 374-380.
- Taieb N, Yahi N & Fantini J (2004) Rafts and related glycosphingolipid-enriched microdomains in the intestinal epithelium: bacterial targets linked to nutrient absorption. *Adv Drug Deliv Rev* **56**, 779-794.
- Thies NH (1997) The effect of 12 months' treatment with eicosapentaenoic acid in five children with cystic fibrosis. *J Paediatr Child Health* **33**, 349-351.
- Thomas C, Landrier JF, Gaillard D, Grober J, Monnot MC, Athias A & Besnard P (2006) Cholesterol dependent downregulation of mouse and human apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT) gene expression: molecular mechanism and physiological consequences. *Gut* **55**, 1321-1331.
- Thompson GN (1989) Relationships between essential fatty acid levels, pulmonary function and fat absorption in pre-adolescent cystic fibrosis children with good clinical scores. *Eur J Pediatr* **148**, 327-329.
- Thomson AB, Keelan M, Thiesen A, Clandinin MT, Ropeleski M & Wild GE (2001) Small bowel review: diseases of the small intestine. *Dig Dis Sci* **46**, 2555-2566.
- Trotter PJ, Ho SY & Storch J (1996) Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. *J Lipid Res* **37**, 336-346.
- Trumbo P (2002) Upcoming DRI report: new ways of defining fiber. *J Am Diet Assoc* **102**, 468.
- Tso P (1994) Intestinal lipid absorption. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, pp. 1867-1908 [LR Johnson, editor]. New York: Raven Press.
- Tsui LC & Buchwald M (1991) Biochemical and molecular genetics of cystic fibrosis. *Adv Hum Genet* **20**, 153-266, 311-152.

- Underwood BA, Denning CR & Navab M (1972) Polyunsaturated fatty acids and tocopherol levels in patients with cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci* **203**, 237-247.
- Valenzuela A, Nieto S, Sanhueza J, Nunez MJ & Ferrer C (2005) Tissue accretion and milk content of docosahexaenoic acid in female rats after supplementation with different docosahexaenoic acid sources. *Ann Nutr Metab* **49**, 325-332.
- Van Biervliet S, Vanbillemont G, Van Biervliet JP, Declercq D, Robberecht E & Christophe A (2007) Relation between fatty acid composition and clinical status or genotype in cystic fibrosis patients. *Ann Nutr Metab* **51**, 541-549.
- van Doorninck JH, French PJ, Verbeek E, Peters RH, Morreau H, Bijman J & Scholte BJ (1995) A mouse model for the cystic fibrosis delta F508 mutation. *Embo J* **14**, 4403-4411.
- Vericel E, Calzada C, Chapuy P & Lagarde M (1999) The influence of low intake of n-3 fatty acids on platelets in elderly people. *Atherosclerosis* **147**, 187-192.
- Vericel E, Polette A, Bacot S, Calzada C & Lagarde M (2003) Pro- and antioxidant activities of docosahexaenoic acid on human blood platelets. *J Thromb Haemost* **1**, 566-572.
- Verkade HJ & Tso P (2001) Biophysics of intestinal luminal lipids. In *Intestinal lipid metabolism*, pp. 1-14 [CM Mansbach, 2nd, P Tso and A Kurkis, editors]. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Voss A, Reinhart M, Sankarappa S & Sprecher H (1991) The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J Biol Chem* **266**, 19995-20000.
- Voss A, Reinhart M & Sprecher H (1992) Differences in the interconversion between 20- and 22-carbon (n - 3) and (n - 6) polyunsaturated fatty acids in rat liver. *Biochim Biophys Acta* **1127**, 33-40.
- Wainwright BJ, Scambler PJ, Schmidtke J, Watson EA, Law HY, Farrall M, Cooke HJ, Eiberg H & Williamson R (1985) Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature* **318**, 384-385.
- Wallis JG, Watts JL & Browse J (2002) Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem Sci* **27**, 467.
- Werner A, Bongers ME, Bijvelds MJ, de Jonge HR & Verkade HJ (2004) No indications for altered essential fatty acid metabolism in two murine models for cystic fibrosis. *J Lipid Res* **45**, 2277-2286.
- Whitcomb DC & Lowe ME (2007) Human pancreatic digestive enzymes. *Dig Dis Sci* **52**, 1-17.
- Wijendran V, Huang MC, Diao GY, Boehm G, Nathanielsz PW & Brenna JT (2002) Efficacy of dietary arachidonic acid provided as triglyceride or phospholipid as substrates for brain arachidonic acid accretion in baboon neonates. *Pediatr Res* **51**, 265-272.
- Williams CM & Burdge G (2006) Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources. *Proc Nutr Soc* **65**, 42-50.
- Woollett LA, Wang Y, Buckley DD, Yao L, Chin S, Granholm N, Jones PJ, Setchell KD, Tso P & Heubi JE (2006) Micellar solubilisation of cholesterol is essential for absorption in humans. *Gut* **55**, 197-204.
- Zucco F, Batto AF, Bises G, Chambaz J, Chiusolo A, Consalvo R, Cross H, Dal Negro G, de Angelis I, Fabre G, Guillou F, Hoffman S, Laplanche L, Morel E, Pincon-Raymond M, Prieto P, Turco L, Ranaldi G, Rousset M, Sambuy Y, Scarino ML, Torreilles F & Stamatii A (2005) An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of Caco-2 cell lines. *Altern Lab Anim* **33**, 603-618.