ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture Agriculture Alimentation Food Biologie Biology Environnement Environment Santé Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

Pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Physiologie de la nutrition

Présentée et soutenue publiquement par

Najoua GUELZIM

Le 22 novembre 2011

Régulation du métabolisme secondaire de l'arginine et de la cystéine par l'acide alpha-linolénique.

Implication dans la physiopathologie du syndrome métabolique

Directeur de thèse : **Dr. Dominique HERMIER**

Jury

M Dominique DARDEVET, DR, INRA, UMR 1019 nutrition humaine, Clermont-Ferrand	Rapporteur
M Philippe LEGRAND, PR, AgroCampusOuest, Biochimie-Nutrition Humaine, Rennes	Rapporteur
Mme Bernadette DELPLANQUE, CR, INSERM, UMR 8195, Centre de neurosciences, Orsay	Examinateur
M Stéphane MANDARD, MC, Université de Bourgogne, U866 LBMN, Dijon	Examinateur
Mme Claire GAUDICHON, PR, AgroParisTech, UMR 914 PNCA, Paris	Examinateur
Mme Dominique HERMIER, CR, INRA, UMR 914 PNCA, Paris	Examinateur

AgroParisTech
U914 INRA /AgroParisTech Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire
16 rue Claude Bernard 75231 Paris Cedex 05 France

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'UMR 914 INRA-AgroParisTech Physiologie de la Nutrition et du Comportement alimentaire, sous la direction de Dominique Hermier, dans le cadre d'une allocation de recherche du ministère de l'éducation et de la recherche.

Je tiens à exprimer en premier, ma profonde reconnaissance à Dominique Hermier, ma directrice de thèse à laquelle je dois la réussite de ce travail. Je voudrais exprimer ici ma gratitude envers son implication, sa disponibilité, sa grande rigueur et son sens des responsabilités. Je voudrais aussi saluer respectueusement son altruisme et sa grande indulgence qui ont été pour moi un soutien considérable au long de ces années de thèse.

Je tiens à remercier le professeur Daniel Tomé pour m'avoir accueillie au sein de ce laboratoire qu'il dirige. Je souhaite également adresser mes sincères remerciements à Gilles Fromentin pour son écoute et sa gentillesse.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à Dominique Dardevet et Philippe Legrand qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie également Claire Gaudichon, Bernadette Delplanque et Stéphane Mandard d'avoir accepté de participer au jury de thèse.

Je remercie chaleureusement Thierry Pineau, Pascal Martin, Frédéric Lasserre et leur équipe pour leur collaboration fructueuse, depuis les premières expériences du master. Je les remercie de nous avoir fait profiter de leur élevage de souris et d'avoir pris le temps de réaliser et d'analyser les données de trancriptomique. Je garde dans ma mémoire l'agréable souvenir de la séance de prélévement super organisée à Toulouse, qui m'avait à l'époque beaucoup impressionnée.

Mes remerciements s'adressent aussi à Dominique Bonnefont-Rousselot et Didier borderie pour nous avoir fourni les cellules BAEC et pour nous avoir fait bénéficier de leur expertise lors des protocoles de culture cellulaire. Je remercie également Raja Djelidi, Catherine Simonneau et Hervé Lemarechal pour avoir réalisé les dosages de l'activité arginase.

Je voudrais aussi remercier Luc Cynober er et Nathalie Neveux pour la réalisation des aminogrammes plasmatiques sur les échantillons des deux premiers protocoles, ainsi que Noureddine Hafnaoui pour s'être occupé de cet analyse pour les échantillons du troisième protocole.

Je suis aussi très reconnaissante à VALOREX et au GLN (Groupe Lipides et Nutrition), d'avoir apporté une partie importante du soutien financier à ce travail.

J'adresse mes remerciements à Jean-François Huneau, Annie Quignard-Boulangé, Philippe Schmidely, Mathieu Guillevic et Guillaume Chesneau pour avoir participé à mon comité de thèse et m'avoir apporté les critiques constructives qui ont participé à l'avancement de mon travail.

Je tiens à profiter de cette occasion pour exprimer ma respectueuse considération à Françoise Launay, directrice de l'école doctorale ABIES, ainsi qu'à son équipe. Je les remercie pour leur professionnalisme et pour leur engagement à garantir les meilleures conditions de travail aux doctorants.

Je tiens également à remercier vivement Jean François Huneau, François Mariotti et Annie Quignard-Boulangé d'avoir toujours été disponibles pour apporter leur expertise scientifique à ce travail et pour m'avoir aussi chaleureusement accueillie dans leur équipe. Mes sincères remerciements s'adressent aussi à Véronique Mathé, je la remercie pour son aide, pour m'avoir transmis les connaissances techniques qui m'ont accompagnées tout au long de cette thèse, mais aussi pour son amitié.

Mes remerciements vont ensuite à l'ensemble des membres du laboratoire avec lesquels j'ai partagé ces années importantes de ma vie, je les félicite tous pour l'ambiance amicale et accueillante qui règne au sein du laboratoire. Je tiens à remercie particulièrement Dalila Azzout-Marniche pour son soutien et ses précieux conseils scientifiques et personnels, Je tiens aussi à remercier Patrick Even pour sa précieuse participation aux protocoles et au traitement des données de calorimétire et de prise alimentaire, je remercie Catherine Chaumontet pour sa grande disponibilité et pour avoir toujours pris le temps de répondre à

mes questions. Je tiens aussi à remercier Catherine Luengo pour son aide précieuse à la réalisation des analyses en spectrométrie de masse, mais également pour son soutien lors de mes premiers pas dans la vie de maman. Mes remerciements vont aussi à Mireille Andriamihaja pour sa bonne humeur, ses gâteux et ses bons repas de Noël. Je remercie aussi Angélique Simonin d'avoir veillé au bien-être de mes animaux.Mes vifs remerciements vont ensuite, à l'ensemble de mes collègues doctorants pour leur soutien et pour les agréables moments que nous avons partagés.

Je remercie également les stagiaires qui ont participé directement ou indirectement à l'avancement de mes travaux, Carole Capitaine, Olivia Rakototsimba, Amélie Cormier, Guillaume Gardère et Florie Daire.

Je tiens aussi à remercier mes très chers amis qui ont été présents tout au long de ces années de thèse, Narjiss, Sanaa, Soumiya, Mariyamti, Alaa, Noura, Karima, Imane, Warda, Joëlle, Nabil, Issam et tous les autres. Merci pour votre fidélité, je ne sais pas ce que je serais devenue sans vous !

Je voudrais exprimer ma plus profonde reconnaissance à mes parents, mes sœurs, mon frère et l'ensemble de ma famille, pour leur soutien inconditionnel pendant toutes ces années d'études qui ont été bien longues pour eux. J'espère du plus profond de mon cœur qu'ils seront fiers de moi à travers ce travail que je leur dédie.

Enfin mes pensées les plus affectueuses s'adressent à mon petit Zyad, ses sourires et son affection ont été ma source d'équilibre.

Sommaire

Liste des tableaux et figures de l'introduction bibliographique ____ *8*

Liste des abréviations ____ *11*

Liste des publications ____ *14*

Introduction générale ____ *16*

Chapitre 1 : Etude bibliographique ____ *19*

I. Le syndrome métabolique ____ 19

1. Définitions du syndrome métabolique ____ 19
2. Prévalence du syndrome métabolique ____ 20
3. Le syndrome métabolique, un complexe de facteurs de risque ____ 20
4. Physiopathologie du syndrome métabolique ____ 21
5. La dysfonction endothéliale associée au SyndMet ____ 22
6. Stress oxydant associé au SyndMet ____ 23
7. Rôle de l'alimentation dans la prise en charge du SyndMet ____ 24

II. Rôle physiopathologique des AGPI n-3 ____ 26

1. Biochimie et nomenclature des acides gras ____ 26
   1.1. Biochimie des AG ____ 26
   1.2. Nomenclature des AG ____ 26
2. Les AGPI n-6 et n-3 ____ 27
   2.1 Métabolisme des AGPI n-6 et n-3 ____ 27
   2.2 L'essentialité des familles d'AGPI n-6 et n-3 ____ 28
   2.3 Origine alimentaire des AGPI n-3 et n-6 ____ 28
   2.4 Besoin, consommation et recommandation nutritionnelles pour les AGPI n-6 et n-3 ____ 29
   2.5 Fonctions biochimiques et rôles physiologiques des AGPI n-6 et n-3 ____ 30
      2.5.1. Incorporation dans les phospholipides membranaires ____ 40
      2.5.2. Précurseurs de métabolites lipidiques ____ 40
      2.5.3. Régulation de l'expression génique ____ 40
3. Implications des AGPI n-3 dans les processus physiopathologiques ____ 32
   3.1. AGPI n-3 et composantes du syndrome métabolique ____ 32
      3.1.1. AGPI n-3 et obésité ____ 32
      3.1.2. AGPI n-3 et métabolisme lipidique ____ 33
      3.1.3. AGPI n-3 glycémie et résistance à l'insuline ____ 33
      3.1.4. AGPI n-3 et hypertension artérielle ____ 34
   3.2. Effets pléotropiques des AGPI n-3 sur la physiopathologie du SyndMet ____ 34

III. Implication de l'arginine et de la cystéine dans la physiopathologie du SyndMet ____ 36

1. La cystéine précurseur du glutathion ____ 37
   1.1. Biosynthèse de la cystéine à partir de la méthionine ____ 37
   1.2. Voies d'utilisation et homéostasie de la cystéine ____ 37
2. Le glutathion ____ 38
   2.1 Synthèse du glutathion ____ 38
   2.2 Facteurs régulant la synthèse du glutathion ____ 38
   2.3 Le pool de glutathion ____ 40
   2.4 Rôles du glutathion ____ 40

2.4.1. Maintien du potentiel redox cellulaire 40
2.4.2. Participation aux défenses anti-oxydantes 41
2.5 Implication du glutathion dans la physiopathologie du SyndMet 42
3. L'arginine, précurseur du NO 43
4. Le NO modulateur clé de l'homéostasie vasculaire 44
4.1. Biochimie et métabolisme du NO 44
4.2. Régulation de la production du NO 44
4.3. Arginase et contrôle de la production du NO 45
4.3.1. Les arginases 45
4.3.2. Implication de l'arginase dans le contrôle de la production du NO 46
4.4. Rôle du NO au niveau vasculaire et implication dans la fonction endothéliale 47
4.5. Implication du NO dans la physiopathologie du syndrome métabolique 48

IV. Régulation du métabolisme des acides aminés via la voie du PPAR α 50

1. PPARα, définition activation et mode d'action 50
1.1. Définitions 50
1.2. Ligands de PPARα 50
1.3. Mode d'action du PPARα 51
2. Mise en évidence des effets pléotropiques du PPARα 51
3. Implication du PPARα dans la régulation du métabolisme des acides aminés 52
4. Implication du PPARα dans le métabolisme secondaire de l'arginine : voie de synthèse du NO 54
5. Implication du PPARα dans le métabolisme secondaire de la cystéine : synthèse et utilisation du glutathion 57

V. Régulation du métabolisme secondaire de l'arginine et de la cystéine par les AGPI n-3 60

1. Effets et conséquences de la régulation du métabolisme secondaire de l'arginine par les AGPI n-3 60
1.1. AGP n-3 et fonction endothéliale 60
1.2. Modulation du métabolisme secondaire de l'arginine par les AGPI n-3 : voie de synthèse du NO 61
1.3. Mécanismes mis en jeu par les AGPI n-3 dans la régulation du métabolisme secondaire de l'arginine 63
2. Effet des AGPI n-3 sur le métabolisme secondaire de la cystéine, implication dans le statut oxydant 64
2.1 AGPI n-3 et statut oxydant 64
2.2 Modulation du métabolisme secondaire de la cystéine par les AGPI n-3 : voie de synthèse du glutathion 65
2.3 Effet des AGPI n-3 sur les enzymes utilisant le glutathion et les enzymes antioxydants 67

VI. Conclusion des données bibliographiques et hypothèses: 69

Chapitre 2 : Objectifs et choix méthodologiques 71

1. Objectifs de la thèse 71
2. Démarche expérimentale 71
3. Choix des modèles 71
4. Choix de la composition des régimes 73
5. Choix des principaux marqueurs 73
6. Choix des principaux organes et tissus cibles 74

Chapitre 3 : Travaux Personnels 77

A. Effet de l'invalidation du PPARα, associée à de faibles apports en acide α-linolénique, sur le métabolisme de l'arginine et de la cystéine 78

B. Modulation du métabolisme secondaire des acides aminés par l'acide α-linolénique apporté dans le cadre d'un régime hyperlipidique. _____ 88

C. Exploration des effets de l'ALA sur le métabolisme secondaire de l'arginine au niveau de l'endothélium vasculaire _____ 101

Chapitre 4 : Discussion générale, conclusions et perspectives _____ 108

Liste des tableaux et figures de l'introduction bibliographique

- **Tableau 1 :** Définitions du Syndrome métabolique.
- **Tableau 2 :** Prévalence du Syndrome métabolique en Europe.
- **Tableau 3 :** Apport nutritionnel conseillé en lipides.
- **Tableau 4 :** ANC et Apports en EPA et DHA.

***

- **Figure 1 :** Physiopathologie du syndrome métabolique**.**
- **Figure 2 :** Ratio plasmatique entre les TBARs (thiobarbituric acide active substances) et le cholestérol chez les individus sains ou atteints de SyndMet.
- **Figure 3 :** Concentration plasmatique de vitamine C et E (alpha-tocophérol) chez les individus sains ou atteints de SyndMet.
- **Figure 4 :** Structure biochimique d'un acide gras**.**
- **Figure 5 :** Nomenclature des acides gras polyinsaturés.
- **Figure 6 :** Capacités de conversion des acides gras dans les différents règnes et biosynthèse des acides gras insaturés.
- **Figure 7 :** Contribution des matières grasses d'origine laitière, animale autre que laitière et végétale à l'apport quotidien en acide alpha-linolénique.
- **Figure 8 :** Stratégies d'augmentation des apports nutritionnels en AGPI n-3
- **Figure 9 :** Encombrement des différents types d'acides gras au sein des phospholipides membranaires.
- **Figure 10 :** Voies de synthèse des eicosanoïdes à partir les familles d'AGPI n-3 et n-6.
- **Figure 11 :** Synthèse de la cystéine.
- **Figure 12 :** Voies d'utilisation et homéostasie de la cystéine.
- **Figure 13 :** Structure biochimique du glutathion.
- **Figure 14 :** Synthèse du glutathion.
- **Figure 15 :** Participation du couple redox du glutathion à la régénération de la forme réduite d'autres antioxydants.
- **Figure 16 :** Origines et effets des ROS.
- **Figure 17 :** Participation du glutathion aux défenses antioxydantes.
- **Figure 18 :** Concentrations rénales en glutathion chez le rat Zucker maigre et Zucker diabétique obèse à 22 semaines d'âge.
- **Figure 19 :** Voies de synthèse et d'utilisation de l'arginine.
- **Figure 20 :** Cofacteur, substrat et produit de la NOS.
- **Figure 21 :** Réaction catalysée par la NOS.
- **Figure 22 :** Cycle de l'urée.
- **Figure 23 :** Expression des arginases 1 et 2 dans les tissus humains.
- **Figure 24 :** Effet de l'âge et/ou de l'inhibition de l'arginase sur les activités aortiques de l'arginase et de la NOS chez le rat jeune et âgé.
- **Figure 25 :** Compétition entre l'arginase et la NOS.

- **Figure 26 :** Concentration de nitrites plasmatiques chez les individus sains ou atteints de SyndMet.
- **Figure 27 :** Effet de l'invalidation du gène de la eNOs chez la souris sur les composantes du SyndMet.
- **Figure 28 :** Rôles du NO au niveau de l'endothélium et du muscle squelettique.
- **Figure 29 :** Mode d'activation des PPARs.
- **Figure 30 :** Effet du fénofibrate sur les niveaux d'expression hépatique de L'ALAT et de L'ASAT chez des souris déficientes en PPARα ou témoins.
- **Figure 31 :** Niveaux d'expression hépatique (Northern Blot) des enzymes du cycle de l'urée chez des souris déficientes en PPARα ou témoins suite à l'administration de WY14643
- **Figure 32 :** Effet du WY14643 sur les concentrations plasmatiques des acides aminés
- **Figure 33 :** Effet de l'invalidation du PPARα sur l'urémie à jeun chez la souris.
- **Figure 34** : Excrétion des nitrites urinaires (24h) chez le rat après traitement par du clofibrate, du L-NAME, du WY14643, ou du clofibrate + L-NAME.
- **Figure 35 :** Effet du clofibrate sur l'activité NOS rénale, chez des souris de type sauvages ou invalidées pour PPARα.
- **Figure 36:** Taux protéique cardiaque de la eNOS chez des rats diabétique (GK) aprés administration de DMSO ou de ligands de PPARα chez le rat.
- **Figure 37:** Effet de doses croissantes de fénofibrate sur l'expression de la eNOS.
- **Figure 38 :** Taux protéique de l'eNOs dans des cellules BAEC après traitement pendant 48 avec du fénofibrate et du RU486.
- **Figure 39 :** Production de NO par les celulles HUVEC en culture après traitement par du DMSO, du fénofibrate , ou du fénofibrate + L-NAME.
- **Figure 40 :** Effet du traitement des HUVEC par le fénofibrate sur la cinétique de phosphorylation de la eNOS.
- **Figure 41:** Concentration hépatique de glutathion total chez la souris de type sauvage ou invalidée pour PPARα.
- **Figure 42 :** Expression hépatique de la CAT et de la SOD chez le rat traité au WY 14643.
- **Figure 43 :** Effet du traitement de cellules HUVEC par le bézafibrate sur l'expression et le taux protéique de la SOD.
- **Figure 44 :** Régulation de l'expression génique par les AGPI alimentaires dépendante et indépendante du PPARα.
- **Figure 45 :** Variations individuelles des concentrations plasmatiques de NOx avant et après 8 semaines de complémentation avec de l'huile de poisson chez l'homme sain.
- **Figure 46 :** Concentrations plasmatiques de NOx chez les rats hypertendus ayant reçu de l'ALA ou de l'huile de tournesol
- **Figure 47 :** Expression relative du gène la eNOS dans les segments aortiques de rats ayant reçu un régime riche en huile de maïs ou de menhaden.
- **Figure 48 :** Rapport de concentration Arginine /citrulline dans l'homogénat de segments aortiques de rats ayant reçu un régime riche en huile de maïs ou de menhaden.
- **Figure 49 :** Effet de l'EPA seul ou en combinaison avec du L-NAME ou avec une délétion de l'endothélium sur la production de nitrates par les anneaux d'artères de mouton.

- **Figure 50 :** Concentration de NO dans les cellules HUVEC exposées à un milieux hyper-glucosé et traitées par l'ALA.
- **Figure 51 :** Phosphorylation de la eNOS dans les celulles HUVEC exposées à un milieux hyper glucosé et traité par l'ALA.
- **Figure 52 :** Effet d'un régime pauvre en lipides ou riche en lipides, contenant du saindoux ou de l'huile de poisson sur les concentrations de gluthation et le rapport gluthation total/glutathion oxydé dans les érythrocyte de rat.
- **Figure 53 :** Effet d'un régime riche en ALA sur la concentration de glutathion au niveau de colon de rat traité ou non au TNBS pour l'induction d'une colite.
- **Figure 54 :** Effet du traitement de fibroblastes humain par des doses croissantes de DHA sur la concentration de glutathion intracellulaire et l'activité de la γGCL.
- **Figure 55 :** Effet du traitement de fibroblastes humain par des doses croissantes de DHA sur l'activité de la glutathion réductase (GR) et la glutathion transférase (GST).

Liste des abréviations

- **AA** : Acide arachidonique
- **Afssa** : Agence française de sécurité sanitaire des aliments
- **AGMI** : Acides gras monoinstaturés
- **AGPI** : Acides gras polyinsaturés
- **AGPI-LC :** Acides gras polyinsaturés à longue chaîne
- **AGS** : Acides gras saturés
- **ALA** : Acide α-linolénique
- **ALAT** : Alanine aminotransférase
- **ANC** : Apports nutritionnels conseillés
- **Anses** : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
- **AP-1** : Activator protein 1
- **ARG** : Arginase
- **ASAT :** Aspartame aminotransférase
- **ASL** : Argininosuccinate lyase
- **ASS** : Argininosuccinate synthétase
- **BAEC**: Bovine Aortic Endothelial Cell
- **BH4** : Tétrahydrobioptérine
- **CAT** (1 ou 2) : Transporteur d'acides aminés cationiques
- **CAT** : Catalase
- **CDO** : Cystéine dioxygénase
- **cGMP / GMPc** : Cyclic guanosine monophosphate
- **C-LDL** : Cholestérol-HDL
- **CoA** : Co-enzyme A
- **COX** : Cyclooxygénases
- **CPS1** : Carbamoyl phosphate synthase 1
- **CRP** : C-Réactive Protéine
- **CSDC** : Cystéinesulfinate décarboxylase
- **DESIR** : Données Epidémiologiques sur le Syndrome d'Insulino-Résistance
- **DHA** : Acide docosahexaénoïque
- **DPA** : Acide docosapentaénoïque
- **DT2** : Diabète de type 2
- **EFSA** : Autorité européenne de sécurité des aliments
- **EGIR** : Group for the Study of Insulin Resistance
- **EPA** : Acide eicosapentaénoique
- **FAD** : Flavine-adénine dinucléotide
- **FMN**: Flavine mononucléotide
- **GC** : Guanylate cyclase
- **GPx** : Glutathion peroxydase
- **GR** : Glutathion réductase
- **GS** : Glutathion synthétase

- **GSH/GSSG** : Glutathion réduit/glutathion oxydé
- **HOMA** : Homeostasis Model assessment of Insulin Resistance
- **HUVEC** : Cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain
- **IDF :** International Diabetes Federation
- **IL-6** : Interleukine-6
- **INCA** : Etude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires
- **ISSFAL** : Société internationale pour l'étude des acides gras et des lipides
- **LA** : Acide linoléique
- **LDL** : Lipoprotéine de basse densité (low density lipoprotein)
- **L-NAME :** N(G)-nitro-L-arginine-méthyl ester
- **L-NNA** : N(G)-nitro-L-arginine
- **LOX** : Lipoxygénases
- **LT** : Leucotriènes
- **MCV** : Maladies cardiovasculaires
- **mTOR** : Cible de la rapamycine chez les mammifères, mammalian Target of Rapamycin
- **NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- **NCEP /ATP III** : National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III
- **NF-κB** : Nuclear factor-kappa B
- **NO** : Monoxyde d'azote
- **NO2** : Nitrites
- **NO3** : Nitrates
- **NOHA** : Nγ-hydroxy-L-Arginine
- **NOS** : Nitric oxide synthase
- **NOx** : Nitrates et nitrites
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **OTC** : Ornithine transcarbamylase
- **PG** : Prostaglandines
- **PGI** : Prostacyclines
- **PI3K** : Phosphoinositide 3-kinase
- **PL** : Phospholipides
- **PPAR** : Peroxisome proliferator activated receptor
- **PPRE** : PPAR-Response Element
- **ROS** : Espèces réactives de l'oxygène
- **RXR** : Récepteur de l'acide rétinoïque, retinoid X receptor
- **SHR** : Rat spontanément hypertendu (spontaneous hypertensive rat)
- **SOD** : Superoxyde dismutase
- **SREBP** : Sterol regulatory element- binding protein
- **SU.VI.MAX** : Etude de SUpplémentation en VItamines et Minéraux Anti-oXydants
- **SyndMet** : Syndrome métabolique
- **TBARs** : Thiobarbituric Acid Reactive Substances
- **TG** : Triglycérides
- **TLR4** : Toll-like receptor 4
- **TNBS**: 2,4,6-trinitrobenzè
- **TNF-α** : Facteur de Nécrose Tumorale alpha (Tumor Necrosis Factor alpha)

- **Tx** : Thromboxanes
- **VLDL** : Lipoprotéines de très faible densité (very low density lipoprotein)
- **γGCL** : γ-glutamylcystéine ligase

Liste des publications

Articles originaux:

Guelzim N, Mariotti F, Martin PG, Lasserre F, Pineau T et Hermier D : **A role for PPARalpha in the regulation of arginine metabolism and nitric oxide synthesis**. Amino Acids. 2011 Oct; 41(4):969-79. Epub 2010 Nov 10. PMID: 21063737

Guelzim N, Huneau JF, Mathé V, Quignard-Boulangé A, Martin PG , Tomé D et Hermier D : **Consequences of PPARα invalidation on glutathione synthesis : Interactions with dietary fatty**. PPAR Res. 2011; 2011:256186. Epub 2011 Sep 12. PMID: 21915176

Posters et résumés publiés:

Guelzim N , Mariotti F , Lasserre F , Mathé V , Azzout D , Pineau T , Huneau JF et Hermier D : **Regulation of arginine metabolism by dietary fatty acids. Involvement of PPARα.**
Résumé publié dans « The Proceedings of the Nutrition Society », sous la référence : Proc Nutr Soc. 2008 May; 67(OCE):E203
Poster présenté au 3éme congrès de la Société Française de Nutrition tenu à Lille les 6 et 7 décembre 2007.

Guelzim N , Mariotti F , Lasserre F , Mathé V , Azzout D , Pineau T , Huneau JF et Hermier D : **Regulation of arginine metabolism by dietary fatty acids. Involvement of PPARα**
Résumé publié dans « The FASEB Journal » sous la référence : FASEB J 2008; 22:1093.7.
Poster présenté au congrès de la Fédération des Sociétés Américaines de Biologie Expérimentale tenu à San Diego (Californie) du 5 au 9 avril 2008.

Guelzim N, Huneau JF, Tomé D et Hermier D: **Role of PPARα in the regulation of glutathione metabolism**.
Résumé publié Résumé publié dans « The FASEB Journal » sous la référence : FASEB J April 6, 2010 24:997.4.
Poster présenté au congrès de la Fédération des Sociétés Américaines de Biologie Expérimentale tenu à Anaheim (Californie) du 24 au 28 avril 2010.

Guelzim N, Mariotti F et Hermier D: **Effect of a diet rich in α-linolenic acid on arginine secondary metabolism**
Résumé et poster présenté aux Journées Chevreul 2011 - LIPIDS & BRAIN 2, du 28 au 30 mars 2011 à Paris.

Guelzim N, Mariotti F et Hermier D: **Effect of a diet rich in α-linolenic acid on nitric oxide synthesis**
Résumé et poster accepté au 11ème congrès de la FENS (**Federation of European Nutrition Societies)** tenu à Madrid du 26 au 29 octobre 2011.

Introduction générale

Introduction générale

Il est admis que les apports en acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) sont insuffisants par rapport aux ANC (Apports Nutritionnels Conseillés) pour la population française (Afssa 2010). Devant ce constat, la diversité de l'alimentation et la recherche d'un maximum de sources d'AGPI n-3 sont nécessaires pour le rééquilibrage des apports. L'acide α-linolénique ALA, en tant que chef de file de cette famille d'acides gras, présente, dans ce cadre, un intérêt potentiel en santé publique, puisqu'il pourrait faciliter en partie, la couverture des besoins en AGPI n-3 de par sa disponibilité et son coût inférieur aux autres sources d'AGPI n-3.

L'intérêt porté à la famille des AGPI n-3 repose sur ses propriétés protectrices vis-à-vis d'une vaste gamme de dysfonctions, dont les composantes du syndrome métabolique, une constellation de facteurs de risques désormais considéré comme l'un des plus importants problèmes de santé publique de notre époque (Carpentier et al. 2006; Poudyal et al. 2011). En effet, la qualité de l'alimentation et la nature des acides gras composant le régime, sont des éléments essentiels dans la prévention et la prise en charge de ce syndrome (Dalle Grave et al. 2010). Constatant que la plupart de la littérature sur le sujet s'intéresse essentiellement aux effets des dérivés AGPI n-3 à longue chaîne (EPA et DHA) sur les facteurs de risque associés au syndrome métabolique, il convient de formuler plus de questions de recherche en nutrition sur les effets de l'ALA, afin de mettre en évidence ses éventuels qualités bénéfiques et de préciser les phénomènes physiologiques qui les impliquent.

L'action des AGPI n-3 sur la physiopathologie du syndrome métabolique résulte d'une synergie entre de multiples mécanismes complexes. En effet, au-delà de leurs effets bénéfiques bien décrits sur l'homéostasie lipidique ou sur l'insulinorésistance, les AGPI n-3 amélioreraient aussi l'état inflammatoire, la fonction endothéliale ou encore l'état de stress oxydant, ces désordres étant impliqués de prés dans la genèse et la progression du syndrome métabolique. Les AGPI n-3 pourraient ainsi moduler l'homéostasie de métabolites bioactifs possédant des propriétés physiologique leurs permettant de jouer des rôles biologiques majeurs, notamment, le monoxyde d'azote (NO) et le glutathion, impliqués dans le maintien de la fonction endothéliale et du statut oxydant. L'arginine et la cystéine sont respectivement les précurseurs du NO et du glutathion, ce qui laisse supposer que les AGPI n-3 affecteraient le métabolisme secondaire de ces acides aminés. Même si la littérature sur le sujet reste limitée, quelques données bibliographiques suggèrent que le PPARα, un des principaux facteurs de transcription qui relaie les effets des AGPI n-3 au niveau cellulaire, régulerait le

métabolisme des acides aminés au même titre que celui des lipides et des glucides (Sheikh et al. 2007)**.** Les AGPI n-3, en tant que ligands naturels du PPARα, pourraient donc potentiellement moduler les voies du métabolisme des acides aminés et de leurs dérivés via ce facteur de transcription.

Notre hypothèse de départ a donc été qu'une modulation du métabolisme secondaire de l'arginine et de la cystéine par l'ALA affecterait l'homéostasie du NO et du glutathion et pourrait ainsi avoir des conséquences au niveau des fonctions biologiques impliquant ces dérivés bioactifs dans la physiopathologie du syndrome métabolique. L'hypothèse secondaire était que l'ALA pouvait exercer ces effets via la voie de régulation génique par le PPARα.

Lors de ce travail nous avons donc essayé de répondre aux interrogations suivantes :

- L'ALA affecte-t-il le métabolisme secondaire des acides aminés, et principalement celui de l'arginine et la cystéine ?
- Quels seraient les mécanismes mis en jeu dans ces régulations; le PPARα y est-il impliqué ?
- Ces modulations auraient-elles des conséquences fonctionnelles pouvant affecter la physiopathologie du syndrome métabolique ?

***

La première partie de ce manuscrit de thèse consiste en une synthèse bibliographique permettant de faire le bilan des connaissances actuelles sur le sujet. Les trois premiers chapitres de cette étude bibliographique devront permettre de justifier l'intérêt porté dans ce travail au syndrome métabolique, aux AGPI n-3 et aux acides aminés. Les deux derniers chapitres de la synthèse bibliographique présenteront les études sur les quelles nous avons basé nos hypothèses, d'abord les données décrivant le rôle du PPARα dans la régulation du métabolisme secondaire des acides aminés et ensuite celles décrivant l'impact des AGPI n-3 sur la régulation du métabolisme secondaire de l'arginine et de la cystéine.

La seconde partie de ce travail présentera les travaux expérimentaux réalisés au cours de cette thèse. Les travaux publiés seront présentés sous formes d'articles en anglais précédés d'une introduction et suivies d'une synthèse des principaux résultats obtenus, les travaux qui ne sont pas encore publiés seront présentés entirement en français.

Enfin l'ensemble des travaux sera discuté dans une dernière partie, dans laquelle seront exposées les conclusions et les perspectives.

Etude bibliographique

Chapitre 1 : Etude bibliographique

I. Le syndrome métabolique

1. Définitions du syndrome métabolique

Bien que le terme de syndrome métabolique (SyndMet) ne soit devenu largement utilisé que depuis son introduction en 2001 par le « National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III » (NCEP/ATP III) (2001), le concept de regroupement d'anomalies existe depuis plusieurs décennies. Dès le début des années 1920, le Dr Kylin a montré une relation entre l'hypertension, l'hyperglycémie et la goutte. En 1980 Albrink et coll. associent l'obésité à l'hypertriglycéridémie et à l'hypertension (Albrink et al. 1980). En 1988, Reaven propose d'individualiser en syndrome, l'association de troubles du métabolisme des glucides et de l'insuline, de l'hypertension artérielle, de l'hypertriglycéridémie et des niveaux bas de cholestérol-HDL. Il suggère que ces anomalies coexistent chez un individu de façon non aléatoire, et qu'elles sont impliquées dans l'initiation et la progression des maladies cardiovasculaires (MCV) et du diabète de type 2 (DT2) (Reaven 1988).

Depuis, le SyndMet a vu ses définitions évoluer et se multiplier selon les objectifs des différents organismes qui se sont penchés sur la question. On distingue deux approches : une approche clinique ayant pour objectif de fournir des critères aisément utilisables en pratique afin de faciliter le diagnostic du SyndMet chez les patients, en l'occurrence celles du NCEP/ATP III et de la Fédération International du Diabète (IDF), et une approche basée sur des critères plus physiologiques, comme celles de l'organisation mondiale de la santé (OMS) et du Groupe pour l'Etude de l'InsulinoRésistance (EGIR).

Un consensus a été proposé en 2009 par de nombreuses organisations scientifiques internationales, considérant le SyndMet comme un problème complexe multifactoriel de santé, incluant l'insulinorésistance/l'hyperinsulinémie, les troubles de tolérance au glucose, l'hypertension artérielle, la dyslipidémie caractérisée par une élévation des triglycérides et un taux bas de cholestérol-HDL, associés à une obésité abdominale évaluée par le tour de taille (Alberti et al. 2009). Cependant, bien que les principaux paramètres sur lesquels reposent les définitions du SyndMet soient similaires, elles diffèrent considérablement pour ce qui est des valeurs-cibles de chacun (Tableau 1).

2. Prévalence du syndrome métabolique

La prévalence du SyndMet dépend de la définition utilisée lors de l'inclusion mais aussi des différences de composition dans les populations étudiées (selon le sexe, l'âge ou encore l'ethnie). Il n'existe donc pas de chiffres de prévalence mondiaux pour le SyndMet. Néanmoins, indépendamment des différences de définitions et de critères, il est à ce jour clairement établi que la prévalence du SyndMet s'accroît dans le monde. Cette augmentation constante est étroitement liée à la progression de l'obésité, posant ainsi de sérieux problèmes de santé publique puisqu'elle représente un fardeau socio-économique pour les systèmes de santé. Aux Etats-Unis, le SyndMet concerne globalement 25 à 30 % de la population adulte (Ford et al. 2004). L'Europe n'est pas épargnée par cette épidémie (Tableau 2). En France, l'étude de Dallongeville a rapporté en 2005, selon les critères du NCEP/ATP III, une prévalence de 23 % chez les hommes et de 17 % chez les femmes ayant un âge compris entre 35 et 64 ans (Dallongeville et al. 2005). En 2006, la même équipe, et toujours selon les mêmes critères, rapporte un chiffre de 30 % chez des hommes français âgés de 50 à 59 ans (Bataille et al. 2006). L'étude française "DESIR" a retrouvé des chiffres moins élevés avec une prévalence de 11 % chez les hommes et 8 % chez les femmes entre 30 et 64 ans (Hillier et al. 2006).

3. Le syndrome métabolique, un complexe de facteurs de risque

Cliniquement parlant, la valeur prédictive du SyndMet en tant que complexe de facteurs de risque prédisposant à la survenue de MCV et du DT2 semble être étroitement liée à la définition utilisée pour sélectionner les patients. Néanmoins, il est établi que sa présence accroît le risque de survenue de MCV et de DT2. Plusieurs études prospectives, dont une récente méta-analyse regroupant 87 études publiées, concluent que la présence du SyndMet est associée à un risque significativement accru de maladies cardiovasculaires (x 2,35), de mortalité de toutes causes (x 1,58) d'infarctus du myocarde (x 1,99) et d'accident vasculaire cérébral (x 2,27), avec un risque comparable que les patients soient atteints ou pas de DT2 (Mottillo et al. 2010). De plus, le risque de survenue de DT2 est 4 fois plus élevé chez les patients atteints de SyndMet (Ford et al. 2008). Outre le DT2 et les MCV, les facteurs de risque du SyndMet sont aussi associés à la survenue d'autres maladies, telles que les maladies hépatiques et le cancer, néanmoins les connaissances actuelles sont encore limitées et ne permettent pas d'éclaircir complètement les mécanismes métabolique sous-jacents.

4. Physiopathologie du syndrome métabolique

L'étiologie du SyndMet est complexe et multifactorielle. Bien que la littérature scientifique sur le sujet soit abondante et croissante, il n'y a pas actuellement d'arguments décisifs en faveur d'une cause unique responsable de l'ensemble des anomalies. La nature exacte des interactions entre les diverses composantes du SyndMet, ainsi que leur ordre d'importance et d'apparition, demeurent mal compris (Eckel et al. 2010). L'état actuel des connaissances suggère néanmoins que la résistance à l'insuline (Reaven 1988) et l'obésité (Carr et al. 2004) joueraient toutes deux un rôle prépondérant dans le développement des complications observées chez les individus atteints du SyndMet. L'hypothèse la plus universellement acceptée est le développement d'une insulinorésistance dans les tissus sensibles tels que le foie et le muscle, en raison de l'excès d'acides gras libres circulants provoqué par l'obésité. En effet, l'accumulation du tissu adipeux viscéral est associée à des troubles du métabolisme lipidique. Le tissu adipeux viscéral constituant un site d'activité lipolytique particulièrement intense, la présence d'une obésité viscérale va donc de pair avec des concentrations plasmatiques accrues d'acides gras libres (Bjorntorp 1990; Arner 2001; Jensen 2008). De plus, la recapture et le stockage d'acides gras libres au niveau hépatique entretiennent l'évolution du SyndMet en favorisant la résistance périphérique à l'insuline, la production de lipoprotéines de très faible densité (VLDL) fortement athérogénes (Lewis et al. 2002) Dans le muscle, ce surplus d'acides gras libres contribue à inhiber la captation et l'oxydation du glucose, ce qui entraîne une hyperglycémie, une hyperinsulinémie compensatoire puis une insulinorésistance (Kelley & Goodpaster 2001) (Figure 1).

Au-delà de son rôle dans le stockage des lipides, le tissu adipeux est un organe endocrine et paracrine qui secrète de nombreuses protéines dites adipokines. Ces adipokines affectent le système inflammatoire (interleukine-6 -IL-6-, adiponectine et TNF-α), la pression sanguine (angiotensinogène), ou encore la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique (leptine). Elles peuvent donc participer à l'induction de la résistance à l'insuline, de l'inflammation et de la dyslipidémie, associées au développement du SyndMet (Rajala & Scherer 2003).

L'élévation de la pression artérielle retrouvée chez les patients atteints de SyndMet semble être la résultante de plusieurs phénomènes. L'obésité serait impliquée dans l'étiologie de l'hypertension par des mécanismes affectant la vasoconstriction, notamment via une libération accrue d'angiotensinogène (Nielsen et al. 2004; Velarde & Berk 2005). L'insulinorésistance peut aussi induire une hypertension artérielle par différents mécanismes affectant la

réabsorption du sodium (Semplicini et al. 1994; Sarafidis & Bakris 2007) ou inhibant l'effet vasodilatateur du monoxyde d'azote (NO) (Higashi et al. 2001; Gallagher et al. 2010).

En plus de ces composantes classiques, d'autres désordres pathologiques non inclus dans les définitions ont été identifiés plus récemment chez les sujets présentant un SyndMet.

Parmi ces troubles, nous nous sommes intéressés particulièrement à la dysfonction endothéliale et au stress oxydant : il paraît donc important de comprendre le lien entre ces anomalies et le SyndMet.

5. La dysfonction endothéliale associée au SyndMet

L'endothélium, cette couche cellulaire à l'interface entre le sang et la paroi vasculaire, est considérée de nos jours comme un organe à part entière, et joue un rôle essentiel et central dans le maintien de l'homéostasie vasculaire (Landmesser et al. 2004). A l'état normal, l'endothélium favorise la vasodilatation, empêche les phénomènes de coagulation et limite le passage d'éléments circulants vers le sous-endothélium. Parallèlement, on décrit un état de dysfonctionnement endothélial, au cours duquel les cellules endothéliales favorisent à différents degrés la vasoconstriction, les phénomènes de coagulation et le recrutement actif de cellules inflammatoires circulantes (Triggle et al. 2003). Cette altération des fonctions endothéliales est l'anomalie la plus précoce de l'atteinte vasculaire et participe activement à l'initiation et à la progression de l'athérosclérose associée au SyndMet. Un état de dysfonction endothéliale est diagnostiqué de façon précoce chez les patients atteints de SyndMet. En effet, l'ensemble des composantes du SyndMet participe mutuellement à l'altération des fonctions endothéliales. L'accumulation du tissu adipeux viscéral joue un rôle délétère sur la fonction endothéliale (Tesauro & Cardillo 2011) par exemple, en raison de la diminution des concentrations plasmatiques d'adiponectine, hormone qui possède des effets favorables sur l'ensemble de la paroi vasculaire, tant sur l'inflammation que sur la prolifération cellulaire (Del Turco et al. 2011). Une dysfonction endothéliale est également détectée de façon très précoce associée à l'insulinorésistance, en partie en raison de l'inhibition des effets vasodilatateurs de l'insuline (activation de la voie NO/cGMP/PKG) en faveur de ses effets vasoconstricteurs (production de l'endothéline-1) (Anfossi et al. 2009). L'hypercholestérolémie participe aussi à la genèse de la dysfonction endothéliale. Le dépôt de cholestérol dans les couches sous-endothéliales induit un état inflammatoire avec l'intervention de macrophages, le recrutement de cellules lymphocytaires et l'oxydation des LDL. Cet état inflammatoire conduit à une diminution de la biosynthèse et à une inactivation

du NO (Stokes et al. 2002). L'hyperglycémie altère directement la fonction endothéliale, en induisant l'apoptose des cellules endothéliales, en diminuant leur prolifération, en augmentant leur perméabilité et en diminuant la biodisponibilité du NO (Han et al. 2007). Enfin l'élévation chronique de la pression artérielle est souvent associée à une diminution de la vasorelaxation endothélium-dépendante. Chez les sujets hypertendus, la dysfonction endothéliale semble être principalement due à une anomalie de la biodisponibilité du NO, mais pourrait aussi être secondaire à une libération accrue de facteurs vasoconstricteurs, tels que les radicaux libres (Landmesser & Drexler 2007).

6. Stress oxydant associé au SyndMet

Le stress oxydant apparaît dans une cellule quand l'équilibre entre les espèces pro-oxydantes et anti-oxydantes est rompu en faveur de l'état pro-oxydant (Sies 1991). Dans les systèmes vivants, une production physiologique d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) se fait de manière continue. Dans des conditions pathologiques ou provoquées par des facteurs exogènes, une surproduction de ces espèces réactives est possible. Les défenses antioxydantes peuvent alors être insuffisantes pour empêcher les dégâts cellulaires que peuvent causer les radicaux libres oxygénés, ce qui génère un stress oxydant.

Le stress oxydant est décrit comme un mécanisme important dans la physiopathologie de l'obésité et du SyndMet (Furukawa et al. 2004). En effet, une forte association est retrouvée entre le diagnostic d'un SyndMet et l'état de stress oxydant (Hopps et al. 2010). De plus, les marqueurs du stress oxydant, tels que les TBARs, sont augmentés chez les patients présentant un SyndMet (figure 2) (Grattagliano et al. 2008). En effet, les composantes du SyndMet sont caractérisées par une surproduction de ROS. L'obésité abdominale, les désordres du métabolisme lipidique, tels que l'accumulation des lipides au niveau hépatique ainsi que l'insulinorésistance qui en résulte, mais aussi l'hyperglycémie, activent la génération de ROS par différentes sources (cytochromes, mitochondries et peroxysomes). Divers mécanismes sont avancés pour expliquer cette surproduction de ROS, parmi lesquels l'excès de peroxydation lipidique, l'oxydation des LDL, la surexpression de la NADPH oxydase. En parallèle, les défenses anti-oxydantes sont significativement abaissées chez les patients atteints de SyndMet, aggravant ainsi l'état de stress oxydant (Ford et al. 2003). A titre d'exemple, les concentration plasmatiques des vitamines C et E (alpha tocophérol), qui participent aux défenses anti-oxydantes non-enzymatiques de l'organisme, sont abaissées significativement en présence de SyndMet (figure 3) (Grattagliano et al. 2008). Ce stress oxydant entraîne des dommages cellulaires et vasculaires favorisant l'installation de

l'insulinorésistance, de la dysfonction endothéliale et de l'inflammation (Di Renzo et al. 2010). Il participe ainsi de façon critique au développement et à la progression des maladies cardiovasculaires et du DT2 (Musaad & Haynes 2007; Pitocco et al. 2010).

***

En conclusion, la physiopathologie du SyndMet est régie par des phénomènes complexes interagissant entre eux et dépendant les uns des autres. L'état de la connaissance actuelle ne permet pas encore de les hiérarchiser complètement. Les dysfonctions telles que le stress oxydant et la dysfonction endothéliale pouvant contribuer à différentes échelles aux mécanismes physiopathologiques associés au SyndMet, représentent de nouveaux mécanismes-cibles pour la compréhension des processus régissant ce syndrome, et permettant ainsi de développer de nouvelles stratégies pour sa prise en charge.

7. Rôle de l'alimentation dans la prise en charge du SyndMet

Il est clairement établi qu'une perte de poids modérée représentant 5 à 10 % du poids initial et obtenu par une diminution de l'apport énergétique total quotidien ou/et par une activité physique suffisante, améliore nettement toutes les composantes du SyndMet (Phelan et al. 2007; Dalle Grave et al. 2010). Plus spécifiquement, la perte de poids a été associée à une diminution des concentrations plasmatiques de triglycérides (TG) et à une augmentation des concentrations plasmatiques de cholestérol-HDL, ainsi qu'à une augmentation de la taille des particules LDL (Dattilo & Kris-Etherton 1992; Poobalan et al. 2004). Une perte de poids >10% du poids initial est généralement associée à une amélioration du profil inflammatoire avec principalement une diminution des concentrations plasmatiques de CRP (C-Réactive Protéine) (Nicklas et al. 2004; Dietrich & Jialal 2005). De plus, chez les patients hypertendus, une diminution significative de la pression artérielle a été observée suite à une perte de poids modérée (Stevens et al. 2001). Enfin, la perte de poids améliore la glycémie à jeun et l'insulinémie chez les patients diabétiques (Kelley et al. 1993). L'atteinte d'un équilibre énergétique optimal ou la perte de poids due à une restriction calorique restent donc sans contredit des éléments primordiaux à considérer pour traiter le SyndMet. Or, de nombreuses études indiquent qu'autant d'attention mériterait d'être portée aux interventions nutritionnelles, prenant en compte la composition des régimes alimentaires en macronutriments, leurs proportions ainsi que leur qualité, tant pour améliorer les désordres liés au SyndMet que pour diriger les efforts vers la prévention.

Des types spécifiques d'alimentation ou des groupes d'aliments ont été associés à la présence du SyndMet. A titre d'exemple, la consommation de produits céréaliers raffinés, d'alcool, de

pâtisseries et de sucreries a été associée aux diverses composantes du SyndMet et ce, indépendamment des changements de poids corporel (Wirfalt et al. 2001). En revanche, la consommation de glucides complexes, de fibres alimentaires, de légumes, de fruits, de produits laitiers a été associée à une faible incidence du SyndMet (Reaven 2000; Davy & Melby 2003). De même, certains types de régimes et d'habitudes alimentaires sont considérés comme « anti-syndrome métabolique ». À titre d'exemple, un nombre croissant de scientifiques s'accordent pour recommander l'adoption d'un régime de type méditerranéen pour traiter de façon optimale l'apparition de maladies coronariennes (Bautista & Engler 2005), mais aussi du SyndMet (Babio et al. 2009).

La majorité des recherches sur ce sujet proviennent d'études épidémiologiques d'observation ou d'études cliniques. Mais, afin de mieux comprendre les effets bénéfiques potentiels de certains groupes d'aliments ou de régimes alimentaires, des questions de recherche ont été soulevées et étudiées quant aux mécanismes physiologiques mis en jeu et aux rôles particuliers de chaque nutriment et micronutriment.

Dans ce contexte, un intérêt à été porté aux lipides alimentaires, de par leur abondance dans l'alimentation des pays industrialisés présentant de fortes incidences du SyndMet, mais aussi de par leurs rôles physiologiques importants. Les études épidémiologiques et d'intervention ont mis en évidence une association entre les types d'acides gras consommés (saturés, polyinsaturés, moninsaturés ou trans) et la physiopathologie du SyndMet. Riccardi et al. (2004) soulignent que, pour les individus atteints de SyndMet, l'apport quantitatif en lipides est un facteur moins important que la composition en acides gras. A titre d'exemple, l'effet délétère de l'acide palmitique et des acides gras trans est bien établie. Par contre, un régime riche en acides gras monoinsatursés aurait des effets favorables sur le profil lipidique, notamment sur le taux de cholestérol total et LDL (Riccardi et al. 2004).

***

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux acides gras polyinsaturés et particulièrement à ceux de la famille des n-3, qui sont décrits pour avoir des effets bénéfiques, rapportés par de nombreuses études épidémiologiques et expérimentales.

Le chapitre suivant a pour objectifs principaux de justifier l'intérêt porté à cette famille d'acides gras et de mettre en évidence son implication physiopathologique en relation avec le SyndMet.

II. Rôle physiopathologique des AGPI n-3

1. Biochimie et nomenclature des acides gras

1.1. Biochimie des AG

Les acides gras (CH3-(CH2)n-COOH) sont les composés de base des lipides. Ce sont des molécules organiques composées de deux parties : une partie hydrophobe représentée par une chaîne carbonée terminée par un groupe méthyle et une partie hydrophile correspondant à un groupe carboxyle (figure 4).

Leur classification est basée sur plusieurs critères; ceux que nous allons utiliser sont :

1) La longueur de la chaîne carbonée : moins de 10 carbones, on parle d'acides gras à chaîne courte, entre 12 et 14 carbones, d'acides gras à chaîne moyenne et au-delà de 16 carbones, d'acides gras à longue chaîne.
2) Le nombre d'insaturations (doubles liaisons éthyléniques entre deux carbones) : les acides gras ne comportant pas de double liaison sont appelés acides gras saturés, ceux possédant une double liaison sont dits monoinsaturés et ceux ayant plus d'une double liaison sont les acides gras polyinsaturés (AGPI). A l'état naturel, on trouve entre 0 et 6 insaturations. Elles sont, dans leur très grande majorité, distantes de trois atomes de carbones.

1.2. Nomenclature des AG

La règle de nomenclature la plus utilisée fait référence au nombre de carbones (n), au nombre de doubles liaisons (x) et à la position de la première double liaison à partir du groupement méthyle terminal (n-y), qui est choisi comme le 1. La formule simplifiée est notée **Cn : x n-y.** A titre d'exemple : l'acide 9,12,15-octadécatriènoïque est noté 18:3 n-3 et l'acide 9,12-octadécadiènoïque est noté 18:2 n-6 (figure 5). Cependant, il est souvent préféré à ce nom systématique un nom commun, choisi afin de rappeler la provenance de l'acide gras. Par exemple l'acide 9,12,15-octadécatriènoïque (18:3 n-3) est appelé acide α-linolénique (ALA) en raison de son abondance dans l'huile de lin.

Parmi les AGPI, on distingue 4 familles en fonction de la position de la première insaturation par rapport à l'atome de carbone de l'extrémité méthyle (carbone oméga): n-9 (oméga 9), n-7 (oméga 7), n-6 (oméga 6) et n-3 (oméga 3). Notre travail porte particulièrement sur les acides gras n-3; néanmoins, quelques informations seront données dans ce chapitre concernant la famille des n-6, étant donné les voies métaboliques communes entre ces deux groupes d'acides gras.

2. Les AGPI n-6 et n-3

2.1. Métabolisme des AGPI n-6 et n-3

Les AGPI de la famille des n-6 et n-3 dérivent de l'acide stéarique (18 : 0). A partir de l'acide stéarique est synthétisé l'acide oléique (18 :1 n-9) qui peut être converti en acide linoléique (C18 : 2 n-6, LA) puis en acide α-linolénique (C18 : 3 n-3, ALA). Le LA et l'ALA sont les précurseurs de chaînes de réactions de désaturation et d'élongation le long desquelles sont formés les AGPI dits à longue chaîne (AGPI-LC) (figure 6). Ces réactions ont lieu en parallèle, essentiellement dans le foie. Les enzymes qui catalysent ces réactions sont identiques pour les deux familles d'acides gras, ce qui leur confère la particularité d'être en compétition sur le plan métabolique (pour revue (Das 2006) et (Legrand 2007)).

La conversion de l'ALA en AGPI-LC débute par l'introduction d'une double liaison en position 6 à partir du groupement méthyle (Δ6-désaturation), suivie d'une élongation de la chaîne de deux unités carbonées, puis d'une Δ5-désaturation pour aboutir à l'acide eicosapentaénoique (C20:5 n-3, EPA). L'élongation suivante permet de synthétiser l'acide docosapentaénoique (C22:5 n-3, DPA). Enfin, une dernière élongation, suivie d'une Δ6-désaturation et de la perte de deux unités carbonées par β-oxydation, aboutissent à la synthèse de l'acide docosahexaénoïque (C22:6 n-3, DHA) (figure 6).

La voie de conversion en AGPI-LC semble être une voie minoritaire d'utilisation de l'ALA, par rapport à la voie d'oxydation qui représente environ 75 % chez l'homme et 60 % chez l'animal (Brenna 2002). Néanmoins, du fait de l'importance physiologique et des implications physiopathologiques des AGPI-LC, de nombreuses études se sont intéressées à ce processus de conversion et à son efficacité. Le taux de conversion de l'ALA en dérivés à longue chaîne est typiquement évalué par la mesure des taux nets circulants d'EPA et de DHA après une modification des apports en ALA. Globalement, la littérature s'accorde sur la faible efficacité de ce processus de conversion. Les études indiquent que l'augmentation de l'apport en ALA augmente de façon modérée les niveaux circulants d'EPA alors que les niveaux de DHA restent stables (Chan et al. 1993; Emken et al. 1994). Chez les adultes sains, les études montrent que 5 à 10 % et 2 à 5 % d'ALA sont convertis respectivement en EPA et en DHA (Wijendran & Hayes 2004), tandis que d'autres suggèrent que ce taux est inférieur à 5 % pour les deux AGPI-LC (Brenna 2002). Plus récemment, en 2009, la Société Internationale pour l'Etude des Acides gras et des Lipides (ISSFAL) a publié une déclaration officielle sur l'efficacité de conversion de l'ALA en DHA. Elle conclut que cette conversion est de l'ordre de 1 % chez les enfants en bas âge et qu'elle serait encore plus faible chez l'adulte, elle serait

aussi plus efficace chez la femme que chez l'homme (Brenna et al. 2009). Chez les rongeurs, la conversion semble être plus efficace. A titre d'exemple, l'utilisation de méthode de traceurs chez le rat en croissance a démontré que le taux de conversion de l'ALA en AGPI-LC atteint 17 % (Poumes-Ballihaut et al. 2001).

2.2. L'essentialité des familles d'AGPI n-6 et n-3

Les familles d'AGPI n-6 et n-3 sont dites « essentielles ». Ce caractère a été mis en évidence chez l'homme et l'animal après l'observation de maladies provoquées par des régimes totalement dépourvus ou carencés en ces acides gras. A titre d'exemple, dans les années 1980 des recherches ont montré qu'une carence prolongée du régime en acide α-linolénique (C18 : 3 n-3, ALA), portant sur plusieurs générations, occasionne des troubles de la vision et du fonctionnement cérébral chez le rat (Tinoco 1982). De nombreux travaux ont ensuite montré l'implication de ces acides gras n-3 dans la structure et le développement du système nerveux de l'homme au cours de la croissance et du vieillissement (Tinoco 1982; Bourre 2004).

Le terme « d'acides gras indispensables » est utilisé pour :

- les deux précurseurs, le LA et l'ALA, car ils sont indispensables pour la croissance normale et les fonctions physiologiques de tous les tissus, mais non synthétisables par l'homme et l'animal. En effet, certains complexes enzymatiques nécessaires aux réactions de synthèse de ces acides gras ne sont pas présents chez les animaux. C'est le cas de certaines désaturases, qui introduisent de manière spécifique les doubles liaisons dans la chaine carbonée, et qui ne sont présentes que chez les végétaux, comme les Δ12- et Δ15-désaturases (figure 6).
- Le DHA, du fait des faibles taux de conversion à partir de l'ALA, et aussi de par son importance physiologique (Legrand 2007).

2.3. Origine alimentaire des AGPI n-3 et n-6

Les sources alimentaires d'AGPI n-3 sont différentes, selon qu'il s'agisse du précurseur, l'ALA ou des dérivés à longue chaîne, EPA et DHA. L'ALA est présent majoritairement dans les huiles végétales, telles que l'huile de lin, où il représente 60 à 70 % des acides gras totaux. Il est aussi présent à des taux plus faibles (7 à 14 %) dans les huiles de colza, de soja ou de noix. Les lipides des végétaux chlorophylliens sont riches en ALA (50 % des acides gras), mais ces lipides sont peu abondants dans les plantes (0,5 %). Les lipides d'origine animale contiennent moins de 2 % d'ALA, par rapport aux acides gras totaux, mais la teneur des produits animaux en ALA peut varier selon les apports de cet acide gras dans l'alimentation animale. L'EPA et le DHA se trouvent essentiellement dans les poissons, en particulier dans

les poissons gras tels que le saumon, le maquereau, le hareng ou le thon. Les poissons, comme tous les animaux, ne peuvent pas synthétiser *de novo* les AGPI n-3, l'ALA est donc apporté par leur alimentation, basée sur le phytoplancton ou sur les autres poissons.

Les AGPI n-6 sont beaucoup plus répandus dans l'alimentation des pays industrialisés que les AGPI n-3. Le LA est contenu en grande quantité dans les huiles végétales de consommation courante telles que les huiles de tournesol, de maïs ou d'arachide, mais aussi en faibles quantités dans les produits animaux (viande et œufs).

2.4. Besoin, consommation et recommandation nutritionnelles pour les AGPI n-6 et n-3

Le besoin physiologique minimal en ALA est estimé à 0,8 % de l'apport énergétique (AE) pour l'adulte, ce qui équivaut à 1,8 g/j pour un AE de 2000 Kcal/j (tableau 3). Compte-tenu de données favorables déduites de nombreuses études épidémiologiques d'observation dans le domaine cardiovasculaire, l'ANC a été réévalué par l'Afssa (actuelle ANSES) depuis 2010 à 1 % de l'AE, c'est-à-dire environ 2,2 g/j (Afssa 2010). L'apport moyen en ALA dans la population française est très faible : environ 0,1 % de l'AE total dans l'étude INCA (sujets > 15 ans) (Afssa 2009) et 0,4 % dans l'étude SU.VI.MAX (adultes âgés de 35 à 60 ans) (Astorg et al. 2004). Cette insuffisance d'apport en ALA avait déjà été rapportée par d'autres travaux dans les années 2000, notamment dans l'étude Transfair (étude européenne multicentrique) (Hulshof et al. 1999) et l'étude d'Aquitaine (femmes âgées de 18 à 50 ans) (Combe N 2001). Il est intéressant de souligner que la consommation des huiles végétales riches en ALA reste faible dans la population française, dans laquelle les apports en ALA sont principalement couverts par des produit animaux, notamment par les produit laitiers (figure 7) (Combe N 2001).

Concernant le DHA, les données relatives à son importance physiologique et à sa très faible conversion à partir de l'ALA, ont conduit à le considérer comme indispensable et à fixer le besoin physiologique minimal et l'ANC pour le DHA à 250 mg/j pour un adulte, valeur 2 fois plus élevée que celle suggérée en 2001 (Coord.A 2001). Pour l'EPA, les arguments actuels sont insuffisants pour le considérer comme rigoureusement indispensable et définir un besoin physiologique minimal. En effet, la conversion de l'ALA en EPA est significative dès lors que les apports en ALA et en LA sont suffisants. Néanmoins, un ANC a été défini pour l'EPA à 250 mg/j sur la base de données de prévention. L'estimation de la consommation des AGPI-LC n-3 (EPA et DHA) est principalement évaluée par la consommation de poisson. Selon les données de l'enquête INCA2, les niveaux des apports en EPA et DHA sont bien inférieurs à

l'ANC (tableau 4) (Afssa 2009). De plus, une stagnation des consommations de poisson est observée depuis 1998 (Afssa 2009). Globalement, la consommation en AGPI n-3 reste donc insuffisante dans la population française. Selon l'Afssa, une politique visant à accroître le niveau des apports en AGPI n-3 est souhaitable.

L'ALA en tant que précurseur pourrait participer à améliorer l'apport alimentaire en AGPI n-3, d'autant plus que les sources alimentaires d'ALA sont variées et surtout abondantes, tandis que les ressources marines sont moins disponibles et plus facilement épuisables. L'augmentation de la consommation de produits naturellement riches en ALA, tels que les graines ou les huiles végétales, est une des stratégies possibles pour accroître les apports en ALA; une autre possibilité est l'augmentation des sources d'ALA dans l'alimentation animale, par exemple sous forme de graine de lin (figure 8). Ce contexte socio-économique justifie en partie l'intérêt porté à cet acide gras dans le cadre de ce travail de thèse. En effet, la détermination et la compréhension des effets potentiels de l'ALA, encore peu étudiés par rapport aux dérivés à longue chaîne, semble être indispensable.

Le besoin physiologique minimal en acide linoléique (LA) est estimé à 2 % de l'AE, ce qui équivaut à 4,4 g/j pour un apport énergétique de 2000 Kcal/j. L'Afssa a établi l'ANC à 4 % de l'AE. Cette valeur résulte à la fois du souci d'atteindre un apport total d'AGPI favorable à la prévention cardiovasculaire, et de limiter les apports en LA pour respecter un rapport acide linoléique/acide α-linolénique inférieur à 5. En effet, les produits intermédiaires et finaux des deux familles d'AGPI n-6 et n-3 ont des effets différents, voire antagonistes. Cela signifie que toute modification du rapport entre les précurseurs de ces deux voies (ALA et LA) aura des conséquences au niveau métabolique. De plus, le déséquilibre de ce rapport est préjudiciable à la synthèse, à la disponibilité et à l'incorporation des AGPI n-3 à longue chaîne dans les tissus, ce qui pourrait accentuer des perturbations physiologiques et contribuer à la survenue de pathologies (Afssa 2010).

2.5. Fonctions biochimiques et rôles physiologiques des AGPI n-6 et n-3

Les acides gras sont une source majeure d'énergie pour l'organisme. Leur oxydation fournit plus d'énergie (9 kcal/g) que l'oxydation des protéines et des glucides (4 kcal/g). Mais les AGPI en particulier la famille des n-3, ont d'autres fonctions physiologiques importantes. **(**pour revue (Jump 2002) et (Legrand 2007).

2.5.1. Incorporations dans les phospholipides membranaires

Les acides gras, sous forme de phospholipides (PL), sont des constituants universels des membranes biologiques; ils modulent leur fluidité et l'activité des protéines qu'elles contiennent (enzymes, récepteurs, transporteurs…). Ces propriétés sont en grande partie déterminées par la longueur de la chaîne carbonée et le degré d'insaturation des acides gras composant les PL; plus les PL sont riches en AGPI, plus la membrane sera fluide. En effet, l'incorporation des AGPI dans les PL rend les membranes moins fluides grâce à leur configuration tridimensionnelle, conférée par leurs insaturations qui introduisent des angles dans la molécule. Ils occupent ainsi plus de volume que les acides gras saturés (AGS) ou les acides gras monoinstaturés AGMI (figure 9).

2.5.2. Précurseurs de médiateurs lipidiques

Les acides gras à 20 carbones des familles n-3 et n-6 (l'acide arachidonique (AA) pour la famille n-6 et l'EPA pour la famille n-3) sont (via les cyclooxygénases (COX) et lipoxygénases (LOX)) les précurseurs de médiateurs lipidiques oxygénés dit eicosanoïdes (figure 10). Ils regroupent les leucotriènes (LT), les prostaglandines (PG), les prostacyclines (PGI) et les thromboxanes (Tx). Les eicosanoïdes modulant de très nombreuses fonctions cellulaires. Leur action biologique varie selon qu'ils sont issus de l'EPA (eicosanoïdes de la série 3) ou de l'AA (eicosanoïdes de la série 2) et leurs effets sont tantôt complémentaires et tantôt opposés. Par exemple, les eicosanoïdes de la série 3 libérés par les plaquettes et les cellules endothéliales sont antiagrégants et vasodilatateurs, alors que ceux de la série 2 sont proagrégants. Les eicosanoïdes libérés au cours de l'inflammation par les cellules immunitaires (macrophages et leucocytes) sont pro-inflammatoires, qu'ils soient issus de l'EPA ou de l'AA, cependant, ceux issus de l'EPA ont un effet plus faibles (Calder 1997; Jump 2002). Les mécanismes d'action de ces eicosanoïdes reposent généralement sur des récepteurs couplés aux protéines G. Ils s'attachent à ces récepteurs ancrés à la surface cellulaire et enclenchent soit un accroissement, soit un abaissement du taux cytosolique de second messager (AMP cyclique ou Ca^{++}), l'activation d'une protéine kinase, ou une modification du potentiel membranaire (Legrand 2007).

Outre les eicosanoïdes, d'autres médiateurs lipidiques sont formés à partir des AGPI-LC n-3 notamment à partir du DHA via la COX2, tels que les résolvines, les docosatriènes et les neuroprotectines, possédant des caractéristiques anti-inflammatoires et neuroprotectrices (Anderson & Ma 2009).

2.5.3. Régulation de l'expression génique

Les acides gras polyinsaturés, leurs esters de Co-enzyme A (CoA), ainsi que leurs dérivés eicosanoïdes sont des régulateurs d'un grand nombre de gènes par l'intermédiaire de l'activation de facteurs de transcription. Parmi ces facteurs de transcription, on trouve classiquement les PPAR (peroxisome proliferator activated receptors), le récepteur aux rétinoïdes RXR (retinoid X receptor), le récepteur hépatique LXR (liver X receptor) ou encore les SREBP (sterol regulatory element- binding proteins). Récemment, d'autres facteurs de transcription comme le NF-κB (nuclear factor-kappa B) ont été identifiés comme étant régulés par les AGPI. Outre l'activation de facteurs de transcription, les AGPI semblent aussi moduler, par des mécanismes encore mal décrits, l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, tels que le TLR4 (Toll-like receptor 4) ou les PPA (protéines de phase aiguë) (Adkins & Kelley 2010). Le rôle des PPAR et en particulier de l'isoforme alpha sera détaillé dans la chapitre IV, page 50.

3. Implications des AGPI n-3 dans les processus physiopathologiques

Les effets des AGPI n-3 sur la santé font l'objet d'études florissantes. On leur attribue une large gamme de bénéfices incluant : des effets cardioprotecteurs, une diminution de la croissance de tumeurs et de métastases, des effets protecteurs contre les maladies neurodégénératives. Nous allons nous focaliser ici sur leurs effets sur les composantes du SyndMet.

3.1. AGPI n-3 et composantes du syndrome métabolique

3.1.1. AGPI n-3 et obésité

Il existe peu d'éléments probants concernant les effets des AGPI n-3 sur la prise en charge de l'obésité (Buckley & Howe 2009). Chez des sujets obèses ou en surpoids, la consommation de 6 g/jour d'huile de poisson pendant 12 semaines, diminue légèrement le pourcentage de graisse corporelle, sans modifier le poids (Hill et al. 2007). Les études suggèrent que les AGPI n-3 joueraient un rôle plus marqué dans la prévention de la prise de poids (Buckley & Howe 2009). En effet, des études menées principalement chez l'animal, mais aussi chez l'homme, montrent que les AGPI-LC n-3 permettent de limiter le dépôt de masse grasse en réponse à un régime hypercalorique (revue de (Buckley & Howe 2009). Chez la souris, la consommation d'un régime riche en ALA diminue de moitié la quantité de tissu adipeux par rapport à un régime riche en acides gras saturés (Morise et al. 2009). Les mécanismes mis en

jeu sont multiples, et portent aussi bien sur la réduction de la synthèse et du transport des lipides que sur la stimulation de leur oxydation.

3.1.2. AGPI n-3 et métabolisme lipidique

La baisse des triglycérides (TG) sanguins à jeun est un des effets les plus décrits en réponse aux AGPI-LC n-3. Concernant l'ALA, une revue de 2006 n'indique pas d'effet bénéfique sur les TG sanguins (Wendland et al. 2006). Cependant, des publications plus récentes indiquent une légère baisse de la triglycéridémie après consommation d'huile de lin (Prasad 2009) ou de margarine riche en ALA (Egert et al. 2009). Cet effet est principalement expliqué par l'activation des gènes de l'oxydation des acides gras, et la répression des gènes de la lipogenèse par les AGPI n-3, essentiellement à longues chaine (Carpentier et al. 2006). Les effets des AGPI n-3 sur le métabolisme du cholestérol sont plus contrastés et dépendent de leurs longueurs de chaine. En effet, les AGPI n-3-LC semblent augmenter légèrement les concentrations du cholestérol-HDL, mais aussi celles du cholestérol-LDL. Cependant, ce dernier effet est contrebalancé par une diminution de la fraction des lipoprotéines petites et denses, fortement athérogénes (Carpentier et al. 2006). Concernant l'ALA, l'avis de l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) publié en 2009, stipule qu'une relation de cause à effet peut être établie entre les apports en ALA et la réduction des concentrations de cholestérol plasmatique (EFSA 2009).

3.1.3. AGPI n-3 glycémie et résistance à l'insuline

Les AGPI n-3 semblent avoir un effet bénéfique sur la résistance à l'insuline et la régulation de la glycémie. Chez les obèses, l'apport d'AGPI-LC n-3 améliore la sensibilité à l'insuline, et ceci même sans perte de poids (Browning et al. 2007). De même, l'ALA abaisse légèrement la glycémie chez des patients hypertriglycéridémiques (Wendland et al. 2006). Chez les individus sains, une complémentation pendant 3 semaines avec des huiles de poisson, réduit de 40 % la réponse insulinémique à une charge orale de glucose (Delarue et al. 1996). Chez l'animal, la complémentation par des AGPI-LC n-3 prévient totalement la résistance musculaire à l'insuline provoquée par un régime hyperlipidique chez le rat (Taouis et al. 2002). Chez le hamster, le remplacement d'un régime riche en AGS (beurre) par un régime riche en ALA (huile de lin) se traduit par des taux plus faibles d'insuline et de l'index HOMA d'insulinorésistance, ce qui traduit une meilleure sensibilité à l'insuline (Morise et al. 2006). Les mécanismes d'action des acides gras sur la sensibilité à l'insuline restent jusqu'alors mal connus. Ils seraient liés à la diminution de l'oxydation du glucose et à l'augmentation de

l'oxydation des lipides, associées à l'augmentation du stockage du glycogène (Lombardo & Chicco 2006; Lombardo et al. 2007).

3.1.4. AGPI n-3 et hypertension artérielle

Les AGPI n-3 à chaîne longue sont connus pour influencer la pression artérielle. La complémentation en huile de poisson réduit légèrement, mais significativement, la pression artérielle, chez des sujets aussi bien hypertendus que normotendus (Geleijnse et al. 2002). De même, chez des patients en surpoids, un apport alimentaire de DHA réduit la pression systolique et diastolique (Mori et al. 1999). Des études chez l'animal montrent aussi l'implication des AGPI-LC n-3 dans l'étiologie de l'hypertension. Chez le rat spontanément hypertendu (SHR), le DHA entraîne une diminution significative de la pression artérielle. De même, dans un modèle murin d'insulino-résistance, l'EPA et le DHA limitent le développement de l'hypertension (Rousseau et al. 2003). Les données sur l'ALA sont plus controversées. Plusieurs études d'interventions randomisées n'ont pas observé d'effet de l'ALA sur la pression artérielle (Revue de (Wendland et al. 2006)). Par contre, l'étude de Takeuichi et coll., a rapporté une diminution significative de la pression artérielle chez les individus normo- et hypertendus, après 12 semaines de consommation d'un régime contenant 3,4g d'ALA/jour (Takeuchi et al. 2007). Des résultats similaires ont été retrouvés chez des patients atteints de dyslipidémie, après complémentation avec de l'huile de lin (15ml d'huile apportant 8g d'ALA par jour) pendant 12 semaines (Paschos et al. 2007). De même, l'administration orale d'une dose unique d'ALA chez le rat SHR permet de diminuer significativement la pression artérielle (Sekine et al. 2007). Les mécanismes impliqués dans ces effets sont probablement liés aux actions des AGPI n-3 sur la production des molécules vasodilatatrices telles que les prostaglandines et le monoxyde d'azote, et vasoconstrictrices telle que l'endothéline notamment via une amélioration de la sensibilité à l'insuline.

3.2. Effets pléotropiques des AGPI n-3 sur la physiopathologie du SyndMet

D'autres effets des AGPI n-3 pourraient expliquer les bénéfices observés chez les patients atteints de SyndMet. Ils consistent principalement en l'amélioration du statut inflammatoire, de la fonction endothéliale (Partie IV/1/1.1 page 60) et des défenses antioxydantes (Partie IV/2/2.1 page 64). Les AGPI n-3-LC modulent la réaction inflammatoire en particulier par un mécanisme de compétition au niveau de la COX et de la LOX, aboutissant à une réduction de la libération des métabolites pro-inflammatoires de l'AA. De plus, les eicosanoïdes dérivés des AGPI-LC n-3 sont environ 100 fois moins actifs sur le processus inflammatoire que ceux

dérivés de l'AA. La COX génère aussi des résolvines, des docosatriènes et des neuroprotectines, ces molécules ayant un effet anti-inflammatoire. Enfin, l'incorporation des AGPI-LC n-3 dans les membranes des cellules mononuclées joue vraisemblablement un rôle dans leur effet inhibiteur sur la production des cytokines pro-inflammatoires : TNF-α, IL-1ß et IL-6 (Calder 2006; Adkins & Kelley 2010).

***

Lors de ce travail, nous avons émis l'hypothèse qu'une partie de ces effets pléiotropiques des AGPI n-3 expliquant leurs bénéfices physiopathologiques, particulièrement au niveau de la fonction endothéliale et du stress oxydant, impliqueraient une régulation du métabolisme secondaire de deux acides aminés, l'arginine et la cystéine.

Le chapitre suivant devrait permettre d'identifier les voies via lesquelles les AGPI n-3 pourraient réguler le métabolisme de l'arginine et de la cystéine et de décrire les conséquences possibles de ces modulations au niveau métabolique et fonctionnel.

III. Implication de l'arginine et de la cystéine dans la physiopathologie du SyndMet

Au-delà de leur fonction essentielle en tant que composants des protéines et des polypeptides, certains acides aminés jouent des rôles importants dans la régulation de diverses voies métaboliques. Dénommés acides aminés fonctionnels, ils incluent l'arginine, la cystéine, la glutamine, la leucine, la proline et le tryptophane (Wu 2009). Ces acides aminés exercent leurs effets métaboliques de façon directe (par exemple inhibition/activation de voies métaboliques), via des acides aminés dérivés, ou en tant que précurseurs essentiels pour la synthèse d'une variété de métabolites bioactifs aux propriétés extrêmement importantes. Les acides aminés et leurs dérivés bioactifs régulent des voies métaboliques clés et des processus vitaux pour la santé, tels que la croissance, le développement, la reproduction, l'immunité et l'homéostasie des organismes vivants. La découverte de ces fonctions physiologiques des acides aminés et de leurs dérivés a ouvert des voies de recherche fondamentales en biochimie et en nutrition, permettant ainsi la compréhension des processus biologiques, mais aussi participant au développement de nouvelles stratégies pour la résolution de problèmes de santé. Parmi ces acides aminés, l'arginine et la cystéine requièrent une attention particulière de par l'extrême implication de leurs métabolites bioactifs, respectivement le NO et le glutathion, dans les processus physiopathologiques de diverses pathologies (MCV, DT2, obésité, SyndMet) et dysfonctions (dysfonction endothéliale, stress oxydant et inflammation). Actuellement en développement croissant, ces désordres et les processus qui y sont impliqués, ainsi que les stratégies pouvant les limiter, font l'objet de recherches florissantes.

***

Cette section a pour objectif de donner les éléments de compréhension nécessaires sur le métabolisme de l'arginine et de la cystéine, d'expliquer l'importance et les rôles de ces acides aminés et surtout de leurs métabolites bioactifs dans la physiopathologie du SyndMet et des dysfonctions associées, mais aussi de justifier les marqueurs que nous avons sélectionnés et ciblés pour rendre compte des possibles régulations de ces voies métaboliques par les AGPI n-3.

1. La cystéine précurseur du glutathion

1.1. Biosynthèse de la cystéine à partir de la méthionine

La cystéine constitue, avec la méthionine, l'homocystéine et la taurine, les quatre acides aminés soufrés présents dans l'organisme. Parmi eux, seule la méthionine est indispensable chez l'homme. La protéosynthèse est la voie d'utilisation principale de la méthionine, mais en fonction des besoins de l'organisme en groupements méthyles, la méthionine libre ou provenant des protéines, est utilisée comme donneur de méthyle via la transméthylation, voie obligatoire de son catabolisme. La transméthylation convertit la méthionine en homocystéine, via la formation de deux intermédiaires métaboliques, la S-adénosylméthionine et la S-adénosylhomocystéine. En fonction des besoins et des apports en méthionine et en cystéine, l'homocystéine produite est soit reméthylée en méthionine sous l'action de la méthyltransférase (c'est le cycle transméthylation/reméthylation ou cycle de la méthionine) soit orientée vers la voie irréversible de la synthèse de la cystéine par transulfuration. Lors de cette étape, qui se déroule principalement au niveau du foie et du pancréas, l'homocystéine est condensée avec une sérine par la cystathionine-β-synthase pour produire la cystathionine, qui est ensuite clivée par la cystathionine γ-lyase pour produire la cystéine (figure 11) (Brosnan & Brosnan 2006) (Mudd et al. 2007).

1.2. Voies d'utilisation et homéostasie de la cystéine

La cystéine est utilisée pour la synthèse des protéines, ainsi qu'en tant que précurseur de composés non protéiques essentiels à l'organisme. Les deux principales voies d'utilisation de la cystéine sont (figure 12) (Stipanuk et al. 2006) :

1) Son oxydation en cystéinesulfinate, réaction catalysée par la cystéine dioxygénase (CDO). La cystéinesulfinate peut ensuite être convertie, soit en taurine par décarboxylation et oxydation sous l'action de la cystéinesulfinate décarboxylase (CSDC), soit en β-sulfonyl-pyruvate par l'aspartate aminotransférase, voie qui aboutit à la formation de sulfates ;
2) Sa condensation avec le glutamate et la glycine pour former le glutathion sous l'action successive de la γ-glutamylcystéine ligase (γGCL) et de la glutathion synthétase (GS).

Les enzymes-clés de ces voies métaboliques sont régulées en réponse aux variations du besoin intracellulaire en cystéine et ses métabolites, et de l'apport alimentaire en cystéine et/ou en acides aminés soufrés. Les variations de régulation de la γGCL et de la CDO déterminent le flux de cystéine entre la voie de catabolisme irréversible et la voie de synthèse du glutathion. La prédominance de la synthèse de glutathion au détriment de la taurine dans les conditions

de faible disponibilité en cystéine suggère une compétition entre ces deux voies, favorable à la γGCL (Bella et al. 1999; Stipanuk 2004).

Pendant ce travail, notre intérêt a porté principalement sur la voie de synthèse du glutathion.

2. Le glutathion

2.1 Synthèse du glutathion

Le glutathion ou (γ-glutamylcystéineglycine), un tripeptide composé de cystéine, de glutamate et de glycine, est le principal thiol de faible poids moléculaire de l'organisme. Il présente deux caractéristiques structurales lui permettant de participer à de nombreuses fonctions cellulaires : sa liaison γ-carboxyle entre les résidus glutamate et cystéine, qui le protège contre l'hydrolyse, et son groupement thiol (-SH), porté par son résidu cystéine, qui lui confère des fonctions importantes dans les défenses antioxydantes et le maintien du statut redox cellulaire (figure 13).

La synthèse du glutathion (figure 14) est assurée par l'action séquentielle de deux enzymes cytosoliques ubiquitaires ATP-dépendantes, la γ-glutamylcystéine ligase (ou synthase, γGCL) et la glutathion synthétase. La première réaction, catalysée par la γGCL, constitue l'étape limitante de la synthèse du glutathion. Elle permet la formation d'une liaison peptidique entre le groupement carboxyle du glutamate et le groupement aminé de la cystéine. 95 % de la γ-glutamylcystéine formée lors de cette réaction est orienté vers la synthèse du glutathion par la GS en présence de glycine, cette deuxième étape étant rarement limitante pour la synthèse du glutathion. Théoriquement, la synthèse du glutathion peut avoir lieu dans toutes les cellules de l'organisme, mais le foie est le principal site de production; une grande partie du glutathion hépatique est néanmoins exportée vers les autres organes, qui l'utilisent comme source de cystéine ou afin de resynthétiser du glutathion (Lu 2009).

2.2 Facteurs régulant la synthèse du glutathion

L'homéostasie du glutathion est finement contrôlée par l'activité de la γGCL, ainsi que par les concentrations et la biodisponibilité de ses substrats, en particulier de la cystéine.

La γGCL est une enzyme constituée de deux sous-unités, une sous-unité catalytique (GCLc) et une sous-unité régulatrice ou modulatrice (GCLm). La sous-unité catalytique est fonctionnelle, mais son activité est plus faible que celle de l'holoenzyme; la sous-unité régulatrice a pour rôle la modulation de l'affinité de la sous-unité catalytique pour ses substrats et inhibiteurs. La γGCL est modulée par de nombreux facteurs susceptibles d'agir

simultanément au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel, ce dernier incluant la stabilité de l'ARN messager et les modulations post-traductionnelles (Huang et al. 1993) (Lu 2009). L'expression de la γGCL est régulée par les facteurs associés au stress oxydant ou nitrosant, par certains antioxydants, par les facteurs de croissance (tels que le facteur de croissance hépatique) ou encore par les facteurs de transcription, tels que NF-kB. Ces régulation géniques sont expliquées par la présence d'éléments de réponse aux espèces oxydantes, aux électrophiles ou encore aux facteurs de transcription au niveau du promoteur du gène codant pour la γGCL (Liu et al. 1998; Dickinson et al. 2004). Au niveau post-traductionnel, l'activité de la γGCL est régulée par les phosphorylations, mais aussi de façon importante par une inhibition compétitive exercée par le glutathion et la γ–glutamylcystéine (Lu 2009). En effet, les résidus -glutamyl et -cysteinyl de ces peptides viennent occuper respectivement les sites de fixation du glutamate et de la cystéine, réduisant ainsi l'activité enzymatique. La formation de l'holoenzyme est aussi associée à une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le glutathion et la γ–glutamylcystéine (Huang et al. 1993). D'autres facteurs peuvent aussi influencer l'activité et/ou l'expression de la γGCL, tels que les cytokines inflammatoires (Dickinson et al. 2004), ou encore les hormones (Lu et al. 1991).

La synthèse du glutathion est aussi fortement influencée par la disponibilité de ses acides aminés précurseurs et en particulier de la cystéine, dont la concentration intracellulaire hépatique est environ 10 fois moins importante que celle de la glycine et du glutamate. Cet aspect limitant serait la conséquence de l'écart entre les tailles des pools de la cystéine et du glutathion (ce dernier étant 30 fois plus important), et du renouvellement fréquent du pool de glutathion. Il a été montré qu'un apport élevé en cystéine libre, ou en protéines riches en cystéine, stimule la synthèse du glutathion (Mariotti et al. 2004) ce qui laisse supposer qu'une augmentation de la biodisponibilité de la cystéine serait associée à une augmentation de la production du glutathion. La biodisponibilité de la cystéine est influencée par l'apport alimentaire en acides aminés, par le transport de la cystéine, de sa forme oxydée la cystine et de la méthionine, ainsi que par la régulation de sa biosynthèse via la voie de transulfuration (Lu 2009).

Dans une moindre mesure, la synthèse du glutathion est également affectée par la disponibilité en glycine. Chez les sujets recevant une alimentation pauvre en acides aminés soufrés ou dépourvue de glycine, l'excrétion urinaire de 5-oxoproline est augmentée. Or, la 5-oxoproline est un dérivé de la γ-glutamylcystéine qui marque une diminution de la synthèse de glutathion (Metges et al. 2000; Yu et al. 2002).

2.3 . Le pool de glutathion

Dans la cellule, le glutathion existe sous 3 formes, réduite, disulfure oxydée, ou complexée aux protéines. Le glutathion est présent dans différents compartiments intracellulaires (cytosol, noyau, mitochondries et réticulum endoplasmique); néanmoins, le compartiment mitochondrial semble être le plus riche en glutathion (Pastore et al. 2003). Le glutathion est présent à des concentrations différentes dans les organes. Le foie étant le producteur majoritaire, il en contient des concentrations 3 fois plus importantes que celles retrouvés dans le rein, le poumon ou le cerveau, autres organes impliqués dans le métabolisme du glutathion. Dans le plasma, le glutathion est présent à des concentrations très faibles, de l'ordre du micromolaire. Les niveaux de glutathion sont stables dans les organes extra-hépatiques, mais peuvent varier dans le foie en réponse aux modulations nutritionnelles et au statut antioxydant de l'organisme (Malmezat et al. 2000; Stipanuk et al. 2002). Les variations du pool hépatique du glutathion et de son turnover sont principalement la conséquence de l'équilibre entre une exportation de glutathion vers les organes extra-hépatiques, et une synthèse suffisante pour maintenir les niveaux hépatiques intracellulaires de glutathion (Pastore et al. 2003).

2.4 . Rôles du glutathion

2.4.1. Maintien du potentiel redox cellulaire

Par la forte réactivité de son groupement thiol et au regard des concentrations intracellulaires importantes en glutathion par rapport au autres couples réducteurs intracellulaires (par exemple la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ou la thioredoxine), le couple glutathion réduit/glutathion oxydé (noté GSH/GSSG) est considéré comme le principal contributeur au maintien du statut redox au niveau intracellulaire (Schafer & Buettner 2001). Le couple GSH/GSSG agit comme un tampon redox, fournissant le pool le plus important d'espèces réduites dans la cellule, participant ainsi au maintien de l'environnement cellulaire dans un état optimal réduit, critique pour la survie de la cellule. La forme réduite du glutathion peut être facilement régénérée à partir de la forme oxydée, sous l'action de la glutathion réductase (GR). Le glutathion oxydé peut aussi se lier aux groupements sulfhydriles des protéines; cette réaction consomme du glutathion oxydé et produit du glutathion réduit limitant ainsi l'accumulation de glutathion oxydé dans les conditions pro-oxydantes. Le glutathion exerce aussi son rôle de tampon redox en participant à la régénération de la forme réduite d'autres antioxydants, tels que les tocophérols ou l'acide ascorbique (vitamines E et C) (figure 15) (Forman et al. 2009).

2.4.2. Participation aux défenses anti-oxydantes

Les radicaux libres sont une forme d'espèces chimiques possédant un électron célibataire. Cette propriété les rend aptes à réagir avec différentes molécules, notamment lors des réactions en chaîne dont l'exemple le plus connu est celui de la peroxydation des lipides. D'autres espèces dites « espèces actives de l'oxygène » comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ne sont pas des radicaux libres, mais sont elles aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé « espèces réactives de l'oxygène ou ROS ». Ces molécules peuvent être à l'origine de dommages cellulaires se traduisant par l'oxydation de l'ADN, des protéines et des lipides dans les conditions de stress (oxydant, inflammatoire ou infectieux) caractérisées par une surproduction de ROS (figure 16). Afin d'éliminer ces espèces réactives, des systèmes dits antioxydants sont mis en place par la cellule. Le glutathion est le principal antioxydant non enzymatique endogène de l'organisme, en raison de sa capacité à capter directement et spontanément différentes espèces radicalaires. Il agit aussi en tant que cofacteur de réactions enzymatiques antioxydantes catalysées par les différents isoformes de la glutathion peroxydase (GPx), enzyme impliquée dans l'élimination des hydroperoxides et peroxides lipidiques (figure 17 a). Les GPx agissent de concert avec la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) pour neutraliser et éliminer les ROS, ces trois enzymes constituant le système enzymatique antioxydant. La SOD est capable de transformer, par une réaction de dismutation, l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ce dernier pouvant ensuite être catabolisé par la CAT pour former des molécules d'eau (figure 17 b) (Forman et al. 2009; Lu 2009).

En plus de ces rôles majeurs dans les défenses antioxydantes et le maintien du statut redox intracellulaire, le glutathion participe à d'autres mécanismes physiologiques importants dans la lutte contre le stress oxydant, tels que la glutathionylation. Cette réaction permet de former des ponts disulfures entre le glutathion et les groupements sulphydryles des protéines, les protégeant ainsi contre certaines réactions irréversibles pouvant avoir lieu dans des conditions de stress oxydant, comme la carbonylation, la glycation ou la nitration, ces réactions étant souvent associées à la perte de la fonction des protéines (Mieyal et al. 2008).

2.5 . Implication du glutathion dans la physiopathologie du SyndMet

Les propriétés du glutathion lui confèrent un rôle majeur dans de nombreux processus biologiques incluant la différenciation, la prolifération et l'apoptose cellulaire, mais aussi la réponse immune et la détoxification. Il n'est donc pas surprenant que les perturbations affectant les taux cellulaires du glutathion, son turnover ou son niveau d'oxydation soient impliquées dans l'étiologie et la progression de nombreuses maladies telles que les cancers, les maladies inflammatoires et métaboliques, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Ballatori et al. 2009).

L'importance physiopathologique du glutathion est mise en évidence par l'exploration de son métabolisme chez les patients, par l'étude des effets de l'administration du glutathion ou de ses précurseurs sur la progression des maladies, ou par l'observation des dérèglements métaboliques et fonctionnels chez les individus portants des altérations acquises ou de naissance au niveau du métabolisme du glutathion (Townsend et al. 2003; Ballatori et al. 2009). Ainsi, un statut en glutathion altéré est observé chez les patients atteints de SyndMet. En effet, des études récentes ont relevé des concentrations plasmatiques en glutathion environ 20 % inférieures chez les patients atteints de SyndMet, par rapport aux individus sains. En parallèle, une augmentation du stress oxydant a été mise en évidence chez ces patients (partie I/6 page 22) (Giral et al. 2008; Di Renzo et al. 2010). Le statut en glutathion est aussi altéré chez les patients atteints de diabète. En effet, les concentrations érythrocytaires et plasmatiques en glutathion sont diminuées chez les patients diabétiques (Yoshida et al. 1995; Sharma et al. 2000). De même, chez l'animal, les concentrations rénales en glutathion sont diminuées chez les rats Zucker diabétiques, obèses et présentant un SyndMet (figure 18) (Chander et al. 2004). De même, dans un modèle murin de SyndMet (des rats sous régime hypersaccharosé pendant 6 semaines), il a été observé une altération du statut redox du glutathion, marquée par un potentiel redox du couple GSH/GSSG devenant plus positif (c'est-à-dire plus oxydé) au niveau hépatique et systémique (Blouet et al. 2007). Ces observations sont en accord avec les études d'intervention qui décrivent l'effet bénéfique d'un apport en glutathion ou en cystéine. En effet, la complémentation en cystéine stimule la synthèse du glutathion et améliore la résistance à l'insuline et le statut oxydant dans les modèles animaux de SyndMet (Blouet et al. 2007) (Jain et al. 2009).

Outre l'altération du pool et de l'état d'oxydoréduction, un dérèglement des enzymes impliquées dans le métabolisme du glutathion est aussi observé en présence de SyndMet ou des dysfonctions associées, même si les résultats restent divergents. A titre d'exemple, il a été

décrit une augmentation des activités plasmatiques de la SOD et de la GPx chez les obèses (Silver et al. 2007). Chez les patients hypertendus, l'activité de la SOD semble diminuée alors que celle de la GPx est augmentée (Russo et al. 1998). Les défenses enzymatiques anti-oxydantes semblent aussi être diminuées en présence de diabète (West 2000).

***

En conclusion, le métabolisme du glutathion semble bel et bien être affecté en présence de SyndMet, d'obésité ou de diabète. En parallèle, le dérèglement du métabolisme du glutathion participe à la progression de ces dysfonctions.

Les voies limitantes qui affectent la synthèse du glutathion ainsi que ses voies d'utilisation notamment via les enzymes antioxydantes nous semblent être les plus judicieuses à explorer, afin de rendre compte des variations de son métabolisme en réponse au AGPI n-3.

3. L'arginine, précurseur du NO

L'arginine est un acide aminé classé comme conditionnellement indispensable. Le pool endogène d'arginine est majoritairement issu de la protéolyse. Néanmoins, une biosynthèse de l'arginine est aussi possible à partir des squelettes carbonés de la glutamine ou à partir du recyclage enzymatique de la citrulline. L'arginine est aussi apportée par l'alimentation. Chez des sujets sains, un apport alimentaire en arginine provoque une augmentation importante et dose-dépendante des concentrations plasmatiques de l'arginine (Mariotti 2009).

En plus de la protéosynthèse, l'arginine est impliquée dans de nombreux processus physiologiques. Elle peut exercer son rôle directement, par exemple via l'activation des voies de signalisation telles que la voie mTOR ou en tant qu'antioxydant. L'arginine est aussi le précurseur d'autres acides aminés et métabolites ayant des fonctions importantes, à savoir : la créatine, l'urée, l'ornithine, l'agmatine et le NO. A titre d'exemple, l'ornithine participe à la détoxification de l'ammoniac, et est le substrat de la proline, du glutamate et des polyamides. Néanmoins, le métabolite le plus important et le plus étudié de l'arginine reste le NO, du fait de ses rôles physiologiques importants (partie III/4/4.4 page 47) (Wu 2009).

La multitude d'enzymes impliquées dans le métabolisme de l'arginine (figure 19), ainsi que la forte variation et la dynamique de leurs expressions dans les différents organes et tissus traduisent la complexité du métabolisme de l'arginine (Morris 2009). *Nous allons donc nous focaliser dans la suite de ce chapitre sur les principales voies du métabolisme de l'arginine influant l'homéostasie de notre métabolite d'intérêt à savoir le NO.*

4. Le NO modulateur clé de l'homéostasie vasculaire

4.1. Biochimie et métabolisme du NO

Chez les mammifères, la biosynthèse du NO est assurée par la NO synthase (NOS). Cette enzyme utilise l'arginine, l'oxygène et le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) comme substrats, alors que le tétrahydrobioptérine (BH4), le calcium calmoduline, le FAD (flavine-adénine dinucléotide) et le FMN (flavine mononucléotide) sont des cofacteurs nécessaires à son processus catalytique (figure 20). La NOS est une métalloenzyme provenant de l'assemblage de 2 monomères. En présence de quantités suffisantes d'arginine et de BH4, la NOS dimérique est capable de coupler l'hème et de réduire l'oxygène, provoquant l'hydroxylation d'un azote du groupement guanidium de l'arginine et formant ainsi un produit intermédiaire instable, la Nγ-hydroxy-L-Arginine (NOHA) qui se scinde rapidement en NO et L-Citrulline (figure 21). A ce jour, trois isoformes de la NOS ont été identifiées : la NOS neuronale (nNOS ou NOS1) et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS3), qui sont constitutives, et la NOS inductible (iNOS ou NOS2), qui est au contraire exprimée en réponse à des stimuli inflammatoires et à la présence d'agents pathogènes (Alderton et al. 2001). Les NOS constitutives génèrent de faibles concentrations de NO, de l'ordre du nM, alors que la NOS inductible synthétise en général de plus fortes concentrations de NO, de l'ordre du μM, permettant de neutraliser rapidement des agents pathogènes.

Le NO est une petite molécule diatomique et labile. En milieu biologique, sa demi-vie est très courte (quelques secondes) étant donné qu'il réagit avec le fer des noyaux hèmes, avec les dérivés de l'oxygène et avec les groupements thiols. Ainsi, le NO est rapidement inactivé par les ions superoxydes (O_2^-) donnant l'anion peroxynitrite ($ONOO^-$), ou transformé en métabolites inactifs, les nitrites (NO_2^-) puis les nitrates (NO_3^-) en contact avec l'oxygène. La liaison du NO aux thiols de bas poids moléculaire conduit à la formation de S-nitrosothiols qui peuvent agir comme donneurs de NO et ainsi augmenter substantiellement sa demi-vie.

4.2. Régulation de la production du NO

La production du NO est principalement régulée par l'activité de la NOS et par la biodisponibilité de l'arginine. La NOS est modulée par des mécanismes transcriptionnels et post-traductionnels. Ainsi, des mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation modulent son activité en réponse à des stimuli pharmacologiques ou mécaniques, comme les contraintes de cisaillement. En outre, plusieurs facteurs peuvent augmenter l'expression et/ou l'activité de la NOS, incluant les hormones telles que l'insuline, les facteurs de croissances ou les concentrations faibles de LDL oxydées. D'autres facteurs sont connus pour réduire

l'expression de la NOS, en particulier le TNF-α et l'hypoxie. Parallèlement, l'activité catalytique de l'enzyme est très régulée par la biodisponibilité de son substrat principal, l'arginine, et de ses cofacteurs FAD, FMN et NADPH et particulièrement de la BH4 (Alderton et al. 2001).

Plusieurs processus peuvent moduler la production du NO via une régulation de la biodisponibilité de l'arginine. D'abord son transport, la co-localisation dans la cavéole du transporteur d'acides aminés cationiques CAT1 et de l'enzyme eNOS permet une mise à disposition idéale de l'arginine pour la synthèse du NO. De plus, le recyclage du pool endogène d'arginine via le cycle de l'urée permet un maintien de l'homéostasie du NO. L'utilisation de l'arginine par la eNOS peut aussi être en compétition avec d'autres voies de catabolisme de l'arginine, telles que l'arginase catabolisant l'arginine en ornithine, ou encore l'arginine décarboxylase, enzyme produisant l'agmatine (Morris 2004; Morris 2006). Enfin, la méthylation de l'arginine entraîne la formation d'un inhibiteur compétitif endogène de la eNOS, la diméthylarginine asymétrique (ADMA), pouvant induire une diminution de la production de NO (Cooke & Ghebremariam 2011).

Lors de ce travail, nous sommes focalisés sur l'un des principaux processus métabolique influençant la synthèse du NO, qui est la compétition entre la NOS et l'arginase.

4.3. Arginase et contrôle de la production du NO

4.3.1. Les arginases

Chez les mammifères, il existe deux isoformes de l'arginase, l'arginase 1 et l'arginase 2, codés par des gènes différents, localisés sur des chromosomes différents. Les deux isoformes de l'arginase présentent environ 50 % d'homologie de structure en acides aminés, mais 100% d'homologie au niveau du site catalytique. Ces isoformes différent néanmoins par leur distribution tissulaire, leur localisation subcellulaire, leur régulation et leur rôle physiologique. L'arginase 1 est l'isoforme la mieux connue, du moins au niveau hépatique. En effet, cette isoforme est située au niveau cytosolique et est très fortement exprimée dans le foie, où elle catalyse la dernière des 5 étapes du cycle de l'urée en hydrolysant l'arginine en urée et en ornithine (figure 22) (pour revue voir (Morris 2009). Cependant, l'arginase 1 est également exprimée par de nombreux tissus extra-hépatiques qui ne possèdent pas le cycle de l'urée complet, tels que le cerveau, les poumons et le cœur. L'arginase 2 est une enzyme de la face externe de la membrane mitochondriale, exprimée de façon plus ubiquitaire dans de nombreux tissus dont le rein où elle est fortement exprimée, le cerveau, le cœur, l'intestin et

les poumons (figure 23) (Neill et al. 2009). L'arginase 2 est souvent associée à la production de polyamides, de proline ou de glutamate. Il convient de préciser que les études réalisées avec les souris transgéniques n'ont pas permis d'éclaircir complètement les rôles physiologiques de ces 2 enzymes. Ainsi les souris invalidées pour le gène de l'arginase 2 sont viables et possèdent un phénotype normal, malgré leur très faible activité arginase rénale (-100 fois) et leur taux plasmatique d'arginine deux fois plus élevé que chez les souris de type sauvages. En revanche, les souris invalidées pour le gène de l'arginase 1 meurent une dizaine de jours après leur naissance d'une hyperammoniémie, confirmant bien le rôle de l'arginase 1 dans le cycle de l'urée (Cederbaum et al. 2004).

4.3.2. Implication de l'arginase dans le contrôle de la production du NO

Plusieurs études se sont intéressées à l'éventualité d'une régulation de la production de NO par l'arginase, puisque la NOS et l'arginase possèdent comme substrat commun l'arginine. Il a ainsi été montré que l'activation des macrophages induisait l'augmentation de l'expression de l'arginase, accompagné d'une inhibition de la production de NO, et que l'inhibition de l'arginase permettait de restaurer la production de NO (Chang et al. 1998). Des résultats similaires ont été obtenus sur le muscle lisse de lapin, où l'inhibition de l'arginase permet d'améliorer la relaxation du muscle, suggérant une meilleure disponibilité de l'arginine pour la synthèse du NO (Cox et al. 1999).

Sur des modèles de cultures cellulaires endothéliales humaines et bovines, il a été montré qu'une inhibition de l'arginase permettait d'augmenter la production du NO (Bachetti et al. 2004; Chicoine et al. 2004). De même, Zhang et coll. ont montré que l'incubation d'artères coronaires isolées de porc en conditions physiologiques avec un inhibiteur de l'arginase améliorait la vasodilatation NO-dépendante (Zhang et al. 2001). Chez le rat âgé, il a été observé une surproduction d'arginase au niveau aortique, alors qu'une inhibition de l'activité arginase améliorait la réponse vasodilatatrice et augmentait l'activité aortique de la NOS (figure 24) (Berkowitz et al. 2003).

La compétition entre les voies NOS et arginase ne se limite pas à la seule compétition vis-à-vis du substrat. En effet, lors de la formation du NO, les NOS produisent un intermédiaire de synthèse, le NOHA, qui est le plus puissant inhibiteur endogène de l'arginase (figure 25) (Ash 2004). D'autres auteurs ont montré que les nitrites, dérivés oxydés du NO, pouvaient également inhiber l'arginase (Hrabak et al. 1996). Enfin, l'urée est également capable d'activer la production de NO et d'inhiber l'arginase (Thuraisingham & Yaqoob 2003).

Ces donnés démontrent que l'utilisation de l'arginine dans la voie de synthèse du NO et modulée en partie par l'activité arginase, ce qui met en évidence l'interaction voire la compétition entre les deux enzymes (NOS et arginases), justifiant ainsi l'intérêt que nous avons porté à ces deux voies métaboliques dans le cadre de ce travail.

4.4. Rôle du NO au niveau vasculaire et implication dans la fonction endothéliale

Le NO est soluble à la fois dans les phases aqueuses et hydrophobes; il peut diffuser rapidement à travers les membranes cellulaires et agir aussi bien au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses que des plaquettes, des érythrocytes et des cellules de l'inflammation. Au niveau des cellules musculaires lisses, le NO inhibe le tonus vasculaire en stimulant la production de la guanosine-monophosphate cyclique (GMPc) suite à sa fixation au groupement hème de la guanylate cyclase (GC). Il participe aussi à la migration et à la prolifération des cellules musculaires lisses, ainsi qu'à la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire. Au niveau de la lumière vasculaire, le NO contribue au maintien de la fluidité du sang et à l'inhibition de l'adhésion des plaquettes sanguines et des leucocytes aux cellules endothéliales. De plus, il prévient et facilite la dissolution d'agrégats plaquettaires (Schini-Kerth 1999) (figure 26).

De par ces effets, le NO est considéré comme une molécule signal cytoprotectrice jouant un rôle fondamental dans l'homéostasie vasculaire, et donc fortement impliqué dans la fonction endothéliale (Yetik-Anacak & Catravas 2006). En effet, de nombreuses études ont suggéré qu'une altération de la production et ou de la biodisponibilité du NO était le mécanisme principal impliqué dans la dysfonction endothéliale observée lors de la pathogenèse de l'athérosclérose associée aux facteurs de risque du SyndMet (partie III/4/4.5 page 48). Des études ont montré qu'une diminution de la synthèse de NO par administration chronique de L-NAME (un inhibiteur de la NOS) accélère l'apparition de la dysfonction endothéliale et des complications cardiovasculaires chez le lapin hypercholestérolémique (Holm et al. 1997). Sur ce même modèle de lapin, la supplémentation en arginine induisait une amélioration de la fonction endothéliale et une réduction de la taille des lésions vasculaires (Cooke et al. 1992). Chez l'homme, en plus de la diminution de la biodisponibilité du NO retrouvé chez les patients atteints d'athérosclérose, l'exploration de vaisseaux sanguins a permis de mettre en évidence une diminution de l'expression de la eNOS chez ces patients (Oemar et al. 1998; Kawashima & Yokoyama 2004).

Par contre, les bénéfices de l'arginine au niveau vasculaire restent controversés chez l'homme (Siasos et al. 2007). Chez les sujets à risque cardiovasculaire, il a été montré une amélioration de la vasodilatation dépendante du NO après supplémentation en arginine (Hambrecht et al. 2000). Cependant, d'autres études n'ont pas montré d'effet de l'arginine sur la fonction endothéliale (Blum et al. 2000; Mariotti et al. 2007), ou ont rapporté des effets délétères (Lee et al. 2003).

4.5. Implication du NO dans la physiopathologie du syndrome métabolique

Chez les patients atteints de SyndMet, il a été observé une diminution des concentrations plasmatiques de nitrites (métabolite du NO) par rapport aux individus sains, ce qui reflète une altération de la synthèse ou de la biodisponibilité du NO (figure 27) (Gomes et al. 2008). Ces données ont été confirmées très récemment. En effet, chez des patients atteints de SyndMet, il a été observé une diminution de la synthèse du NO au niveau du corps entier, mesuré par une nouvelle méthode nommée test oral au nitrite. Dans cette même étude, les niveaux de production du NO chez les patients obèses non atteints de SyndMet étaient intermédiaires entre les individus sains et ceux atteints de SyndMet (Siervo et al. 2011). Cette altération de la production du NO est aussi liée aux différentes composantes du SyndMet. Elle est retrouvée chez les patients obèses, hypertendus, ou encore insulino-résistants (Huang 2009). A titre d'exemple, la présence d'insulinorésistance est associée à une diminution de la production de NO et de l'activité de la eNOS (Kim et al. 2006). Les mécanismes sous-jacents à ces observations ne sont pas clairement élucidés. Néanmoins, plusieurs possibilités ont été soulevées. A titre d'exemple, la résistance à l'insuline provoque une diminution de la production de NO, par inhibition de l'activité NOS. En effet, l'insuline stimule la production du NO via la voie PI3K/AKT/NOS, alors qu'en présence d'insulinorésistance cette voie est inhibée, diminuant ainsi la synthèse du NO (Kim et al. 2006). Le stress oxydant, qui accompagne la présence de SyndMet, est aussi considéré comme un des phénomènes-clés impliqués dans la diminution de la biodisponibilité du NO. En effet, le NO est aussi une espèce radicalaire qui donne naissance, en situation de stress oxydant, à des produits secondaires extrêmement cytotoxiques, dits espèces réactives nitrosantes, ce qui diminue sa biodisponibilité (Martinez & Andriantsitohaina 2009).

Par ailleurs, la présence de SyndM à été associée aux polymorphismes du gène de la eNOS chez l'homme. En effet, des polymorphismes communs de la eNOS ont été retrouvés chez les patients hypertendus (Fernandez et al. 2004). De même, il a été mis en évidence que des

variantes du gène de la eNOS sont impliquées dans l'hyperinsulinémie, l'insulinorésistance et le DT2 (Monti et al. 2003).

De façon intéressante, il a été montré que les souris déficientes pour le gène de la eNOS affichaient plusieurs des composantes du SyndMet, y compris l'hypertension, la dyslipidémie, l'insulinorésistance et une prise de poids accrue (figure 28) (Duplain et al. 2001; Cook et al. 2003; Carlstrom et al. 2010).

D'autre part, plusieurs travaux ont mis en évidence des effets bénéfiques de la complémentation en arginine sur les composantes du SyndMet. Il a ainsi été montré, chez l'homme, qu'une complémentation orale à long terme en arginine, diminuait la masse adipeuse chez les patients obèses atteints de DT2 (Lucotti et al. 2006). De même, chez l'animal, il a aussi été montré que le traitement de rats obèses diabétiques avec de l'arginine, réduisait la masse du tissu adipeux blanc et augmentait le tissu adipeux brun (Jobgen et al. 2009). De plus, la sensibilité à l'insuline semble aussi être améliorée en réponse à une complémentation en arginine (Wu & Meininger 2009). Ces effets de l'arginine sont en partie attribués à l'activation de la voie mTOR, mais aussi à la modulation de la voie de signalisation du NO.

***

En conclusion, nous pouvons constater que le métabolisme secondaire de l'arginine et de la cystéine est fortement impliqué dans les processus physiopathologiques liés au SyndMet. Les métabolites bioactifs qui dérivent de ces deux acides aminés, ainsi que les voies métaboliques qui les impliquent, sont donc des cibles d'intérêt dans les stratégies de prise en charge du SyndMet. Plusieurs données de la littérature scientifique nous ont permis de formuler l'hypothèse d'une possible modulation nutritionnelle de ces voies par les AGPI n-3 (chapitres IV et V). La voie de régulation génique via le PPARα est un des mécanismes candidats qui pourraient être à l'origine des régulations du métabolisme de l'arginine et de la cystéine par les AGPI n-3, et c'est principalement cette voie que nous avons explorée lors de ce travail. Le chapitre suivant à pour objectif de synthétiser les données sur lesquelles nous nous sommes basés pour formuler cette hypothèse.

IV. Régulation du métabolisme des acides aminés via la voie du PPAR α

1. PPARα, définition activation et mode d'action

1.1. Définitions

Les PPARs sont des facteurs de transcription initialement identifiés pour leur capacité à être activés par les proliférateurs de peroxysomes, molécules pharmacologiques utilisées dans le traitement des hyperglycémies et des hyperlipidémies (Kliewer et al. ,1997). Plusieurs isoformes du PPAR ont été caractérisés :

- le PPARα, principalement exprimé dans les tissus impliqués dans le catabolisme des acides gras comme le foie, le cœur, le muscle squelettique, le rein, le pancréas et la muqueuse intestinale. Le PPARα est aussi exprimé par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages.
- le PPARγ, exprimé essentiellement dans les tissus adipeux blanc et brun et les macrophages.
- le PPARβ/δ, exprimé de façon ubiquitaire.

Les PPARs forment le groupe C de la sous-famille 1 dans la super-famille des récepteurs nucléaires hormonaux, nommée NR1C. Nous allons nous focaliser dans la suite de ce manuscrit sur l'isoforme alpha.

1.2. Ligands de PPARα

Le PPARα est activé par une vaste gamme de ligands naturels et synthétiques. Les ligands synthétiques les plus importants sont les fibrates (ex : WY14643, clofibrate, gemfibrozil, fenofibrate et bézafibrate), une classe de médicaments hypolipémiants, généralement prescrits pour le traitement des dyslipidémies. PPARα est aussi activé par les pesticides et les insecticides. Les ligands naturels du PPARα sont principalement les acides gras, ainsi qu'un certain nombre de leurs dérivés, tels que les acyl-CoA, les acides gras oxydés et les eicosanoïdes. Les acides gras saturés et monoinsaturés sont généralement considérés comme de faibles activateurs du PPARα aux concentrations physiologiques. Les meilleurs ligands naturels paraissent être les AGPI, avec un potentiel activateur des AGPI n-3 supérieur à celui des n-6. (Jump 2002).

1.3. Mode d'action du PPARα

A l'état inactivé, le PPARα est lié à des éléments co-répresseurs, situés dans le cytoplasme de la cellule. Lorsque le PPARα fixe un de ses ligands, les co-répresseurs sont remplacés par des éléments co-activateurs. Le récepteur PPARα activé est transloqué dans le noyau de la cellule. Il se dimérise avec le récepteur à l'acide rétinoïque (RXR), lui-même activé par l'acide 9-cis rétinoïque. Un hétérodimère PPARα-RXR est ainsi formé. Cet hétérodimère peut alors se lier à l'ADN sur un élément de réponse appelé PPAR-Response Element (PPRE) constitué de deux demi-sites AGGTCA séparés par un ou deux nucléotides. Une fois ce complexe lié à l'ADN, la transcription est activée (figure 29). Le récepteur PPARα activé par son ligand peut également réguler négativement l'expression de certains gènes par une transrépression transcriptionnelle (Xu et al. 2001). Le PPARα peut ainsi réguler l'expression de gène-cibles codant pour des protéines fonctionnelles telles que les enzymes, et peut aussi exercer des régulations indirectes via d'autres facteurs de transcription qui à leur tour peuvent moduler l'expression de leurs gènes-cibles.

2. Mise en évidence des effets pléotropiques du PPARα

PPARα a été découvert au début des années 1990 et a, depuis lors, été identifié comme le maître régulateur du métabolisme lipidique au niveau hépatique. Ces dernières années, le développement des technologies de puce à ADN a permis l'étude de profils d'expression de génomes entiers. Combinées avec des données utilisant des méthodes plus classiques, les puces à ADN ont permis la génération d'une image de plus en plus complète de l'impact du PPARα sur l'expression de gènes, fournissant ainsi un aperçu du rôle fonctionnel de PPARα. Selon les résultats de ces études, le PPARα semble être un régulateur important de divers processus métaboliques, principalement au niveau hépatique. Il serait aussi impliqué dans la réponse inflammatoire, dans le métabolisme des xénobiotiques et dans l'homéostasie énergétique. Le PPARα régule, directement ou indirectement, la transcription des gènes-clés de l'oxydation mitochondriale et peroxisomale, de la lipogenèse et du transport des acides gras. Il régule aussi les gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines, du cholestérol, du glucose et du glycérol. De plus, un nombre croissant de données suggère que le PPARα régule le métabolisme des acides aminés (pour revue(Rakhshandehroo et al. 2010).

3. Implication du PPARα dans la régulation du métabolisme des acides aminés

Les preuves permettant de mettre en évidence l'implication du PPARα dans la régulation du métabolisme des acides aminés reposent sur :

- L'identification des gènes du métabolisme des acides aminés sensibles à l'invalidation ou à l'activation spécifique du PPARα par des agonistes pharmacologiques. Ces études utilisent des méthodes de biologie moléculaire, qualitatives ou quantitatives (puces à ADN, Northern blot et qPCR).
- L'observation de modifications du métabolisme des acides aminés ou des conséquences fonctionnelles qui leur sont liées, suite à l'invalidation, à l'inhibition ou à l'activation du PPARα par des ligands synthétiques. Ces études sont basées principalement sur les modèles animaux et sur des méthodes *in vitro*.

Ainsi, l'exploration des gènes-cibles du PPARα a révélé son implication dans la régulation des gènes du **catabolisme et de la synthèse des acides aminés**.

Tout d'abord, le PPARα semble inhiber les gènes impliqués dans la transamination (ex : l'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartame aminotransférase (ASAT)) et la désamination (glutaminase et glutamate déshydrogénase) des acides aminés. Ces enzymes sont responsables de la dégradation des acides aminés en excès et de leur conversion en ammonium transformé ensuite en urée via le cycle de l'urée puis éliminé par le rein.

En effet, l'étude du groupe de Kersten a montré en 2001 que l'invalidation du PPARα chez la souris, augmente globalement la transcription des enzymes de la désamination et de la synthèse des dérivés d'acides aminés. Dans la même étude, l'administration par voie orale d'un ligand pharmaceutique de PPARα, le WY14643 aux souris de type sauvage, diminue, au niveau hépatique, l'expression des enzymes impliquées dans la transamination et la désamination, à l'exception de la forme mitochondriale de l'ASAT dont le taux d'ARNm semble être augmenté par le WY14643 (Kersten et al. 2001). En accord avec ces observations, une étude plus fragmentaire portant sur l'ALAT et l'ASAT, avait rapporté que le taux d'ARNm hépatique des deux enzymes est approximativement deux fois plus élevé dans le foie des souris déficientes en PPARα que chez celles de type sauvage. Dans cette étude, le traitement des souris de type sauvage par le fénofibrate diminue les taux d'ARNm de l'ASAT et de l'ALAT, respectivement de 81 % et 42 % chez les souris témoins, alors qu'aucune variation n'a été observée chez les souris déficientes en PPARα (figure 30) (Edgar et al.

1998). Ces données montrent que l'invalidation du PPARα active la désamination et la transamination des acides aminés, et que son activation par le fénofibrate provoque logiquement l'effet contraire. En revanche, le traitement de cellules hépatiques humaines en culture par des fibrates, augmente l'expression des transaminases (Edgar et al. 1998; Thulin et al. 2008). Ces données sont en désaccord avec les résultats obtenus chez la souris. La discordance entre les deux espèces quant à l'effet des fibrates sur l'expression des transaminases, reste pour l'instant inexpliquée.

Outre les transaminases, d'autres enzymes du catabolisme et de la synthèse des acides aminés semblent être modulées par le PPARα. Dans l'étude de Makowski et coll., la mesure au niveau du muscle squelettique de l'expression du gène de l'isovaléryl-CoA déshydrogénase, enzyme impliquée dans le catabolisme des acides aminés branchés, a révélé une augmentation du taux d'ARNm chez les souris déficientes en PPARα dans des conditions de jeûne, alors qu'aucun effet n'a été observé chez les souris de type sauvage, suggérant une activation du catabolisme des acides aminés par le jeûne chez les souris déficientes en PPARα (Makowski et al. 2009).

Les enzymes du cycle de l'urée à savoir la carbamoyl phosphate synthase 1 (CPS1), l'ornithine transcarbamylase (OTC), l'argininosuccinate synthétase (ASS), l'argininosuccinate lyase (ASL) et l'arginase (ARG), sont aussi régulées par le PPARα. L'expression des gènes des enzymes CPS1, OTC, ASS et ASL sont inhibées suite à l'activation de PPARα par des fibrates (Kersten et al. 2001) (figure 31). L'arginase constitue une exception: elle semble être surexprimée après activation du PPARα par des ligands pharmacologiques chez la souris de type sauvage mais, paradoxalement, elle l'est aussi chez les souris invalidées pour PPARα (Kersten et al. 2001) (Chu et al. 2004).

Pour la souris, les revues de Mandard et coll. et plus récemment celle de Rakhshanderhoo, compilent des listes complètes de gènes régulés par le PPARα, dont ceux du métabolisme des acides aminés (Mandard et al. 2004; Rakhshandehroo et al. 2010). Par contre, il est important de remarquer que, chez l'homme, ce domaine d'étude est presque inexploré. Des auteurs affirment avoir observé une diminution globale de l'expression de nombreux gènes du métabolisme des acides aminés après traitement de cellules sanguines mononuclées humaines par le WY14643, mais n'ont pas donné d'informations précises (Bouwens et al. 2008).

Ces régulations géniques du métabolisme des acides aminés par le PPARα, semblent avoir des conséquences fonctionnelles. En effet, l'activation et l'invalidation du PPARα influencent les **concentrations** tissulaires et circulantes **en acides aminés**. Dans l'étude de Sheikh et coll. réalisée chez le rat, 12 des 22 acides aminés ont vu leurs concentrations plasmatiques augmentées après traitement des souris par le WY14643, incluant les acides aminés glucoformateurs et les acides aminés cétogènes. Dans cette étude, l'arginine est le seul acide aminé dont la concentration a été diminuée par l'activation du PPARα (Sheikh et al. 2007) (figure 32). En accord avec cela, la mesure des concentrations en acides aminés dans le muscle squelettique des souris déficientes en PPARα a montré une diminution des teneurs en plusieurs acides aminés en comparaison avec les souris de type sauvage (Makowski et al. 2009). En parallèle, il a aussi été rapporté que **l'urémie** à jeun était plus élevée chez les souris déficientes en PPARα, ce qui pourraient être la conséquence fonctionnelle d'un catabolisme plus important des acides aminés chez ces souris (figure 33) (Kersten et al. 2001).

L'ensemble de ces travaux met en évidence l'implication du PPARα dans le métabolisme des acides aminés incluant: la biosynthèse, la transamination, la désamination, le cycle de l'urée, et le métabolisme des produits dérivés. L'hypothèse avancée par certains auteurs est que le PPARα, particulièrement lors des phases de jeûne, intervient pour réduire l'oxydation des acides aminés au détriment de celle des acides gras, dont il stimule la β-oxydation et contribuerait à préserver les acides aminés.

***

Notre hypothèse est qu'une modification de l'homéostasie des acides aminés pourrait affecter leur disponibilité pour les différentes voies métaboliques. Une diminution du catabolisme des acides aminés sous le contrôle de PPARα pourrait moduler leur orientation et affecter les flux d'acides aminés entrant dans des voies métaboliques secondaires. Ainsi, des variations dans le métabolisme de la cystéine et l'arginine pourraient moduler leur utilisation dans les voies de production du glutathion et du monoxyde d'azote.

4. Implication du PPARα dans le métabolisme secondaire de l'arginine : voie de synthèse du NO

L'effet bénéfique sur la santé vasculaire est une des actions attribuées au fibrates, ligands synthétiques du PPARα. Plusieurs essais cliniques ont mis en évidence une réduction de la progression de l'athérosclérose et une diminution de l'incidence des maladies coronariennes

suite à un traitement par les fibrates (Frick et al. 1997; Lancet 2001). Les fibrates améliorent la fonction endothéliale, en augmentant la vasodilatation dépendante de l'endothélium, chez les patients atteints de DT2 et chez les individus non-diabétiques présentant une hyperlipidémie ou une maladie coronarienne (Evans et al. 2000; Playford et al. 2002). Par ailleurs, le PPARα semble aussi avoir des effets antihypertenseurs. En effet, les souris déficientes en PPARα montrent une pression artérielle plus élevée que les souris de type sauvage (Newaz et al. 2005). En accord avec cela, l'activation du PPARα par les fibrates diminue la pression sanguine chez le rat hypertendu (Li et al. 2009). Les mécanismes exacts sous-jacents à ces effets bénéfiques sont encore peu élucidés, néanmoins ils impliqueraient les actions anti-inflammatoires et vaso-protectrices décrites pour les fibrates. Selon la littérature, la modulation de la production et de la biodisponibilité du NO est un des mécanismes expliquant les effets protecteurs du PPARα et des fibrates au niveau vasculaire (pour revue (Touyz & Schiffrin 2006)).

En effet, plusieurs études sur des modèles de rongeurs ont révélé une implication du PPARα dans la modulation de la voie de synthèse du NO. Ainsi, l'excrétion urinaire de nitrites (produit final de dégradation du NO) est augmentée de 3 fois environ chez des rats sains traités par des agonistes synthétiques de PPARα (clofibrate ou WY14643). Cette augmentation est abolie par l'administration de L-NAME, un inhibiteur de la NOS (figure 34), suggérant que l'effet observé des fibrates est dû à une augmentation de la production de NO via la NOS (Newaz et al. 2004). De même, une étude récente a montré que l'administration d'un ligand synthétique de PPARα, l'AVE8134, augmentait l'excrétion urinaire des NOx (nitrates et nitrites) chez les rats ayant subi un infarctus du myocarde induit artificiellement. De façon intéressante, dans cette étude, il a été rapporté en parallèle à l'augmentation des NOx une diminution de la concentration plasmatique d'arginine et une augmentation de celle de la citrulline, laissant penser à une utilisation accrue de l'arginine dans la voie de synthèse du NO après activation du PPARα (Linz et al. 2009).

Par ailleurs, l'activité et l'expression de la NOS semblent être modulées et plutôt augmentées par le PPARα, ce qui pourrait expliquer les effets décrit ci-dessus sur le NO. Il a été observé une augmentation de l'activité de la NOS rénale après traitement des souris de type sauvage par le clofibrate, alors qu'aucun effet n'a été retrouvé chez les souris déficientes en PPARα avec le même traitement (figure 35) (Newaz et al. 2005). En accord avec cela, le traitement avec des fibrates augmente l'expression de la eNOS au niveau du muscle cardiaque dans les modèles murins d'ischémie myocardique et de DT2 (figure 36) (Bulhak et al. 2006; Bulhak et al. 2009). D'autres études n'ont rapporté aucune modification de l'expression de la eNOS,

notamment dans le cerveau (Deplanque et al. 2003) et le cœur (Tabernero et al. 2002) de souris après traitement par les fibrates. Ces deux dernières études ont néanmoins constaté des effets bénéfiques des fibrates, notamment, une amélioration de la fonction endothéliale objectivée par la mesure de la vasodilatation NO-dépendante (Tabernero et al. 2002).

Les études mécanistiques *in vitro* confirment l'implication du PPARα dans la modulation de la voie NO/NOS. Le traitement de cellules aortiques bovines (BAEC) avec du bézafibrate stimule le relargage du NO par les cellules en culture, et ceci de façon dose-dépendante (Wang et al. 2006). En même temps, il augmente l'expression (figure 37), le taux protéique et l'activité de la eNOS (Goya et al. 2004; Wang et al. 2006). De façon intéressante, le traitement des BAEC par un antagoniste du PPARα (le RU486) abolit l'effet des fibrates sur le taux protéique de la eNOS (figure 38) (Goya et al. 2004). Cette dernière observation met bien en évidence que ces effets des fibrates sont PPARα-dépendants.

Des résultats similaires ont été observés en utilisant des cellules humaines. Le traitement de cellules du cordon ombilical humain en culture (HUVEC) par les fibrates stimule la production de NO. En accord avec ce qui a été décrit *in vivo* (Newaz et al. 2004), l'effet des fibrates disparait complètement en présence du L-NAME (figure 39), ce qui confirme que l'effet observé implique une augmentation de la production de NO via la NOS. Ceci est conforté par l'observation d'une augmentation de l'expression, mais aussi de la phosphorylation (figure 40) de la eNOS dans les HUVEC après traitement par les fibrates (Murakami et al. 2006; Okayasu et al. 2008).

A la lecture de ces données, nous pouvons conclure que le PPARα est impliqué de façon importante dans la régulation du métabolisme du NO. Par contre, les mécanismes mis en jeu dans ces régulations sont pour l'instant peu explorés et semblent être plutôt complexes. En effet, le promoteur de la eNOS ne possède pas de séquence PPRE et, en conséquence, l'activation du PPARα par le fénofibrate n'augmente pas l'activité du promoteur de la eNOS. Cependant, le fénofibrate semble augmenter la stabilité du messager de la eNOS en affectant la demi-vie de l'ARNm (Wang et al. 2006) (Watts & Staels 2004). Cette observation inhabituelle soulève la question du mécanisme par lequel le PPARα exerce les effets décrits plus haut sur l'expression de la eNOS. Cette question est pour l'instant sans réponse exacte. Une des hypothèses retrouvée dans la littérature serait un effet indirect du PPARα qui affecterait l'expression des facteurs de transcription régissant les voies de signalisation inflammatoire connues pour moduler la production du NO. Ces facteurs de transcription pourraient relayer l'effet du PPARα en régulant l'expression de la eNOS. Cette hypothèse semble plausible, surtout que le promoteur du gène de la eNOS possède les sites de liaison

pour certains de ces facteurs nucléaires ou de transcription dont le NF-kB, l'AP-1 et l'IL-6 (Watts & Staels 2004; Okayasu et al. 2008). Les fibrates pourraient aussi exercer des modulations post-traductionnelles sur la eNOS, sans que cela explique l'augmentation des taux d'ARNm, en provoquant sa phosphorylation suite à l'activation de la voie AMPK/Pi3K par exemple (Murakami et al. 2006; Bulhak et al. 2009).

Nous pouvons constater que, jusqu'à aujourd'hui, aucune étude n'a établi de lien entre les effets du PPARα sur la production du NO et les autres voies d'utilisation de l'arginine. Comme décrit plus haut, le PPARα semble réguler les enzymes du cycle de l'urée et affecte la production d'urée via l'arginase, voie en compétition directe avec la NOS pour l'utilisation de l'arginine. De plus, contrairement à la NOS, le promoteur de l'arginase 1 possède bien une séquence PPRE (Odegaard et al. 2007). Il parait donc intéressant d'explorer en parallèle les effets du PPARα sur ces deux voies d'utilisation de l'arginine à savoir la voie Arginase/urée et la voie NOS/NO.

5. Implication du PPARα dans le métabolisme secondaire de la cystéine : synthèse et utilisation du glutathion

L'activation du PPARα augmente l'oxydation des acides gras au niveau mitochondrial, microsomal et peroxisomal, et cette oxydation est à l'origine d'une production de ROS. Ainsi, l'activation chronique du PPARα avec des agonistes spécifiques pourrait induire un stress oxydant délétère (Teissier et al. 2004). Cependant, il existe des preuves d'un effet protecteur du PPARα via-à-vis du stress oxydant. Ainsi, le traitement avec des fibrates atténue le stress oxydant chez les patients diabétiques (Evans et al. 2000), mais aussi chez le rat (Toyama et al. 2004; Olukman et al. 2010) ou encore chez la souris âgée (Poynter & Daynes 1998). De plus, l'invalidation de PPARα induit des dommages oxydatifs chez la souris (Guellich et al. 2007).

Le système antioxydant enzymatique de l'organisme est constitué de 3 enzymes (GPX, SOD et CAT) qui utilisent le glutathion comme substrat pour permettre de lutter contre les ROS. Le glutathion est l'antioxydant le plus abondant de l'organisme, la cystéine étant l'acide aminé limitant pour sa synthèse qui se déroule principalement dans le foie (partie III/2/2.4/2.4.2 page 41). Comme décrit plus haut, nous avons émis l'hypothèse que le PPARα pourrait moduler la production du glutathion en affectant l'homéostasie de la cystéine. Ce domaine de recherche est pour l'instant inexploré. Néanmoins, quelques rares éléments suggèrent une implication du PPARα dans la modulation de la production ou la biodisponibilité du glutathion. En effet,

chez la souris, l'invalidation du PPARα diminue significativement les concentrations hépatiques de glutathion en condition de jeûne (figure 41) (Abdelmegeed et al. 2009). Inversement, le traitement par les fibrates augmente le contenu hépatique en glutathion (Lores Arnaiz et al. 1997). Ces donnés suggèrent que l'activation du PPARα augmenterait le pool de glutathion. Cependant, les études réalisées *in vitro* vont à l'encontre de ces observations. En effet, il a été observé une diminution des concentrations en glutathion suite au traitement d'hépatocytes humains en culture (HepG2) avec de fortes doses de fénofibrate, alors que les faibles doses n'affectent pas les contenus intracellulaires en glutathion (Jiao & Zhao 2002). De même, l'incubation de macrophages d'origine humaine ou murine avec des agonistes de PPARα diminue les concentrations cellulaires en glutathion pendant les premières 24 heures d'incubation (Teissier et al. 2004). Il reste donc difficile de conclure quant à l'effet exact du PPARα sur la modulation du pool de glutathion. De même, aucune donnée n'est disponible quant aux effets de l'invalidation ou de l'activation spécifique du PPARα par des agonistes pharmaceutiques sur les enzymes (telles que la γGCL), responsables de la voie de synthèse du glutathion à partir de la cystéine.

Il existe plus de données bibliographiques concernant la modulation des enzymes antioxydantes (voie d'utilisation du glutathion) par le PPARα. Pour ce qui est de la GPX, chez l'homme, le traitement de patients atteints de dyslipidémie pendant 8 semaines avec des fibrates augmente l'activité de la GPX dans les érythrocytes de 80 % par rapport à la valeur initiale (Tkac et al. 2006). Les données chez l'animal sont plutôt divergentes. D'un côté, l'invalidation du PPARα ne semble pas affecter significativement l'activité et l'expression de la GPX ni au niveau hépatique (Abdelmegeed et al. 2009) ni au niveau cardiaque (Guellich et al. 2007). De l'autre, le traitement des rats par les fibrates augmente l'expression hépatique de la GPX2 (Nishimura et al. 2008).

L'expression et l'activité de la SOD sont diminuées chez la souris déficiente en PPARα au niveau hépatique et cardiaque (Guellich et al. 2007; Abdelmegeed et al. 2009). En accord avec cela, le traitement par les fibrates stimule l'expression (figure 42) et l'activité hépatiques de la SOD chez le rat (Toyama et al. 2004; Nishimura et al. 2008) (Inoue et al. 1998). Ces données sont confirmées par les résultats obtenus *in vitro* sur les cellules humaines en cultures. En effet, le traitement de cellules HUVEC par le bézafibrate augmente l'expression de la SOD1 ainsi que son taux protéique (figure 43) (Inoue et al. 2001). De même, l'activité de la SOD2 est augmentée après traitement de cellules hépatiques HPG2 humaines par le clofibrate (Becuwe et al. 1999).

Concernant la CAT, la déficience en PPARα diminue son activité chez la souris à jeun (Abdelmegeed et al. 2009), mais pas à l'état nourri (Guellich et al. 2007; Abdelmegeed et al. 2009), alors que le traitement par les fibrates stimule l'activité et l'expression hépatiques de la CAT chez le rat (Toyama et al. 2004; Nishimura et al. 2008).

Malgré quelques discordances, les conclusions des auteurs soutiennent majoritairement l'hypothèse que l'activité et/ou l'expression des enzymes antioxydantes seraient plutôt stimulées suite à l'activation de PPARα.

Il est important de noter que parmi ces enzymes, seule la SOD1 présente une séquence de liaison PPRE (Yoo et al. 1999) ce qui laisse supposer une régulation indirecte des autres enzymes du système antioxydant par le PPARα. Une des possibilités serait que les effets observés soient plutôt la réponse du système antioxydant à une variation de l'état de stress oxydant de l'organisme et non un effet direct de la régulation générique via le PPARα.

***

En conclusion, ces données décrivant les conséquences de l'activation spécifique du PPARα ou de son invalidation, sont une preuve de l'implication de ce facteur de transcription dans la modulation du métabolisme secondaire des acides aminés. Le PPARα exercerait des effets directs ou via d'autres facteurs de transcription, et permettrait de moduler l'utilisation des acides aminés entre les voies de catabolisme et de synthèse de dérivés bioactifs. Les AGPI n-3, ligands naturels de PPARα seraient eux-aussi susceptibles de moduler le métabolisme des acides aminés. Cette hypothèse est basée d'un côté sur le mode d'action des AGPI n-3 qui, bien qu'ayant des effets pléïotropiques, exercent leur action de régulation génique principalement via le PPARα. Ceci est particulièrement vrai au niveau du foie. En effet, il a été montré que l'impact des AGPI n-3 sur la régulation des gènes hépatiques était PPARα-dépendant, et reproduirait en partie les effets des agonistes synthétiques (figure 44) (Sanderson et al. 2008). D'un autre coté cette hypothèse est confortée par les études décrivant des effets des AGPI n-3 sur le métabolisme secondaire des acides aminés et plus spécifiquement de leurs dérivés bioactifs. Ce sont ces études qui seront décrites principalement dans le paragraphe suivant.

V. Régulation du métabolisme secondaire de l'arginine et de la cystéine par les AGPI n-3

Les données issues de recherches en nutrition clinique et épidémiologique chez l'homme, mais aussi les études nutritionnelles d'intervention chez l'animal, suggèrent que les AGPI n-3 jouent un rôle dans la prévention nutritionnelle du SyndMet. Les AGPI n-3 semblent contribuer à l'amélioration des composantes et des complications du SyndMet par une action pléiotropique affectant, entre autres, le statut oxydant et la fonction endothéliale, processus qui impliquent de près les voies du métabolisme secondaire de l'arginine et de la cystéine. De plus, les études d'interventions chez l'homme et chez l'animal, mais aussi les expérimentations *in vitro* ont permis de repérer les voies du métabolisme de l'arginine et de la cystéine sensibles aux AGPI n-3 et pouvant être impliqués dans leurs effets pléiotropiques. Le croisement entre ces données bibliographiques suggère une régulation possible du métabolisme secondaire de l'arginine et de la cystéine, par les AGPI n-3.

1. Effets et conséquences de la régulation du métabolisme secondaire de l'arginine par les AGPI n-3

1.1. AGP n-3 et fonction endothéliale

Les bénéfices des AGPI n-3 au niveau cardiovasculaire sont souvent attribués à leur effet sur le métabolisme des lipides, des lipoprotéines et du cholestérol, mais aussi à leurs actions anti-arythmiques, anti-thrombotiques et anti-inflammatoires. Cependant, les AGPI n-3 semblent aussi protéger contre l'initiation et la progression des maladies cardiovasculaires en diminuant la pression artérielle et en améliorant la fonction endothéliale (Brown & Hu 2001). Les processus spécifiques régissant l'effet bénéfique des AGPI n-3 sur la fonction endothéliale sont encore mal connus; néanmoins, un nombre croissant d'études suggère une stimulation de la vasodilatation dépendante de l'endothélium par les AGPI n-3. Ceci a été observé chez l'homme sain, hyper-cholestérolémique ou à risque cardiovasculaire (Goodfellow et al. 2000; Khan et al. 2003; de Berrazueta et al. 2009), mais aussi dans des modèles animaux (Engler & Engler 2000; Omura et al. 2001). Cette action vasodilatatrice des AGPI n-3 serait due en partie à une augmentation de la production et/ou de la biodisponibilité du NO, molécule-clef régulant le tonus vasculaire et ayant des effets antiathérogènes avérés (partie III/4 page 44).

1.2. Modulation du métabolisme secondaire de l'arginine par les AGPI n-3 : voie de synthèse du NO

Chez l'homme sain, peu études ont exploré les effets des AGPI n-3 sur la production du NO. Dans l'étude en simple aveugle de Harris et coll. (1997), les volontaires recevant une complémentation d'huile de poisson (5g/jour pendant 3 semaines) ont vu leurs taux urinaires de NOx (nitrates+nitrites, produits de dégradation du NO) augmenter, et ceci par rapport aux mesures faites après une période placebo pendant laquelle les volontaires ont reçu de l'huile d'olive. Dans cette même étude, aucun effet sur les NOx n'a été reporté chez le groupe d'individus ayant reçu de l'EPA purifié à la place des huiles de poissons. L'excrétion d'urée urinaire est restée inchangée chez les individus des deux groupes (huile de poisson et EPA) (Harris et al. 1997). Dans une étude plus récente, la complémentation du régime d'individus sains avec de l'huile de poisson à des doses proches de celle de l'étude précédente (6 g/j) pendant 8 semaines, a permis d'augmenter les concentrations plasmatiques de NOx, cette augmentation allant de 12 à 112 % de la valeur de concentration de NOx initiale de chaque individu (figure 45) (Piolot et al. 2003).

Ces observations chez l'homme sont cohérentes avec celles obtenues *in vivo* chez l'animal. Les apports d'AGPI n-3 augmentent la biodisponibilité du NO, estimée indirectement par la mesure des concentrations de nitrates et de nitrites plasmatiques, chez des rats sains ayant reçu une dose d'huile de poisson de 0,4g/kg pendant 30 jours (Erdogan et al. 2004). Ce résultat a été confirmé dans un modèle de rats hypertendus en réponse à une dose orale de 500 mg d'ALA. Quatre heures après l'administration de cette charge, les concentrations de NOx plasmatiques des rats ayant reçu l'ALA étaient supérieures à celles des rats témoins ayant reçu une dose d'huile de tournesol (figure 46) (Sekine et al. 2007). De même, chez le rat sain ou diabétique recevant une dose d'EPA (100 mg/j) pendant 6 semaines, les auteurs ont rapporté une augmentation significative de l'excrétion de nitrates urinaires par rapport aux animaux recevant de l'eau à partir de la 5éme semaine de complémentation en EPA. Dans cette étude, les rats diabétiques ont été répartis en 3 groupes recevant en même temps que la dose d'EPA de 100 mg/j, de l'arginine pour le premier, un inhibiteur de la NOS (L-NNA) pour le second et de l'eau pour le troisième, et ceci pendant 7 jours. Aucun effet de la complémentation en arginine n'a été observé; par contre, l'administration du L-NNA a fortement diminué (3 fois) l'excrétion de nitrites urinaires par rapport au groupe témoin (Nishimura et al. 2000). Selon ces études, l'apport en AGPI n-3 semble donc stimuler la

production ou la biodisponibilité du NO corps entier; l'atténuation de cet effet en présence d'inhibiteur de la NOS laisse supposer que les AGPI n-3 modulent de la production de NO via la NOS.

A côté de ces observations *in vivo* chez l'homme et chez l'animal, d'autres travaux ont tenté de déterminer *in situ* et *ex vivo*, principalement au niveau aortique, les mécanismes d'action des AGPI n-3 sur la production du NO. Les travaux de Lopez et coll. ont montré *in situ* que l'administration à des rats sains d'un régime à faible teneur en lipides (5 %) mais riche en huile de menhaden, un poisson gras, permet de doubler la production de NO par les segments d'aortes isolées par rapport à un régime riche en huile de maïs. Les résultats obtenus sur les aortes isolées montrent une augmentation de l'expression (figure 47) et de la quantité de protéine de la eNOS (70 % par rapport au régime riche en acides gras saturés), ainsi que de l'activité de l'enzyme (102 %). Cette équipe a aussi montré, dans les broyats d'aorte, une diminution significative de l'arginine et une augmentation de la citrulline suite à la complémentation en huile de poisson, ce qui pourrait être expliqué par une utilisation accrue de l'arginine dans la voie de synthèse du NO (figure 48). Ces travaux sont à notre connaissance les seuls ayant exploré de façon directe le métabolisme secondaire de l'arginine suite à l'administration d'un régime riche en huile de poisson (Lopez et al. 2001; Lopez et al. 2004; Lopez et al. 2008).

Ces observations *in situ* sont en concordance avec les résultats obtenus *ex vivo*. Dans une étude récente, il a été montré qu'une courte incubation d'anneaux d'artères pulmonaires de mouton avec 30 µM d'EPA augmentait la production de nitrites (figure 49) (Singh et al. 2010). Les auteurs ont rapporté que l'effet de l'EPA était significativement atténué en cas de prétraitement avec du L-NAME (un inhibiteur de la NOS), mais aussi dans le cas où les anneaux d'artères avaient été dénudés de leur endothélium. Précisons que lors de cette étude, tous les segments d'artères avaient été prétraités avec un inhibiteur spécifique de la iNOS ; les observations des auteurs rejoignent donc celle de Lopez et coll. et confirment que les effets des AGPI n-3 passent par une stimulation de la production de NO *via* la eNOS.

Plusieurs études *in vitro* ont aussi révélé que les AGPI n-3 stimulent la production de NO par les cellules endothéliales humaines en culture. Le traitement des cellules endothéliales du cordon ombilical humain (HUVEC) avec de l'EPA stimule la production de nitrites et prévient sa diminution dû à un stress hyper-glucosé (Okuda et al. 1997; Omura et al. 2001). Par contre, l'effet *in vitro* du DHA semble plus controversé. Le DHA n'a aucun effet sur la production de NO par les HUVEC traitées avec 50 µM pendant 5 mn (Omura et al. 2001). Néanmoins, il semble stimuler la production de NOx par les cellules endothéliales coronaires

(HCAEC) à de plus faibles doses (50 nM) et pour des durées de traitements plus longues (Stebbins et al. 2008).

A notre connaissance, la seule étude ayant traité des effets de l'ALA *in vitro* a montré que le traitement de cellules HUVEC par des doses d'ALA (de 10 à 100 µmol/L) atténue significativement l'inhibition de la production de NO (figure 50) et la diminution de la phosphorylation de la eNOS (figure 51) qui sont induits par un stress hyper-glucosé. Dans cette étude, les effets de l'ALA sont atténués par l'ajout d'un inhibiteur de la NOS ce qui confirme, comme nous l'avons vu dans les études précédentes, que l'effet des AGPI n-3 sur le NO passerait par une régulation de sa production via la NOS (Zhang et al. 2007). L'ALA semble donc avoir des effets similaires à ceux des dévié AGPI n-3 LC.

1.3. Mécanismes mis en jeu par les AGPI n-3 dans la régulation du métabolisme secondaire de l'arginine

Les études présentées ci-dessus démontrent clairement un effet bénéfique des AGPI n-3 sur la production du NO à partir de l'arginine. Jusqu'à aujourd'hui, les mécanismes d'action cellulaires et moléculaires sous-jacents sont très mal élucidés. Néanmoins, il semble clair que l'activation de la eNOS est un des mécanismes importants expliquant les effets des AGPI n-3 sur la production du NO. Les AGPI n-3 affecteraient l'activité de la eNOS via des modulations post-transcriptionnelles, en augmentant de façon directe ou indirecte sa translocation et sa phosphorylation. Plusieurs hypothèses sont avancées par les auteurs pour expliquer cette activation. Tout d'abord, l'incorporation des AGPI n-3 LC dans les phospholipides des cellules endothéliales augmente la fluidité des membranes, ce qui pourrait participer à la translocation de la eNOS. Mais cet effet n'est possible qu'avec des traitements à long terme (Nishimura et al. 2000). Les AGPI n-3 peuvent aussi stimuler les voies de phosphorylation notamment la voie PI3K/Akt/eNOS. L'Akt augmenterait l'activité de la eNOS par phosphorylation après qu'elle soit elle-même phosphorylée via la PI3 Kinase (Zhang et al. 2007; Stebbins et al. 2008). Les AGPI n-3 semblent aussi jouer un rôle de second messager en augmentant les concentrations intracellulaires de Ca^{++}, provocant l'activation du système Ca^{++}calmoduline de la eNOS et stimulant ainsi sa translocation des cavéoles vers le cytosol (Okuda et al. 1997; Omura et al. 2001; Sekine et al. 2007). Pour ce qui est des possibles modulations transcriptionnelles, aucune hypothèse n'a été formulée par les auteurs afin d'expliquer l'augmentation de l'expression de la eNOS observée dans l'étude de Lopez et al (Lopez et al. 2004). Les modulations du métabolisme de l'arginine, notamment des autres voies d'utilisation, ont été aussi très peu, voire inexplorées, dans ces études.

Par ailleurs, les données concernant les effets des AGPI n-3 sur le métabolisme secondaire de l'arginine dans les tissus autres que l'endothélium vasculaire sont encore plus rares. Dans le cerveau de rats recevant un régime enrichi avec de l'huile de poisson riche en DHA (28 %), il a été montré une augmentation significative de l'activité NOS (+33 %) par rapport au animaux recevant un régime enrichi en beurre (Engstrom et al. 2009).

A notre connaissance, aucune étude n'a exploré ce métabolisme dans le foie, pourtant siège important du métabolisme des acides aminés.

Il nous semble donc intéressant d'étudier en parallèle l'effet des AGPI n-3 sur la modulation de la synthèse et de la biodisponibilité du NO, et les autres voies d'utilisation de l'arginine, principalement la voie de synthèse de l'urée via l'arginase, qui rentre en compétition directe avec la NOS.

2. Effet des AGPI n-3 sur le métabolisme secondaire de la cystéine, implication dans le statut oxydant

2.1 AGPI n-3 et statut oxydant

Parmi les propriétés des AGPI, notamment ceux à longue chaîne (tels l'EPA et le DHA), on note une forte oxydabilité qui leur est conférée par la présence de doubles liaisons sensibles à l'oxygène. La peroxydation de ces acides gras fournit une variété de produits pouvant être à l'origine d'un stress oxydant et affectant la stabilité des lipides, des lipoprotéines et des acides nucléiques. Une telle peroxydation est impliquée dans l'étiologie d'un certain nombre de maladies, y compris des maladies cardiovasculaires (Yagi 1987). Quelques études ont observé une augmentation des marqueurs de peroxydation et de stress oxydant suite à l'ingestion de fortes doses d'AGPI n-3 (Meydani et al. 1991; Allard et al. 1997). Cependant, les effets des AGPI n-3 sur la peroxydation lipidique et le stress oxydant restent discutables. En effet, la complémentation quotidienne du régime de femmes post-ménopausées (Higdon et al. 2000) ainsi que de sujets atteints de DT2 (Mori et al. 2003) avec des doses relativement élevées d'AGPI n-3 (3 g/j et plus), réduit le stress oxydant. Les doses nutritionnelles d'AGPI n-3 semblent aussi avoir des effets antioxydants. A titre d'exemple, chez l'homme sain, il a été démontré qu'une supplémentation de 200 mg/j avec du DHA pendant 2 semaines avait un effet antioxydant objectivé par l'augmentation des concentrations plaquettaires en vitamine E (alpha-tocophérol) (Guillot et al. 2009). De la même façon, les études *in vitro* suggèrent un effet antioxydant des AGPI n-3 LC (revue de (Richard et al. 2008)). Même si les mécanismes exacts régissant ces effets antioxydants des AGPI n-3 ne sont pas complètement compris, il

semblerait que ces acides gras inhibent les systèmes pro-oxydants (Massaro et al. 2006) et stimulent les systèmes antioxydants (Arab et al. 2006).

2.2 Modulation du métabolisme secondaire de la cystéine par les AGPI n-3 : voie de synthèse du glutathion

La biodisponibilité de la cystéine est un des facteurs limitant pour la synthèse du glutathion, un des plus puissants antioxydants intracellulaires. A ce jour, aucune étude ne s'est intéressée directement aux effets des AGPI n-3 sur le métabolisme secondaire de la cystéine en tant que précurseur du glutathion. Dans les études présentées ci-dessous, les mesures du taux de synthèse du glutathion, de son état d'oxydation ainsi que des activités protéiques associées à son métabolisme, sont explorées en tant que marqueurs de l'état de stress oxydant de l'organisme en réponse aux modulations de l'apport en AGPI n-3.

Chez l'homme, les données sur ce sujet sont très limitées. A notre connaissance, il existerait deux études plutôt contradictoires. Dans l'étude de Foulon et coll. (1999), 19 volontaires sains ont reçu 6 g/j d'huile de poisson (1,8 g de n-3 /j) pendant 3 semaines. Les taux sanguins de glutathion réduit (forme protectrice) ont diminué chez ces volontaires (Foulon et al. 1999). Dans une étude mexicaine, une cinquantaine de personnes âgées, exposées à des particules polluantes connues pour induire un stress oxydant, ont reçu 2 g/j d'huile de poisson contenant 52 % de DHA et 25 % d'EPA. Après 4 mois de complémentation, l'huile de poisson a eu un effet protecteur contre la diminution des concentrations plasmatiques de glutathion, induite par le stress oxydant (Romieu et al. 2008).

Chez l'animal, il existe plus de preuves quant à la modification du taux de glutathion par l'apport en AGPI n-3. Dans une récente étude, des rats sains ont reçu pendant 6 semaines des régimes témoins à faible teneur en lipides (10 % de l'énergie) ou des régimes d'induction à forte teneur en lipides (40 % de l'énergie), les sources de lipides étant soit du saindoux, soit de l'huile de poisson équilibrée en AGPI n-6 avec 10 % d'huile de soja. Dans cette étude, les concentrations érythrocytaires de glutathion, ainsi que le rapport entre le glutathion total et oxydé, ont été augmentées chez les animaux ayant reçu de l'huile de poisson, et ceci indépendamment de la teneur en lipides du régime (figure 52). Les concentrations de glutathion oxydé n'ont été affectées, ni par la variation de la quantité de lipides ni par l'apport en AGPI n-3 (Walczewska et al. 2010). Dans un modèle d'insuffisance cardiaque accompagnée d'une déficience du système antioxydant chez le rat, la complémentation chronique et aigue du régime des rats avec un mélange d'AGPI (450 mg/kg/j) composé de

30% d'ALA, 17% d'EPA et 3% DHA a augmenté, au niveau cardiaque, l'activité de la γGCL ainsi que le glutathion total et réduit, et a diminué le glutathion oxydé (Fang et al. 2011). Cette étude est la seule ayant démontré *in vivo* un effet des AGPI n-3 sur l'activité de la γGCL, enzyme limitante de la synthèse du glutathion (Fang et al. 2011). De même, dans un modèle murin de colite induite chimiquement par du TNBS (2,4,6-trinitrobenzène), la complémentation du régime des rats avec de l'huile de cameline riche en ALA, 7 jours avant l'induction de la colite et 7 jours après, a permis de prévenir la diminution des concentrations coliques de glutathion des animaux traités au TNBS (Hassan et al. 2010) (figure 53). Contrairement à l'homme, les données chez l'animal semblent donc converger vers un effet bénéfique des AGPI n-3. Les AGPI n-3 semblent avoir un effet protecteur sur le statut oxydant : ils modulent le pool de glutathion, probablement *via* une régulation de sa synthèse et semble aussi affecter son statut oxydé-réduit.

De plus, ces effets des AGPI n-3 sur la production ou la biodisponibilité du glutathion au niveau des organes humains et animaux, semblent être confirmés par les études *in vitro*. Le traitement de culture de fibroblastes humains avec des doses croissantes de DHA (entre 5 et 60 µmol/l) pendant 48h a montré une augmentation de l'activité de la γGCL, ainsi que du contenu intracellulaire en glutathion, par rapport aux cellules non traitées, à partir de la dose de 30 µmol/l (figure 54). Le même effet a été retrouvé de façon plus significative après 7 jours de traitement à la dose de 30 µmol/l de DHA. Dans cette même étude, une augmentation significative du taux d'ARNm de la γGCL à été observée entre 4 et 48h après le traitement au DHA avec un pic au bout de la 8ème heure de traitement (Arab et al. 2006). Cette observation est à notre connaissance la seule ayant mis en évidence un effet des AGPI n-3 sur l'expression génique de la γGCL. Enfin, le traitement avec des AGPI n-3 de culture de lymphocytes T provenant de patients atteints de diabète de type 1 a provoqué une augmentation des taux de glutathion réduit par rapport au cellules non traitées (Merzouk et al. 2008).

Même si la majorité des résultats de ces études ne dépasse pas le stade de l'observation, ils permettent néanmoins de mettre en évidence une modulation de la biodisponibilité du glutathion, voire une régulation de sa production par les AGPI n-3, sans pour autant pouvoir conclure sur la puissance de ces effets. De même, l'exploration des effets des AGPI n-3 au niveau du foie, premier lieu de synthèse du glutathion, reste à faire.

2.3 Effet des AGPI n-3 sur les enzymes utilisant le glutathion et les enzymes antioxydants

En plus de son potentiel en tant que tampon redox intracellulaire, le glutathion est utilisé par le système antioxydant enzymatique (constitué par 3 enzymes principales la GPX, la SOD et la CAT) afin de faire face aux ROS. Par ailleurs, d'autres enzymes sont impliquées dans le métabolisme du glutathion, telles que la glutathion réductase permettant le recyclage (oxydé/réduit) du glutathion, et la glutathion transférase qui permet sa conjugaison aux xénobiotiques et aux électrophiles. Il semble donc intéressant de s'attarder sur les effets potentiels des AGPI n-3 vis-à-vis de ces enzymes.

Chez l'homme, l'apport quotidien d'huile de poisson (2,1 g/j) à des patients atteints de dyslipidémie et/ou d'hypercholestérolémie, induit l'augmentation des activités plasmatiques des 3 enzymes antioxydantes (GPX, SOD et CAT) au bout de 90 jours (Bouzidi et al. 2010).

Chez le rat, la littérature reste peu convergente quant aux effets des AGPI n-3 sur les enzymes antioxydantes. L'activité hépatique de la GPX semble diminuée chez le rat recevant pendant 60 jours des régimes à base de poudre de lait enrichie en huile de lin riche en ALA ou en huile de poisson par rapport à un régime riche en huile d'arachide (Ramaprasad et al. 2005). A l'inverse, l'activité plasmatique de cette enzyme reste inchangée après une complémentation de 0,4 g/kg d'huile de poisson pendant 30 jours (Erdogan et al. 2004). L'activité de la SOD demeure inchangée au niveau hépatique dans l'étude de Ramaprasad et coll. (2005), alors qu'elle augmente significativement au niveau plasmatique dans celle d'Erdogan et coll. (2004) suite à l'apport d'huile de poisson. Pour la CAT, les données semblent être plus cohérentes. L'activité hépatique de la CAT est augmentée en réponse aux régimes riches en AGPI n-3 (Yamazaki et al. 1987; Ramaprasad et al. 2005).

Au vu de la divergence de ces données, il semble difficile de conclure quant aux effets des AGPI n-3 sur le système enzymatique antioxydant. Néanmoins, les conclusions des auteurs iraient plus vers une stimulation des défenses antioxydantes enzymatiques par les AGPI n-3.

Concernant la glutathion réductase et la glutathion transférase, il existe très peu de données. Ramaprasad et coll. ont montré une augmentation de la glutathion transférase chez les rats sains recevant pendant 60 jours des régimes à base de poudre de lait enrichie en huile de lin ou de poisson par rapport à un régime riche en huile d'arachide (Ramaprasad et al. 2005). Cette donnée est confirmée *in vitro*. L'étude d'Arab et coll., présentée plus haut, a montré, sur des fibroblastes humains traités au DHA, une augmentation des activités de la glutathion réductase et de la glutathion transférase pour des doses de DHA $\geq$ à 15µmol/l (figure 55)

(Arab et al. 2006). Ceci pourrait refléter une stimulation du turn-over du glutathion par les AGPI n-3, ce qui affecterait sa biodisponibilité.

***

En conclusion, nous pouvons constater que les AGPI n-3 modulent le statut oxydant en partie en affectant le pool de glutathion ou son état d'oxydoréduction, mais aussi en affectant son utilisation par les enzymes antioxydantes. Néanmoins, il est clair qu'aucune conclusion ne peut être formulée quant aux mécanismes biologiques régissant ces modulations. De même, les conséquences fonctionnelles d'une éventuelle régulation du métabolisme du glutathion par les AGPI n-3 restent non élucidées. Il semble donc d'intérêt de mettre en place des études qui permuteraient de mettre la lumière sur ces problématiques.

VI. Conclusion des données bibliographiques et hypothèses:

De l'ensemble des données bibliographiques, il ressort que les AGPI n-3 possèdent des effets bénéfiques avérés vis-à-vis des différentes composantes du syndrome métabolique, ainsi qu'au niveau cardiovasculaire. Les AGPI n-3 exercent leurs effets en modulant un spectre de voies métaboliques (métabolisme lipidique, glucidique…) *via* des mécanismes divers (régulation génique, synthèse de médiateurs lipidiques…). Ces actions pléiotropiques des AGPI n-3 et leurs conséquences fonctionnelles ont été principalement décrites pour les AGPI n-3 à longue chaine (EPA et DHA). Cependant, l'acide α-linolénique (ALA, 18:3 n-3) semble exercer des effets de même nature que ses dérivés à longue chaine, notamment sur la régulation du métabolisme lipidique. Néanmoins, les mécanismes d'action propres à cet acide gras restent pour l'instant peu étudiés.

A côté des observations épidémiologiques et cliniques mettant en évidence les effets bénéfiques des AGPI n-3, un ensemble d'études descriptives ont souligné le rôle de ces acides gras, dans la modulation de la production, de la biodisponibilité ou de l'utilisation de molécules bioactives dérivant du métabolisme secondaire des acides aminés (tels que le NO et le glutathion). Ces métabolites participent au maintien de fonctions biologiques (telles que la fonction endothéliale et le statut oxydant) impliquées de près dans la physiopathologie du syndrome métabolique.

Sur la base de ces données, nous avons émis l'hypothèse, jusqu'alors inexplorée, qu'une partie des effets favorables des AGPI n-3 sur le SyndMet pourrait être la conséquence fonctionnelle d'une régulation des voies d'utilisation secondaire des acides aminés, et principalement de l'arginine et de la cystéine, en modulant le métabolisme de leurs dérivés bioactifs.

Par ailleurs, nous nous sommes basés d'un côté sur l'hypothèse d'une régulation coordonnée via PPARα de l'utilisation des nutriments, postulant que le PPARα régule le métabolisme des acides aminés au même titre que celui des acides gras et des glucides; et, d'un autre côté, sur les éléments de la bibliographie qui signalent une régulation génique de certaines enzymes du métabolisme des acides aminés par des ligands pharmacologiques de PPARα. **Ceci nous a conduits à supposer que les AGPI n-3, ligands naturels du PPARα apportés par l'alimentation, pourraient réguler les enzymes impliquées dans le métabolisme secondaire de l'arginine et de la cystéine par l'intermédiaire du PPARα.**

Objectifs et choix méthodologiques

Chapitre 2 : Objectifs et choix méthodologiques

1. Objectifs de la thèse

L'objectif principal de ce travail de thèse était de mettre en évidence le rôle de l'apport alimentaire en ALA dans la régulation des voies du métabolisme secondaire des acides aminés, et en particulier les voies du métabolisme de l'arginine et de la cystéine impliquées dans la physiopathologie du syndrome métabolique.

Le second objectif de ce travail était d'évaluer l'importance de la voie du PPARα dans la régulation du métabolisme secondaire des acides aminés par l'ALA

2. Démarche expérimentale

Pour répondre aux objectifs de la thèse, nous avons adopté une démarche de physiologie intégrée.

Dans un premier temps, nous avons adopté une approche *in vivo* permettant d'étudier les conséquences de l'apport alimentaires d'ALA sur les voies du métabolisme des acides aminés au niveau hépatique et "corps entier". Ceci consiste principalement à identifier les voies du métabolisme de l'arginine et de la cystéine modulées par l'apport d'ALA, d'évaluer les conséquences de ces régulations en terme de production de métabolites bioactifs impliqués dans la physipathologie du syndrome métabolique et de comprendre les mécanismes mis en jeu dans ces régulations.

Dans un second temps, nous avons consacré une partie du travail à l'approche *in vitro* en nous focalisant sur l'étude de l'effet de l'ALA sur le métabolisme de l'arginine au niveau de l'organe cible majeur du NO, qu'est l'endothélium. Ceci permet principalement de vérifier si les éventuels effets observés *in vivo* se traduisent en termes de conséquences fonctionnelles mais aussi d'approfondir les mécanismes mis en jeu.

3. Choix des modèles

Le caractère exploratoire de ce travail et le besoin d'accéder à des tissus inaccessibles chez l'homme, tels que le foie, nous a conduits à travailler sur un modèle animal. Nous avons choisi de travailler sur des animaux invalidés pour le gène du PPARα, ce qui nous a amené à adopter un modèle de souris pour toute la partie d'expérimentation *in vivo*.

L’utilisation des souris déficientes pour le gène du PPARα (KO PPARα) représentait un double intérêt : d’un côté, ce modèle de souris nous permettait de mettre en évidence l’implication de ce facteur de transcription dans le métabolisme de l’arginine et de la cystéine. D’un autre côté, les souris KO PPARα sont un modèle intéressant puisqu’elles présentent une partie des anomalies caractéristiques du syndrome métabolique. Elles sont en effet obèses, hypertriglycéridémiques et hypercholestérolémiques, et elles développent une stéatose hépatique prononcée et qui s'aggrave avec l'âge (Costet et al. 1998). La glycémie à jeun des souris invalidées pour PPARα a été décrite comme étant soit normale (Sugden et al. 2002), soit plus basse que chez les souris de type sauvage (Kersten et al. 1999). Ces souris sont considérées comme insulinorésistantes au niveau hépatique (Sugden et al. 2002), mais pas au niveau périphérique (Kersten et al. 1999). De plus, tel que décrit dans la partie IV/3 page 52, ces souris présentent quelques dérégulations du métabolisme des acides aminés. En revanche, elles sont viables, raisonnablement fertiles et ne présentent aucun défaut phénotypique majeur.

Les souris KO PPARα nous ont été fournies par l’équipe de Thierry Pineau (unité ToxALim, INRA/INP, Toulouse) détenteur de la lignée pour la France. Des souris KO de souche C57Bl/6J ont été produites par cette équipe suite au re-croisement de souris mâles invalidées de la souche chimérique Sv129* C57BL/6, créées par l’équipe de F. Gonzalez (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA), avec des souris femelles C57BL/6.

Le choix de la souche (C57Bl/6J) découle donc en premier du besoin de garder un fond génétique identique entre les souris invalidées et du type sauvage, dans le but de pouvoir s’affranchir d’une quelconque différence inter-souche dans l’analyse des réponses aux effecteurs nutritionnels. De plus, les souris C57BL/6J sont décrites comme étant un des meilleurs modèles pour mimer la physiopathologie du syndrome métabolique induit par un régime hypercalorique/hyper-lipidique. En effet, comme c’est le cas chez l’homme, en réponse à un régime hyperlipidique, ces souris développent une adiposité centrale (viscérale), une hyperinsulinémie, une hyperglycémie et une hypertension (Collins et al. 2004). Ceci nous a poussés à mener l’ensemble de nos investigations *in vivo* chez ce modèle animal.

Pour l’étude *in vitro*, il nous a semblé qu'un modèle de cellules endothéliales était le plus approprié pour continuer à explorer les effets de l'ALA sur la production du NO à partir d'arginine et son implication dans la fonction endothéliale. Le choix du modèle des cellules endothéliales bovines BAEC (cellules aortiques bovines) repose sur la similitude entre les

réponses obtenues avec les cellules d'origine humaine telles que les (HUVEC) et celles d'origine bovines. Ces études *in vitro* ont fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe de Dominique Bonnefont-Rousselot et Didier Borderie, EA 4466 Stress cellulaire : Stratégies nutritionnelles et thérapeutiques de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Paris Descartes. Cette équipe a mis à notre disposition son expertise concernant l'utilisation des cellules BAEC et nous a fourni le matériel biologique nécessaire pour mener nos investigations. Cette collaboration, ainsi que la disponibilité de ce modèle de cellules (BAEC) ont donc été déterminantes dans le choix que nous avons effectué.

4. Choix de la composition des régimes

Tel que décrit dans l'introduction bibliographique, le choix de l'ALA comme effecteur nutritionnel repose en premier sur son intérêt économique et physiologique. Ce choix a néanmoins été conforté par les conditions expérimentales d'utilisation des différents AGPI n-3 : d'une part, l'ALA est beaucoup moins sujet aux peroxydations, ce qui facilite son emploi dans les régimes pour rongeurs à long terme; d'autre part, il est possible de faire varier ses apports dans une large plage tout en restant dans un contexte nutritionnel réaliste et compatible avec la nutrition humaine quotidienne. A l'inverse, les AGPI n-3 sont surtout abordés dans un contexte de complémentation nutritionnelle.

Dans un premier temps, nous avons choisi de travailler avec des régimes à faible teneur en lipides (5 %) représentant des apports lipidiques à dose nutritionnelle pour la souris. Ce choix a été basé sur les études antérieures ayant prouvé qu'un faible apport en ALA suffisait pour mettre en évidence des effets chez la souris, notamment au niveau de la régulation génique (Martin et al. 2007).

Dans un second temps, nous avons décidé de nous placer dans des conditions permettant d'augmenter les niveaux d'apport en ALA et de mimer un régime de type occidental riche en énergie et en lipides (50 % de l'énergie et 20 % du poids).

5. Choix des principaux marqueurs

Afin d'explorer les effets des régimes apportant l'ALA ou les conséquences de l'invalidation du gène du PPARα sur le métabolisme de l'arginine, nous avons choisi des marqueurs permettant de rendre compte de l'utilisation de l'arginine dans les voies qui nous intéressent, principalement la voie de synthèse du NO via la NOS, et la voie qui est en compétition avec cette dernière, à savoir la synthèse de l'urée via l'arginase. Nous avons donc mesuré comme

marqueurs principaux : les concentrations des métabolites d'intérêt (nitrates, nitrites et urée) et les taux d'utilisation de l'arginine dans chacune de deux voies. Dans l'hypothèse d'une possible régulation génique de ces voies métaboliques par les AGPI n-3, nous avons évalué les expressions des principales enzymes impliquées (arginase, NOS). La même démarche a été adoptée pour le métabolisme secondaire de la cystéine : nous avons mesuré principalement les concentrations et les pools du glutathion, et des thiols précurseur et intermédiaire de sa synthèse, respectivement la cystéine et la cystéinylglycine, l'expression et l'activité de la γGCL enzyme limitante de la synthèse du glutathion et l'expression de la CDO enzyme en compétition directe avec la γGCL pour l'utilisation de la cystéine. De plus, il nous a semblé indispensable d'évaluer en parallèle l'impact des apports en acides gras sur différents marqueurs fonctionnels, tels que les marqueurs du SyndMet, du statut oxydant ou inflammatoire.

A côté de l'arginine et la cystéine, nous avons aussi exploré plus largement quelques aspects du métabolisme des acides aminés que nous avons repérés dans la littérature et considérés comme pouvant être potentiellement sensibles aux AGPI n-3, tel que les transaminases. Dans ce cadre nous avons aussi exploré l'impact des régimes riches en ALA sur les concentrations plasmatiques des acides aminés, en établissant des aminogrammes complets.

Nous avons aussi décidé d'adopter une approche plus globale afin de continuer à explorer les voies du métabolisme des acides aminés sensibles aux apports en ALA, toujours dans une hypothèse de régulation génique du métabolisme des acides aminés par les AGPI n-3. Pour cela, une étude de transcriptomique a été menée, dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de Pascal Martin et Hervé Guillou (Unité Toxalim, INRA/INP, Toulouse).

Par ailleurs, nous avons effectué une étude calorimétrique pour rendre compte des effets de l'apport en ALA sur l'oxydation des nutriments (lipides, glucides, protéines). Cette approche s'inscrit dans le cadre de l'hypothèse stipulant une différence d'orientation de l'utilisation des nutriments par les AGPI n-3 par rapport à d'autres types d'acides gras. Cette différence d'orientation pourrait être à l'origine d'une épargne des acides aminés en faveur d'une oxydation préférentielle des lipides.

6. Choix des principaux organes et tissus cibles

Le choix du foie comme organe-cible repose sur son rôle central dans le métabolisme des acides aminés (cycle de l'urée, synthèse du glutathion …) ainsi que dans le métabolisme et

l'homéostasie des acides gras (synthèse, oxydation). Il est aussi le tissu qui exprime le plus le PPARα. Pour ces raisons, il nous a semblé judicieux d'explorer en priorité cet organe pour évaluer les activités, les expressions protéiques et les expressions géniques des enzymes que nous avons ciblées. La mesure d'un certain nombre de marqueurs du syndrome métabolique et du métabolisme des acides aminés (aminogrammes, urée, NO…) dans l'urine et le plasma a aussi été indispensable pour rendre compte des possibles modulations des voies métaboliques d'intérêt.

*****

Dans la suite de ce manuscrit, seront présentés l'ensemble des travaux expérimentaux réalisés pour répondre aux objectifs de ce travail de thèse.

Dans une première partie seront décrits les protocoles *in vivo* dont l'objectif était d'étudier en parallèle :

- Les effets de l'invalidation du PPARα sur le métabolisme de l'arginine et de la cystéine
- Les effets d'un faible apport en ALA sur le métabolisme de l'arginine et de la cystéine

Ces deux protocoles seront présentés sous forme d'articles publiés en anglais.

La seconde partie des travaux personnels traitera des modulations du métabolisme secondaire de l'arginine et de la cystéine par l'ALA apporté dans le cadre d'un régime hypercalorique/hyperlipidique chez la souris.

Dans une troisième partie seront présentés les travaux *in vitro* explorant la régulation du métabolisme secondaire de l'arginine par l'ALA au niveau des cellules de l'endothélium vasculaire.

Les résultats des parties 2 et 3, n'étant pas encore rédigées sous forme d'article, seront présentés en français.

Travaux personnels

Chapitre 3 : Travaux Personnels

Effet de l'invalidation du PPARα, associée à de faibles apports en acide α-linolénique, sur le métabolisme secondaire de l'arginine et de la cystéine.

Ces résultats expérimentaux ont donné lieu à la publication de

L'article 1 : Guelzim N, Mariotti F, Martin PG, Lasserre F, Pineau T et Hermier D : A role for PPARalpha in the regulation of arginine metabolism and nitric oxide synthesis. Amino Acids. 2011 Oct; 41(4):969-79. Epub 2010 Nov 10. PMID: 21063737

L'article 2 : Guelzim N, Huneau JF, Mathé V, Quignard-Boulangé A, Martin PG , Tomé D et Hermier D : Consequences of PPARα invalidation on glutathione synthesis : Interactions with dietary fatty. PPAR Res. 2011; 2011:256186. Epub 2011 Sep 12. PMID:21915176

A. Effet de l'invalidation du PPARα, associée à de faibles apports en acide α-linolénique, sur le métabolisme de l'arginine et de la cystéine

I. Contexte scientifique et objectifs de l'étude

Une série d'études basées sur l'utilisation de ligands pharmacologiques du PPARα ou d'animaux transgéniques, suggère une régulation possible du métabolisme des acides aminés par le PPARα (partie IV/3 page 52). Les AGPI n-3 et leurs dérivés sont les ligands naturels du PPARα et pourraient donc à ce titre, exercer leurs effets par activation de ce facteur de transcription et réguler ainsi le métabolisme des acides aminés.

Par ailleurs, des données de la littérature décrivent un effet bénéfique de l'apport d'AGPI n-3 et de l'activation du PPARα par des ligands synthétiques, sur des fonctions et des états physiologiques tels que la fonction endothéliale et le stress oxydant (Evans et al. 2000; Brown & Hu 2001). De plus, quelques observations suggèrent une implication des AGPI n-3 et du PPARα dans la modulation de la production et/ou de la biodisponibilité de métabolites secondaires dérivants des acides aminés et impliqués dans des processus physiologiques importants. C'est le cas du NO, dérivé de l'arginine dont le métabolisme semble être affecté par l'apport en AGPI n-3, mais aussi par les ligands synthétiques du PPARα (partie IV/4 page 54). Dans une moindre mesure, le métabolisme du glutathion, synthétisé à partir de la cystéine, semble aussi être sensible aux variations des apports en AGPI n-3, ainsi qu'à l'activation ou à l'invalidation du PPARα (partie IV/5 page 57).

Cependant, jusqu'alors, aucun lien n'a encore été établi entre la régulation du métabolisme du NO et du glutathion par les AGPI n-3 et une possible modulation plus large du métabolisme secondaire des acides aminés précurseurs, à savoir l'arginine et la cystéine. De même, la possibilité d'une régulation de ces processus *via* l'activation du PPARα par les AGPI n-3 n'a pour l'instant jamais été explorée.

Par ailleurs, les recherches décrivant une modulation du métabolisme du NO et du glutathion par les AGPI n-3 ont principalement porté sur les effets des AGPI n-3-LC, soit sous forme d'huile de poisson, soit sous forme d'extrait purifié d'EPA et/ou de DHA. Les effets de l'ALA restent donc à démontrer.

A partir de l'ensemble de ces éléments, nous nous sommes fixés comme premiers objectifs:

1- D’évaluer l’implication de l’apport d'ALA dans le cadre d’un régime normolipidique, dans la modulation du métabolisme secondaire de l’arginine, en particulier la production du NO, et de la cystéine, et principalement de la voie de synthèse du glutathion.
2- D’évaluer la contribution du PPARα à ces régulations en décrivant les conséquences de l’invalidation du gène du PPARα chez la souris sur ces voies métaboliques.

Pour répondre aux objectifs de cette partie expérimentale, un premier protocole *in vivo* a été consacré à l’exploration du métabolisme de l’arginine. Un second protocole, quasiment identique, avait pour objectif principal de cibler les marqueurs du métabolisme de la cystéine, Lors de ce dernier, nous avons aussi remesuré les marqueurs du métabolisme de l’arginine afin d’augmenter la puissance statistique. L’article 1 traite donc des résultats des deux protocoles mis en commun, alors que l’article 2 fait référence uniquement au second protocole.

II. Matériels et méthodes

1. Protocoles expérimentaux

Pour chacun des deux protocoles (Figure 56), une trentaine de souris de 2 génotypes différents a été utilisée :

- Des souris mâles témoins (WT pour Wild Type) C57Bl/6J.
- Des souris mâles invalidées pour PPARα (KO PPARα) de l’élevage de Thierry Pineau (INRA, Unité Toxalim, Toulouse), de fond génétique C57Bl/6J.

A l’âge de 11 semaines, les souris de chacun des génotypes ont reçu deux régimes expérimentaux sous forme de croquettes pendant 8 semaines:

- Un régime dit COCO : riche en acides gras saturés à base d'huile de coco hydrogénée (AGS, 93 %),
- Un régime dit LIN : riche en acide α-linolénique (ALA, 18:3 n-3, 60 %), à base d'huile de lin. Le Tableau 5 présente la composition des régimes.

Les animaux ont été pesés et la consommation alimentaire mesurée de façon hebdomadaire pendant les 8 semaines de régime expérimental. A la fin de la période expérimentale, des

prélèvements d'urine, de sang et d'organes ont été réalisés chez ces souris ainsi qu'une composition corporelle.

2. Principales analyses

Afin d'apprécier les conséquences fonctionnelles qui accompagneraient les régulations des voies métaboliques explorées et dans un objectif de validation du modèle expérimental, les marqueurs de la déficience du gène du PPARα et de l'induction du syndrome métabolique (tels que la glycémie, les marqueurs du métabolisme lipidique, du cholestérol, d'inflammation et de stress oxydant) ont été évalués.

Nous avons voulu cibler dans un premier temps, les effets de l'invalidation du PPARα et de l'apport d'ALA sur le métabolisme secondaire de l'arginine, et principalement sur son utilisation dans les voies en compétition de synthèse du NO et de l'urée. Pour cela, nous avons choisi une technique utilisant des isotopes stables permettant de mesurer spécifiquement la synthèse du NO "corps entier". Cette technique consiste à marquer la L-arginine au niveau de deux azotes du groupement guanidium, permettant ainsi de discriminer son utilisation dans les voies de synthèse du NO et de l'urée (Figure 57). Les urines ont été recueillies pendant les 23h qui ont suivi l'injection intrapéritonéale chez les souris d'une dose traceuse de $^{15}N_2$-(guanido)-arginine. Après une étape d'extraction (Figure 58), les enrichissements isotopiques en différents métabolites de l'arginine ont été mesurés de façon très précise par une analyse par spectrométrie de masse. En effet, la mesure de l'enrichissement isotopique en [^{15}N] nitrates et en [^{15}N] urée au niveau des urines permet respectivement, une évaluation du taux de production du NO "corps entier" et de la conversion systémique de l'arginine en urée.

D'importantes précautions sont à prendre quant à la dose d'arginine injectée, la durée et le mode de recueil des urines. De même, lors de l'extraction de l'urée et des nitrates urinaires sur résine et lors de la mesure des enrichissements par spectrométrie de masse, des précautions sont indispensables afin d'éviter les contaminations avec les nitrates environnementaux. Cette méthode, qui représente la technique la plus précise pour suivre l'utilisation de l'arginine, demande donc un haut niveau de technicité. En effet, la mesure isolée de l'excrétion urinaire de nitrites et de nitrates (NOx), souvent utilisée, est une technique biaisée pour rendre compte de la capacité de production du NO, puisque les nitrates et nitrites urinaires peuvent provenir de sources autres que la dégradation du NO, telles que

l’alimentation. D’autre part, la mesure des NOx urinaires ne permet en aucun cas d’évaluer les taux d’utilisation de l’arginine dans la voie de synthèse du NO.

Afin de rechercher les mécanismes sous-jacents à la régulation de la production du NO et d’urée par le PPARα et l’ALA, nous avons évalué l’expression des arginases et des NOS, enzymes impliquées dans les deux voies d’intérêt.

Dans un second temps, notre intérêt s’est porté sur les conséquences de l’invalidation du PPARα et d'un faible apport en ALA sur le métabolisme de la cystéine, et principalement sur son utilisation dans la voie de synthèse du glutathion. Lors de ce protocole, nous avons ciblé, dans le foie, la mesure par HPLC des principaux thiols, ainsi que la mesure de l’activité enzymatique et/ou l’expression des gènes impliqués dans le métabolisme du glutathion (γGCL, GPX, SOD, CAT) et dans les autres voies d’utilisation de la cystéine, principalement la voie de synthèse de la taurine via la CDO.

Article 1

Guelzim N, Mariotti F, Martin PG, Lasserre F, Pineau T et Hermier D : A role for PPARalpha in the regulation of arginine metabolism and nitric oxide synthesis. Amino Acids. 2011 Oct; 41(4):969-79. Epub 2010 Nov 10. PMID: 21063737

Amino Acids
DOI 10.1007/s00726-010-0797-7

ORIGINAL ARTICLE

A role for PPARα in the regulation of arginine metabolism and nitric oxide synthesis

Najoua Guelzim · François Mariotti · Pascal G. P. Martin · Frédéric Lasserre · Thierry Pineau · Dominique Hermier

Received: 10 September 2010 / Accepted: 22 October 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract The pleiotropic effects of PPARα may include the regulation of amino acid metabolism. Nitric oxide (NO) is a key player in vascular homeostasis. NO synthesis may be jeopardized by a differential channeling of arginine toward urea (via arginase) versus NO (via NO synthase, NOS). This was studied in wild-type (WT) and PPARα-null (KO) mice fed diets containing either saturated fatty acids (COCO diet) or 18:3 n-3 (LIN diet). Metabolic markers of arginine metabolism were assayed in urine and plasma. mRNA levels of arginases and NOS were determined in liver. Whole-body NO synthesis and the conversion of systemic arginine into urea were assessed by using $^{15}N_2$-guanido-arginine and measuring urinary $^{15}NO_3$ and [^{15}N]-urea. PPARα deficiency resulted in a markedly lower whole-body NO synthesis, whereas the conversion of systemic arginine into urea remained unaffected. PPARα deficiency also increased plasma arginine and decreased citrulline concentration in plasma. These changes could not be ascribed to a direct effect on hepatic target genes, since NOS mRNA levels were unaffected, and arginase mRNA levels decreased in KO mice. Despite the low level in the diet, the nature of the fatty acids modulated some effects of PPARα deficiency, including plasma arginine and urea, which increased more in KO mice fed the LIN diet than in those fed the COCO diet. In conclusion, PPARα is largely involved in normal whole-body NO synthesis. This warrants further study on the potential of PPARα activation to maintain NO synthesis in the initiation of the metabolic syndrome.

Keywords Metabolic syndrome · Amino acids · α-Linolenic acid · n-3 PUFA · Urea

N. Guelzim · F. Mariotti · D. Hermier (✉)
UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, INRA, 16 rue Claude Bernard, 75005 Paris, France
e-mail: dominique.hermier@agroparistech.fr

N. Guelzim · F. Mariotti · D. Hermier
UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, AgroParisTech, 75005 Paris, France

P. G. P. Martin · F. Lasserre · T. Pineau
ToxAlim INRA, Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, Institut National de la Recherche Agronomique, INRA UR66, Toulouse, France

Introduction

The metabolic syndrome, the prevalence of which is increasing worldwide, is a cluster of abnormalities including visceral obesity, dyslipidemia, insulin resistance, and elevation in blood pressure that results in a higher risk of cardiovascular diseases and type-2 diabetes (Cornier et al. 2008). Intense and sustained research efforts aiming to the prevention and care of metabolic syndrome have enlightened the importance of a group of nuclear receptors known as peroxisome activated receptors (PPAR) as efficient targets for nutritional and pharmaceutical interventions (Kersten et al. 2000; Robinson and Grieve 2009). Among PPARs, PPARα has been identified as a major modulator of various aspects of lipid metabolism, such as fatty acid (FA) catabolism (uptake, trafficking, oxidation, and ketogenesis), polyunsaturated FA synthesis, and lipoprotein metabolism (assembly, transport, and catabolism). PPARα is activated by pharmacological (fibrates) and nutritional (n-3 polyunsaturated FA, PUFA) agonists, which are both widely used as regulators of lipid metabolism, especially as hypolipidemic agents (Hachem and Mooradian 2006). Following its activation, the transcriptional regulation of target genes by PPARα is achieved by

Published online: 10 November 2010

its direct binding to specific, yet ubiquitous, nucleotidic sequences known as peroxisome proliferators response elements (PPRE). In consequence, beyond lipid metabolism, the effects of PPARα extend to a number of target genes involved in the metabolism of glucose, glycerol and glycogen, and of bile acids, as well as in inflammation, detoxification, and hepatocarcinogenesis (Mandard et al. 2004, 2007; Patsouris et al. 2004). In line with these pleiotropic effects, PPARα has also been suggested to play a role in the regulation of amino acid metabolism, but the current literature remains limited. The use of PPARα-null (KO) mice, or fibrate-treated rodents, has evidenced that PPARα is directly implicated in the regulation of a number of hepatic target genes involved in transamination, deamination and urea synthesis (Edgar et al. 1998; Kersten et al. 2001; Sheikh et al. 2007).

In the context of the metabolic syndrome, interest in amino acids has focused on L-arginine, because it is the precursor of nitric oxide (NO), a key player in vascular homeostasis. Indeed, the impairment in NO synthesis/bioavailability is closely associated with vascular endothelial dysfunction, which is the hallmark of atherosclerosis and is closely associated with insulin resistance (Brunner et al. 2005; Forstermann 2010; Kim et al. 2006). However, arginine is implicated in many metabolic pathways, and is largely used for urea synthesis, quantitatively much more than for NO synthesis. Accordingly, the literature suggests that NO synthesis could depend on the differential arginine channeling toward either urea (via arginase) versus NO (via NO synthase, NOS) (Morris 2009). Interestingly, PPARα could be involved in this differential channeling of arginine. Indeed, PPARα-null mice exhibit a higher systolic blood pressure and a lower renal NOS activity (Newaz et al. 2005), together with higher fasting levels of hepatic arginase mRNA and plasma urea (Kersten et al. 2001). In parallel, treatment by pharmacological PPARα agonists improves endothelial function both in vitro and in vivo, including in the human (Touyz and Schiffrin 2006). Exact in vivo mechanisms for these beneficial actions remain unclear, but would probably involve NO synthesis. Indeed, pharmacological PPARα activation was suggested to increase NO synthesis in the rat (Linz et al. 2009; Newaz et al. 2004, 2005), renal NOS activity in the WT mouse (Newaz et al. 2005), and eNOS protein expression and phosphorylation in the rat (Bulhak et al. 2009; Linz et al. 2009), whereas plasma arginine concentration was decreased (Linz et al. 2009). Thus, PPARα activation appears to play a major role in the regulation of arginine metabolism.

A growing body of evidence suggests that not only pharmacological, but also nutritional PPARα agonists favor NO synthesis. This is the case in endothelial cells or in isolated arteries not only in response to one of the long-chain PUFA found in fish oil (EPA, 20:5 n-3) (Omura et al. 2001; Singh et al. 2010), but also in response to its direct precursor α-linolenic acid (ALA, 18:3 n-3) (Zhang et al. 2007). More interestingly, in vivo studies suggested that dietary n-3 PUFA intake enhanced whole-body NO synthesis, as indirectly assessed by determination of nitrate and nitrite levels in hypertensive rats (in response to ALA) (Sekine et al. 2007), or urinary nitrate in healthy volunteers (in response to fish oil) (Harris et al. 1997), or by measurement of NOS activity and eNOS phosphorylation in brain and muscle of piglets (in response to another long-chain PUFA found in fish oil, DHA, 22:6 n-3) (Li et al. 2008). However, it remains to be determined to what extent these beneficial effects of dietary n-3 PUFA on NO synthesis involve PPARα, on the one hand, and regulation of amino acid metabolism, and especially of arginine, on the other hand. In this respect, studies on the liver are a special interest, since this organ plays a central role in the metabolism of amino acids and is a key target of PPARα activation.

The aim of the present study was, therefore, to evaluate the role of PPARα in the regulation of arginine metabolism, with special emphasis on the impact on NO synthesis, using wild-type (WT) and PPARα-null (KO) mice. We used a state-of-the-art tracer-based method to measure whole-body NO synthesis, using [$^{15}N_2$-(guanido)]-arginine. Because we also made the hypothesis that a change in NO synthesis could originate from a competition between NO synthesis and urea production, we also evaluated the conversion of systemic arginine into urea, using the same tracer method. Lastly, because the liver is a key target of PPARα activation, we evaluated the gene regulation of some hepatic enzymes involved in arginine metabolism.

We have shown previously in the mouse that a number of hepatic genes known to be regulated essentially via PPARα were up-regulated by ALA, as they are by its long-chain derivatives. This was observed not only in WT mice fed rather high-fat diets (Morise et al. 2009) but also in WT mice fed low-fat diets, albeit to a lesser extent (Martin et al. 2007). For these reasons, as a secondary objective, we aimed to assess the contribution of dietary n-3 PUFA to PPARα activation, by exposing mice to contrasted diets, containing mostly either saturated FA or ALA.

Materials and methods

Experimental procedures

Animals

Male PPARα-deficient mice (Lee et al. 1995) were bred locally in INRA's facility in Toulouse, in which several additional rounds of backcrossing have been performed

initially to increase the C57BL/6J genetic background and to generate the animals used (Costet et al. 1998). Age-matched male C57BL/6J mice were obtained from Charles River (L'Arbresle, France) and were acclimated to local animal facility conditions for 4 weeks. In vivo studies were conducted under European Union guidelines for the use and care of laboratory animals and were approved by the institutional ethical committee. The same protocol was conducted on two successive series of 30 mice.

Animals were housed collectively on wood litter, at 22 ± 2°C under 12-h light/dark cycles (light on at 06:00 am). They were fed ad libitum a standard pelleted diet for 4 weeks (Teklad 20-18S, Harlan, Gannat, France). At 10–11 weeks of age, mice were fed one of the experimental diets during 8 weeks. They had free access to food and tap water. Food consumption (as assessed per collective cage, and expressed relatively to the mean body weight of mice in each cage) and individual body weight were recorded weekly.

Diets

The two experimental diets were provided as pellets by UPAE-INRA (Jouy-en-Josas, France) as described previously (Martin et al. 2007). The calculated composition (in weight) of the two diets was 21.0% protein, 69.2% carbohydrate, 4.8% lipid, 4.0% vitamins and 4.0% minerals. The experimental diets were isoenergetic, with lipids providing 11.3% of total energy intake. The choice of a low-fat diet was determined by a previous nutrigenomic study of some of the present authors, showing significant effects of PPARα deficiency on lipid and xenobiotic metabolism in mice on the same diet as in the present study (Martin et al. 2007). Oils used for experimental diet preparation were hydrogenated coconut oil for a saturated FA diet (SFA, 99%, COCO diet), and linseed oil for an ALA-rich oil (58%, LIN diet). Their fatty acid composition was (in weight %): 99.6 SFA, 0.3 monounsaturated FA (MUFA) and 0.1% PUFA for the COCO diet; 9.0 SFA, 18.0 MUFA and 72.9 PUFA (58 n-3 PUFA) for the LIN diet (Martin et al. 2007).

Experimental design

At 18–19 weeks of age, after 8 weeks of experimental diets, mice were fasted for 5 h, then weighed and anesthetized. Blood was taken by cardiac puncture, and mice were then killed by exsanguination. Plasma was separated by centrifugation (1,700*g*, 20 min, 4°C) and aliquots were stored at −80°C.

The abdominal cavity was then opened and the liver was carefully removed and weighed. Several liver samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C. Epididymal adipose tissue (EpAT, visceral localization) and inguinal adipose tissue (IngAT, subcutaneous localization) were removed and weighed.

Before killing, mice were used for the evaluation of in vivo whole-body NO synthesis as described previously in rats (Magne et al. 2009). Briefly, mice were fasted for 3 h, administered IP 90 mg/kg body wt of [$^{15}N_2$-(guanido)]-arginine:HCl, then placed immediately in a metabolic chamber and fed ad libitum. Urine was collected over 23 h in glass tubes containing antibiotics for the determination of whole-body NO synthesis, as described below.

Analyses

Plasma and urine metabolites

Blood glucose concentration was determined with an Accu-Chek® glucometer (Roche Diagnostics, Meylan, France). Plasma cholesterol, triglycerides, and urea were determined by colorimetric enzymatic methods using the kits Cholesterol RTU, Triglycerides PAP 150 and Urea-Kit S 1000 (Bio-Merieux, Craponne, France) (Fawcett and Scott 1960; Fossati and Prencipe 1982; Richmond 1973).

Plasma amino acids were determined by ion-exchange chromatography with postcolumn ninhydrine detection (Aminotac JLC-500/V; Jeol, Tokyo, Japan). To calculate the total excretion of urea, nitrate and creatinine during the tracer study (see below), urinary urea concentration was determined as in plasma after the samples were diluted 1/2,000, and urinary creatinine and nitrate concentrations were measured using colorimetric kinetic (Biomerieux) and fluorimetric methods, respectively (Marzinzig et al. 1997; Vassault et al. 1992).

Assessment of whole-body NO synthesis and conversion of systemic arginine into urea

Whole-body NO synthesis was measured as the relative recovery of ^{15}N as urinary nitrate following the IP administration of [$^{15}N_2$-(guanido)]-arginine (Cambridge Isotope Lab), based on a method described by Forte et al. (1997), and as reported in detail previously (Blouet et al. 2007; Magne et al. 2009). This method was preferred to the measure of urinary nitrate excretion, which is highly confounded by other sources, in particular the dietary nitrate (Forte et al. 1997). In contrast, this tracer-based method has the advantage of being quantitative and specific for the L-arginine/NO pathway, and is considered as a state-of-the-art technique to assess whole-body NO synthesis in vivo. Briefly, urinary nitrate were extracted by ion-exchange chromatography and the microdiffusion technique, and the isotopic enrichment was determined by Elemental analyzer coupled to Isotope Ratio Mass Spectrometry (EA-IRMS).

The conversion of systemic arginine into urea was quantified as the relative recovery of ^{15}N in urinary urea following the same IP administration of [$^{15}N_2$-(guanido)]-arginine. Urea was isolated from urine as previously described by Mariotti et al. (2000). Briefly, urine ammonia was first extracted using a cation exchange resin (Dowex AG-50X8, Mesh 100-200, BioRad, France). Then, urea was extracted from the ammonia-free urine by conversion into ammonium through hydrolysis with urease (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) for 2 h at 30°C, pH 7, on cation exchange resin. Urea-derived ammonia were eluted from the resins by the addition of 2.5 mol/L KH_2SO_4, and ~50 µL eluate samples were combusted in the EA-IRMS to determine isotopic enrichment.

To calculate whole-body NO synthesis and systemic conversion of arginine into urea, the amounts of ^{15}N recovered as nitrate and urea in the 23-h urine collection were corrected for the excretion of creatinine, so as to correct for possible differences in urinary excretion rate between animals and treatments and for possible incomplete urinary collection (Forte et al. 1997). Thus, values were expressed as % of the amount of ^{15}N administered as [$^{15}N_2$]-arginine as follows: QE/dC, where Q are the total amounts of nitrate (or urea) and C the total amounts of creatinine excreted in urine, E the ^{15}N enrichment (as atom percent excess) in urinary nitrate (or urea, respectively) and d the amount of ^{15}N injected as [$^{15}N_2$-(guanido)]-arginine.

The calculation takes advantage of the fact that the amount of [^{15}N-^{14}N]-arginine is negligible as compared to the amount of [^{15}N-^{15}N]-arginine, since the former originate from the recycling of ^{15}N-citrulline that originates from a very minor pathway (<1%) of utilization of [^{15}N-^{15}N]-arginine (Luiking and Deutz 2003). Accordingly, the $^{15}NO3$ formed from [^{15}N-^{14}N]-arginine is also negligible compared to that formed from [^{15}N-^{15}N]-arginine, and, likewise, the amount of [^{15}N-^{14}N]-urea is negligible as compared to the amount of [^{15}N-^{15}N]-urea.

Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from a liver sample homogenized with an UltraTurrax in the presence of Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA). Total RNA concentrations were determined by measuring absorbance at 260 nm with a Nanodrop spectrophotometer (Labtek, Paris, France). A 260 nm/280 nm ratio of ~2 indicated that samples were essentially free from contaminants such as protein and phenol. The quality and integrity of total RNA were assessed on 1% agarose.

Synthesis of cDNA was performed on 400 ng of total RNA using a high capacity cDNA reverse transcription kit, based on the use of both oligodT and hexamers (Applied Biosystems, Foster City, USA). Primers were designed using Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA) with the following sequences: Cyp4a14: forward primer, TCAGTCTATTTCTGGTGCTGTTC; reverse primer, GAGCTCCTTGTCCTTCAGATGGT; ARG1 (Arginase 1): forward primer, GCAGAGGTCCAGAAGAA TGGAA; reverse primer, GCGTGGCCAGAGATGCTT; ARG2 (Arginase 2): forward primer, CTTGGGATCC AGAAGGTGATG; reverse primer, GCCTCTGCCTT TTGCCAAT; NOS3 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS): forward primer, GCACAAGAGCTACAAAAT CCGATT; reverse primer, GCCGCCAAGAGGATACCA; NOS2 (inducible nitric oxide synthase, iNOS): forward primer, GCAAACCCAAGGTCTACGTTCA; reverse primer, GAGCACGCTGAGTACCTCATTG; ALAT (Alanine aminotransferase): forward primer, AAGGCACT TACCACTTCAGAATGAC; reverse primer, ACCTTG TGGAGCACGGTCTT; cASAT (aspartate aminotransferase, cytosolic precursor): forward primer, AGCTGTGC TTCTCGCCTAGTTC C; reverse primer, GCCTGTCCC TCCCAAAGACT; mASAT (aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor): forward primer, TGCCAAT CGTATGCCAAGAAC; reverse primer, CCTTTTGGCT TCTTCTGCATCT. To normalize the mRNA abundance of each gene, 18S rRNA was used as a housekeeping gene, with the exception of Cyp4a14 gene, for which TBP (tata-box binding protein) was used. Sequences of the corresponding primers were: 18S: forward primer, ACGGA AGGGCACCACCAGGAG; reverse primer, GCACCAC CACCCACGGAAACG; TBP: forward primer, ACTTCG TGCAAGAAATGCTGAA; reverse primer, GCAGT TGTCCGTGGCTCTCT. In order to not amplify possible residual genomic DNA, only primers for which at least one sequence of the pair overlaps an exon/exon junction on the mRNA sequence, or primers located on different exons, were chosen. PCR reactions were performed using a 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems), as described previously (Chotechuang et al. 2009). Each cDNA was amplified in a 20 µL volume containing 15 µL of 2× SYBR Green master mix (Applied Biosystems) and 500 nM concentrations of the gene-specific primer. Thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 95°C for 10 min and 40 amplification cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. For each run, data were analyzed as previously described for residual genomic DNA amplification and for primer–dimers formation (Chotechuang et al. 2009). Gene expression was determined using the $2^{-\Delta Ct}$ formula where ΔCt = (Ct target gene − Ct housekeeping gene).

Statistical analyses

Data are presented as mean ± standard errors. They were analyzed using the SAS program (SAS Institute, Cary,

USA). The effects of the genotype (KO vs. WT), the diet (LIN vs. COCO), and the genotype–diet interaction were tested using a two-way ANOVA with genotype, diet, and series as factors, using the GLM procedure. When the effect of genotype and/or diet factor was significant, differences between means were tested for significance using the post hoc Tukey–Kramer procedure. Significance level was set at $P < 0.05$. When a series effect was significant, data were normalized as % of the WT group fed the COCO diet.

Results

Markers of PPARα deficiency (Table 1)

Throughout the 8 weeks of the experimental protocol, daily food intake was similar in all groups (±120 mg/g body weight per day) whatever the genotype or the diet (data not shown). In WT mice, the dietary treatment did not influence the body weight and composition significantly. PPARα deficiency resulted in a higher body weight than in WT mice, but between-group differences were significant only in those fed the COCO diet. Similarly, when compared to their WT counterparts, KO mice fed the COCO diet exhibited higher proportions of liver and of epididymal (visceral) and inguinal (subcutaneous) adipose tissue, but not those fed the LIN diet.

PPARα deficiency resulted in lower glycemia and higher triglyceridemia, the degree of which was irrespective of the diet. In contrast, hypercholesterolemia found in the KO mice was more pronounced in mice fed the COCO diet than in those fed the LIN diet.

Plasma amino acids (Table 2)

As concerns the amino acids involved in the urea cycle, their plasma concentration in the WT group fed the COCO diet was: arginine, 53.1 µmol/L; ornithine, 44.0 µmol/L; citrulline, 53.0 µmol/L. Whatever the genotype, the dietary treatment did not influence their plasma concentration (Table 2). When compared to the WT mice (COCO and LIN diet together), PPARα deficiency resulted in a higher arginine concentration and a lower citrulline concentration, whereas ornithine concentration tended to decrease, but was not significantly affected. Besides, post hoc analysis revealed that, in KO mice, the increase in arginine concentration was more pronounced in those fed the LIN diet, whereas the decrease in ornithine and citrulline concentration was accounted for by mice fed the COCO diet mainly. Accordingly, ornithine/arginine ratio and citrulline/arginine ratio were significantly lower in KO mice than in WT ones, whereas ornithine/citrulline ratio was not affected by the genotype (Table 2).

Some other amino acids were also sensitive to the genotype. PPARα deficiency resulted in increased plasma concentrations of serine, valine, methionine, histidine and lysine, and in decreased plasma concentrations of taurine, glycine and α-amino-*N*-butyric acid. A few amino acids were sensitive to the diet, their plasma concentration being lower in the LIN group than in the COCO diet. This was the case for histidine, lysine, and α-amino-*N*-butyric acid, with no interaction with the genotype.

Hepatic expression of target genes (Fig. 1)

Relative mRNA levels were expressed as the % of the WT group fed on the COCO diet. Level of mRNA for Cyp4a14, a typical PPARα target gene, was measured to check whether the genotype and/or the diet were associated with changes in PPARα activity in the liver. Cyp4a14 was almost null in PPARα-null mice (±2% of the WT COCO group), but significantly increased in WT mice fed the LIN diet, as compared to those fed the COCO diet. As concerns the target genes of arginine metabolism, level of mRNA for arginase 1

Table 1 Markers of PPARα deficiency in WT and PPARα-null (KO) mice fed diets rich in either saturated FA (COCO diet) or ALA (LIN diet) for 8 weeks

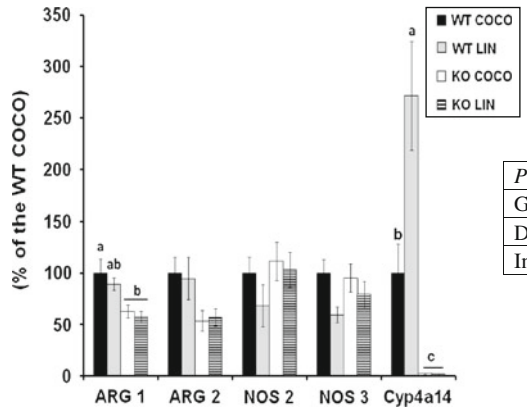
	WT		KO		*P* values		
	COCO	LIN	COCO	LIN	Genotype (*G*)	Diet (*D*)	Interaction $G \times D$
Body weight (g)	29.5 ± 0.5^{b}	29.6 ± 0.5^{b}	36.7 ± 1.0^{a}	32.7 ± 1.5^{b}	<0.0001	0.0379	0.0261
EpAT weight (%)	2.31 ± 0.16^{b}	2.58 ± 0.19^{ab}	3.47 ± 0.28^{a}	2.91 ± 0.40^{ab}	0.0038	0.5062	0.0720
IngAT weight (%)	1.46 ± 0.19^{b}	1.78 ± 0.12^{ab}	2.50 ± 0.23^{a}	1.79 ± 0.22^{ab}	0.0090	0.3293	0.0102
Liver weight (%)	3.88 ± 0.10^{b}	3.88 ± 0.25^{b}	4.50 ± 0.12^{a}	3.71 ± 0.12^{b}	0.1403	0.0112	0.0123
Blood glucose (g/L)	1.94 ± 0.18^{b}	1.83 ± 0.21^{b}	1.48 ± 0.17^{ab}	1.17 ± 0.12^{a}	<0.0001	0.1892	0.4690
Plasma TG (mg/dL)	34.5 ± 3.0^{ab}	35.3 ± 3.1^{b}	45.7 ± 3.0^{a}	50.3 ± 5.1^{a}	<0.0001	0.2957	0.4611
Plasma CT (mg/dL)	83.4 ± 3.7^{bc}	67.5 ± 5.7^{c}	120.7 ± 4.4^{a}	95.5 ± 6.3^{b}	<0.0001	<0.0001	0.3136

Values are mean ± standard errors for 11–13 mice per group. Mean values within a row sharing a same superscript letter, or without superscript letter, were not significantly different at $P < 0.05$

Table 2 Plasma amino acids in WT and PPARα-null (KO) mice fed diets rich in either saturated FA (COCO diet) or ALA (LIN diet) for 8 weeks

	WT		KO		*P* values		
	COCO	LIN	COCO	LIN	Genotype (*G*)	Diet (*D*)	Interaction $G \times D$
Serine	100 ± 3	95 ± 6	112 ± 5	116 ± 7	0.0044	0.9040	0.3943
Valine	100 ± 5	96 ± 3	106 ± 5	111 ± 7	0.0287	0.9187	0.2969
Methionine	100 ± 4	100 ± 6	118 ± 7	122 ± 10	0.0083	0.8054	0.8084
Histidine	100 ± 5	86 ± 3	109 ± 5	105 ± 5	0.0039	0.0495	0.2772
Lysine	100 ± 8^{ab}	75 ± 5^{b}	108 ± 8^{a}	99 ± 9^{ab}	0.0366	0.0484	0.2448
Taurine	100 ± 9	109 ± 8	90 ± 7	81 ± 6	0.0268	0.9932	0.2680
Glycine	100 ± 5^{a}	97 ± 5^{ab}	81 ± 4^{b}	95 ± 4^{ab}	0.0144	0.2232	0.0827
α-Amino-*N*-butyric acid	100 ± 8^{a}	70 ± 4^{ab}	74 ± 9^{ab}	66 ± 4^{b}	0.0340	0.0139	0.1321
Threonine	100 ± 3^{ab}	95 ± 6^{ab}	87 ± 5^{b}	113 ± 7^{a}	0.7852	0.0754	0.0061
Arginine	100 ± 5^{b}	93 ± 6^{b}	111 ± 5^{ab}	129 ± 7^{a}	0.0008	0.3789	0.0483
Ornithine	100 ± 5^{a}	81 ± 6^{ab}	80 ± 6^{b}	87 ± 6^{ab}	0.1053	0.2477	0.0197
Citrulline	100 ± 5^{a}	92 ± 6^{ab}	79 ± 4^{b}	88 ± 5^{ab}	0.0104	0.9679	0.1096
Ornithine/arginine	100 ± 7^{a}	88 ± 7^{ab}	70 ± 5^{b}	67 ± 5^{b}	0.0002	0.2197	0.5362
Citrulline/arginine	100 ± 5^{a}	100 ± 6^{a}	71 ± 4^{b}	69 ± 4^{b}	<0.0001	0.7827	0.7675
Ornithine/citrulline	100 ± 7	87 ± 4	100 ± 6	99 ± 9	0.4346	0.3208	0.3828

Due to some statistically significant inter-series effects, values are expressed as % of the WT group fed the COCO diet. Only amino acids of which plasma concentration was influenced by the genotype and/or the diet are reported, with the exception of amino acids of the urea cycle, of which concentrations are reported in Fig. 1. Values are mean ± standard errors for 11–13 mice per group. Mean values within a row sharing a same superscript letter, or without superscript letter, were not significantly different at $P < 0.05$



P values	ARG1	ARG2	NOS2	NOS3	Cyp4a14
Genotype (G)	0.0005	0.0052	0.1974	0.5390	<.0001
Diet (D)	0.3792	0.9441	0.2640	0.0241	0.0023
Interaction (G*D)	0.7793	0.7742	0.5196	0.3209	0.0021

Fig. 1 Hepatic mRNA levels of CYP4a14 and arginine metabolism key genes in WT and PPARα-null (KO) mice fed diets rich in either saturated FA (COCO diet) or ALA (LIN diet) for 8 weeks. Values (after correction relative to mRNA TBP or 18S levels) are expressed as % of the WT group fed the COCO diet (mean ± standard errors for 11–13 mice per group). For each parameter, *columns* sharing a *same superscript letter*, or *without superscript letter*, were not significantly different at $P < 0.05$

(ARG1), which is cytosolic and mainly ascribed to the urea cycle in the liver, was not affected by the dietary treatment. In contrast, it was significantly decreased by PPARα deficiency. Arginase 2 is mitochondrial, more ubiquitous, and competes with NOS3 (eNOS) for NO synthesis. Similar to arginase 1, arginase 2 (ARG2), mRNA level was not diet-responsive, but was significantly lower in KO mice. The expression of (constitutive) NOS3 (eNOS) was not affected by the genotype, but was significantly lower in mice fed the LIN diet. In contrast, the expression of (inductible) NOS2 (iNOS) was affected neither by genotype nor by the diet. Lastly, expression of the three transaminase genes (ALAT, cASAT, mASAT) was not affected by either PPARα deficiency or the diet (data not shown).

Plasma and urinary arginine metabolism (Table 3)

Plasma urea concentration was not affected by genotype. In contrast, it was higher in the LIN group than in the COCO one, this effect being significant in KO mice only.

Table 3 Urinary 23-h excretion of creatinine, urea, and nitrate, and plasma urea concentration in WT and KO mice fed on diets rich in either saturated FA (COCO diet) or ALA (LIN diet) for 8 weeks

	WT		KO		*P* values		
	COCO	LIN	COCO	LIN	Genotype (*G*)	Diet (*D*)	Interaction $G \times D$
Plasma urea (mmol/L)	6.99 ± 0.56^{ab}	7.33 ± 0.44^{ab}	6.56 ± 0.38^{a}	8.57 ± 0.43^{b}	0.4803	0.0069	0.0809
Urinary creatinine (μmol)	4.17 ± 0.60	2.59 ± 0.25	3.02 ± 0.23	3.09 ± 0.43	0.3512	0.0896	0.0569
Urinary urea (mmol)	2.19 ± 0.29^{a}	1.60 ± 0.20^{ab}	1.56 ± 0.15^{ab}	1.45 ± 0.13^{b}	0.0600	0.0660	0.1916
Urinary nitrate (μmol)	4.37 ± 0.59	3.59 ± 0.60	3.12 ± 0.37	2.91 ± 0.48	0.0528	0.3220	0.5624
Urinary urea (mmol/μMol creatinine)	0.53 ± 0.03	0.59 ± 0.08	0.52 ± 0.03	0.53 ± 0.04	0.4680	0.4657	0.3840
Urinary nitrate (μmol/μmol creatinine)	1.10 ± 0.13	1.22 ± 0.13	1.04 ± 0.10	0.99 ± 0.19	0.3010	0.8372	0.5106

Mean values ± standard errors for 11–13 mice per group. Urinary excretions of urea and nitrate are expressed in absolute values and relative to creatinine excretion. Mean values within a row sharing a same superscript letter, or without superscript letter, were not significantly different at $P < 0.05$

Urinary excretions of creatinine, urea, and nitrate were not affected by either dietary treatment or genotype. However, when compared to WT mice, absolute values of urea and nitrate excretions in KO mice tended to be lower ($P = 0.0600$ and 0.0528, for urea and nitrate, respectively), but this trend disappeared when urinary excretions of urea and nitrate were expressed relatively to the creatinine excretion.

NO synthesis and the competition with systemic arginine conversion into urea (Fig. 2)

The conversion of systemic arginine into urea did not differ with either the genotype or the diet (Fig. 2a). In contrast, the conversion of systemic arginine into nitrate (a measure of whole-body NO synthesis) was significantly lower in KO mice, but remained not affected by the diet (Fig. 2b). When expressed as relative to the conversion of systemic arginine into urea, the effect of PPARα on whole-body NO synthesis was diet-sensitive (diet × genotype interaction) and the effect of PPARα inactivation was significant in mice fed the LIN diet but not in those fed COCO diet (Fig. 2c).

Discussion

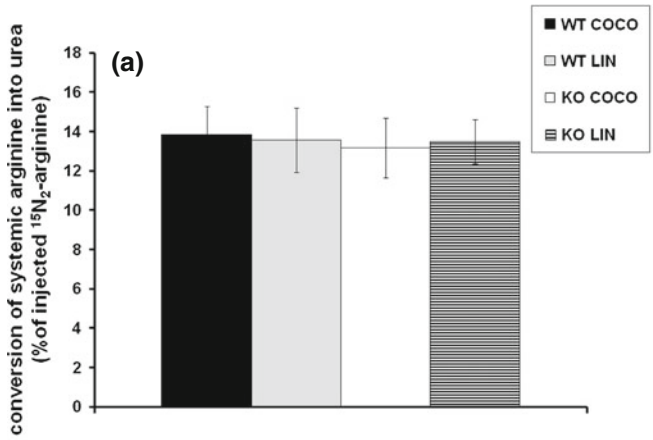
Validation of the model

In the present study, PPARα-null mice exhibited characteristic phenotypic alterations such as obesity, hepatic hypertrophy, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, and glycemic dysregulation (Table 1). These alterations are consistent with those initially described for lipid metabolism (Costet et al. 1998) and glucose homeostasis (Kersten et al. 1999; Neschen et al. 2007) and resemble those clustered in the metabolic syndrome (Cornier et al. 2008). Besides, in the present study, the degree of some alterations was sensitive to the nature of dietary fatty acids. Indeed, in KO mice, the LIN diet limited obesity, hepatic hypertrophy, and hypercholesterolemia, and aggravated the decrease in glycemia. These data are in line with our previous reports that an ALA-rich diet (as compared to saturated FA) alleviates some of the risk factors associated with the metabolic syndrome resulting from PPARα deficiency, and that even with a very low intake (Martin et al. 2007; Morise et al. 2009). Besides, in accordance with our previous study (Martin et al. 2007), they confirm that even a very low fatty acid intake (<5% in weight) can modulate markedly the phenotypic consequences of PPARα deficiency. In parallel, mRNA level of Cyp4a14, a typical PPARα target gene, was nearly abolished in KO mice, which indicated the absence of PPARα activity (Fig. 1). It was increased in WT mice fed the LIN diet (vs. the WT COCO group), showing that PPARα activity was sensitive to the diet.

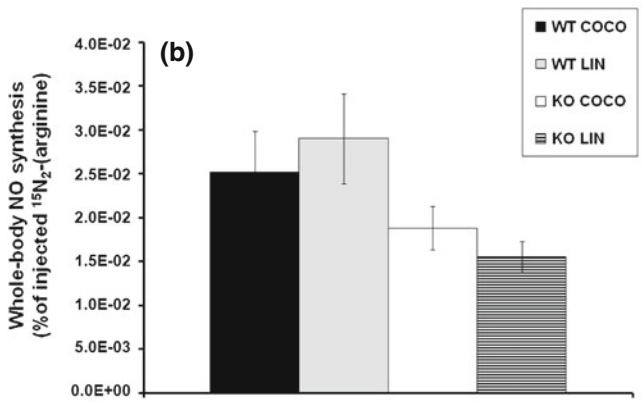
Thus, our experimental conditions reproduced the classical phenotype associated with PPARα deficiency, as well as the previously reported influence of dietary fatty acids on the degree of these alterations. This allowed us to consider our model as valid to investigate the effects of PPARα deficiency and dietary fatty acids on another metabolic pathway involved in the metabolic syndrome, i.e. NO synthesis from arginine.

PPARα deficiency alters arginine metabolism and NO synthesis

A few animal studies have investigated the role of PPARα in the regulation of amino acid metabolism, and especially of arginine metabolism. Using PPARα-null mice or PPARα pharmacological agonists, they clearly showed that PPARα regulates the mRNA level of key enzymes of arginine metabolism, such as arginase, deaminases, or transaminases (Edgar et al. 1998; Kersten et al. 2001; Sheikh et al.



P values	Urea	NO	NO/Urea
Genotype (G)	0.8015	0.0093	0.0325
Diet (D)	0.9786	0.9389	0.9661
Interaction (G*D)	0.8403	0.3314	0.0653



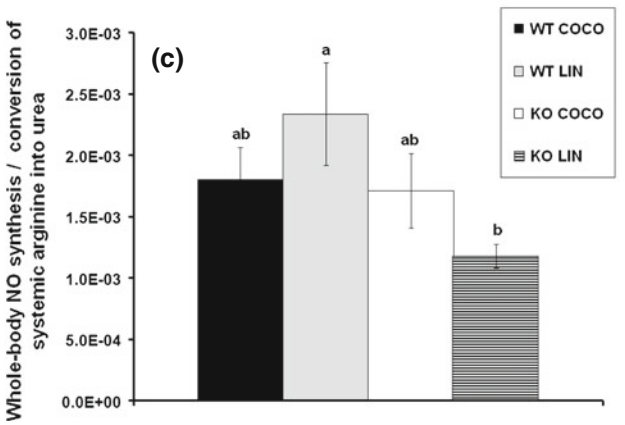


Fig. 2 Whole-body nitric oxide (NO), synthesis and conversion of systemic arginine into urea in WT and PPARα-null (KO) mice fed diets rich in either saturated FA (COCO diet) or ALA (LIN diet) for 8 weeks. Values are mean ± standard errors for 11–13 mice per group. For each parameter, *columns* sharing a *same superscript letter*, or *without superscript letter*, were not significantly different at $P < 0.05$. **a** Tracer-based measurement of the conversion of systemic arginine into urea. Values are presented as the percentage of the injected $^{15}N_2$-(guanido)-arginine dose that has been converted into ^{15}N-urea and recovered in the 23-h urine collection, adjusted for urinary creatinine excretion (in μmol). **b** Whole-body synthesis of nitric oxide (NO) after a systemic dose of $^{15}N_2$-(guanido)-arginine. Values are presented as the percentage of injected $^{15}N_2$-(guanido)-arginine converted into ^{15}N-nitrate, after adjustment of ^{15}N-urea relative to urinary creatinine (in μM). **c** Ratio of the whole-body synthesis of NO to the relative conversion of systemic arginine into urea

2007). Plasma markers of arginine metabolism (urea, amino acids of the urea cycle) were also affected (Kersten et al. 2001; Makowski et al. 2009; Sheikh et al. 2007), as well as kidney NOS activity (Newaz et al. 2005). All these studies clearly pointed out that PPARα is involved in the regulation of arginine metabolism, even if the underlying mechanisms appear to be complex.

The main objective of our study was to investigate the metabolism of arginine with a focus on NO synthesis, using a whole-body approach. One of the major findings is that PPARα deficiency significantly, markedly, reduced whole-body NO synthesis (Fig. 2). Interestingly, we found that the decrease in NO synthesis in PPARα deficiency could not be ascribed to an increase in the competitive systemic arginase pathway. The major evidence comes from the tracer-based measurements of the systemic conversion of arginine into urea, which was the same in all groups. The role of arginase as a modulator of NOS activity has been advocated in different pathophysiological situations where NO synthesis is thought to be impaired as a result an increased arginase activity and consequent reduction in L-arginine availability (Morris 2009). In contrast, in the present study, PPARα deficiency and the decrease in NO synthesis were associated with an increase in plasma arginine (Table 2), which does not indicate an arginine deficiency. However, arginine metabolism is highly compartmented, and we cannot rule out that the intracellular availability of arginine at the site of NO synthesis may be lowered in PPARα deficiency. The higher plasma arginine concentration in PPARα-null mice was paralleled with a lower plasma citrulline concentration (Table 2). This is consistent with the opposite pattern of variations in plasma arginine and citrulline that was reported in rats treated by pharmacological PPARα agonists (Linz et al. 2009; Sheikh

et al. 2007). Nevertheless, it is doubtful that the decreased plasma concentration of citrulline in PPARα-null mice can be fully accounted for by the impairment of arginine bioconversion via NOS, since this metabolic pathway contributes only marginally to the flux of plasma citrulline.

The molecular mechanisms by which PPARα deficiency impairs arginine channeling and whole-body NO synthesis remain unclear. On the one hand, hepatic mRNA levels of either NOS3 (constitutive) or NOS2 (inducible) were not affected (Fig. 1). It is important to note that the regulation of NO synthesis is so complex that mRNA levels of hepatic eNOS are unlikely to reveal the final modification in the NO synthesis pathway (Fleming and Busse 2003). On the other hand, PPARα deficiency also significantly increased plasma arginine concentration and decreased the mRNA level of arginase 1, which is strongly expressed in the liver, and is the key enzyme of bioconversion of arginine into ornithine and urea. This contrasts with a previous study showing that PPARα deficiency up-regulated hepatic arginase expression (Kersten et al. 2001). A possible explanation for this discrepancy is the fasting duration, which was 5 h in the present study and 24 h in the previous one.

We did not measure arginase activity in the present study, but this activity usually appears to be proportional to the amount of arginase protein, which, in turn, is determined primarily by transcription of the arginase genes (Morris 2009). Therefore, the marked decrease in hepatic arginase expression indicates that the reduction of NO synthesis in PPARα deficiency is not accounted for by an up-regulation of arginase pathway in the liver. It remains, however, very difficult to understand the changes in arginine metabolism using biochemical data from the liver only. In this regard, our measurement of whole-body NO synthesis has the advantage of offering a clear integrative insight into the final overall metabolic process of NO biosynthesis in PPARα deficiency.

In addition, the present study shows that PPARα deficiency affects not only arginine metabolism, but also overall amino acid metabolism, as evidenced by the changes in the plasma amino acid profile (Table 2). The complex pattern of changes that we found contrasts with previous data showing that PPARα deficiency globally decreases the plasma concentration of amino acids, including arginine (Makowski et al. 2009). These discrepancies may result from a difference in the difference of the fasting duration. Considering the high metabolic rates and substrate turn-over in mice (as compared to humans), the 5-h fasting that we used is much more physiological than the 18 h used previously (Makowski et al. 2009). Taken together, this would suggest that the role of PPARα in the prevention of amino acid catabolism is prominent in the adaptation to prolonged food deprivation (18 h), as suggested by Makowski et al. (2009), but is more complex in the regulation of the physiological fed-to-fasted transition.

The nature of dietary fatty interacts with the regulation of arginine metabolism by PPARα

A few in vivo studies suggested that dietary n-3 intake enhances NO synthesis (Harris et al. 1997; Li et al. 2008; Sekine et al. 2007). However, the role of PPARα as a mediator of n-3 PUFA-induced NO synthesis remains to be determined, as well as the underlying changes in the metabolism of amino acids, and especially of arginine. To our knowledge, the present study is the first to reveal that the nature of dietary fatty acids, even in a few amount, modulated some aspects of amino acid metabolism in either WT or PPARα-null mice.

Indeed plasma concentrations of histidine, lysine and α-amino-*N*-butyric acid concentrations were lower in the mice fed the LIN diet than in those fed the COCO diet (Table 2). Besides, the difference between the dietary groups was less pronounced in KO mice than in the WT ones. This is indicative of a classical activation of PPARα by dietary n-3 fatty acids in WT mice, which is partly abolished by PPARα deficiency. This contrasts with a previous study showing that rats treated with a pharmacological PPARα agonist (WY 14,643) exhibited either similar or higher concentrations of plasma amino acids (Sheikh et al. 2007). This discrepancy may be ascribed to the difference in the lipid content of the diets, which was low in our study and high in the rat study (48% in weight).

In contrast with the above-cited amino acids, plasma concentrations of arginine, threonine and urea were not affected by dietary FA in WT mice, but increased more in KO mice fed the LIN diet than in those fed the COCO diet (Tables 2, 3). On the opposite, plasma concentration of ornithine and citrulline decreased in KO mice fed the COCO diet, but not in those fed the LIN diet. Interestingly, in KO mice, utilization of systemic arginine for NO versus urea synthesis also tended to be sensitive to the nature of dietary FA, inasmuch as it was significantly impaired in the LIN group, but not in the COCO group (Fig. 2c). This suggests that PPARα deficiency makes the metabolism of some amino acids, including arginine, sensitive to the nature of dietary FA, as shown previously for lipid metabolism (Morise et al. 2009). Despite that, under our experimental conditions [lipids accounting for only 4.8% (in weight) of the diet], the effects of PPARα deficiency are largely prominent over those of the diet, these findings provide new insights into the pleiotropic effects of PPARα activation, and into the complex interactions between dietary fatty acids, gene transcription, and functional effects.

In conclusion, we have demonstrated for the first time that PPARα deficiency affects whole-body arginine metabolism, resulting in a marked impairment in NO synthesis. Accordingly, PPARα activation would favor NO synthesis, which warrants further study on the potential of PPARα up-regulation to prevent the decrease in NO synthesis that is closely associated with the physiopathology of the metabolic syndrome.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge the contribution of Angélique Foucault-Simonin and Colette Bétoulières for animal care and help with sampling and dissection, Dalila Azzout-Marniche, Véronique Mathé and Catherine Chaumontet for their precious advice on RT-PCR, and of Jean-François Huneau for his contribution to the data discussion. They also thank sincerely Pierre Weill and Guillaume Chesneau (Valorex company, La Messayais, Combourtillé, France) for providing linseed oil, and the Rohm & Hass company for their gift of the special ion-exchange resin. Najoua Guelzim is supported by a doctoral fellowship.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Blouet C, Mariotti F, Mathe V, Tome D, Huneau JF (2007) Nitric oxide bioavailability and not production is first altered during the onset of insulin resistance in sucrose-fed rats. Exp Biol Med (Maywood) 232:1458–1464

Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, Kiowski W, Luscher TF, Mancia G, Natali A, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Spieker LE, Taddei S, Webb DJ (2005) Endothelial function and dysfunction. Part II. Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. J Hypertens 23:233–246

Bulhak AA, Jung C, Ostenson CG, Lundberg JO, Sjoquist PO, Pernow J (2009) PPAR-alpha activation protects the type 2 diabetic myocardium against ischemia-reperfusion injury: involvement of the PI3-Kinase/Akt and NO pathway. Am J Physiol Heart Circ Physiol 296:H719–H727

Chotechuang N, Azzout-Marniche D, Bos C, Chaumontet C, Gausseres N, Steiler T, Gaudichon C, Tome D (2009) mTOR, AMPK, and GCN2 coordinate the adaptation of hepatic energy metabolic pathways in response to protein intake in the rat. Am J Physiol Endocrinol Metab 297:E1313–E1323

Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, Van Pelt RE, Wang H, Eckel RH (2008) The metabolic syndrome. Endocr Rev 29:777–822

Costet P, Legendre C, More J, Edgar A, Galtier P, Pineau T (1998) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. J Biol Chem 273:29577–29585

Edgar AD, Tomkiewicz C, Costet P, Legendre C, Aggerbeck M, Bouguet J, Staels B, Guyomard C, Pineau T, Barouki R (1998) Fenofibrate modifies transaminase gene expression via a peroxisome proliferator activated receptor alpha-dependent pathway. Toxicol Lett 98:13–23

Fawcett JK, Scott JE (1960) A rapid and precise method for the determination of urea. J Clin Pathol 13:156–159

Fleming I, Busse R (2003) Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 284:R1–R12

Forstermann U (2010) Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. Pflugers Arch 459:923–939

Forte P, Copland M, Smith LM, Milne E, Sutherland J, Benjamin N (1997) Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. Lancet 349:837–842

Fossati P, Prencipe L (1982) Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. Clin Chem 28:2077–2080

Hachem SB, Mooradian AD (2006) Familial dyslipidaemias: an overview of genetics, pathophysiology and management. Drugs 66:1949–1969

Harris WS, Rambjor GS, Windsor SL, Diederich D (1997) n-3 fatty acids and urinary excretion of nitric oxide metabolites in humans. Am J Clin Nutr 65:459–464

Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. J Clin Invest 103:1489–1498

Kersten S, Desvergne B, Wahli W (2000) Roles of PPARs in health and disease. Nature 405:421–424

Kersten S, Mandard S, Escher P, Gonzalez FJ, Tafuri S, Desvergne B, Wahli W (2001) The peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates amino acid metabolism. FASEB J 15:1971–1978

Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ (2006) Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. Circulation 113:1888–1904

Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero PM, Westphal H, Gonzalez FJ (1995) Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. Mol Cell Biol 15:3012–3022

Li P, Kim SW, Li X, Datta S, Pond WG, Wu G (2008) Dietary supplementation with cholesterol and docosahexaenoic acid increases the activity of the arginine-nitric oxide pathway in tissues of young pigs. Nitric Oxide 19:259–265

Linz W, Wohlfart P, Baader M, Breitschopf K, Falk E, Schafer HL, Gerl M, Kramer W, Rutten H (2009) The peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha) agonist, AVE8134, attenuates the progression of heart failure and increases survival in rats. Acta Pharmacol Sin 30:935–946

Luiking YC, Deutz NE (2003) Isotopic investigation of nitric oxide metabolism in disease. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 6:103–108

Magne J, Huneau JF, Delemasure S, Rochette L, Tome D, Mariotti F (2009) Whole-body basal nitric oxide production is impaired in postprandial endothelial dysfunction in healthy rats. Nitric Oxide 21:37–43

Makowski L, Noland RC, Koves TR, Xing W, Ilkayeva OR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Muoio DM (2009) Metabolic profiling of PPARalpha−/− mice reveals defects in carnitine and amino acid homeostasis that are partially reversed by oral carnitine supplementation. FASEB J 23:586–604

Mandard S, Muller M, Kersten S (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. Cell Mol Life Sci 61:393–416

Mandard S, Stienstra R, Escher P, Tan NS, Kim I, Gonzalez FJ, Wahli W, Desvergne B, Muller M, Kersten S (2007) Glycogen synthase 2 is a novel target gene of peroxisome proliferator-activated receptors. Cell Mol Life Sci 64:1145–1157

Mariotti F, Mahe S, Luengo C, Benamouzig R, Tome D (2000) Postprandial modulation of dietary and whole-body nitrogen

utilization by carbohydrates in humans. Am J Clin Nutr 72:954–962

Martin PGP, Guillou H, Lasserre F, Déjean S, Lan A, Pascussi JM, SanCristobal M, Legrand P, Besse P, Pineau T (2007) Novel aspects of PPARα mediated regulation of lipid and xenobiotic metabolism revealed through a nutrigenomic study. Hepatology 45:767–777

Marzinzig M, Nussler AK, Stadler J, Marzinzig E, Barthlen W, Nussler NC, Beger HG, Morris SM Jr, Bruckner UB (1997) Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and *S*-nitrosothiols. Nitric Oxide 1:177–189

Morise A, Thomas C, Landrier JF, Besnard P, Hermier D (2009) Hepatic lipid metabolism response to dietary fatty acids is differently modulated by PPARalpha in male and female mice. Eur J Nutr 48:465–473

Morris SM Jr (2009) Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. Br J Pharmacol 157:922–930

Neschen S, Morino K, Dong J, Wang-Fischer Y, Cline GW, Romanelli AJ, Rossbacher JC, Moore IK, Regittnig W, Munoz DS, Kim JH, Shulman GI (2007) n-3 Fatty acids preserve insulin sensitivity in vivo in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner. Diabetes 56:1034–1041

Newaz MA, Ranganna K, Oyekan AO (2004) Relationship between PPARalpha activation and NO on proximal tubular Na+ transport in the rat. BMC Pharmacol 4:1

Newaz M, Blanton A, Fidelis P, Oyekan A (2005) NAD(P)H oxidase/nitric oxide interactions in peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)alpha-mediated cardiovascular effects. Mutat Res 579:163–171

Omura M, Kobayashi S, Mizukami Y, Mogami K, Todoroki-Ikeda N, Miyake T, Matsuzaki M (2001) Eicosapentaenoic acid (EPA) induces Ca(2+)-independent activation and translocation of endothelial nitric oxide synthase and endothelium-dependent vasorelaxation. FEBS Lett 487:361–366

Patsouris D, Mandard S, Voshol PJ, Escher P, Tan NS, Havekes LM, Koenig W, Marz W, Tafuri S, Wahli W, Muller M, Kersten S (2004) PPARalpha governs glycerol metabolism. J Clin Invest 114:94–103

Richmond W (1973) Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. Clin Chem 19:1350–1356

Robinson E, Grieve DJ (2009) Significance of peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system in health and disease. Pharmacol Ther 122:246–263

Sekine S, Sasanuki S, Aoyama T, Takeuchi H (2007) Lowering systolic blood pressure and increases in vasodilator levels in SHR with oral alpha-linolenic acid administration. J Oleo Sci 56:341–345

Sheikh K, Camejo G, Lanne B, Halvarsson T, Landergren MR, Oakes ND (2007) Beyond lipids, pharmacological PPAR{alpha} activation has important effects on amino acid metabolism as studied in the rat. Am J Physiol Endocrinol Metab 292:E1157–E1165

Singh TU, Kathirvel K, Choudhury S, Garg SK, Mishra SK (2010) Eicosapentaenoic acid-induced endothelium-dependent and -independent relaxation of sheep pulmonary artery. Eur J Pharmacol 636:108–113

Touyz RM, Schiffrin EL (2006) Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications. Vascul Pharmacol 45:19–28

Vassault A, Cherruau B, Labbe D, Alabrune B, Baltassat P, Bonete R, Carroger G, Costantini S, Georges P, Giroud C et al (1992) Serum creatinine assay: results of a multicentric study with 16 analytical systems. Ann Biol Clin (Paris) 50:81–95

Zhang W, Wang R, Han SF, Bu L, Wang SW, Ma H, Jia GL (2007) Alpha-linolenic acid attenuates high glucose-induced apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells via PI3K/Akt/eNOS pathway. Nutrition 23:762–770

Article 2

Guelzim N, Huneau JF, Mathé V, Quignard-Boulangé A, Martin PG , Tomé D et Hermier D : Consequences of PPARα invalidation on glutathione synthesis : Interactions with dietary fatty. PPAR Res. 2011; 2011:256186. Epub 2011 Sep 12. PMID:21915176

Erratum

De l'article 2 : Guelzim N, Huneau JF, Mathé V, Quignard-Boulangé A, Martin PG , Tomé D et Hermier D : Consequences of PPARα invalidation on glutathione synthesis : Interactions with dietary fatty. PPAR Res. 2011; 2011:256186. Epub 2011 Sep 12. PMID:21915176

- Dans le tableau 2 à la page 4 de l'article : Pour plasma TG et plasma CT l'unité avancée est (mg/dl), alors que l'unité réelle est (g/l)

- Dans la figure 1 à la page 5 de l'article : Erreur dans le titre des figures, en réalité la figure 1 a correspond à Hepatic γGCL **specific** activity et la figure 1b correspond à Hepatic γGCL **total** activity.

Hindawi Publishing Corporation
PPAR Research
Volume 2011, Article ID 256186, 10 pages
doi:10.1155/2011/256186

Research Article

Consequences of PPARα Invalidation on Glutathione Synthesis: Interactions with Dietary Fatty Acids

Najoua Guelzim,[1,2] Jean-François Huneau,[1,2] Véronique Mathé,[1,2] Annie Quignard-Boulangé,[1,2] Pascal G. Martin,[3] Daniel Tomé,[1,2] and Dominique Hermier[1,2]

[1] *INRA, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France*
[2] *AgroParisTech, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France*
[3] *INRA, UR66 ToxAlim, Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, Toulouse, France*

Correspondence should be addressed to Dominique Hermier, dominique.hermier@agroparistech.fr

Received 26 April 2011; Revised 26 June 2011; Accepted 11 July 2011

Academic Editor: Stephane Mandard

Copyright © 2011 Najoua Guelzim et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Glutathione (GSH) derives from cysteine and plays a key role in redox status. GSH synthesis is determined mainly by cysteine availability and γ-glutamate cysteine ligase (γGCL) activity. Because PPARα activation is known to control the metabolism of certain amino acids, GSH synthesis from cysteine and related metabolisms were explored in wild-type (WT) and PPARα-null (KO) mice, fed diets containing either saturated (COCO diet) or 18 : 3 n-3, LIN diet. In mice fed the COCO diet, but not in those fed the LIN diet, PPARα deficiency enhanced hepatic GSH content and γGCL activity, superoxide dismutase 2 mRNA levels, and plasma uric acid concentration, suggesting an oxidative stress. In addition, in WT mice, the LIN diet increased the hepatic GSH pool, without effect on γGCL activity, or change in target gene expression, which rules out a direct effect of PPARα. This suggests that dietary 18 : 3 n-3 may regulate GSH metabolism and thus mitigate the deleterious effects of PPARα deficiency on redox status, without direct PPARα activation.

1. Introduction

PPARα is a major regulator of the macronutrient metabolism, especially during the fed-to-fasting transition [1]. Formerly, PPARα has been involved in the regulation of lipid metabolism, including cellular uptake of fatty acids, intracellular fatty acid binding and activation, microsomal ω-oxidation, β-oxidation and ketogenesis, and synthesis of lipoproteins [2, 3]. Later on, PPARα effects have been shown to extend to a number of target genes involved in the metabolism of glucose, glycerol and glycogen, and bile acids, as well as in inflammation, detoxification, and hepatocarcinogenesis [4, 5]. More recently, PPARα has also been shown to play a role in amino acid metabolism, through the regulation of a number of hepatic target genes involved in transamination, deamination, and urea synthesis [6–8].

Beyond nutritional situations, interest in PPARα effects on amino acids metabolism can also be considered in light of the involvement of specific amino acids in physiopathological processes associated with the metabolic syndrome. We have recently shown that PPARα deficiency decreases whole body nitric oxide (NO) synthesis from arginine, suggesting a beneficial effect of PPARα on vascular function [9]. Cysteine is a second amino acid of which metabolism might be of importance in the context of metabolic syndrome. Indeed, cysteine is the rate-limiting substrate for the synthesis of glutathione (GSH) [10], a major endogenous antioxidant, protecting cells from reactive oxygen species (ROS). Most of the GSH is utilized in antioxidant defence via the glutathione peroxidase (GPX) enzyme family to neutralize ROS and protect the body from their noxious effect [11]. GSH synthesis is a two-step process. The first rate-limiting step is the condensation of cysteine and glutamate to γ-glutamylcysteine and is catalyzed by γ-glutamate cysteine ligase (γGCL). While GSH synthesis occurs in every tissue, the liver plays a prominent role in whole body GSH flux [12]. A growing number of studies support a link between glutathione synthesis and utilization and the metabolic syndrome. Alterations in glutathione status and utilisation are long-recognized hallmarks of metabolic syndrome-associated oxidative stress

[13–17]. In parallel, fuelling glutathione synthesis through an extra cysteine supply has been shown to alleviate insulin resistance and oxidative stress in animal models of the metabolic syndrome [18, 19].

Despite that PPARα activation enhances ROS generation by activating fatty acid and β- and ω-oxidation, it can also promote ROS clearance through increased expression and/or activity of antioxidant enzymes, such as catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) [20–23]. Accordingly, PPARα deficiency decreases the activity of the same enzymes [23]. However, little is known regarding the role of PPARα in hepatic metabolism of GSH. In fasted mice, PPARα deficiency reduced hepatic GSH level and GPX activity [23]. Consistently, fibrate treatment increased erythrocyte GPX activity in human [24] and hepatic GSH content in the mouse [25]. A few studies have also addressed the effect of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), natural PPARα ligands, on GSH metabolism. In a rat model of chronic heart failure, n-3 fatty acid treatment increased cardiac γGCL content and activity, increased total and reduced glutathione, and decreased oxidized glutathione [26]. As concerns the destruction of ROS, the effects of n-3 PUFA supplementation in the rat are inconsistent, with GPX activity being decreased [27] or not changed [28]. In cultured human fibroblasts, DHA (22 : 6 n-3) induced expression and activity of γGCL, as well as intracellular GSH content [29]. However, none of these studies provided a direct evidence for a role of PPARα in the modulation of GSH metabolism by n-3 fatty acids.

The first and main objective of the present study was to investigate the effects of PPARα invalidation in the regulation of GSH metabolism by using wild-type (WT) and PPARα-deficient mice (KO). We have shown previously in the mouse that a number of hepatic genes known to be regulated essentially via PPARα were upregulated by α-linolenic acid (ALA, 18 : 3 n-3) as they are by its long-chain derivatives. This was observed in WT mice fed rather high-fat diets [30] but also in WT mice fed low-fat diets, albeit to a lesser extent [31]. For these reasons, as a secondary objective, we aimed to assess the contribution of dietary n-3 PUFA to PPARα activation, by exposing mice to contrasted diets, containing mostly either saturated FA or ALA. We explored GSH synthesis from cysteine, as well as hepatic thiol content and mRNA levels of enzymes involved in the protection against oxidative damages.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Diets. Male PPARα-deficient mice [32] were supplied by the ToxAlim laboratory (UR66, INRA, Toulouse), in which several additional rounds of backcrossing have been performed initially to increase the C57BL/6J genetic background and to generate the animals used [33]. Wild type male C57BL/6J mice were obtained from Charles River (L'Arbresle, France). *In vivo* studies were conducted under European Union guidelines for the use and care of laboratory animals.

Twenty-eight 6-7-week-old mice were bred in INRA's facility in Paris and housed collectively on wood litter, at $22 \pm 2^{\circ}$C under 12-h light/dark cycles (light on at 06:00 am). They were fed *ad libitum* a standard pelleted diet (Teklad 20-18S, Harlan, Gannat, France) and acclimated to local conditions for 4 weeks. At 10-11 weeks of age, mice were fed during 8 weeks one of the two experimental diets differing in their fatty acid profile (LIN or COCO diet, as described below). They had free access to food and tap water. Food consumption (as assessed per collective cage and expressed relatively to the mean body weight of mice in each cage) and individual body weight were recorded weekly.

Diets were provided as pellets by UPAE-INRA (Jouy-en-Josas, France) as described previously [31]. The calculated composition (in weight) of the two diets was 21.0% protein, 69.2% carbohydrate, 4.8% lipid, 4.0% vitamins, and 4.0% minerals. The experimental diets were isoenergetic, with lipids providing 11.3% of total energy intake. The choice of a low fat diet was based on the results of a previous nutrigenomic study of some of the present authors, showing significant effects of PPARα deficiency on lipid and xenobiotic metabolism in mice fed the same diets as in the present study [31]. Besides, in our previous studies, Cyp4a14 gene, exhibiting a PPRE sequence and being specifically activated by PPARα pure agonists [34], was significantly more expressed in WT mice than in KO mice fed a low fat diet rich in 18 : 3 n-3 [9, 31]. This indicated that even a low dietary amount of n-3 PUFA was able to activate PPARα, which justified the choice of the dietary conditions. Oils used for experimental diet preparation were hydrogenated coconut oil for a saturated FA-rich diet (SFA, COCO diet) and linseed oil for a ALA-rich oil (LIN diet). Their fatty acid composition was (in weight %): 99.6% SFA, 0.3% monounsaturated FA (MUFA), and 0.1% PUFA for the COCO diet; 9.0% SFA, 18.0% MUFA, and 72.9% PUFA (58% ALA) for the LIN diet [31].

2.2. Experimental Design. At the end of the experimental period, mice were fasted for 5 h, then weighed and anesthetized with combined xylazine/ketamine solution. Blood was taken by cardiac puncture, and mice were then killed by exsanguination. Plasma was separated by centrifugation (1,700$*$g, 20 min, 4°C) and aliquots were stored at -80°C. The abdominal cavity was then opened, and the liver was removed and weighed. Several liver samples were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Epididymal adipose tissue (EpAT, visceral localization) and inguinal adipose tissue (IngAT, subcutaneous localization) were removed and weighed.

2.3. Biochemical Analyses. Blood glucose concentration was determined with an Accu-Chek glucometer (Roche Diagnostics, Meylan, France). Plasma cholesterol, triglycerides, and uric acid were determined by colorimetric enzymatic methods using commercial kits (Bio-Merieux, Craponne, France), adapted for use in a 96-well microplate reader (Molecular Devices, Saint-Grégoire, France). Plasma amino acids were determined by ion-exchange chromatography with postcolumn ninhydrine derivatisation on an Aminotac JLC-500/V (Jeol, Tokyo, Japan). Plasma concentrations

Table 1: Primer sequences used in quantitative RT-PCR analysis.

Gene name	Abbreviation	Ref Seq	Forward primer	Reverse primer
Glutathione peroxidase 1 (GPX1)	Gpx1	NM_008160	GACACCAGGAGAATGGCAAGA	ACCATTCACTTCGCACTTCTCA
Cysteine dioxygenase (CDO)	Cdo	NM_033037	GATACATGCCACGCCTTTGA	CCTGAAGTTGTAAATGGAGTCCTGAT
Catalase (CAT)	Cat	NM_009804	GCCAGAAGAGAAACCCACAGACT	CACTGAACAAGAAAGAAACCTGATG
Glutamate cysteine ligase (γGCL), catalytic subunit	Gclc	NM_010295	GGAGGCGATGTTCTTGAGACTCT	CCTTCGATCATGTAACTCCCATACT
Glutamate-cysteine ligase (γGCL), modifier subunit	Gclm	NM_008129	GGCCTCCTGCTGTGTGATG	GCCTCAGAGAGCAGTTCTTTCG
Superoxide dismutase 1 (SOD1)	Sod1	NM_011434.1	GTGCAGGGAACCATCCACTT	GTCCTGACAACACAACTGGTTCA
Superoxide dismutase 2 (SOD2)	Sod2	NM_013671	GCTCTGGCCAAGGGAGATG	TGATTAATATGTCCCCCACCATT
CD68 antigen (CD68)	Cd68	NM_009853.1	CATCAGAGCCCGAGTACAGTCTACC	AATTCTGCGCCATGAATGTCC
Chemokine (C-C motif) ligand 2 (MCP1)	Ccl2	NM_011333.3	GGCTCAGCCAGATGCAGTTAA	CCAGCCTACTCATTGGGATCA
Serum amyloid A (SAA)	Saa	NM_009117.3	GCGAGCCTACACTGACATGA	TTTTCTCAGCAGCCCAGACT

All primer sequences were designed using Primer Express (Applied Biosystems) software and were from Eurogentec (Eurogentec, Seraing, Belgium).

of adiponectin, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), leptin, and insulin were determined using multiplexed immunoassays (Millipore-Linco Research, St. Charles, USA) on a Bioplex-200 analyzer (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France).

2.4. Gene Expression. Total RNA was extracted from a liver sample using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA), and synthesis of cDNA was performed on 400 ng of total RNA using a high capacity cDNA reverse transcription kit, based on the use of both oligodT and hexamers (Applied Biosystems, Foster City, USA). The primers listed in Table 1 were used for quantitative PCR on a 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems), as described previously [35]. Gene expression was determined using the $2^{-\Delta Ct}$ formula where ΔCt = (Ct target gene − Ct 18S).

2.5. Hepatic Thiol Concentrations. Total low-molecular weight thiols (cysteine, GSH, and cysteinylglycine (CysGly)) were analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) as described previously, with slight modifications [36]. Briefly, 50 mg of liver samples were homogenized in 950 μL of 0.1 M phosphate buffer and centrifuged (3,000∗g, 5 min). A small volume of supernatant was removed for subsequent protein assay with the Pierce bicinchoninic acid (BCA) Assay Kit (Pierce, Rockford, USA). Sixty μL of the supernatant were reduced with 0.66 vol of triphenylphosphine (10% in dimethylformamide) deproteinized by 2 vol of 10% TCA and derivatized by 3% 4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole at pH 9.0. After 1 hour incubation at 4°C, derivatization was stopped by adding 25 μL of 4 mM HCL. N-acetylcysteine was added in every sample as an internal standard. Thiol separation was achieved at 45°C on a Kromasil c18 column (15 cm × 4.6 mm id., 3.5 μm) with a mobile phase consisting in 90% 100 mM citrate buffer pH 4.0 and 10% methanol. External standards of GSH, cysteine, and CysGly were used for the identification and quantification of thiols in liver homogenates. Results were normalized for liver weight or protein content.

2.6. Hepatic γGCL Activity. Liver γGCL activity was assessed in liver homogenate using a fluorescence-based method as described previously [37]. Briefly, a cytosolic fraction was prepared from a 50 mg liver homogenate by successive centrifugation (10,000∗g, 10 min, 4°C and 15,000∗g, 5 min, 4°C). Fifty μL of this cytosolic fraction were preincubated for 5 min at 37°C with 1 vol of reaction medium consisting in (final concentration): 133 mM Tris, 13.3 mM ATP, 6.66 mM glutamic acid, 0.66 mM serine, 0.66 mM EDTA, 6.66 mM sodium borate and 13.3 mM $MgCl_2$. The reaction was started by the addition of 50 μL of cysteine (0.66 mM, final concentration) and stopped after 20 minutes at 37°C with 50 μL of 200 mM sulfosalicylic acid followed by centrifugation at 2,000 ×g. For derivatization, 20 μL of the resulting supernatant were incubated with 180 μL of 10 mM 2,3-naphthalenedicarboxaldehyde (NDA) solution, to form NDA-γ-glutamylcysteine. Fluorescence intensity (ε_{ex} 472 nm $-\varepsilon_{em}$ 528 nm) was measured on a fluorescence plate reader (CytoFluor 4000, Applied Biosystems) and quantified using standard curves of NDA-GSH. Results were corrected for initial GSH content and normalized for liver weight or protein concentration of the cytosolic fraction.

2.7. Statistical Analyses. Data are presented as means ± SEM. They were analysed using the SAS program (SAS Institute, Cary, USA). Differences between treatments and interactions were tested with a two-way ANOVA with genotype and diet

Table 2: Markers of PPARα deficiency in WT and PPARα-null (KO) mice fed diets containing either saturated FA (COCO diet) or ALA (LIN diet) for 8 weeks.

	WT		KO		*P* values			
	COCO	LIN	COCO	LIN	ANOVA	Genotype (G)	Diet (D)	Interaction G∗D
Body weight (g)	29.5 ± 0.5^{b}	29.6 ± 0.5^{b}	36.7 ± 1.0^{a}	32.7 ± 1.5^{b}	0.0001	0.0001	0.0379	0.0261
Liver weight (g)	1.07 ± 0.04^{b}	1.07 ± 0.06^{b}	1.55 ± 0.08^{a}	1.04 ± 0.04^{b}	<0.0001	0.0004	0.0001	0.0001
Liver weight (%)	3.88 ± 0.10^{b}	3.88 ± 0.25^{b}	4.50 ± 0.12^{a}	3.71 ± 0.12^{b}	0.0007	0.1403	0.0112	0.0123
EpAT weight (%)	2.31 ± 0.16^{b}	2.58 ± 0.19^{ab}	3.47 ± 0.28^{a}	2.91 ± 0.40^{ab}	0.0013	0.0038	0.5062	0.0720
IngAT weight (%)	1.46 ± 0.19^{b}	1.78 ± 0.12^{ab}	2.50 ± 0.23^{a}	1.79 ± 0.22^{ab}	0.0063	0.0090	0.3293	0.0102
Blood glucose (g/L)	1.94 ± 0.18^{b}	1.83 ± 0.21^{b}	1.48 ± 0.17^{ab}	1.17 ± 0.12^{a}	0.0001	0.0001	0.1892	0.4690
Plasma TG (mg/dL)	0.25 ± 0.02^{a}	0.30 ± 0.03^{ab}	0.39 ± 0.01^{b}	0.36 ± 0.05^{ab}	0.0231	0.0039	0.7881	0.3064
Plasma CT (mgd/L)	0.75 ± 0.02^{b}	0.62 ± 0.05^{b}	1.20 ± 0.07^{a}	0.84 ± 0.11^{b}	0.0001	0.0001	0.0015	0.0823

Values are means ± standard errors for 7 mice per group. Mean values within a row sharing a same superscript letter, or without superscript letter, were not significantly different at $P < 0.05$.

as factors, using the GLM procedure. When the genotype and/or diet factor was significant, differences between means were tested for significance using the *post hoc* Tukey-Kramer procedure. Significance level was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Markers of PPARα Deficiency in Relation to Dietary Treatment (Table 2). Body weight was higher in the KO mice. Throughout the 8 weeks of the experiment, individual daily food intake (in g, and as estimated from total food consumed per cage) was higher in KO mice, but was similar to the WT mice when corrected for the body weight (130 ± 14 mg/g body weight per day, whatever the genotype or the diet). This indicated that the higher body weight of the KO groups did not differ primarily from a higher food intake. In WT mice, the fatty acid composition of the diets did not affect the markers of the metabolic syndrome. PPARα deficiency resulted in higher body and liver weights, as well as in adipose tissue proportion than in WT mice. *Post-hoc* analysis showed that this genotype effect was significant only in the COCO-fed mice, and not in the LIN-fed ones. In contrast, there was no overall effect of PPARα deficiency on liver proportion but a significant genotype ∗ diet interaction, so that *post-hoc* analyses revealed that the liver proportion was significantly increased by PPARα deficiency the COCO-fed group, and not in the LIN-fed one. Similarly, the higher plasma concentrations of triglyceride and cholesterol found in the KO mice were more pronounced in the COCO-fed group than in the LIN-fed one. In contrast, when compared to their WT counterparts, KO mice exhibited a lower glycemia, this effect being more pronounced in mice fed the LIN diet.

3.2. GSH Metabolism Related Parameters

3.2.1. Hepatic Thiols Status (Table 3). Hepatic GSH concentration and pool varied according to the experimental conditions, with a strong interaction between the genotype and the diet ($P < 0.001$). In WT mice, GSH concentration and pool were 40% higher in those fed the LIN diet than in those fed the COCO diet. PPARα deficiency resulted in increased concentration and pool of GSH in the COCO-fed mice, while it did not affect the LIN-fed diet ones. Hepatic concentration and pool of cysteine and CysGly were much lower than those of GSH and were neither affected by PPARα deficiency nor by the diet.

3.2.2. Hepatic γGCL Activity (Figure 1) and mRNA Levels of γGCL and CDO (Table 4). In WT mice, the fatty acid composition of the diets did not influence either specific or total γGCL activity. PPARα deficiency significantly increased γGCL specific activity (Figure 1(a)) and total activity (Figure 1(b)). The *post-hoc* analysis showed that the effect of PPARα deficiency on γGCL was significant only in the LIN-fed mice for the specific activity and in the COCO-fed mice for the total activity. Hepatic mRNA level of γGCL and CDO was not affected by either PPARα deficiency or the diet (Table 4).

3.2.3. Plasma Amino Acid Concentrations (Table 5). Among amino acids related to cysteine metabolism, PPARα deficiency was associated with a significantly higher plasma concentration of methionine and lower concentration of glycine and taurine. Plasma concentration of glutamic acid and cysteine was not affected by the genotype. None of the plasma concentrations was influenced by the diet.

3.3. Oxidative Stress and Inflammatory Status

3.3.1. Hepatic mRNA Levels of Antioxidant Enzymes and of Inflammatory Markers (Table 4). Hepatic mRNA levels of the genes coding for GPx (Gpx1), CAT (Cat), and Cu/ZnSOD (Sod1) were not affected by PPARα deficiency, while PPARα deficiency significantly increased the mRNA level coding for

Table 3: Hepatic thiols concentrations and pools in WT and PPARα-null (KO) mice fed diets containing either saturated FA (COCO diet) or ALA (LIN diet) for 8 weeks.

	WT		KO		*P* values			
	COCO	LIN	COCO	LIN	ANOVA	Genotype (G)	Diet (D)	Interaction G∗D
GSH (μmol/g of protein)	3 112 ± 180^{b}	5 138 ± 412^{a}	5 201 ± 509^{a}	3 892 ± 382^{ab}	0.0013	0.2815	0.3569	0.0003
Cysteine (μmol/g of protein)	274 ± 91.8	190 ± 66.0	211 ± 55.8	243 ± 55.8	0.8377	0.9432	0.7061	0.4144
CysGly (μmol/g of protein)	97.5 ± 5.80	83.6 ± 12.7	102 ± 20.5	93.5 ± 8.14	0.8012	0.6243	0.4461	0.8514
GSH (μmol/ liver)	439 ± 31.3^{b}	774 ± 77.2^{ac}	1031 ± 118^{a}	544 ± 80.7^{bc}	0.0002	0.0367	0.3590	<.0001
Cysteine (μmol/ liver)	40.2 ± 16.0	29.3 ± 10.6	41.3 ± 10.1	33.2 ± 7.62	0.8614	0.8304	0.4181	0.9034
CysGly (μmol/ liver)	14.2 ± 1.24	13.1 ± 2.03	20.0 ± 3.49	12.9 ± 1.19	0.1456	0.2600	0.1099	0.2383

Values are means ± standard errors for 7 mice per group. Mean values within a row sharing a same superscript letter, or without superscript letter, were not significantly different at $P < 0.05$.

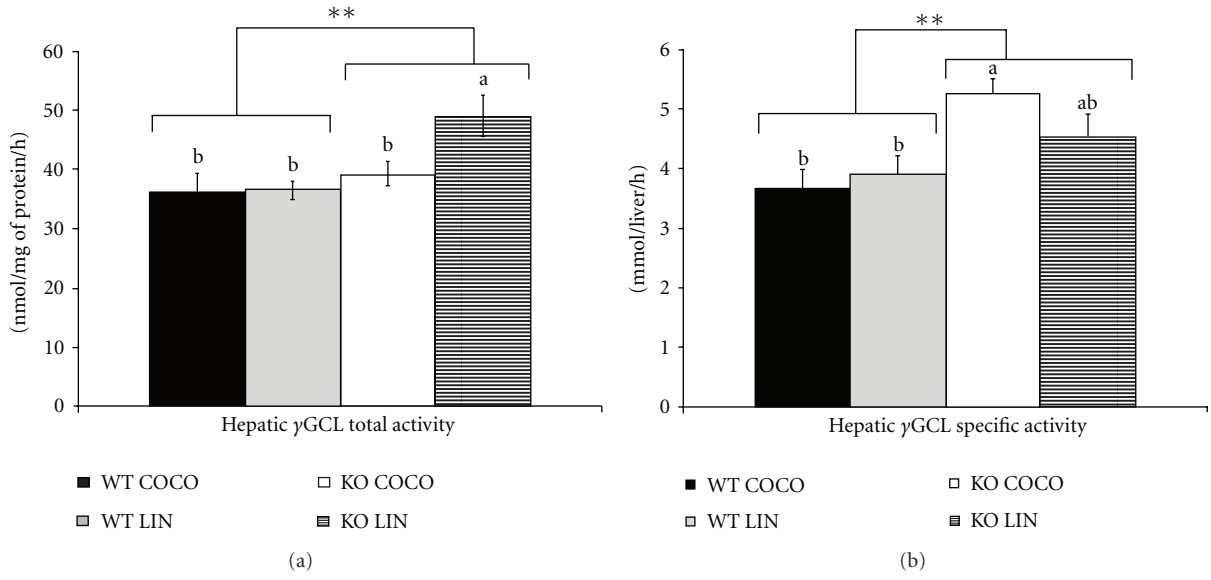


Figure 1: Hepatic GCL activity in WT and PPARα-deficient (KO) mice fed diets containing either saturated FA (COCO diet) or ALA (LIN diet) for 8 weeks. Values are expressed as nmol/mg of protein/h for specific activity (a) and as mmol/liver/h for total activity (b). They are means ± standard errors for 7 mice per group, **KO group significantly different from WT group $P < 0.01$. Columns sharing a same superscript letter, or without superscript letter, were not significantly different at $P < 0.05$.

MnSOD (Sod2). None of these mRNA levels was influenced by the diet, whatever the genotype.

CD68 mRNA level was significantly higher in KO mice than in WT ones. *Post-hoc* analysis showed that this genotype effect was borne by the mice fed the LIN diet essentially. SAA and MCP1 mRNA levels were also numerically higher in KO mice, but the difference was not statistically significant ($P = 0.0684$ for SAA and 0.0829 for MCP1).

3.3.2. Plasma Concentration of Uric Acid (Figure 2). In WT mice, the fatty acid composition of the diets did not influence

Table 4: Hepatic mRNA levels of cysteine and glutathione metabolism key genes, and of inflammatory markers, in WT and PPARα-null (KO) mice fed diets containing either saturated FA (COCO diet) or ALA (LIN diet) for 8 weeks (arbitrary units).

	WT		KO			*P* values		
	COCO	LIN	COCO	LIN	ANOVA	Genotype (G)	Diet (D)	Interaction G∗D
Glutamate cysteine ligase (γGCLc), catalytic subunit	0.22 ± 0.04	0.30 ± 0.07	0.22 ± 0.05	0.13 ± 0.02	0.1583	0.0941	0.9836	0.1183
Glutamate cysteine ligase (γGCLm), modifier subunit	0.68 ± 0.11	0.65 ± 0.07	0.55 ± 0.07	0.63 ± 0.17	0.8840	0.5255	0.8070	0.6317
Cysteine dioxygenase (CDO)	3.84 ± 0.61	2.24 ± 0.16	2.22 ± 0.38	3.92 ± 1.02	0.1193	0.8885	0.9780	0.0181
Glutathione peroxidase 1 (GPX1)	8.65 ± 1.58	9.32 ± 1.15	8.79 ± 1.55	9.54 ± 2.71	0.9857	0.9272	0.7211	0.9844
Catalase (CAT)	1.05 ± 0.28	0.97 ± 0.12	0.92 ± 0.22	0.71 ± 0.13	0.6463	0.3327	0.4750	0.7445
Superoxide dismutase 1 (SOD1)	64.9 ± 3.36	61.2 ± 3.68	63.1 ± 3.95	69.8 ± 3.96	0.4529	0.3941	0.7101	0.2006
Superoxide dismutase 2 (SOD2)	5.09 ± 1.06^{b}	5.66 ± 0.77^{bc}	10.1 ± 0.63^{a}	8.49 ± 0.7^{ac}	0.0005	<0.001	0.517	0.1873
CD68 antigen (CD68)	20.0 ± 10.4^{ab}	8.75 ± 8.28^{b}	30.9 ± 11.9^{a}	29.1 ± 14.8^{a}	0.0121	0.0027	0.1717	0.3142
Chemokine (C-C motif) ligand 2 (MCP1)	0.94 ± 0.45	0.77 ± 0.25	1.45 ± 0.28	1.55 ± 1.77	0.3467	0.0898	0.7011	0.9267
Serum amyloid A (SAA)	0.47 ± 0.29	0.51 ± 0.36	2.13 ± 3.83	2.70 ± 2.69	0.2919	0.0684	0.7926	0.7615

Gene expression was determined using the $2^{-\Delta Ct}$ formula where ΔCt = (Ct target gene − Ct 18S). Values are means ± standard errors for 4–7 mice per group. Mean values within a row sharing a same superscript letter, or without superscript letter, were not significantly different at $P < 0.05$.

Table 5: Plasma concentrations of amino acid involved in cysteine metabolism in WT and PPARα-null (KO) mice fed diets containing either saturated FA (COCO diet) or ALA (LIN diet) for 8 weeks.

	WT		KO			*P* values		
	COCO	LIN	COCO	LIN	ANOVA	Genotype (G)	Diet (D)	Interaction G∗D
Cysteine	16.3 ± 3.64	15.0 ± 2.12	17.2 ± 2.71	17.6 ± 3.87	0.9574	0.6144	0.8946	0.7949
Glycine	231 ± 17.3^{a}	219 ± 14.26^{ab}	170 ± 5.85^{b}	214 ± 16.3^{ab}	0.0236	0.0250	0.2603	0.0600
L-glutamic acid	23.6 ± 1.20	23.9 ± 3.09	21.5 ± 1.38	19.4 ± 1.20	0.3186	0.0800	0.6746	0.5300
Methionine	39.8 ± 1.89	38.9 ± 2.07	47.1 ± 3.83	49.8 ± 5.32	0.0980	0.0150	0.8094	0.6253
Taurine	436 ± 59.8	511 ± 38.0	389 ± 43.0	366 ± 22.4	0.1290	0.0403	0.5624	0.2797

Values are expressed in μM. Values are means ± standard errors for 7 mice per group. Mean values within a row sharing a same superscript letter, or without superscript letter, were not significantly different at $P < 0.05$.

uric acid concentration. When compared to their WT counterparts, PPARα KO mice exhibited a higher plasma uric acid concentration. However, due to a significant genotype*diet interaction, this concentration was affected only in mice fed the COCO diet.

3.3.3. Plasma Cytokines and Hormones (Table 6). Concentrations of leptin, insulin, and PAI1 were neither affected by the diet nor by the genotype. Independently of the genotype, adiponectine concentration was significantly higher in the LIN-fed mice diet than in the COCO-fed mice and tended to decrease ($P = 0.0596$) in response to PPARα deficiency. In contrast, MCP1 concentration was not affected by the diet, but significantly decreased in PPARα-deficient mice compared to WT mice.

4. Discussion

PPARα KO has been previously shown to affect fatty acid metabolism [33] and glucose homeostasis [1, 38]. In line with these observations, our experimental conditions

Table 6: Plasma hormones and cytokines concentrations in WT and PPARα-null (KO) mice fed diets containing either saturated FA (COCO diet) or ALA (LIN diet) for 8 weeks.

	WT		KO		*P* values			
	COCO	LIN	COCO	LIN	ANOVA	Genotype (G)	Diet (D)	Interaction G∗D
Insulin (ng/mL)	1.68 ± 0.36	2.87 ± 0.54	2.66 ± 0.37	1.83 ± 0.77	0.2300	0.9510	0.7145	0.0531
Leptin (pg/mL)	222 ± 52.9	254 ± 71.54	179 ± 39.2	242 ± 57.9	0.7748	0.6541	0.4430	0.8041
Adiponectine (mg/mL)	8.11 ± 1.03^{b}	13.6 ± 1.37^{a}	6.95 ± 0.45^{b}	10.7 ± 0.81^{ab}	0.0005	0.0596	0.0002	0.3990
MCP 1 (pg/mL)	20.2 ± 4.55	18.3 ± 1.75	10.3 ± 1.89	13.8 ± 1.69	0.1040	0.0338	0.8119	0.4066
PAI 1 (ng/mL)	1.53 ± 0.19	1.65 ± 0.31	0.97 ± 0.21	1.65 ± 0.43	0.2241	0.3203	0.1616	0.3120

Values are means ± standard errors for 7 mice per group. Mean values within a row sharing a same superscript letter, or without superscript letter, were not significantly different at $P < 0.05$.

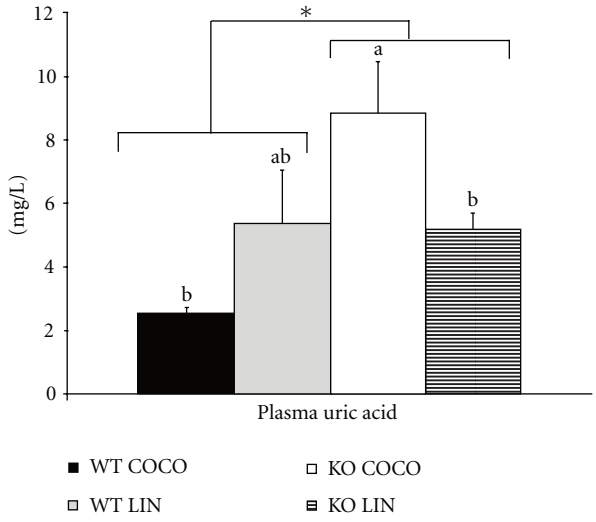


Figure 2: Plasma concentrations of uric acid in WT and PPARα-deficient (KO) mice fed diets containing either saturated FA (COCO diet) or ALA (LIN diet) for 8 weeks. Values are means ± standard errors for 7 mice per group, *KO group significantly different from WT group $P < 0.05$. Columns sharing a same superscript letter, or without superscript letter, were not significantly different at $P < 0.05$.

reproduced the characteristic phenotypic alterations associated with PPARα deficiency, which are similar to some of those clustered in the metabolic syndrome, such as obesity, hepatic hypertrophy, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, and glycemic dysregulation (Table 2). Because alteration of glutathione metabolism is a common feature of the metabolic syndrome [39], and since we and others have previously shown that PPARα invalidation impacted some specific amino acid metabolic pathways [6–9, 40], investigating the effects of PPARα deficiency on cysteine metabolism and GSH status was especially relevant.

4.1. Consequences of PPARα Deficiency on GSH Metabolism. Under our experimental conditions, PPARα invalidation was primarily associated with an overall increase in the hepatic pool of GSH ($P < 0.0367$, Table 3). The significant genotype ∗ diet interaction ($P < 0.001$) showed that this was true only in mice fed the COCO diet, as discussed below. An increase in GSH pool might reflect an increase in GSH synthesis and/or a decrease in GSH utilization (export and/or degradation). As concerns GSH synthesis, it is regulated primarily by γGCL activity, cysteine availability, and GSH feedback inhibition [41]. In PPARα-deficient mice, the increase in hepatic GSH pool could be directly related to an enhanced synthesis from cysteine, as suggested by their higher total γGCL activity (Figure 1(b)). In parallel, PPARα invalidation was accompanied by a lower plasma concentration of one of the GSH precursors, glycine, but also of taurine, whereas that of methionine increased (Table 5). In contrast, plasma concentration of cysteine was not affected, suggesting that cysteine availability was not limiting for GSH synthesis. Our results on taurine are consistent with the decrease in plasma taurine concentration and in CDO mRNA level in the adipose tissue of obese mice [42]. The blunting of cysteine to taurine flux in the adipose tissue may eventually result in a sparing of cysteine which could be used for glutathione synthesis. Because part of glycine synthesis involves methyl transfer from methionine, the decrease in glycine, together with the increase in methionine, may reflect alterations in one-carbon metabolism, as reported in subjects with nonalcoholic hepatosteatitis [43].

In addition to an increase in synthesis rate, the higher hepatic GSH pool in KO mice could also result from a decreased utilization in antioxidant defences. Under our experimental conditions, the level of GPX1 mRNA, the major glutathione peroxidase isoform, was unaffected by PPARα deficiency (Table 4). This is consistent with a previous study showing that GPX activity was not altered in fasted PPARα KO mice [23] and suggests that fibrate-enhanced GPX activity found in human erythrocytes [24] was PPARα independent, and probably involved complex post-transcriptional regulations.

4.2. Interactions between Genotype and Diet. A secondary aim of this study was to investigate the impact of n-3 PUFA, the nutritional PPARα ligands, on GSH metabolism. In WT mice, hepatic GSH concentration and pool are higher in mice fed the LIN diet than in those fed the COCO diet.

This is consistent with previous studies suggesting that long-chain n-3 PUFA may exert a beneficial action on oxidative stress by increasing total glutathione in a rat model of chronic heart failure [26] and in cultured human fibroblasts [29]. However, to our knowledge, the present study is the first evidence that, in comparison with saturated fatty acids, even a very low amount of ALA may exert the same effects on GSH metabolism as its long-chain derivatives. We have shown previously that even a very low intake of dietary ALA (identical to the present study) activates typical targets of PPARα, such as Cyp4a14 [9, 31]. However, the mechanisms by which ALA regulates GSH metabolism in WT mice remains speculative, since none of the genes studied, and in particular γGCL, exhibited a difference in mRNA level between the COCO and the LIN diet. Thus, even if typical target genes of PPARα are activated by the LIN diet, rich in 18 : 3 n-3, it is not possible to conclude on a direct involvement of PPARα into the regulation of GSH level by fatty acids. Other pleiotropic effects of fatty acids have to be investigated, such as modifications of membrane microdomain composition (thus modulating receptors and ion channels functioning) or regulation of downstream cell signalling pathways.

Unexpectedly, the impact of the dietary fatty acid profile on GSH metabolism was even more pronounced in KO mice. Indeed, *post-hoc* analysis showed that PPARα deficiency increased total GSH content only in COCO-fed mice, and not in the LIN-fed mice. Specific activity and mRNA level of γGCL were not affected by PPARα deficiency in mice fed the COCO diet (Figure 1(a) and Table 4). Thus, their higher GSH content results not only from a difference in liver weight, which was 50% higher in this group than in the three other ones (Table 2), but also from their increased GSH concentration (Table 3), suggesting that the increased GSH pool in KO mice fed the COCO diet is diet specific. The mechanistic reasons why GSH concentration increased in KO mice when fed the COCO diet remain unclear, since γGCL specific activity was the same as in their WT counterparts, whereas GPx activity was not affected by PPARα deficiency. It may be hypothesised that, secondary to PPARα invalidation, exportation of GSH into plasma towards extrahepatic tissues is impaired in KO mice, which would functionally affect the antioxidative defences of the whole body. In contrast, GSH concentration and pool were not significantly affected by PPARα deficiency in mice fed the LIN diet (Table 3). To our knowledge, the only other study having investigated the consequence of PPARα deficiency on GSH metabolism reported a significant depletion (20–25%) in total hepatic GSH content in fasted KO mice fed a standard rodent chow [23]. The fatty acid composition of the diet did not figure in this study, but was probably, as usual in standard rodent chows, soy oil rich in n-6 PUFA. Taken together, our data and the previous ones suggest that a diet in which the lipid moiety is rich in saturated FA and poor in PUFA, such as the COCO diet, makes the liver GSH pool sensitive to PPARα invalidation, whereas PUFA would protect the mice against the effects of PPARα deficiency.

In addition to the changes in cysteine metabolism and GSH status, PPARα deficiency seemed to alter some markers of the oxidative and inflammatory status, in interaction with dietary fatty acids. Indeed, Sod2 (but not Sod1) mRNA level increased in KO mice, especially when fed the COCO diet (Table 4), which indicates an activation of antioxidant defences [44]. This is apparently inconsistent with the enhanced Sod2 expression by fenofibrate in mouse brain microvessels [45] and with the decrease in SOD activity in fasted PPARα KO mice compared to the WT ones [23]. As discussed above for GSH content, these discrepancies may reflect an effect of the dietary fatty acid profile on the response to oxidative stress of PPARα KO mice. In line with the higher Sod2 expression in PPARα KO mice, we also observed an increase in the plasma concentration of uric acid, a widely recognized marker of oxidative stress [46], with the same diet $*$ genotype interaction: this concentration was 4-fold increased in KO mice fed the COCO diet, but not in those fed the LIN diet (Figure 2). To our knowledge, this is the first evidence of the impact of PPARα deficiency of plasma uric acid concentration, in interaction with the dietary fatty acid profile. Altogether, these two markers (hepatic Sod2 mRNA level and plasma uric acid concentration) support the existence of a mild oxidative stress in PPAR KO mice, which is mitigated by the LIN diet. This is consistent with the previously reported prevention of hepatic steatosis in PPAR KO mice by ALA [30, 31]. Triglyceride accumulation in the liver is known to trigger oxidative stress, which in turn contributes to the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis [47]. Therefore, a decrease in fatty acid accumulation in response to ALA feeding is expected to mitigate the oxidative stress resulting from PPARα invalidation.

While PPAR deficiency induced a mild oxidative stress, evidences for inflammation were less conclusive, since the plasma concentration of both the proinflammatory cytokine MCP1 and the anti-inflammatory adipokine, adiponectine, was decreased, whereas PAI1 concentration did not change (Table 6). In the liver, mRNA levels of CD68, SAA, and MCP1 increased in KO mice, but the difference with WT mice was significant for CD68 only. Taken together, these results suggest a mild inflammatory status in response to PPARα invalidation. This is consistent with previous results reporting that obesity-induced inflammation is aggravated in PPAR-deficient mice [48]. Finally, whatever the genotype, the plasma concentration of adiponectine, an anti-inflammatory adipokine, was higher in mice fed the LIN diet, suggesting an influence of the fatty acid profile of the diet, which is PPARα independent.

5. Conclusion

Under our experimental conditions, and in accordance with a previous study [23], PPARα deficiency seemed to induce an oxidative and inflammatory stress in the liver, as evidenced by the higher values of hepatic GSH pool and concentration, total γGCL activity, Sod2 mRNA level, and plasma uric acid concentration. However, the phenotypic consequences of PPARα deficiency depended, as last partly, on the dietary fatty acid profile. Indeed, most increases

observed in KO mice fed the COCO diet (hepatic GSH pool and concentration, total γGCL activity, Sod2 mRNA level, and plasma uric acid concentration) were alleviated, or even absent, in mice fed the LIN diet, suggesting that ALA would be protective against these effects of PPARα invalidation. The reasons of this diet-based sensitivity remains unclear, but it is likely that it is not directly related to the PPARα deficiency. More probably, it is secondary to the previously described effects of dietary fatty acids on hepatic steatosis in PPARα KO mice [30, 31]. Indeed, this hepatic steatosis occurred in KO mice fed a SFA-containing diet, but was alleviated, and even absent, in those fed a PUFA-containing diet. It may thus be hypothesized that the beneficial effects of dietary PUFA on liver metabolism in KO mice, even in low amounts, may be accounted for by a protection against lipid accumulation, resulting in lower lipotoxicity and oxidative stress than with SFA.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Thierry Pineau for the PPARα-deficient mice, which are a kind gift from Dr. Franck J. Gonzalez and are carefully bred by Colette Bétoulières (Toulouse). They gratefully acknowledge the contribution of Angélique Foucault-Simonin (Paris) for animal care and help with dissection and sampling. They also thank sincerely Pierre Weill and Guillaume Chesneau (Valorex company, La Messayais, Combourtillé, France) for providing linseed oil. G. Najoua is supported by a doctoral fellowship.

References

[1] S. Kersten, J. Seydoux, J. M. Peters, F. J. Gonzalez, B. Desvergne, and W. Wahli, "Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 103, no. 11, pp. 1489–1498, 1999.

[2] H. Keller, F. Givel, M. Perroud, and W. Wahli, "Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements," *Molecular Endocrinology*, vol. 9, no. 7, pp. 794–804, 1995.

[3] P. Lefebvre, G. Chinetti, J.-C. Fruchart, and B. Staels, "Sorting out the roles of PPARα in energy metabolism and vascular homeostasis," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 3, pp. 571–580, 2006.

[4] S. Mandard, M. Muller, and S. Kersten, "Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 61, no. 4, pp. 393–416, 2004.

[5] S. Mandard, R. Stienstra, P. Escher et al., "Glycogen synthase 2 is a novel target gene of peroxisome proliferator-activated receptors," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 64, no. 9, pp. 1145–1157, 2007.

[6] S. Kersten, S. Mandard, P. Escher et al., "The peroxisome proliferator-activated receptor α regulates amino acid metabolism," *FASEB Journal*, vol. 15, no. 11, pp. 1971–1978, 2001.

[7] D. Patsouris, S. Mandard, P. J. Voshol et al., "PPARα governs glycerol metabolism," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 114, no. 1, pp. 94–103, 2004.

[8] K. Sheikh, G. Camejo, B. Lanne, T. Halvarsson, M. R. Landergren, and N. D. Oakes, "Beyond lipids, pharmacological PPARα activation has important effects on amino acid metabolism as studied in the rat," *American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism*, vol. 292, no. 4, pp. E1157–E1165, 2007.

[9] N. Guelzim, F. Mariotti, P. G. Martin, F. Lasserre, T. Pineau, and D. Hermier, "A role for PPARα in the regulation of arginine metabolismand nitric oxide synthesis," *Amino Acids*. In press.

[10] D. L. Bella, L. L. Hirschberger, Y. Hosokawa, and M. H. Stipanuk, "Mechanisms involved in the regulation of key enzymes of cysteine metabolism in rat liver in vivo," *American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism*, vol. 276, no. 2, part 1, pp. E326–E335, 1999.

[11] H. J. Forman, H. Zhang, and A. Rinna, "Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 30, no. 1-2, pp. 1–12, 2009.

[12] M. H. Stipanuk, "Role of the liver in regulation of body cysteine and taurine levels: a brief review," *Neurochemical Research*, vol. 29, no. 1, pp. 105–110, 2004.

[13] A. C. Maritim, R. A. Sanders, and J. B. Watkins III, "Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review," *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, vol. 17, no. 1, pp. 24–38, 2003.

[14] A. Galinier, A. Carriere, Y. Fernandez et al., "Site specific changes of redox metabolism in adipose tissue of obese Zucker rats," *FEBS Letters*, vol. 580, no. 27, pp. 6391–6398, 2006.

[15] C. K. Roberts, R. J. Barnard, R. K. Sindhu, M. Jurczak, A. Ehdaie, and N. D. Vaziri, "Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome," *Metabolism*, vol. 55, no. 7, pp. 928–934, 2006.

[16] F. Song, W. Jia, Y. Yao et al., "Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed type 2 diabetes," *Clinical Science*, vol. 112, no. 12, pp. 599–606, 2007.

[17] P. Giral, N. Jacob, C. Dourmap et al., "Elevated γ-glutamyltransferase activity and perturbed thiol profile are associated with features of metabolic syndrome," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 28, no. 3, pp. 587–593, 2008.

[18] C. Blouet, F. Mariotti, D. Azzout-Marniche et al., "Dietary cysteine alleviates sucrose-induced oxidative stress and insulin resistance," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 42, no. 7, pp. 1089–1097, 2007.

[19] S. K. Jain, T. Velusamy, J. L. Croad, J. L. Rains, and R. Bull, "L-Cysteine supplementation lowers blood glucose, glycated hemoglobin, CRP, MCP-1, and oxidative stress and inhibits NF-κB activation in the livers of Zucker diabetic rats," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 46, no. 12, pp. 1633–1638, 2009.

[20] T. Toyama, H. Nakamura, Y. Harano et al., "PPARα ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 324, no. 2, pp. 697–704, 2004.

[21] I. Inoue, S. Noji, T. Awata et al., "Bezafibrate has an antioxidant effect: peroxisome proliferator-activated receptor α is associated with Cu^{2+}, Zn^{2+}-superoxide dismutase in the liver," *Life Sciences*, vol. 63, no. 2, pp. 135–144, 1998.

[22] I. Inoue, S. Goto, T. Matsunaga et al., "The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα)

and PPARγ increase Cu^{2+}, Zn^{2+}-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells," *Metabolism*, vol. 50, no. 1, pp. 3–11, 2001.

[23] M. A. Abdelmegeed, K. H. Moon, J. P. Hardwick, F. J. Gonzalez, and B. J. Song, "Role of peroxisome proliferator-activated receptor-α in fasting-mediated oxidative stress," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 47, no. 6, pp. 767–778, 2009.

[24] I. Tkac, A. Molcanyiova, M. Javorsky, and M. Kozarova, "Fenofibrate treatment reduces circulating conjugated diene level and increases glutathione peroxidase activity," *Pharmacological Research*, vol. 53, no. 3, pp. 261–264, 2006.

[25] S. L. Arnaiz, M. Travacio, A. J. Monserrat, J. C. Cutrin, S. Llesuy, and A. Boveris, "Chemiluminescence and antioxidant levels during peroxisome proliferation by fenofibrate," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1360, no. 3, pp. 222–228, 1997.

[26] Y. Fang, J. Favre, M. Vercauteren et al., "Reduced cardiac remodelling and prevention of glutathione deficiency after ω-3 supplementation in chronic heart failure," *Fundamental and Clinical Pharmacology*, vol. 25, no. 3, pp. 323–332, 2011.

[27] T. R. Ramaprasad, V. Baskaran, T. P. Krishnakantha, and B. R. Lokesh, "Modulation of antioxidant enzyme activities, platelet aggregation and serum prostaglandins in rats fed spray-dried milk containing n-3 fatty acid," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 280, no. 1-2, pp. 9–16, 2005.

[28] H. Erdogan, E. Fadillioglu, S. Ozgocmen et al., "Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats," *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 71, no. 3, pp. 149–152, 2004.

[29] K. Arab, A. Rossary, F. Flourié, Y. Tourneur, and J. P. Steghens, "Docosahexaenoic acid enhances the antioxidant response of human fibroblasts by upregulating γ-glutamyl-cysteinyl ligase and glutathione reductase," *British Journal of Nutrition*, vol. 95, no. 1, pp. 18–26, 2006.

[30] A. Morise, C. Thomas, J. F. Landrier, P. Besnard, and D. Hermier, "Hepatic lipid metabolism response to dietary fatty acids is differently modulated by PPARα in male and female mice," *European Journal of Nutrition*, vol. 48, no. 8, pp. 465–473, 2009.

[31] P. G. Martin, H. Guillou, F. Lasserre et al., "Novel aspects of PPARα-mediated regulation of lipid and xenobiotic metabolism revealed through a nutrigenomic study," *Hepatology*, vol. 45, no. 3, pp. 767–777, 2007.

[32] S. S. Lee, T. Pineau, J. Drago et al., "Targeted disruption of the α isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 15, no. 6, pp. 3012–3022, 1995.

[33] P. Costet, C. Legendre, J. Moré, A. Edgar, P. Galtier, and T. Pineau, "Peroxisome proliferator-activated receptor α -isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 45, pp. 29577–29585, 1998.

[34] M. Rakhshandehroo, L. M. Sanderson, M. Matilainen et al., "Comprehensive analysis of PPARα-dependent regulation of hepatic lipid metabolism by expression profiling," *PPAR Research*, vol. 2007, Article ID 26839, 13 pages, 2007.

[35] N. Chotechuang, D. Azzout-Marniche, C. Bos et al., "mTOR, AMPK, and GCN2 coordinate the adaptation of hepatic energy metabolic pathways in response to protein intake in the rat," *American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism*, vol. 297, no. 6, pp. E1313–E1323, 2009.

[36] T. Santa, C. Aoyama, T. Fukushima, K. Imai, and T. Funatsu, "Suppression of thiol exchange reaction in the determination of reduced-form thiols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after derivatization with fluorogenic benzofurazan reagent, 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate and 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole," *Biomedical Chromatography*, vol. 20, no. 6-7, pp. 656–661, 2006.

[37] C. C. White, H. Viernes, C. M. Krejsa, D. Botta, and T. J. Kavanagh, "Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity," *Analytical Biochemistry*, vol. 318, no. 2, pp. 175–180, 2003.

[38] S. Neschen, K. Morino, J. Dong et al., "n-3 fatty acids preserve insulin sensitivity in vivo in a peroxisome proliferator-activated receptor-α-dependent manner," *Diabetes*, vol. 56, no. 4, pp. 1034–1041, 2007.

[39] E. Hopps, D. Noto, G. Caimi, and M. R. Averna, "A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress," *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, vol. 20, no. 1, pp. 72–77, 2010.

[40] M. Bunger, G. J. Hooiveld, S. Kersten, and M. Muller, "Exploration of PPAR functions by microarray technology—a paradigm for nutrigenomics," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1771, no. 8, pp. 1046–1064, 2007.

[41] A. Pastore, G. Federici, E. Bertini, and F. Piemonte, "Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification," *Clinica Chimica Acta*, vol. 333, no. 1-2, pp. 19–39, 2003.

[42] N. Tsuboyama-Kasaoka, C. Shozawa, K. Sano et al., "Taurine (2-aminoethanesulfonic acid) deficiency creates a vicious circle promoting obesity," *Endocrinology*, vol. 147, no. 7, pp. 3276–3284, 2006.

[43] S. Kalhan, J. Edmison, S. Marczewski et al., "Methionine and protein metabolism in non-alcoholic steatohepatitis: evidence for lower rate of transmethylation of methionine," *Clinical Science*, vol. 121, no. 4, pp. 179–189, 2011.

[44] L. Miao and D. K. S. Clair, "Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 47, no. 4, pp. 344–356, 2009.

[45] G. Wang, X. Liu, Q. Guo, and S. Namura, "Chronic treatment with fibrates elevates superoxide dismutase in adult mouse brain microvessels," *Brain Research*, vol. 1359, pp. 247–255, 2010.

[46] P. Strazzullo and J. G. Puig, "Uric acid and oxidative stress: relative impact on cardiovascular risk?" *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, vol. 17, no. 6, pp. 409–414, 2007.

[47] B. A. Neuschwander-Tetri, "Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites," *Hepatology*, vol. 52, no. 2, pp. 774–788, 2010.

[48] W. V. Berghe, L. Vermeulen, P. Delerive, K. de Bosscher, B. Staels, and G. Haegeman, "A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-κB and PPAR," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 544, pp. 181–196, 2003.

III. Principaux résultats, discussion et perspectives

1. Effet de l'invalidation du gène du PPARα sur le métabolisme de l'arginine et de la cystéine

Grâce à la méthode de traçage isotopique, nous avons mis en évidence, pour la première fois, que **la déficience en PPARα réduit significativement (effet du génotype P= 0,0093) la synthèse "corps entier" du NO à partir de l'arginine sans pour autant affecter la voie compétitive de synthèse de l'urée** (figure 2 article 1). Dans nos conditions expérimentales, cette observation n'est pas liée à une diminution de l'expression de la NOS, puisque **l'invalidation du PPARα n'affecte pas le taux d'ARNm de cette enzyme** (figure 1, article 1), du moins au niveau hépatique. De même, **l'expression de l'arginase 1 étant diminuée et les concentrations plasmatiques d'arginine plus élevées chez les souris invalidées pour PPARα** (figure 1 et tableau 2 article 1), nous ne pouvons supposer une utilisation accrue de l'arginine par l'arginase et donc sa moindre disponibilité pour la synthèse du NO, chez les souris déficientes en PPARα. A ce stade, la diminution de l'utilisation de l'arginine dans la voie de synthèse du NO chez les souris déficientes en PPARα reste donc difficile à expliquer. Néanmoins, ce résultat est en accord avec les études antérieures montrant que l'activation du PPARα par les fibrates augmente les marqueurs de biodisponibilité et de production du NO (études décrites dans La partie IV/4 page 54). Dans la littérature, l'effet des fibrates est expliqué en partie par une régulation de l'activité de la NOS, notamment via des mécanismes de phosphorylation. Nous pouvons donc supposer que, dans nos conditions expérimentales, la régulation de la synthèse du NO par le PPARα s'opère suite à des modulations post-traductionnelles en affectant l'activité de la NOS, notamment via l'intervention d'autres facteurs de transcription dont l'activité est modulée par le PPARα. Ceci pourrait expliquer l'absence d'effet sur l'ARNm, mais reste de l'ordre de l'hypothèse. Il faudra donc par la suite mesurer l'activité de la eNOS et son état de phosphorylation chez les souris KO PPARα.

Par ailleurs, l'invalidation du PPARα pourrait aussi affecter la biodisponibilité du NO. Parmi les hypothèses possibles, figure une augmentation de l'oxydation du NO, ce qui pourrait le piéger sous forme d'espèces dites nitrosantes telles que les peroxynitrites ou les nitrosothiols. La présence de ces métabolites reflète un état de stress nitrosant, retrouvé dans des conditions pathologiques telles que le diabète ou l'insulinorésistance (Chander et al. 2004; Kaneki et al. 2007). C'est aussi le cas en situation de stéatose hépatique non alcoolique, proche de celle observée chez les souris déficientes en PPARα (Musso et al. 2007). En effet, il a été montré

récemment que la déficience en PPARα est accompagnée d'une augmentation de la production des espèces nitrosantes, cette production étant en étroite association avec la dérégulation de la production de ROS en situation de stress oxydant (Yoo et al. 2011) . Ceci serait en accord avec les conclusions que nous avons formulées sur l'état de stress oxydant des souris KO PPARα (article 2). En effet, en nous basant sur **l'augmentation importante des taux d'acide urique** (article 2, figure 2), un marqueur de stress oxydant, ainsi que sur **l'activation de l'expression de la SOD** (article 2, tableau 4), enzyme du système antioxydant pouvant être activée en réponse à un état de stress oxydant, et en accord avec la littérature traitant du sujet, nous avons émis l'hypothèse d'une dégradation de l'état d'oxydoréduction chez les souris déficientes en PPARα. Néanmoins, l'hypothèse d'une oxydation accrue du NO provoquant sa moindre biodisponibilité chez les souris KO PPARα reste à vérifier par la mesure objective des marqueurs de stress oxydant et nitrosant chez ces souris.

L'augmentation des concentrations et du pool hépatique du glutathion retrouvée chez les souris déficientes en PPARα (article 2, tableau 3) est en accord avec **l'augmentation de l'activité de la γGCL, malgré l'absence d'effet sur son taux d'ARNm** (article 2, figure 1 et tableau 4). Dans l'hypothèse d'un état de stress oxydant chez les souris KO PPARα, l'augmentation des concentrations hépatiques de glutathion peut être considérée comme une stimulation de sa production au niveau du foie, en réponse compensatoire à une demande extra-hépatique de glutathion. Néanmoins, parmi les enzymes qui utilisent le glutathion comme cofacteur pour lutter contre les états de stress oxydant, seule l'expression de la SOD est augmentée chez la souris KO PPARα, alors que **le taux d'ARNm de la GPX et de la CAT n'est pas affecté par l'invalidation du PPARα**. Cependant, ces enzymes sont aussi fortement régulées au niveau post-transcriptionnel, et la mesure de leurs activités serait un indicateur intéressant.

Les concentrations hépatiques et plasmatiques de cystéine ne sont pas différentes entre les souris déficientes et témoins (tableau 5 article 2) : la cystéine ne semble pas être un facteur limitant pour la synthèse du glutathion chez les souris témoins. Par contre, chez les souris KO, **la diminution des concentrations plasmatiques de taurine** (tableau 5 article 2) pourrait refléter une moindre utilisation de la cystéine dans la voie de synthèse de la taurine, et donc sa meilleure disponibilité pour la synthèse du glutathion. Cependant, l**'absence d'effet de l'invalidation du PPARα sur l'expression de la CDO** (article 2, tableau 4)**,** enzyme responsable cette voie de synthèse, n'appuie pas cette possibilité.

En conclusion, nos résultats démontrent un effet de l'invalidation du gène de PPARα chez la souris sur le métabolisme secondaire de l'arginine et la cystéine. Néanmoins, la diminution de la synthèse ou de la biodisponibilité du NO, et l'augmentation du pool et des concentrations du glutathion, observées chez les souris déficientes en PPARα, ne sont pas la conséquence directe d'une régulation génique des principales enzymes de ces voies métaboliques. Nos résultats, notamment l'effet sur l'activité de la γGCL, laissent plutôt penser à une implication du PPARα dans des régulations post-transcriptionnelles des enzymes cibles.

2. Interaction entre la nature des acides gras du régime et les effets de l'invalidation du PPARα sur le métabolisme de l'arginine et de la cystéine

Il est important de remarquer que la nature des acides gras du régime interagit avec l'effet de l'invalidation. Comme cela a déjà été observé précédemment pour le métabolisme lipidique (Morise et al. 2009), l'invalidation du PPARα semble rendre le métabolisme des acides aminés sensible à la nature des acides gras apportés par le régime. En effet, certains effets décrits ci-dessus chez les souris KO PPARα sont différents selon la nature des acides gras du régime. C'est le cas pour l'augmentation de la concentration et du pool hépatique du glutathion (tableau 3, article 2) ainsi que de l'activité totale de la γGCL (figure 2b, article 2) qui sont observés uniquement chez les KO en réponse au régime COCO. En revanche, l'effet de l'invalidation sur le rapport entre la production corps entier du NO et la conversion systémique d'arginine en urée est observé uniquement chez les souris recevant le régime LIN (figure 2, article 1).

3. Effet de l'apport en ALA sur le métabolisme de l'arginine et de la cystéine chez les souris témoins

Lors de ces deux protocoles, quelques aspects du métabolisme des acides aminés se sont révélés modulés par la nature des acides gras alimentaires chez les souris de type sauvage.

Le métabolisme de l'arginine, et plus spécifiquement l'aiguillage entre la production d'urée via l'arginase et la production de NO via les NOS, semble être régulé par la nature des acides gras alimentaires. Plus spécifiquement, **la conversion de l'arginine en urée ne semble pas différer entre les deux régimes, en revanche, la synthèse du NO tend à augmenter chez les souris témoins recevant le régime apportant l'ALA** par rapport à celles recevant le régime riche en AGS (figure 2 article 1). De façon surprenante, **le niveau d'expression de la eNOS hépatique est plus faible chez les souris recevant le régime ALA** (figure 1 article 1).

Ce dernier résultat est en désaccord avec les éléments retrouvés dans la bibliographie, qui indiquent une augmentation de l'activité de la eNOS en réponse aux AGPI n-3 (Lopez et al. 2004; Lopez et al. 2008).

En ce qui concerne le métabolisme secondaire de la cystéine, chez les souris WT, **le pool hépatique de glutathion est significativement plus élevé chez les souris recevant le régime riche en ALA** par rapport à celles soumises au régime AGS (tableau 3 article 2), mais ce résultat reste isolé **puisque aucun effet de la nature des acides gras n'a été observé au niveau des enzymes impliquées dans le métabolisme du glutathion,** et en particulier de la γGCL (figure 1 et tableau 4 article 2). La seule explication possible à ce stade serait une moindre utilisation ou un moindre export du glutathion vers les organes extra-hépatiques chez les souris témoins recevant le régime contenant de l'ALA, ce qui reste à vérifier.

4. Résultats complémentaire : Effet de l'invalidation et des faibles apports en ALA sur le métabolisme secondaire global des acides aminés

L'évaluation de l'expression des gènes des transaminases a révélé que les taux d'ARNm de la cASAT, de la mASAT et de l'ALAT n'étaient affectés ni par le génotype ni par le régime. Cette absence d'effet de l'invalidation du PPARα sur les taux d'ARNm des transaminases dans nos conditions expérimentales est en désaccord avec les données rapportées dans l'étude d'Edgard et coll., En revanche l'étude de Kesten et coll. avait déjà révélé des incohérences avec la précédente, en montrant l'absence d'effet significatif de l'invalidation du PPARα sur les transaminases (Edgar et al. 1998; Kersten et al. 2001). Par ailleurs, la mesure des concentrations de transaminases plasmatiques chez nos souris a révélé qu'elles ne sont pas significativement différentes entre les groupes, suggérant que l'invalidation du PPARα chez la souris n'altère pas spécifiquement la fonction hépatique.

Lors de ce protocole, nous avons réalisé des aminogrammes afin d'explorer l'effet de l'invalidation du PPARα, en interaction avec les faibles apports d'ALA, sur les concentrations plasmatiques des acides aminés. Ce dosage a montré que les concentrations de10 acides aminés sur 22 étaient sensibles à l'invalidation du PPARα (article 1, Tableau 2). Nous n'avons pas observé la tendance à la diminution des concentrations plasmatiques en acides aminés suite à l'invalidation du PPARα rapportée par la littérature (Makowski et al. 2009). En effet, le profil de variations que nous avons mis en évidence est plus complexe. Néanmoins, nos résultats mettent en évidence un effet de l'invalidation du PPARα sur l'homéostasie des acides aminés.

***

Ces variations au niveau du pool du glutathion et de l'utilisation de l'arginine dans la voie de synthèse du NO obtenus avec de faibles apports en ALA ont représenté dans notre démarche des pistes intéressantes. En revanche, nous avons constaté qu'avec de faibles apports en acides gras, il était difficile de mettre en évidence des mécanismes de régulation, notamment au niveau génique. Ceci nous a poussés à nous placer dans des conditions d'apport plus fort en lipides pour la suite des expérimentations.

Modulation du métabolisme secondaire des acides aminés par l'acide α-linolénique apporté dans le cadre d'un régime hyperlipidique.

B. Modulation du métabolisme secondaire des acides aminés par l'acide α-linolénique apporté dans le cadre d'un régime hyperlipidique.

I. Contexte et objectifs de l'étude

Les AGPI n-3 semblent prévenir une partie importante des désordres caractéristiques du syndrome métabolique. En effet, l'apport d'AGPI n-3, et principalement de ceux à longue chaîne, améliore le profil lipidique, la sensibilité à l'insuline et la pression artérielle. De façon moins établie les AGPI n-3 joueraient aussi un rôle dans la prévention de l'accumulation de tissu adipeux. De plus, les AGPI n-3 possèdent des actions pléiotropiques et affecteraient aussi la physiopathologie du syndrome métabolique, en modulant la dysfonction endothéliale, la capacité antioxydante ou encore l'état inflammatoire de l'organisme. Tel que décrit dans l'introduction bibliographique, une des hypothèses possibles serait une modulation par les AGPI n-3 de l'homéostasie de métabolites bioactifs dérivés des acides aminés tels que le NO et le glutathion, ces derniers jouant des rôles centraux dans la modulation de nombreuses fonctions biologiques.

Les travaux ayant mis en évidence l'implication des AGPI n-3 dans la régulation du métabolisme du NO et du glutathion ont fait appel principalement à des méthodes d'intervention nutritionnelle par complémentation ou à des méthodes d'investigation *ex vivo.* Lors de ce travail de thèse, notre objectif était d'adopter une démarche plus nutritionnelle en apportant la source d'AGPI n-3 dans le cadre d'un régime alimentaire sur le moyen terme.

En effet, lors des précédents protocoles (articles 1 et 2), nous avons pu mettre en évidence pour la première fois, dans le cadre d'un régime normo-calorique à faible apport en lipides, l'implication de l'ALA dans la modulation du métabolisme secondaire des acides aminés. En particulier, nous avons montré, chez les souris de type sauvage, qu'un faible apport en ALA pouvait affecter l'homéostasie du NO et du glutathion.

Dans ce deuxième volet expérimental, nous avons voulu augmenter les apports en ALA. Nous nous sommes donc placés dans des conditions nutritionnelles proches de celles observées chez l'homme occidental, en utilisant des régimes riches en lipides. En nous plaçant dans ces conditions expérimentales, nous avons voulu estimer le potentiel préventif de forts apports en ALA vis-à-vis du développement du syndrome métabolique, induit par ce type de régime (hypercalorique/hyperlipidique) en explorant en particulier les variations aux niveaux du métabolisme secondaire des acides aminés, qui pourraient accompagner les actions déjà

décrites pour l'ALA (par exemple sur le métabolisme lipidique). Les objectifs de cette étude étaient donc de vérifier les tendances que nous avions obtenues avec de faibles apports en ALA et de mettre en évidence d'autres effets éventuels d'un régime riche en acides gras polyinsaturés n-3 sur le métabolisme des acides aminés.

II. Matériels et méthodes

1. Protocole expérimental

Lors de ce protocole d'intervention nutritionnelle, nous avons utilisé 30 souris mâles C57Bl/6J âgées de 7 semaines (Charles River, L'Arbresle, France). Après une semaine d'adaptation, les animaux ont été répartis dans 4 groupes recevant chacun un régime différent (Tableau 6) pendant 5 semaines.

Deux groupes de souris ont reçu des régimes témoins à faible teneur en lipides :

- Groupe **Croquettes** : 5 souris recevant un régime témoin à base de croquettes d'entretien pour rongeurs (SAFE A04, Teklad, 3 % de lipides apportant 3,1 % de l'énergie)
- Groupe **Oléisol** : 5 souris recevant un régime semi-synthétique pauvre en lipides apportant du tournesol oléique, riche en 18:1 n-9

Les deux autres groupes ont reçu des régimes d'induction hypercaloriques/hyperlipidiques:

- Groupe **Lin** : 10 souris recevant un régime riche en ALA à base d'huile de lin.
- Groupe **Palme** : 10 souris recevant un régime riche en AGS à base d'huile de palme.

Les régimes Oléisol, Lin et Palme, ont été préparés manuellement à partir de matières premières fournies par l'UPAE (Unité de Préparation des Aliments Expérimentaux) de l'INRA de Jouy-en-Josas.

Durant la 4ème semaine de régime, les souris recevant les deux régimes riches en lipides ont reçu une injection d'arginine marquée au ^{15}N et ont été placées dans des cages métaboliques pour recueillir l'urine. A la fin des 5 semaines de régime, les souris ont été sacrifiées après 5 heures de jeûne. Le sang a été prélevé par voie intracardiaque avant exsanguination. Le plasma a été séparé par centrifugation (4000 g, 10 mn, 4°C). Le foie et les tissus adipeux ont été prélevés et pesés, des échantillons de plasma et de foie ont été aliquotés et stockés à -80°C.

2. Analyses

Les détails des analyses que nous avons réalisées durant ce protocole figurent dans les articles 1 et 2. En voici une présentation rapide, principalement pour identifier les analyses supplémentaires et les différences de procédures par rapport aux protocoles précédents.

Afin de valider l'induction du syndrome métabolique suite à l'apport de régimes hyperlipidiques, nous avons mesuré chez les 4 groupes d'animaux: le poids et la composition corporelle, la glycémie, le bilan lipidique sanguin : TG, CT et cholestérol-HDL (C-HDL). Les dosages ont été réalisés au moyen de kits enzymatiques acquis chez BioMérieux (Craponne, France) pour le CT et C-HDL et chez Randox (Crumin, Royame-Uni) pour les TG.

Pour identifier les voies du métabolisme des acides aminés sensibles à la nature des AG alimentaires, nous avons mesuré l'activité et/ou l'expression génique des enzymes-clés du métabolisme de l'arginine et de la cystéine. Parallèlement, nous avons tenté d'évaluer par western-blotting les quantités de protéines correspondant aux enzymes-clés du métabolisme hépatique de l'arginine. Compte-tenu des difficultés que nous avons rencontrées pour détecter et distinguer les différentes isoformes de la NOS au niveau hépatique, nous n'avons pu quantifier que les arginases. Contrairement à l'arginase 1, qui est cytosolique, l'arginase 2 est mitochondriale. Il a donc d'abord fallu préparer, à partir de la fraction de protéines hépatiques totales, une fraction mitochondriale par centrifugations successives. Après incubation des membranes de transfert avec les anticorps dirigés contre chacune des enzymes, la révélation s'est faite par chimioluminescence. Les images ont été traitées grâce à un appareil de photo numérique (FluorChem® FC2) couplé à un logiciel de traitement d'images (IMAGER FC2). Ce logiciel permet d'objectiver l'intensité et la taille de chaque bande de protéine et fournit des valeurs chiffrées dites IDV (Integrated Density Value). La quantification s'est faite relativement à une protéine de référence (actine pour l'arginase 1, cytosolique, et porine, pour l'arginase 2, mitochondriale).

Au regard de la complexité des voies de régulation du métabolisme du NO, nous avons voulu combiner plusieurs marqueurs afin d'avoir à une vision plus pertinente des variations de la production et de la biodisponibilité du NO. Nous avons donc utilisé la méthode décrite précédemment de marquage isotopique de l'arginine afin d'évaluer l'utilisation de l'arginine dans les voies métaboliques en compétition (urée, NO). Nous avons aussi mesuré les nitrites

plasmatiques, qui sont considérés comme un marqueur de la production et de biodisponibilité du NO et qui sont aussi très bien corrélés avec les variations d'activité de la eNOS (Kleinbongard et al. 2003; Lundberg & Weitzberg 2005). Comme les nitrites ont une demi-vie très courte dans le sang (une 10ène de minutes) et que les sources de contamination en nitrites sont nombreuses, des précautions drastiques sont à prendre quant aux conditions préanalytiques (Bryan & Grisham 2007). A titre d'exemple le sang recueilli doit être centrifugé et le plasma immédiatement récolté; de même, tous les consommables utilisés (y compris les pointes de pipettes automatiques) doivent avoir été lavés au préalable avec de l'eau ultra-pure sans nitrites. Nous avons ensuite utilisé une technique de dosage très sensible de chimioluminescence pour mesurer les concentrations de nitrites dans le plasma. Le principe de cette technique est basé sur l'utilisation de triiodure de potassium qui transforme les nitrites en NO. Celui-ci réagit avec l'oxygène et émet de l'énergie sous forme de lumière. L'intensité de celle-ci traduit la quantité de nitrites, qui est proportionnelle au NO produit dans le milieu réactionnel. Le protocole de référence est celui de Marzinzig (Marzinzig et al. 1997), utilisé sur l'analyseur NOAi280 (Sievers, Boulder, USA). Par le biais de cette même technique, en utilisant un réactif différent (le trichloride de vanadium) nous avons mesuré les concentrations plasmatiques de nitrates, tout en ayant à l'esprit que ce marqueur reste moins pertinent que les nitrites et ne reflète pas uniquement la dégradation du NO, compte tenu des sources multiples de nitrates dans le plasma, dont l'alimentation.

Pour ce qui est du métabolisme de la cystéine et du glutathion, nous avons évalué les pools et les concentrations hépatiques des principaux thiols (glutathion, cystéine, cystéinylglycine). Lors de ce protocole, nous avons voulu déterminer en plus des thiols totaux, les fractions réduites et oxydées, l'objectif étant de pouvoir estimer l'état d'oxydoréduction cellulaire, évalué principalement par le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG). Les thiols totaux ont été mesurés en utilisant une procédure légèrement modifiée par rapport à celle décrite dans l'article 2, principalement par l'utilisation d'un réducteur différent, le TCEP 2.5mM (tris (2-carboxyethyl) phosphine). La mesure des thiols réduits se fait aussi suivant le même protocole, mais sans ajout de réducteur. La valeur des thiols oxydés est obtenue par différence entre les thiols totaux et réduits.

Nous avons aussi mesuré les marqueurs du métabolisme secondaire des acides aminés, à savoir l'urée et la créatinine plasmatiques et urinaires. Des aminogrammes ont été réalisés sur les échantillons de plasma. Cette analyse a été confiée à la plate-forme dédiée de l'INRA de

Clermond-Ferrand - Theix (Unité de Nutrition Humaine). Les aminogrammes plasmatiques ont été obtenus par chromatographie échangeuse d'ions avec dérivation post-colonne à la ninhydrine sur un Aminotac JLC-500/V (Jeol, Tokyo, Japon).

Une analyse transcriptomique a été réalisée par l'équipe de Pascal Martin et Hervé Guillou sur le foie des souris soumises aux deux régimes hyperlipidiques. Pour cela des puces pan-génomiques Agilent ont été utilisées. Le traitement des données a fait intervenir des scripts spécifiques développés par l'équipe de Toulouse (logiciel R).

Une mesure de la dépense énergétique a aussi été réalisée lors de ce protocole à l'aide d'un système de calorimétrie indirecte. Ce système permet le suivi en temps réel et en continu de la consommation d'oxygène (VO2) et de la production de CO2 (VCO2) individuelles de chaque souris placée en cage métabolique. A partir des valeurs de VO2 et de VCO2 recueillies, nous avons calculé le quotient respiratoire QR= (VCO2/VO2). En tenant compte du pool d'azote excrété par voie urinaire sous forme d'urée, et par l'intermédiaire d'équations standardisées, nous avons estimé les taux d'oxydation des lipides (LOX), des glucides (GOX) et des protéines (POX) pendant la durée du séjour des souris en cage métabolique. Le système permet aussi la mesure précise de la consommation alimentaire et l'analyse précise du comportement alimentaire (pattern) des souris.
L'analyse statistique a reposé sur une analyse de variance et des comparaisons de moyennes par test *post-hoc* de Tukey-Kramer.

III. Résultats et discussion

Légende des résultats :
Régime d'induction hyperlipidique riche en acides gras saturés : Palme (PALME)
Régime d'induction hyperlipidique riche en ALA : Lin (LIN)
Régimes témoins normo-lipidiques : Croquettes (CROQ), Oléisol (OLE)

1. Validation de l'effet des régimes hyperlipidiques

Pour une consommation alimentaire identique entre les 4 groupes (en moyenne 13 kcal/jour/souris), les deux groupes de souris ayant reçu les régimes hyperlipidiques semblent avoir une croissance plus rapide que les souris ayant reçu les régimes témoins pauvres en lipides (figure 59). Néanmoins, le poids corporel au sacrifice ne diffère pas significativement entre les 4 groupes. Par contre, les deux groupes ayant reçu les régimes hyperlipidiques ont

une proportion de tissu adipeux significativement plus élevée que les groupes témoins (Tableau 7).

Les deux groupes de souris ayant reçu les régimes hyperlipidiques ont une glycémie similaire et significativement plus élevée par comparaison aux régimes à faible teneur en lipides. Par contre, seules les souris ayant reçu le régime hyperlipidique PALME montrent une triglycéridémie ainsi que des concentrations de cholestérol total, de cholestérol-HDL, et de cholestérol non-HDL supérieures à celles des 3 autres groupes (Tableau 8).

Pour l'ensemble de ces composantes, si l'on restreint la comparaison statistique aux deux groupes ayant reçu les régimes hyperlipidiques, les animaux ne différent pas par leur composition corporelle ainsi que leur glycémie. Cependant, les 4 paramètres du bilan lipidique sont significativement moins élevés dans le groupe LIN que dans le groupe PALME. Il apparaît donc que les souris ayant consommé le régime hyperlipidique riche en acides gras saturés ont développé un syndrome métabolique (obésité viscérale, hyperglycémie, dyslipidémie), tandis que celles ayant reçu le régime hyperlipidique riche en ALA sont partiellement protégées, principalement vis-à-vis du dérèglement du métabolisme lipidique. Cet effet protecteur a été décrit principalement pour les AGPI n-3 à chaîne longue. Néanmoins, nos résultats sont en accord avec la littérature décrivant que l'ALA semble avoir les effets similaires aux AGPI n-3 sur la régulation du métabolisme lipidique (Morise et al. 2005). Cela nous permet de considérer notre modèle comme valide.

Par ailleurs, nos résultats démontrent que les concentrations plasmatiques de créatinine sont deux fois plus élevées chez les souris ayant reçu les régimes hyperlipidiques (Tableau 9) ce qui pourrait être le marqueur d'une dysfonction rénale chez ces souris.

2. Influence de la nature des acides gras alimentaire sur des voies du métabolisme de l'arginine

La conversion de l'arginine systémique en urée, mesurée par marquage isotopique, ne diffère pas entre les groupes LIN et PALME. En revanche, la synthèse « corps entier » de nitrates, reflet de la production du NO, tend à être plus importante chez les souris du groupe LIN, ce qui fait que le rapport entre l'utilisation de l'arginine dans la voie de synthèse du NO et dans celle de la production d'urée est significativement plus élevé dans le groupe LIN (figure 60). Ceci signifie qu'en réponse au régime LIN, la synthèse de NO à partir de l'arginine est spécifiquement favorisée, sans effet sur la conversion de l'arginine en urée.

Ce résultat confirme la tendance que nous avons observée lors du protocole précédent avec de faibles apports en ALA (article 1). Il est aussi tout-à-fait en accord avec les études qui ont montré une stimulation de la production et/ou de la biodisponibilité du NO suite à une complémentation en AGPI n-3. Néanmoins, c'est la première fois qu'un tel effet de la nature des acides gras alimentaires est mis en évidence sur l'utilisation systémique d'un acide aminé. De plus, l'augmentation chez les souris LIN des concentrations de nitrites et de nitrates plasmatiques, respectivement métabolites intermédiaires et finaux de dégradation du NO (Tableau 10) conforte ce résultat. En effet, l'augmentation des taux de nitrites plasmatiques traduit une activité NOS plus importante dans le groupe LIN, ce qui expliquerait l'utilisation plus importante de l'arginine marquée dans la voie de synthèse du NO chez ces souris. L'absence d'effet de la nature des acides gras sur l'expression des gènes de la NOS (Tableau 10) pourrait donc plutôt traduire une régulation post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle de la NOS par les AGPI n-3. Ceci est en cohérence avec les hypothèses proposées dans la littérature (partie V/1/1.3 page 63) décrivant une activation de la phosphorylation de la eNOS ou une augmentation de sa translocation par les AGPI n-3-LC. Il serait donc intéressant d'explorer l'effet des apports en ALA sur ces paramètres.

Par ailleurs nous avons constaté une augmentation de l'expression de la DDAH 1 (dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1) (Tableau 11) chez les souris ayant reçu le régime LIN. Cette enzyme est responsable de la dégradation de l'ADMA (Asymmetric dimethylarginine) un inhibiteur compétitif endogène de la eNOS. La voie DDAH/ADMA est considérée comme une des voies importantes dans la régulation de la biodisponibilité du NO (Cooke & Ghebremariam 2011). On pourrait donc supposer qu'une augmentation de la dégradation de l'ADMA par la DDAH 1 pourrait aussi expliquer l'augmentation de la production de NO que nous avons observée chez les souris du groupe LIN. Ceci reste néanmoins spéculatif, et un dosage d'ADMA s'avère indispensable pour vérifier la pertinence de cette hypothèse.

Concernant la voie de synthèse de l'urée, les concentrations d'arginine, de citrulline et d'ornithine plasmatiques sont identiques dans les groupes LIN et PALME (Tableau 18). Ceci est cohérent avec les mesures isotopiques de conversion de l'arginine systémique en urée, qui ne montrent pas d'effet de la nature des acides gras alimentaires sur cette voie d'utilisation de l'arginine. De même, l'absence d'effet sur la quantité de protéine de l'arginase 1 et 2 (Tableau 12) est cohérente avec l'absence d'effet sur la concentration plasmatique d'urée et sur le pool urinaire d'urée. En revanche, le taux d'ARNm de l'arginase 1 est significativement plus élevé dans le groupe LIN (Tableau 11). Cette incohérence entre quantité d'ARNm et quantité de

protéine est un peu surprenante dans la mesure où l'activité de l'arginase 1 est largement régulée au niveau transcriptionnel (Morris 2009). Cependant, ce résultat pourrait être en cohérence avec la diminution de l'expression de l'arginase 1 retrouvée chez les souris KO PPARα dans nos précédents travaux (article 1). En effet, on pourrait penser que l'activation du PPARα par les AGPI n-3 stimule l'expression du gène de l'arginase 1 puisque l'invalidation inhibe son expression. De façon concordante, l'activation du PPARα par les fibrates se traduit aussi par une augmentation de l'expression de l'arginase 1 (Chu et al. 2004). Néanmoins, l'absence de variations au niveau des pools de l'urée et des concertations d'acides aminés suggère que l'augmentation du taux d'ARNm de l'arginase 1 n'a pas de conséquence fonctionnelle dans nos conditions expérimentales.

3. Influence de la nature des acides gras alimentaire sur les voies du métabolisme de la cystéine.

L'activité spécifique de la γGCL (γ-glutamyl-cystéine ligase), enzyme limitante de la synthèse de glutathion, est augmentée de 30% chez les souris du groupe LIN comparées à celles du groupe PALME. Il en va de même de l'activité exprimée par foie total, traduisant la capacité de synthèse par l'organe entier (figure 61). En accord avec ces résultats, en réponse au régime LIN, le taux d'ARNm de la sous-unité catalytique GCLc est significativement plus élevé, alors que celui de la sous-unité modulatrice ne diffère pas entre les deux groupes ayant reçu les régimes hyperlipidiques (Tableau 15). Nos résultats sont en accord avec les études ayant montré des effets du même type suite à une complémentation par des AGPI n-3 (partie V/2/2.2 page 65), mais ceci est la première fois que de tels effets sont montrés *in vivo* en réponse à un régime apportant uniquement de l'ALA comme source d'AGPI n-3. De plus, l'expression du gène de la CDO, enzyme clé de la synthèse de taurine en compétition directe avec la γGCL pour l'utilisation de la cystéine, est 3 fois moins élevée dans le groupe LIN que dans le groupe PALME (Tableau 15). Ce résultat, mis en parallèle avec l'augmentation de l'activité et de l'expression de la γGCL, suggèrerait que le métabolisme de la cystéine serait orienté vers la synthèse du glutathion au détriment de la synthèse de la taurine en réponse au régime LIN.

En revanche, nous avons constaté que les pools et les concentrations hépatiques des thiols totaux, principalement du glutathion, ne différent pas entre les deux groupes ayant reçu les régimes hyperlipidiques (Tableaux 13 et 14). Ce résultat est en désaccord avec les effets observés quant à l'activité et l'expression de la γGCL. Il est d'autant plus surprenant que nous

avions mis en évidence, lors du protocole précédent (article 2) une augmentation du pool du glutathion avec de faibles apports en ALA. De plus, nous avons constaté que les valeurs des concentrations de glutathion obtenu lors de ce protocole étaient en moyenne 10 fois inférieures à celles du protocole précédent (article 2). Ceci nous a conduits à interpréter avec réserve les résultats du dosage des thiols chez les souris ayant reçu les régimes hyperlipidiques. Notamment, concernant le rapport entre le glutathion réduit et oxydé qui est significativement inférieur chez le groupe LIN (Tableaux 13 et 14). En effet, ce dernier résultat pourrait refléter une altération de l'état d'oxydoréduction cellulaire chez les souris LIN, mais ceci reste difficile à affirmer au vu des doutes que nous avons émis sur ce dosage. Nous envisageons donc de refaire cette analyse afin d'écarter tout biais expérimental.
Les concentrations plasmatiques de la cystine (dimère de la cystéine) sont plus élevées chez les souris LIN, suggérant que la cystéine n'est pas un facteur limitant pour la synthèse du glutathion. Cependant, les données sur la cystine doivent être considérées avec prudence, compte tenu des très faibles concentrations détectées dans le plasma. En revanche, les concentrations des deux autres acides aminés précurseurs du glutathion, à savoir la glycine et le glutamate ne semblent pas être sensibles à la nature des acides gras alimentaires. Il en va de même pour les acides aminés précurseur (méthionine) et dérivé (taurine) de la cystéine (Tableau 19).

Concernant la voie d'utilisation du glutathion par les enzymes antioxydantes, les niveaux d'ARNm de la GPX1 (glutathion peroxydase) et de la CAT (catalase) ne diffèrent pas significativement entre les groupes alors que ceux de la SOD 2 et 3 (superoxyde dismutases), enzymes responsables de l'élimination des espèces réactives de l'oxygène, sont significativement plus élevées dans le groupe LIN que dans le groupe PALME. L'augmentation de l'expression des SOD en réponse au régime LIN, observée dans nos conditions expérimentales, pourrait traduire une stimulation des défenses antioxydantes. Cependant, selon la littérature, la mesure de l'activité des enzymes antioxydantes semble être un paramètre plus pertinent (que l'exprssion) à explorer pour l'avenir, afin de rendre compte de l'utilisation du glutathion par ces enzymes.

4. Influence de la nature des acides gras alimentaire sur les marqueurs du métabolisme des acides aminés

L'aminogramme plasmatique présenté dans le Tableau 19 révèle que les concentrations de glutamine et de cystine sont significativement plus élevées et celles de phosphosérine, de lysine et de leucine significativement moins élevées dans le groupe LIN que dans le groupe PALME. La lysine et la leucine sont deux acides aminés essentiels, la diminution de leur concentration plasmatique signerait donc une utilisation plus importante de ces acides aminés chez les souris ayant reçu le régime LIN.

Les taux d'ARNm de la cASAT et de l'ALAT ne différent pas entre les deux groupes ayant reçu les régimes hyperlipidiques. Seule l'expression de la mASAT (mitochondrial aspartate aminotransferase) est plus élevée dans le groupe LIN par rapport au groupe PALME (Tableau 12). Cet effet de l'ALA sur la mASAT semble être en accord avec celui observé chez la souris après activation du PPARα par des ligands synthétiques. En effet, le taux d'ARNm de la mASAT est augmenté après traitement par les fibrates. Par contre, l'ALA n'affecte pas les taux d'ARNm de la cASAT et de l'ALAT, contrairement aux fibrates qui semblent les diminuer (Edgar et al. 1998; Kersten et al. 2001).

5. Analyses complémentaire

Analyse calorimétrique : Dans nos conditions expérimentales, la nature des acides gras composant la fraction lipidique des régimes hypercaloriques (LIN et PALM) n'a pas eu d'effet sur les paramètres calorimétriques (Tableau 17). Le passage des souris en cage métabolique a révélé que leur comportement alimentaire n'était pas affecté par le type de régime. Par conséquent, les modulations que nous avons observées au niveau des voies métaboliques d'intérêt, ne peuvent pas être expliquées par une différence de consommation, de comportement alimentaire ou d'oxydation des nutriments entre les souris recevant les deux types de régimes.

Analyse transcriptomique : Le Tableau 20 fournit la liste des 200 premiers gènes dont l'expression est modifiée par la nature des acides gras du régime hyperlipidique. Le LogFC est le log2(LIN/PALM), et exprime le facteur de variation pour le groupe LIN par rapport au groupe PALM pris comme référence. Ex : logFC = 1 signifie qu'un gène est 2 fois plus exprimé dans le groupe LIN. Une valeur négative de logFC indique une sous-expression (ou une répression) dans le groupe LIN. Adj.P.Val correspond à la valeur de P ajustée par la

méthode de Benjamini & Hochberg pour tenir compte de la multiplicité. Elle permet de retenir tous les gènes pour lesquels adjP<0,1 (au lieu de 0,05 pour P.value).

Une première approche de cette liste permet de repérer des gènes cibles de PPARα, tels que les cytochromes P450, mais aussi l'acylCoA-oxydase, qui sont surexprimés en réponse au régime LIN, signant l'activation du PPARα. Elle permet aussi de mettre en évidence un effet anti-inflammatoire du régime LIN. En effet, les 2 isoforme de l'orosomucoide (ORM 1 et 2) faisant partie des protéines de la phase aigues baissent en réponse au régime LIN. Cependant, l'annotation des voies métaboliques influencées par la nature des acides gras du régime n'est pas terminée, il faudra explorer la suite de cette liste pour repérer une éventuelle régulation des voies métaboliques des acides aminés.

6. Influence de la nature des acides gras alimentaire sur les marqueurs de l'activation du PPARα

Nos résultats Tableau 18 montrent un effet de l'ALA sur l'expression du CYP4a14, membre de la famille des cytochromes P450, dont le taux d'ARNm est considérablement augmenté chez les souris LIN, alors que celui de la FAS (acide gras synthase) est diminué chez ces souris. Ceci confirme les données de l'analyse transcriptomique et marque l'activation du PPARα par le régime riche en ALA. Nous avons aussi mis en évidence une augmentation numérique du taux d'ARNm du PPARα, mais cet effet reste non significatif statistiquement. Dans nos conditions expérimentales, nous ne pouvons pas discuter de l'implication directe du PPARα dans les effets que nous avons observés Pour ce faire, il faudrait introduire un groupe témoin recevant des agonistes pharmacologiques du PPARα.

***

En conclusion, lors de ces études *in vivo*, nous avons pu constater pour la première fois les effets de l'ALA sur le métabolisme du NO et du glutathion. L'ALA semble avoir un effet bénéfique sur la production de NO, qui serait principalement dû a une stimulation de l'activité de la NOS par l'ALA ou/et à une inhibition de l'ADMA par la DDAH 1, induisant une augmentation de la biodisponibilité du NO. L'utilisation de la cystéine via la γGCL serait aussi augmentée par l'ALA. Cependant nous n'avons pas pu mettre en évidence, à ce stade, un effet fonctionnel de la nature des acides gras, en particulier sur le pool de glutathion hépatique. Néanmoins, les effets de l'apport d'ALA sur la CDO et le γGCL, ainsi que sur les acides aminés précurseurs du glutathion permettent de conclure que son métabolisme est sensible à la nature des acides gras du régime.

L'expérimentation *in vivo* que nous avons menée procède par substitution des acides gras alimentaires entre eux. Cette démarche permet certes de mettre en évidence sans ambiguïté un effet de la nature des acides gras alimentaires. Cependant, chez l'animal entier, il n'est pas toujours facile de savoir si l'effet observé est dû à l'augmentation de l'apport d'un acide gras, ou à la diminution de l'apport d'un autre. De plus, *in vivo* l'effet-dose est parfois difficile à interpréter. Pour ces raisons, nous avons décidé de compléter nos investigations par des expérimentations *in vitro*, en nous focalisant sur le métabolisme de l'arginine au niveau endothélial.

Chapitre 3 : Travaux Personnels

Exploration des effets de l’ALA sur le métabolisme secondaire de l’arginine au niveau de l’endothélium vasculaire

C. Exploration des effets de l'ALA sur le métabolisme secondaire de l'arginine au niveau de l'endothélium vasculaire

I. Contexte et objectifs de l'étude

Lors des protocoles sur les modèles animaux, nous avons pu mettre en évidence un effet de l'apport en ALA dans le cadre d'un régime hyperlipidique sur la production du NO « corps-entier » à partir de l'arginine systémique. En effet, l'ALA semble favoriser l'utilisation de l'arginine dans la voie de synthèse du NO. Afin de rechercher les modulations métaboliques qui accompagneraient ces effets, nous avions exploré l'expression des gènes du métabolisme secondaire de l'arginine (arginase et NOS) dans le foie. Cependant, nous avons observé que les taux d'ARNm des NOS et de l'arginase 2 n'étaient pas affectés par l'apport en ALA. Seule l'expression de l'arginase 1, enzyme hépatique impliquée dans la synthèse de l'urée à partir de l'arginine, était paradoxalement augmentée en réponse au régime hyperlipidique riche en ALA. Nos résultats *in vivo* sont les premiers à mettre en évidence un effet de l'apport en ALA alimentaire sur la production du NO « corps-entier ». Cependant, des investigations supplémentaires *in vitro* nous ont semblé nécessaires afin de rechercher l'action directe de l'ALA indépendamment de la diminution de l'apport en d'autres acides gras, sur le métabolisme secondaire de l'arginine, mais aussi afin d'explorer les éventuelles conséquences fonctionnelles de ces modulations. Pour cela, l'endothélium nous a paru être le tissu-cible le plus approprié, étant donné le rôle important que joue le NO dans le maintien de ses fonctions, et au vu de l'implication précoce de ce tissu dans les dysfonctions vasculaires associées à la présence du syndrome métabolique.

Quelques études *in vitro* ont déjà montré que les AGPI n-3 stimulent la production du NO par les cellules endothéliales humaines en culture. En effet, l'EPA stimule la production de nitrites et prévient sa diminution due à un stress hyper-glucosé par des cellules endothéliales du cordon ombilical humain (HUVEC) (Okuda et al. 1997; Omura et al. 2001). De même, le DHA stimule la production de NOx par les cellules endothéliales coronaires (HCAEC) (Stebbins et al. 2008). L'ALA semble avoir des effets similaires à ses dérivés à longue chaîne. Il atténue significativement l'inhibition de la production du NO induite par un stress hyper-glucosé dans les cellules HUVEC (Zhang et al. 2007). Néanmoins, jusqu'à aujourd'hui aucune donnée n'existe quant à l'effet de traitement des cellules endothéliales avec de l'ALA dans les conditions basales.

Par ailleurs, des données soulignent de façon intéressante la similitude d'effet entre les AGPI n-3 et les agonistes du PPARα au niveau de la voie NO/NOS endothéliale. En effet, le traitement de cellules BAEC ou HUVEC par des agonistes synthétiques du PPARα stimule le relargage du NO par les cellules en culture, en même temps qu'il augmente l'expression génique, le taux protéique et l'activité de la eNOS (Wang et al. 2006) (Goya et al. 2004; Wang et al. 2006) (Murakami et al. 2006; Okayasu et al. 2008).

L'objectif principal de ce protocole expérimental est de mettre en évidence les effets directs de l'ALA, sur le métabolisme secondaire de l'arginine dans les cellules endothéliales à l'état basal. De plus, nous avons voulu aussi étudier l'implication du PPARα dans la modulation de la production du NO endothéliale en utilisant des agonistes synthétiques du PPARα

II. Matériels et méthodes

1. Cellules et conditions de culture

Lors de ce protocole nous avons travaillé sur une lignée de cellules endothéliales aortiques d'origine bovine (BAEC). Ces cellules nous ont été fournies dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de Dominique Bonnefont-Rousselot et Didier Borderie (EA 4466, Faculté de Pharmacie Paris Descartes, Paris).

Après une décongélation au bain-marie à 37°C, les cellules BAEC sont cultivées à l'état basal, dans des flacons de 75 et 25cm^2 ou dans des plaques 6 puits de 9cm^2 chacun. Les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) à 1g/L de glucose complémenté avec du sérum de veau fœtal (SVF) à 10%, de la pénicilline et de la streptomycine à 1% ainsi que de la L-glutamine à 1%. Elles sont incubées dans un incubateur à atmosphère humide enrichie en CO2 (5 %). Le milieu de culture est changé toutes les 48 heures.

Lorsque les cellules sont confluentes, elles sont repiquées afin d'entretenir la lignée et de multiplier les cellules afin d'avoir le matériel suffisant pour effectuer les expériences. Le principe du repiquage consiste à détacher les cellules du support à l'aide d'une enzyme protéolytique (la trypsine), puis à centrifuger la suspension pour récupérer le culot de cellules, qui est ensuite remis en suspension dans un volume du milieu de culture permettant d'ensemencer un nombre suffisant de flacons. Les cellules utilisées pour nos expériences proviennent des passages compris entre 9 et 13.

2. Traitement des cellules

Avant son utilisation, l'ALA est saponifié. Pour cela, la solution-mère d'ALA, mise en solution dans l'éthanol, est reprise dans du KOH 10 % dissout dans de l'éthanol puis chauffé à 70°C. Le sel d'acide gras formé est ensuite complexé à l'albumine. Les fibrates sont préparés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) afin de permettre leur dissolution. Les solutions d'ALA et de fibrates sont ensuite stérilisées par filtration, puis diluées successivement pour obtenir les différentes concentrations de traitement de 10 et 200 µmol/l.

Une fois à confluence, les cellules sont incubées, soit avec les solutions d'ALA ou de fibrates diluées aux concentrations choisies dans un milieu dit complet (milieu DMEM complémenté avec 1% de SVF (au lieu de 10%), 200 µmol/l d'albumine et 0,1% de DMSO), soit uniquement avec du milieu complet pour les témoins.

3. Récupération du milieu et des cellules pour analyse

Après 24h d'incubation, les flacons ou les boîtes sont disposées dès la sortie de l'incubateur sur de la glace. Les milieux de culture sont récupérés, centrifugés afin d'éliminer les débris cellulaires, puis aliquotés et stockés à -80°C. Les cellules sont ensuite récupérées, soit dans du tampon de lyse, soit dans du Trizol, selon l'analyse programmée par la suite.

4. Analyses

Afin de rendre compte de l'utilisation de l'arginine par les cellules endothéliales, nous avons évalué dans les milieux de cultures la production d'urée et de NO (estimé par la mesure des NOx en utilisant la technique de chemoluminescence). Sur les cellules, nous avons mesuré l'expression génique des enzymes-clés du métabolisme de l'arginine par qPCR, ainsi que l'activité de l'arginase.

Toutes les méthodes utilisées pour les cellules (qPCR, dosage d'urée, chemoluminescence) sont identiques à celles décrites pour les protocoles *in vivo* chez la souris. Le dosage de l'activité arginase a été réalisé par les collègues de la Faculté de Pharmacie.

L'analyse statistique a reposé sur une analyse de variance et des comparaisons de moyennes par test post-hoc de Tukey-Kramer.

III. Résultats et discussion

1. Effet de l'ALA et des fibrates sur l'utilisation de l'arginine pour la production de NO

Les concentrations de NOx dans le milieu de culture ne varient pas avec les concentrations croissantes de bézafibrate (figure 62).Cependant, plusieurs études *in vivo* ont mis en évidence une augmentation de la production du NO après traitement de cellules endothéliales par les fibrates (partie IV/4 page 54), il est donc tout à fait surprenant de ne pas retrouver cet effet lors de nos expérimentations. En revanche, le relargage de NOx dans le milieu de culture semble augmenter avec les concentrations croissantes d'ALA (figure 63), sans atteindre pour autant le seuil de significativité (effet du traitement, $p = 0.3348$). Cette tendance est tout à fait en accord avec ce que nous avons montré lors de nos expérimentations *in vivo* chez la souris. En effet, l'augmentation des apports en ALA dans le cadre du régime hyperlipidique (travaux personnels partie B, page 88) a permis de confirmer les tendances de l'augmentation de la production de NO que nous avons obtenu avec des faibles apports en ALA (article 2), mettant ainsi en évidence un effet de la dose d'ALA apporté sur la production du NO à partir de l'arginine. Par ailleurs, l'effet de l'ALA sur la production de NO par les cellules endothéliales, bien que non significatif, semble être similaire à celui de ses dérivés à longue chaîne. En effet, il a été montré que le traitement des cellules endothéliales en culture avec de l'EPA ou du DHA augmente la production de NO (partie V/1/1.2 page 61), mais ceci est la première fois que de tels effets sont obtenus avec l'ALA sur des cellules endothéliales à l'état basal.

Concernant l'expression des NOS, nous avons encore des difficultés à quantifier le taux d'ARNm, en raison d'un problème de spécificité d'amorces, car il s'agit de cellules bovines pour lesquelles il existe peu d'amorces validées. En effet, les amorces que nous avons recherchées nous-mêmes sur les séquences d'ARNm ainsi que toutes celles déjà publiées dans la littérature, n'ont pas donnés de résultats satisfaisants. Cependant, nous avons pu constater que les gènes de la NOS sont très faiblement exprimés, l'isoforme inductible de la NOS n'étant pas détectable dans les cellules que nous avons utilisées. Selon la littérature, l'expression de la eNOS semble être affectée par un ensemble de paramètres, dont le stade de prolifération cellulaire et les conditions de culture (Arnal et al. 1994; Zollner et al. 2000). Des expériences visant à maîtriser ces paramètres semblent être indispensables afin de choisir les conditions idéales pour la détection des variations au niveau de l'expression de la eNOS.

2. Effet de l'ALA et des fibrates sur l'utilisation de l'arginine pour la production d'urée

Le traitement des cellules endothéliales par les concentrations croissantes d'ALA (figure 64) ou de bézafibrate (figure 65) n'affecte pas significativement la sécrétion d'urée dans le milieu de culture. Le taux d'ARNm de l'arginase 2 ne varie pas en réponse au bézafibrate (figure 66); en revanche, ce taux augmente avec la dose d'ALA (figure 67). Néanmoins, cet effet reste à la limite de la significativité (p = 0,0511), et il est surtout porté par la dose à 200 µmol/L (p = 0,0578 *vs* témoin non traité). Quant à l'ANRm de l'arginase 1, il est quasiment indétectable dans les cellules BAEC. Ceci semble être plutôt normal, puisque cet isoforme est exprimé essentiellement dans le foie. Néanmoins, la mesure des concentrations en urée dans les milieux de culture a révélé que la production d'urée par les cellules BAEC était 1000 fois supérieure à celle des NOx. Malgré l'absence d'expression du gène d l'arginase 1, ces cellules semblent donc posséder un cycle de l'urée complet. Le traitement des cellules BAEC par l'ALA (figure 68) et le bézafibrate (figure 69) n'a pas d'effet significatif sur l'activité de l'arginase. Seule la dose 50µmol/L d'ALA semble affecter l'activité de l'arginase, mais cela reste difficile à objectiver en vue des écarts-types très élevés.

Aucune donnée bibliographique n'existe quant aux effets de l'ALA et des fibrates sur la production d'urée et l'expression de l'arginase dans les cellules endothéliales. On peut néanmoins constater que l'absence d'effet significatif du traitement des cellules BAEC par l'ALA sur la production d'urée, est en accord avec ce que nous avons montré *in vivo* chez la souris (article 2 et travaux personnels partie B). On peut aussi remarquer que l'ALA semble affecter les taux d'ARNm des isoformes de l'arginase majoritairement exprimés dans les tissus explorés. En effet, les forts apports en ALA semblent augmenter les taux d'ARNm de l'arginase 2 dans les cellules BAEC et de l'arginase 1 hépatique chez la souris (travaux personnels partie B). Cependant, l'absence d'effet sur l'activité arginase et sur la production d'urée indiquerait que ces régulations géniques n'auraient pas de conséquences fonctionnelles.

***

En conclusion, nous n'avons pas réussi, à ce stade, à reproduire les effets, décrits dans la bibliographie, des ligands synthétiques du PPARα sur l'utilisation de l'arginine dans la voie

de synthèse du NO par les cellules endothéliales. Il semblerait que les cellules que nous avons utilisées n'aient pas réagi au traitement par les fibrates. Nous avons essayé lors de ces protocoles expérimentaux d'utiliser un autre type de fibrates (fénofibrate) avec lequel nous avons obtenu des résultats similaires. Ceci peut être dû à un problème d'incorporation des fibrates dans les cellules; pour cette raison, des marqueurs de l'activation du PPARα seraient intéressants à explorer parallèlement au traitement par les fibrates afin de vérifier leur entrée dans les cellules

Concernant le traitement par l'ALA, les tendances que nous avons obtenues pour l'augmentation de la production de NOx et l'absence d'effet sur l'urée sont en accord avec nos résultats *in vivo* et avec les données de la littérature. Ce qui est plutôt très encourageant. En revanche, le nombre de séries est encore insuffisant pour atteindre le seuil statistique de significativité (n= 4 séries pour les NOx et l'urée), des protocoles supplémentaires sont donc nécessaires afin de confirmer ces tendances.

Discussion générale conclusions et perspectives

Chapitre 4 : Discussion générale, conclusions et perspectives

Les effets bénéfiques des AGPI n-3 sur la physiopathologie du syndrome métabolique impliquent une large pléiotropie. En effet, les mécanismes d'action des AGPI n-3 découlent, entre autres, de leurs effets sur l'homéostasie lipidique et glucidique (par ex. baisse des triglycérides, effet favorable sur la sensibilité à l'insuline…) mais aussi d'un effet probable sur le métabolisme secondaire des acides aminés via des mécanismes encore mal élucidés. Lors de ce travail, nous avons pu mettre en évidence pour la première fois, à travers l'établissement d'aminogrammes plasmatiques, que les concentrations plasmatiques de plusieurs acides aminés (ex : lysine, leucine, glutamine, phosphosérine et cystine) étaient sensibles aux apports alimentaires d'ALA dans le cadre de régimes normo ou hypelipidique. Ces observations mériteraient d'être approfondies afin de mieux comprendre les mécanismes qui les régissent et les conséquences qu'elles peuvent avoir au niveau des voies impliquant ces acides aminés.
Lors de ce travail de recherche, nous nous sommes focalisés particulièrement sur le métabolisme secondaire de l'arginine et de la cystéine. Notre hypothèse était qu'une modulation de l'homéostasie de leurs dérivés bioactifs (NO et glutathion) par les AGPI n-3, serait un des mécanismes par lequel ces acides gras affecteraient la physiopathologie du syndrome métabolique.

1. Effet de l'ALA sur le métabolisme de l'arginine et du NO

Il ressort clairement des travaux expérimentaux que nous avons menés lors de cette thèse que l'ALA module le métabolisme secondaire de l'arginine. En effet l'apport alimentaire d'ALA augmente la production du NO « corps-entier » à partir de l'arginine, sans affecter la voie compétitive de synthèse de l'urée. Dans nos conditions expérimentales, l'augmentation de la production de NO à partir de l'arginine systémique était plus marquée avec les forts apports en ALA (42% de l'apport calorique) qu'avec les plus faibles apports (11%). En concordance avec ces résultats, les NOx et en particulier les nitrites plasmatiques, marqueurs de la biodisponibilité du NO, ont été augmentés seulement suite aux forts apports en l'ALA. Il apparait donc que l'augmentation de la production du NO est dépendante de la quantité d'ALA apportée.

Nos résultats sont tout à fait en cohérence avec les données de la littérature (études résumées dans le tableau 21, qui montrent assez clairement une augmentation des marqueurs de la

production du NO suite à une complémentation en AGPI n-3. Néanmoins, l'originalité de nos résultats repose sur les éléments suivants :

1- Nous avons mis en évidence pour la première fois, chez le rongeur sain, que l'ALA a les mêmes effets sur la production de NO que ses dérivés à longue chaine.
2- La méthode de traçage isotopique que nous avons utilisée nous a permis de mesurer précisément l'utilisation de l'arginine dans la voie de synthèse du NO, cette mesure étant plus pertinente que le dosage de NOx isolé utilisé dans la plupart de ces études.
3- Nous avons choisi d'incorporer l'ALA à l'alimentation alors que l'ensemble des études *in vivo* ayant traitées des effets des AGPI n-3 sur la production de NO ont apportés les AGPI en complétation alimentaire sous forme d'extrait purifié ou de dose d'huile riche en AGPI, se rapprochant plus d'une démarche pharmacologique.

Cependant, notre démarche *in vivo* présente plusieurs limites. Nous avons comparé les groupes recevant l'ALA au groupe recevant les AGS (huile de palme ou de coco). On peut donc se demander si les effets qu'on observe sont dûs à la substitution d'AGS par l'ALA ou vraiment à un effet signal de l'ALA. En effet, la diminution de l'apport en AGS pourrait, en soi, atténuer leurs effets délétères notamment sur la fonction endothéliale (Mugabo et al. 2011; Newens et al. 2011). Néanmoins, nous avons observé des effets de l'ALA chez la souris dans le cadre du régime normolipidique apportant des faibles quantités d'acides gras (11% de l'apport énergétique), ce qui laisse plutôt supposer que les effets observés pourraient être attribués à une action spécifique de l'ALA. Cependant, l'introduction d'un groupe supplémentaire recevant des AGMI pour les études *in vivo*, ainsi que l'utilisation de modèles de cultures cellulaires permettrait de s'affranchir de ce biais. Par ailleurs, les quantités d'ALA que nous avons apportées lors de nos protocoles expérimentaux sont largement au-delà des recommandations nutritionnelles. En effet, cela permet d'apporter des quantités d'effecteurs nutritionels suffisamment importantes pour pouvoir observer des effets métaboliques tout en travaillant sur des protocoles de durée compatible avec les contraintes expérimentales et les modèles animaux. Néanmoins, dans une perspective d'étude chez l'homme, il serait nécessaire de se placer dans des niveaux d'apports plus nutritionnels, mais en allongeant la durée des protocoles.

Par ailleurs, la tendance à l'augmentation de la production de NOx que nous avons observée dans les milieux de culture de cellules BAEC traitées avec de l'ALA est aussi en cohérence avec les données de la littérature démontrant une augmentation de la production de NO sous

l'effet des AGPI n-3 au niveau des tissus vasculaires (Lopez et al. 2001; Lopez et al. 2004; Singh et al. 2010) et des cellules endothéliales en cultures (Okuda et al. 1997; Omura et al. 2001; Zhang et al. 2007; Stebbins et al. 2008). On peut donc supposer que l'augmentation de la production de NO « corps-entier » sous l'action de l'ALA peut avoir des conséquences fonctionnelles au niveau des organes-cibles du NO, et principalement au niveau endothélial.

Il apparaît donc à l'issue de ce travail que l'effet bénéfique des AGPI n-3 sur la fonction endothéliale et la prévention du risque cardiovasculaire rapporté par la littérature, pourrait du moins en partie être attribué à l'augmentation de la production et à une meilleure biodisponibilité du NO. Cependant une objectivation des conséquences fonctionnelles de l'augmentation de la production de NO suite à l'apport alimentaire en ALA permettrait de consolider cette conclusion. A titre d'exemple, il serait intéressant d'explorer l'effet de l'apport d'ALA chez des modèles animaux de dysfonction endothéliale, tels que celui développé dans notre laboratoire (Magne et al. 2009; Magne et al. 2010).

Au-delà de la mise en évidence d'une modulation de la production du NO par l'ALA, nous avons voulu, lors de ce travail de thèse, comprendre les mécanismes par lesquels l'ALA exercerait ces effets. Notre hypothèse était basée sur une éventuelle régulation génique par l'ALA, via le PPARα, des enzymes affectant la synthèse du NO à partir de l'arginine, particulièrement les NOS et les arginases. Nos résultats ont clairement montré que l'apport en ALA n'a aucun effet significatif sur l'expression hépatique des gènes des NOS et de l'arginase 2. Même si l'absence d'effet sur ces taux d'ARNm dans le foie n'exclut pas un effet dans d'autres tissus, il semble néanmoins, à l'issue de ce travail, que **les mécanismes de modulation de la production du NO par l'ALA soient plus complexes qu'une régulation génique directe de l'expression des enzymes en compétition pour l'utilisation de l'arginine.** En effet, l'absence d'effet sur l'expression du gène hépatique de la NOS et de l'ARG 2 oriente la réflexion vers les modulations post-transcriptionnelles que pourrait exercer l'ALA, en affectant par exemple l'activité de la eNOS, sa phosphorylation ou sa translocation, ce qui aurait des conséquences directes sur la production du NO. L'estimation de l'état de phosphorylation de la NOS et de son taux protéique serait donc l'étude la plus pertinente à mener dans un premier temps, afin de compléter ce travail.

Lors de ce travail, nous avons aussi mis en évidence que l'apport en ALA, dans le cadre du régime hyperlipidique, augmente l'expression de la DDAH 1 enzyme responsable de la dégradation de l'ADMA, un inhibiteur compétitif de la eNOS. Cette observation constitue une

piste intéressante à explorer, car elle pourrait contribuer à expliquer l'augmentation de la production du NO observée avec les régimes apportant l'ALA. La mesure de l'expression de cette enzyme chez les souris ayant reçu les régimes normolipidiques, ainsi qu'un dosage d'ADMA, seraient intéressants à réaliser pour affiner cette hypothèse.

Il est intéressant de souligner qu'en parallèle, nos résultats montrent une diminution de la production du NO après invalidation du PPARα (artcicle 1). On peut donc cuposer que **l'effet de l'ALA sur la production du NO observé avec de fort apport en ALA serait, du moins en partie, PPARα dépendant**. Le promoteur de la NOS ne présente pas de séquence de liaison PPRE, néanmoins, le PPARα pourrait indirectement affecter la production du NO par l'intermédiaire d'autres facteurs de transcription pouvant relayer son action au niveau du gène de la NOS. Cependant, l'absence d'effet de l'invalidation du PPARα sur le gène de la NOS, du moins au niveau hépatique, laisse penser que le PPARα affecterait la biodisponibilité du NO en modulant d'autres processus. Parmi les hypothèses possibles, une meilleure biodisponibilité du NO, liée à l'augmentation des capacités antioxydantes (Tabernero et al. 2002; Deplanque et al. 2003) ou à l'inhibition de la voie de la NADPH oxydase après activation du PPARα (Newaz et al. 2005).

2. Effet de l'ALA sur le métabolisme de la cystéine et du glutathion

Lors de ce travail nous avons montré, pour la première fois, que l'apport alimentaire en ALA (dans le cadre du régime normolipidique, article 2) affecte l'homéostasie du glutathion. En effet l'apport en ALA permet d'augmenter le pool hépatique de glutathion total. Cet effet, observé chez les souris ayant reçu le régime normolipidique riche en ALA, est en accord avec les études ayant rapporté une augmentation des concentrations cardiaques (Fang et al. 2011) et érythrocytaires (Walczewska et al. 2010) de glutathion, suite à l'apport d'huile de poisson ou de mélange d'AGPI n-3.

Paradoxalement, cet effet n'a pas été retrouvé en augmentant les apports en ALA dans le cadre du régime hyperlipidique. les fortes quantités d'ALA apportées dans le cadre du régime hyperlipidique, même si elles ne semblent pas affecter le pool hépatique total de glutathion, augmentent l'activité et l'expression de la γGCL, enzyme limitante pour sa synthèse, et diminuent en parallèle l'expression de la CDO, enzyme en compétition directe avec la γGCL pour l'utilisation de la cystéine. **Ces résultats suggèrent que l'ALA modulerait l'utilisation de la cystéine, qui serait à priori orientée vers la synthèse du glutathion**, au détriment de l'autre voie principale de son catabolisme pour la synthèse de taurine via la CDO. Néanmoins,

ces observations n'ont pour l'instant pas été confirmées par les valeurs des concentrations hépatiques de cystéine et des concentrations plasmatiques de taurine, qui ne sont pas affectées par les forts apports d'ALA. Il semble donc que des investigations supplémentaires soient indispensables pour s'assurer des conséquences fonctionnelles des régulations que nous avons observées concernant l'expression et l'activité des enzymes du métabolisme de la cystéine.

L'évaluation de l'implication du PPARα dans la modulation du métabolisme de la cystéine et de la voie de synthèse du glutathion a révélé **que l'invalidation de ce facteur de transcription augmentait les concentrations hépatiques de glutathion ainsi que l'activité de la γGCL**. Deux éléments sont importants à souligner :

1- le premier est l'absence de ces effets chez les souris invalidés pour PPARα recevant les régimes apportant d'ALA. En effet, l'augmentation des concentrations de glutathion et de l'activité de la γGCL a été observée uniquement quand les souris invalidées recevaient des régimes apportant les AGS.
2- le second est que l'augmentation des concentrations hépatiques de glutathion et de l'activité de la γGCL est observée chez les souris invalidées pour le PPARα, mais aussi paradoxalement chez les souris sauvages recevant les régimes apportant l'ALA.

Ces deux éléments nous poussent à penser que les effets de l'apport en ALA sur le métabolisme du glutathion chez les souris de type sauvage seraient plutôt une modulation de sa synthèse via des mécanismes de régulations transcriptionnelles, mais qui semblent selon nos résultats être indépendants du PPARα. Cependant, il reste difficile de conclure, sur la base de nos résultats, quant aux conséquences d'un apport d'ALA sur la modulation du stress oxydant cellulaire via un impact sur la synthèse du glutathion à partir de la cystéine. Afin de pouvoir conclure sur cet aspect, il serait indispensable d'interpréter les modulations du métabolisme du glutathion que nous avons observées à la lumière des effets de l'ALA sur les marqueurs de l'état de stress oxydant.

En revanche, chez les souris invalidées pour PPARα, nous avons pu conclure à partir d'un certain nombre de marqueurs (acide urique, marqueurs de l'inflammation) mais aussi en nous basant sur les données bibliographiques, que l'état de stress oxydant des ces souris serait probablement dégradé. Ainsi, les variations que nous avons observées au niveau du métabolisme du glutathion chez les souris invalidées pour PPARα seraient une réponse à cet état de stress oxydant. L'apport de l'ALA chez ces souris semble donc avoir un effet « protecteur » indépendant du PPARα. Nous avons aussi observé cet effet au niveau des

dérégulations du métabolisme lipidique, qui étaient atténuées chez les souris invalidés pour PPARα recevant les régimes apportant l'ALA par rapport à celles recevant les AGS. Cette « protection » chez les souris invalidées pour PPARα, pourrait s'expliquer par l'enrichissement en AGPI n-3 des tissus (principalement le foie) des animaux invalidés recevant le régime apportant l'ALA comme cela a été démontré dans la bibliographie (Martin et al. 2007). Cet enrichissement permettrait de donner lieu à des effets des AGPI n-3 indépendamment de la régulation génique via le PPARα. La disponibilité des AGPI n-3 pour la synthèse de médiateurs lipidiques pourrait par exemple atténuer l'état inflamatoire provoqué par l'invalidation du PPARα et amélioration ainsi l'état général de ces souris.

Au terme de ce travail de thèse, nous pouvons conclure que l'apport alimentaire d'ALA affecte certainement le métabolisme secondaire de l'arginine et de la cystéine. En effet, l'ALA augmente la production de NO à partir de l'arginine; le pool du glutathion est aussi augmenté suite à l'apport d'ALA dans le cadre d'un régime normolipidique. On peut considérer qu'une meilleure biodisponibilité de ces métabolites serait plutôt bénéfique, d'autant plus que ces effets s'associent à une amélioration des composantes du syndrome métabolique chez les animaux recevant les régimes riche en ALA.

En revanche, nos travaux n'ont pas permis d'élucider complètement les mécanismes mis en jeu dans ces régulations. Il semblerait néanmoins, que l'ALA modulerait la production du NO via des régulations post-transcriptionnelles affectant l'activité de la eNOS. En revanche il affecterait l'homéostasie du glutathion via des régulations géniques au niveau des enzymes-clés impliquées dans son métabolisme. Par ailleurs, nous ne pouvons pas exclure l'intervention d'autres mécanismes indirects dans les effets de l'apport alimentaire d'ALA sur le métabolisme du NO et du glutathion. A titre d'exemple, l'effet anti-inflammatoire de l'ALA que nous avons mis en évidence lors de l'analyse transcriptomique pourrait contribuer à l'atténuation du stress oxydant en réduisant l'activité NADPH oxydase. Il est aussi possible qu'une amélioration du profil lipidique suite aux apports d'ALA participerait à l'amélioration de la vasorelaxation en affectant la biodisponibilité du NO (Poudyal et al. 2011). Il nous semble donc que les interactions entre les divers facteurs de risque du syndrome métabolique devraient être impérativement prises en considération afin d'interpréter correctement les mécanismes d'action des AGPI n-3.

Réferences bibliographiques

(2001): Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). Jama 285: 2486-97.

Abdelmegeed MA, KH Moon, JP Hardwick, FJ Gonzalez & BJ Song (2009): Role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in fasting-mediated oxidative stress. Free Radic Biol Med 47: 767-78.

Adkins Y & DS Kelley (2010): Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. J Nutr Biochem 21: 781-92.

Afssa (2009): Étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 2 INCA2

Afssa (2010): Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras

Alberti KG, RH Eckel, SM Grundy, PZ Zimmet, JI Cleeman, KA Donato, JC Fruchart, WP James, CM Loria & SC Smith, Jr. (2009): Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. Circulation 120: 1640-5.

Albrink MJ, RM Krauss, FT Lindgrem, J von der Groeben, S Pan & PD Wood (1980): Intercorrelations among plasma high density lipoprotein, obesity and triglycerides in a normal population. Lipids 15: 668-76.

Alderton WK, CE Cooper & RG Knowles (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J 357: 593-615.

Allard JP, R Kurian, E Aghdassi, R Muggli & D Royall (1997): Lipid peroxidation during n-3 fatty acid and vitamin E supplementation in humans. Lipids 32: 535-41.

Anderson BM & DW Ma (2009): Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? Lipids Health Dis 8: 33.

Anfossi G, I Russo, G Doronzo & M Trovati (2009): Contribution of insulin resistance to vascular dysfunction. Arch Physiol Biochem 115: 199-217.

Arab K, A Rossary, F Flourie, Y Tourneur & JP Steghens (2006): Docosahexaenoic acid enhances the antioxidant response of human fibroblasts by upregulating gamma-glutamyl-cysteinyl ligase and glutathione reductase. Br J Nutr 95: 18-26.

Arnal JF, J Yamin, S Dockery & DG Harrison (1994): Regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA, protein, and activity during cell growth. Am J Physiol 267: C1381-8.

Arner P (2001): Free fatty acids--do they play a central role in type 2 diabetes? Diabetes Obes Metab 3 Suppl 1: S11-9.

Ash DE (2004): Structure and function of arginases. J Nutr 134: 2760S-2764S; discussion 2765S-2767S.

Astorg P, N Arnault, S Czernichow, N Noisette, P Galan & S Hercberg (2004): Dietary intakes and food sources of n-6 and n-3 PUFA in French adult men and women. Lipids 39: 527-35.

Babio N, M Bullo & J Salas-Salvado (2009): Mediterranean diet and metabolic syndrome: the evidence. Public Health Nutr 12: 1607-17.

Bachetti T, L Comini, G Francolini, D Bastianon, B Valetti, M Cadei, P Grigolato, H Suzuki, D Finazzi, A Albertini, S Curello & R Ferrari (2004): Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions. J Mol Cell Cardiol 37: 515-23.

Ballatori N, SM Krance, S Notenboom, S Shi, K Tieu & CL Hammond (2009): Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. Biol Chem 390: 191-214.

Bataille V, B Perret, J Dallongeville, D Arveiler, J Yarnell, P Ducimetiere & J Ferrieres (2006): Metabolic syndrome and coronary heart disease risk in a population-based study of middle-aged men from France and Northern Ireland. A nested case-control study from the PRIME cohort. Diabetes Metab 32: 475-9.

Bautista MC & MM Engler (2005): The Mediterranean diet: is it cardioprotective? Prog Cardiovasc Nurs 20: 70-6.

Becuwe P, A Bianchi, JM Keller & M Dauca (1999): Effects of the peroxisome proliferator clofibric acid on superoxide dismutase expression in the human HepG2 hepatoma cell line. Biochem Pharmacol 58: 1025-33.

Bella DL, LL Hirschberger, Y Hosokawa & MH Stipanuk (1999): Mechanisms involved in the regulation of key enzymes of cysteine metabolism in rat liver in vivo. Am J Physiol 276: E326-35.

Berkowitz DE, R White, D Li, KM Minhas, A Cernetich, S Kim, S Burke, AA Shoukas, D Nyhan, HC Champion & JM Hare (2003): Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. Circulation 108: 2000-6.

Bjorntorp P (1990): "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. Arteriosclerosis 10: 493-6.

Blouet C, F Mariotti, D Azzout-Marniche, V Mathe, T Mikogami, D Tome & JF Huneau (2007): Dietary cysteine alleviates sucrose-induced oxidative stress and insulin resistance. Free Radic Biol Med 42: 1089-97.

Blum A, L Hathaway, R Mincemoyer, WH Schenke, M Kirby, G Csako, MA Waclawiw, JA Panza & RO Cannon, 3rd (2000): Effects of oral L-arginine on endothelium-dependent vasodilation and markers of inflammation in healthy postmenopausal women. J Am Coll Cardiol 35: 271-6.

Bourre JM (2004): Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. J Nutr Health Aging 8: 163-74.

Bouwens M, LA Afman & M Muller (2008): Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in human peripheral blood mononuclear cells reveals an individual gene expression profile response. BMC Genomics 9: 262.

Bouzidi N, K Mekki, A Boukaddoum, N Dida, A Kaddous & M Bouchenak (2010): Effects of omega-3 polyunsaturated fatty-acid supplementation on redox status in chronic renal failure patients with dyslipidemia. J Ren Nutr 20: 321-8.

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: 127-32.

Brenna JT, N Salem, Jr., AJ Sinclair & SC Cunnane (2009): alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 80: 85-91.

Brosnan JT & ME Brosnan (2006): The sulfur-containing amino acids: an overview. J Nutr 136: 1636S-1640S.

Brown AA & FB Hu (2001): Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. Am J Clin Nutr 73: 673-86.

Browning LM, JD Krebs, CS Moore, GD Mishra, MA O'Connell & SA Jebb (2007): The impact of long chain n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on inflammation, insulin sensitivity and CVD risk in a group of overweight women with an inflammatory phenotype. Diabetes Obes Metab 9: 70-80.

Bryan NS & MB Grisham (2007): Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. Free Radic Biol Med 43: 645-57.

Buckley JD & PR Howe (2009): Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. Obes Rev 10: 648-59.

Bulhak AA, C Jung, CG Ostenson, JO Lundberg, PO Sjoquist & J Pernow (2009): PPAR-alpha activation protects the type 2 diabetic myocardium against ischemia-reperfusion injury: involvement of the PI3-Kinase/Akt and NO pathway. Am J Physiol Heart Circ Physiol 296: H719-27.

Bulhak AA, PO Sjoquist, CB Xu, L Edvinsson & J Pernow (2006): Protection against myocardial ischaemia/reperfusion injury by PPAR-alpha activation is related to production of nitric oxide and endothelin-1. Basic Res Cardiol 101: 244-52.

Calder PC (1997): N-3 polyunsaturated fatty acids and immune cell function. Adv Enzyme Regul 37: 197-237.

Calder PC (2006): n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. Am J Clin Nutr 83: 1505S-1519S.

Carlstrom M, FJ Larsen, T Nystrom, M Hezel, S Borniquel, E Weitzberg & JO Lundberg (2010): Dietary inorganic nitrate reverses features of metabolic syndrome in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 17716-20.

Carpentier YA, L Portois & WJ Malaisse (2006): n-3 fatty acids and the metabolic syndrome. Am J Clin Nutr 83: 1499S-1504S.

Carr DB, KM Utzschneider, RL Hull, K Kodama, BM Retzlaff, JD Brunzell, JB Shofer, BE Fish, RH Knopp & SE Kahn (2004): Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. Diabetes 53: 2087-94.

Cederbaum SD, H Yu, WW Grody, RM Kern, P Yoo & RK Iyer (2004): Arginases I and II: do their functions overlap? Mol Genet Metab 81 Suppl 1: S38-44.

Chan JK, BE McDonald, JM Gerrard, VM Bruce, BJ Weaver & BJ Holub (1993): Effect of dietary alpha-linolenic acid and its ratio to linoleic acid on platelet and plasma fatty acids and thrombogenesis. Lipids 28: 811-7.

Chander PN, O Gealekman, SV Brodsky, S Elitok, A Tojo, M Crabtree, SS Gross & MS Goligorsky (2004): Nephropathy in Zucker diabetic fat rat is associated with oxidative and nitrosative stress: prevention by chronic therapy with a peroxynitrite scavenger ebselen. J Am Soc Nephrol 15: 2391-403.

Chang CI, JC Liao & L Kuo (1998): Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. Am J Physiol 274: H342-8.

Chicoine LG, ML Paffett, TL Young & LD Nelin (2004): Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 287: L60-8.

Chu R, H Lim, L Brumfield, H Liu, C Herring, P Ulintz, JK Reddy & M Davison (2004): Protein profiling of mouse livers with peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation. Mol Cell Biol 24: 6288-97.

Combe N BC (2001): Apports alimentaires en acides linoléique et alpha-linolénique d'une population d'Aquitaine. Oléagineux, Corps Gras, Lipides
8: 118-21, .

Cook S, O Hugli, M Egli, P Vollenweider, R Burcelin, P Nicod, B Thorens & U Scherrer (2003): Clustering of cardiovascular risk factors mimicking the human metabolic syndrome X in eNOS null mice. Swiss Med Wkly 133: 360-3.

Cooke JP & YT Ghebremariam (2011): DDAH says NO to ADMA. Arterioscler Thromb Vasc Biol 31: 1462-4.

Cooke JP, AH Singer, P Tsao, P Zera, RA Rowan & ME Billingham (1992): Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. J Clin Invest 90: 1168-72.

Coord.A M (2001): Les apports nutritionnels conseillés pour la population française. . Editions Tech et Doc.

Costet P, C Legendre, J More, A Edgar, P Galtier & T Pineau (1998): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. J Biol Chem 273: 29577-85.

Cox JD, NN Kim, AM Traish & DW Christianson (1999): Arginase-boronic acid complex highlights a physiological role in erectile function. Nat Struct Biol 6: 1043-7.

Dalle Grave R, S Calugi, E Centis, R Marzocchi, ME Ghoch & G Marchesini (2010): Lifestyle modification in the management of the metabolic syndrome: achievements and challenges. Diabetes Metab Syndr Obes 3: 373-85.

Dallongeville J, D Cottel, J Ferrieres, D Arveiler, A Bingham, JB Ruidavets, B Haas, P Ducimetiere & P Amouyel (2005): Household income is associated with the risk of metabolic syndrome in a sex-specific manner. Diabetes Care 28: 409-15.

Das UN (2006): Biological significance of essential fatty acids. J Assoc Physicians India 54: 309-19.

Dattilo AM & PM Kris-Etherton (1992): Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis. Am J Clin Nutr 56: 320-8.

Davy BM & CL Melby (2003): The effect of fiber-rich carbohydrates on features of Syndrome X. J Am Diet Assoc 103: 86-96.

de Berrazueta JR, JM Gomez de Berrazueta, JA Amado Senaris, N Pena Sarabia, C Fernandez Viadero, MT Garcia-Unzueta, M Saez de Adana, CJ Sanchez Ovejero & J Llorca (2009): A diet enriched with mackerel (Scomber scombrus)-derived products improves the endothelial function in a senior population (Prevencion de las Enfermedades Cardiovasculares: Estudio Santona--PECES project). Eur J Clin Invest 39: 165-73.

Del Turco S, T Navarra, A Gastaldelli & G Basta (2011): Protective role of adiponectin on endothelial dysfunction induced by AGEs: A clinical and experimental approach. Microvasc Res.

Delarue J, C Couet, R Cohen, JF Brechot, JM Antoine & F Lamisse (1996): Effects of fish oil on metabolic responses to oral fructose and glucose loads in healthy humans. Am J Physiol 270: E353-62.

Deplanque D, P Gele, O Petrault, I Six, C Furman, M Bouly, S Nion, B Dupuis, D Leys, JC Fruchart, R Cecchelli, B Staels, P Duriez & R Bordet (2003): Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation as a mechanism of preventive neuroprotection induced by chronic fenofibrate treatment. J Neurosci 23: 6264-71.

Di Renzo L, F Galvano, C Orlandi, A Bianchi, C Di Giacomo, L La Fauci, R Acquaviva & A De Lorenzo (2010): Oxidative stress in normal-weight obese syndrome. Obesity (Silver Spring) 18: 2125-30.

Dickinson DA, AL Levonen, DR Moellering, EK Arnold, H Zhang, VM Darley-Usmar & HJ Forman (2004): Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. Free Radic Biol Med 37: 1152-9.

Dietrich M & I Jialal (2005): The effect of weight loss on a stable biomarker of inflammation, C-reactive protein. Nutr Rev 63: 22-8.

Duplain H, R Burcelin, C Sartori, S Cook, M Egli, M Lepori, P Vollenweider, T Pedrazzini, P Nicod, B Thorens & U Scherrer (2001): Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. Circulation 104: 342-5.

Eckel RH, KG Alberti, SM Grundy & PZ Zimmet (2010): The metabolic syndrome. Lancet 375: 181-3.

Edgar AD, C Tomkiewicz, P Costet, C Legendre, M Aggerbeck, J Bouguet, B Staels, C Guyomard, T Pineau & R Barouki (1998): Fenofibrate modifies transaminase gene expression via a peroxisome proliferator activated receptor alpha-dependent pathway. Toxicol Lett 98: 13-23.

EFSA (2009): Opinion on the substantiation of health claims related to alpha-linolenic acid and maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 493) and maintenance of normal blood pressure (ID 625) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/20061. EFSA Journal 7(9):1252.

Egert S, F Kannenberg, V Somoza, HF Erbersdobler & U Wahrburg (2009): Dietary alpha-linolenic acid, EPA, and DHA have differential effects on LDL fatty acid composition but similar effects on serum lipid profiles in normolipidemic humans. J Nutr 139: 861-8.

Emken EA, RO Adlof & RM Gulley (1994): Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. Biochim Biophys Acta 1213: 277-88.

Engler MB & MM Engler (2000): Docosahexaenoic acid--induced vasorelaxation in hypertensive rats: mechanisms of action. Biol Res Nurs 2: 85-95.

Engstrom K, AS Saldeen, B Yang, JL Mehta & T Saldeen (2009): Effect of fish oils containing different amounts of EPA, DHA, and antioxidants on plasma and brain fatty acids and brain nitric oxide synthase activity in rats. Ups J Med Sci 114: 206-13.

Erdogan H, E Fadillioglu, S Ozgocmen, S Sogut, B Ozyurt, O Akyol & O Ardicoglu (2004): Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 71: 149-52.

Evans M, RA Anderson, J Graham, GR Ellis, K Morris, S Davies, SK Jackson, MJ Lewis, MP Frenneaux & A Rees (2000): Ciprofibrate therapy improves endothelial function and reduces postprandial lipemia and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. Circulation 101: 1773-9.

Fang Y, J Favre, M Vercauteren, B Laillet, I Remy-Jouet, M Skiba, F Lallemand, C Dehaudt, C Monteil, C Thuillez & P Mulder (2011): Reduced cardiac remodelling and prevention of glutathione deficiency after omega-3 supplementation in chronic heart failure. Fundam Clin Pharmacol 25: 323-32.

Fernandez ML, R Ruiz, MA Gonzalez, R Ramirez-Lorca, C Couto, A Ramos, R Gutierrez-Tous, JM Rivera, A Ruiz, LM Real & A Grilo (2004): Association of NOS3 gene with metabolic syndrome in hypertensive patients. Thromb Haemost 92: 413-8.

Ford ES, WH Giles & AH Mokdad (2004): Increasing prevalence of the metabolic syndrome among u.s. Adults. Diabetes Care 27: 2444-9.

Ford ES, C Li & N Sattar (2008): Metabolic syndrome and incident diabetes: current state of the evidence. Diabetes Care 31: 1898-904.

Ford ES, AH Mokdad, WH Giles & DW Brown (2003): The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Diabetes 52: 2346-52.

Forman HJ, H Zhang & A Rinna (2009): Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. Mol Aspects Med 30: 1-12.

Foulon T, MJ Richard, N Payen, JL Bourrain, JC Beani, F Laporte & A Hadjian (1999): Effects of fish oil fatty acids on plasma lipids and lipoproteins and oxidant-antioxidant imbalance in healthy subjects. Scand J Clin Lab Invest 59: 239-48.

Frick MH, M Syvanne, MS Nieminen, H Kauma, S Majahalme, V Virtanen, YA Kesaniemi, A Pasternack & MR Taskinen (1997): Prevention of the angiographic progression of coronary and vein-graft atherosclerosis by gemfibrozil after coronary bypass surgery in men with low levels of HDL cholesterol. Lopid Coronary Angiography Trial (LOCAT) Study Group. Circulation 96: 2137-43.

Furukawa S, T Fujita, M Shimabukuro, M Iwaki, Y Yamada, Y Nakajima, O Nakayama, M Makishima, M Matsuda & I Shimomura (2004): Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J Clin Invest 114: 1752-61.

Gallagher EJ, D Leroith & E Karnieli (2010): Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome. Mt Sinai J Med 77: 511-23.

Geleijnse JM, EJ Giltay, DE Grobbee, AR Donders & FJ Kok (2002): Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. J Hypertens 20: 1493-9.

Giral P, N Jacob, C Dourmap, B Hansel, A Carrie, E Bruckert, X Girerd & MJ Chapman (2008): Elevated gamma-glutamyltransferase activity and perturbed thiol profile are associated with features of metabolic syndrome. Arterioscler Thromb Vasc Biol 28: 587-93.

Gomes VA, A Casella-Filho, AC Chagas & JE Tanus-Santos (2008): Enhanced concentrations of relevant markers of nitric oxide formation after exercise training in patients with metabolic syndrome. Nitric Oxide 19: 345-50.

Goodfellow J, MF Bellamy, MW Ramsey, CJ Jones & MJ Lewis (2000): Dietary supplementation with marine omega-3 fatty acids improve systemic large artery endothelial function in subjects with hypercholesterolemia. J Am Coll Cardiol 35: 265-70.

Goya K, S Sumitani, X Xu, T Kitamura, H Yamamoto, S Kurebayashi, H Saito, H Kouhara, S Kasayama & I Kawase (2004): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists increase nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24: 658-63.

Grattagliano I, VO Palmieri, P Portincasa, A Moschetta & G Palasciano (2008): Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. J Nutr Biochem 19: 491-504.

Guellich A, T Damy, Y Lecarpentier, M Conti, V Claes, JL Samuel, J Quillard, JL Hebert, T Pineau & C Coirault (2007): Role of oxidative stress in cardiac dysfunction of PPARalpha-/- mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 293: H93-H102.

Guillot N, E Caillet, M Laville, C Calzada, M Lagarde & E Vericel (2009): Increasing intakes of the long-chain omega-3 docosahexaenoic acid: effects on platelet functions and redox status in healthy men. Faseb J 23: 2909-16.

Hambrecht R, L Hilbrich, S Erbs, S Gielen, E Fiehn, N Schoene & G Schuler (2000): Correction of endothelial dysfunction in chronic heart failure: additional effects of exercise training and oral L-arginine supplementation. J Am Coll Cardiol 35: 706-13.

Han SH, MJ Quon & KK Koh (2007): Reciprocal relationships between abnormal metabolic parameters and endothelial dysfunction. Curr Opin Lipidol 18: 58-65.

Harris WS, GS Rambjor, SL Windsor & D Diederich (1997): n-3 fatty acids and urinary excretion of nitric oxide metabolites in humans. Am J Clin Nutr 65: 459-64.

Hassan A, A Ibrahim, K Mbodji, M Coeffier, F Ziegler, F Bounoure, JM Chardigny, M Skiba, G Savoye, P Dechelotte & R Marion-Letellier (2010): An alpha-linolenic acid-rich formula reduces oxidative stress and inflammation by regulating NF-kappaB in rats with TNBS-induced colitis. J Nutr 140: 1714-21.

Higashi Y, S Sasaki, K Nakagawa, H Matsuura, K Chayama & T Oshima (2001): Effect of obesity on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in normotensive individuals and patients with essential hypertension. Am J Hypertens 14: 1038-45.

Higdon JV, J Liu, SH Du, JD Morrow, BN Ames & RC Wander (2000): Supplementation of postmenopausal women with fish oil rich in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid is not associated with greater in vivo lipid peroxidation compared with oils rich in oleate and linoleate as assessed by plasma malondialdehyde and F(2)-isoprostanes. Am J Clin Nutr 72: 714-22.

Hill AM, JD Buckley, KJ Murphy & PR Howe (2007): Combining fish-oil supplements with regular aerobic exercise improves body composition and cardiovascular disease risk factors. Am J Clin Nutr 85: 1267-74.

Hillier TA, A Fagot-Campagna, E Eschwege, S Vol, M Cailleau & B Balkau (2006): Weight change and changes in the metabolic syndrome as the French population moves towards overweight: the D.E.S.I.R. cohort. Int J Epidemiol 35: 190-6.

Holm P, N Korsgaard, M Shalmi, HL Andersen, P Hougaard, SO Skouby & S Stender (1997): Significant reduction of the antiatherogenic effect of estrogen by long-term inhibition of nitric oxide synthesis in cholesterol-clamped rabbits. J Clin Invest 100: 821-8.

Hopps E, D Noto, G Caimi & MR Averna (2010): A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. Nutr Metab Cardiovasc Dis 20: 72-7.

Hrabak A, T Bajor, A Temesi & G Meszaros (1996): The inhibitory effect of nitrite, a stable product of nitric oxide (NO) formation, on arginase. FEBS Lett 390: 203-6.

Huang CS, LS Chang, ME Anderson & A Meister (1993): Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. J Biol Chem 268: 19675-80.

Huang PL (2009): eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. Trends Endocrinol Metab 20: 295-302.

Hulshof KF, MA van Erp-Baart, M Anttolainen, W Becker, SM Church, C Couet, E Hermann-Kunz, H Kesteloot, T Leth, I Martins, O Moreiras, J Moschandreas, L Pizzoferrato, AH Rimestad, H Thorgeirsdottir, JM van Amelsvoort, A Aro, AG Kafatos, D Lanzmann-Petithory & G van Poppel (1999): Intake of fatty acids in western Europe with emphasis on trans fatty acids: the TRANSFAIR Study. Eur J Clin Nutr 53: 143-57.

Inoue I, S Goto, T Matsunaga, T Nakajima, T Awata, S Hokari, T Komoda & S Katayama (2001): The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and PPARgamma increase Cu2+,Zn2+-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. Metabolism 50: 3-11.

Inoue I, S Noji, T Awata, K Takahashi, T Nakajima, M Sonoda, T Komoda & S Katayama (1998): Bezafibrate has an antioxidant effect: peroxisome proliferator-activated receptor alpha is associated with Cu2+, Zn2+-superoxide dismutase in the liver. Life Sci 63: 135-44.

Jain SK, T Velusamy, JL Croad, JL Rains & R Bull (2009): L-cysteine supplementation lowers blood glucose, glycated hemoglobin, CRP, MCP-1, and oxidative stress and inhibits NF-kappaB activation in the livers of Zucker diabetic rats. Free Radic Biol Med 46: 1633-8.

Jensen MD (2008): Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. J Clin Endocrinol Metab 93: S57-63.

Jiao HL & BL Zhao (2002): Cytotoxic effect of peroxisome proliferator fenofibrate on human HepG2 hepatoma cell line and relevant mechanisms. Toxicol Appl Pharmacol 185: 172-9.

Jobgen W, CJ Meininger, SC Jobgen, P Li, MJ Lee, SB Smith, TE Spencer, SK Fried & G Wu (2009): Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. J Nutr 139: 230-7.

Jump DB (2002): The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. J Biol Chem 277: 8755-8.

Kaneki M, N Shimizu, D Yamada & K Chang (2007): Nitrosative stress and pathogenesis of insulin resistance. Antioxid Redox Signal 9: 319-29.

Kawashima S & M Yokoyama (2004): Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24: 998-1005.

Kelley DE & BH Goodpaster (2001): Skeletal muscle triglyceride. An aspect of regional adiposity and insulin resistance. Diabetes Care 24: 933-41.

Kelley DE, R Wing, C Buonocore, J Sturis, K Polonsky & M Fitzsimmons (1993): Relative effects of calorie restriction and weight loss in noninsulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 77: 1287-93.

Kersten S, S Mandard, P Escher, FJ Gonzalez, S Tafuri, B Desvergne & W Wahli (2001): The peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates amino acid metabolism. Faseb J 15: 1971-8.

Kersten S, J Seydoux, JM Peters, FJ Gonzalez, B Desvergne & W Wahli (1999): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. J Clin Invest 103: 1489-98.

Khan F, K Elherik, C Bolton-Smith, R Barr, A Hill, I Murrie & JJ Belch (2003): The effects of dietary fatty acid supplementation on endothelial function and vascular tone in healthy subjects. Cardiovasc Res 59: 955-62.

Kim JA, M Montagnani, KK Koh & MJ Quon (2006): Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. Circulation 113: 1888-904.

Kleinbongard P, A Dejam, T Lauer, T Rassaf, A Schindler, O Picker, T Scheeren, A Godecke, J Schrader, R Schulz, G Heusch, GA Schaub, NS Bryan, M Feelisch & M Kelm (2003): Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. Free Radic Biol Med 35: 790-6.

Lancet (2001): Effect of fenofibrate on progression of coronary-artery disease in type 2 diabetes: the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study, a randomised study. Lancet 357: 905-10.

Landmesser U & H Drexler (2007): Endothelial function and hypertension. Curr Opin Cardiol 22: 316-20.

Landmesser U, B Hornig & H Drexler (2004): Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? Circulation 109: II27-33.

Lee J, H Ryu, RJ Ferrante, SM Morris, Jr. & RR Ratan (2003): Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 4843-8.

Legrand P (2007): LES ACIDES GRAS : STRUCTURES, FONCTIONS, APPORTS NUTRITIONNELS CONSEILLES. Cah. Nutr. Diét.

42.

Lewis GF, A Carpentier, K Adeli & A Giacca (2002): Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. Endocr Rev 23: 201-29.

Li CB, XX Li, YG Chen, C Zhang, MX Zhang, XQ Zhao, MX Hao, XY Hou, ML Gong, YX Zhao, PL Bu & Y Zhang (2009): Effects and mechanisms of PPARalpha activator fenofibrate on myocardial remodelling in hypertension. J Cell Mol Med 13: 4444-52.

Linz W, P Wohlfart, M Baader, K Breitschopf, E Falk, HL Schafer, M Gerl, W Kramer & H Rutten (2009): The peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha) agonist, AVE8134, attenuates the progression of heart failure and increases survival in rats. Acta Pharmacol Sin 30: 935-46.

Liu RM, L Gao, J Choi & HJ Forman (1998): gamma-glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal. Am J Physiol 275: L861-9.

Lombardo YB & AG Chicco (2006): Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. J Nutr Biochem 17: 1-13.

Lombardo YB, G Hein & A Chicco (2007): Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. Lipids 42: 427-37.

Lopez D, C Caballero, J Sanchez, P Puig-Parellada & MT Mitjavila (2001): Free radical production in aortic rings from rats fed a fish oil-rich diet. Am J Physiol Heart Circ Physiol 280: H2929-35.

Lopez D, M Moller, A Denicola, K Casos, H Rubbo, JI Ruiz-Sanz & MT Mitjavila (2008): Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid from fish oil modulates aortic nitric oxide and tocopherol status in the rat. Br J Nutr 100: 767-75.

Lopez D, X Orta, K Casos, MP Saiz, P Puig-Parellada, M Farriol & MT Mitjavila (2004): Upregulation of endothelial nitric oxide synthase in rat aorta after ingestion of fish oil-rich diet. Am J Physiol Heart Circ Physiol 287: H567-72.

Lores Arnaiz S, M Travacio, AJ Monserrat, JC Cutrin, S Llesuy & A Boveris (1997): Chemiluminescence and antioxidant levels during peroxisome proliferation by fenofibrate. Biochim Biophys Acta 1360: 222-8.

Lu SC (2009): Regulation of glutathione synthesis. Mol Aspects Med 30: 42-59.

Lu SC, J Kuhlenkamp, C Garcia-Ruiz & N Kaplowitz (1991): Hormone-mediated down-regulation of hepatic glutathione synthesis in the rat. J Clin Invest 88: 260-9.

Lucotti P, E Setola, LD Monti, E Galluccio, S Costa, EP Sandoli, I Fermo, G Rabaiotti, R Gatti & P Piatti (2006): Beneficial effects of a long-term oral L-arginine treatment added to a hypocaloric diet and exercise training program in obese, insulin-resistant type 2 diabetic patients. Am J Physiol Endocrinol Metab 291: E906-12.

Lundberg JO & E Weitzberg (2005): NO generation from nitrite and its role in vascular control. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 915-22.

Magne J, JF Huneau, S Delemasure, L Rochette, D Tome & F Mariotti (2009): Whole-body basal nitric oxide production is impaired in postprandial endothelial dysfunction in healthy rats. Nitric Oxide 21: 37-43.

Magne J, F Mariotti, R Fischer, V Mathe, D Tome & JF Huneau (2010): Early postprandial low-grade inflammation after high-fat meal in healthy rats: possible involvement of visceral adipose tissue. J Nutr Biochem 21: 550-5.

Makowski L, RC Noland, TR Koves, W Xing, OR Ilkayeva, MJ Muehlbauer, RD Stevens & DM Muoio (2009): Metabolic profiling of PPARalpha-/- mice reveals defects in carnitine and amino acid homeostasis that are partially reversed by oral carnitine supplementation. Faseb J 23: 586-604.

Malmezat T, D Breuille, P Capitan, PP Mirand & C Obled (2000): Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. J Nutr 130: 1239-46.

Mandard S, M Muller & S Kersten (2004): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. Cell Mol Life Sci 61: 393-416.

Mariotti F, JF Huneau, I Szezepanski, KJ Petzke, Y Aggoun, D Tome & D Bonnet (2007): Meal amino acids with varied levels of arginine do not affect postprandial vascular endothelial function in healthy young men. J Nutr 137: 1383-9.

Mariotti F, Petzke KJ, Huneau JF, Szezepanski I, Tome D, Bos C et Bonnet D (2009): Despite a large first-pass extraction for urea synthesis, the systemic bioavailability of meal arginine is high and dose-dependent
in men. FASEB J. 23.
Mariotti F, KL Simbelie, L Makarios-Lahham, JF Huneau, B Laplaize, D Tome & PC Even (2004): Acute ingestion of dietary proteins improves post-exercise liver glutathione in rats in a dose-dependent relationship with their cysteine content. J Nutr 134: 128-31.
Martin PG, H Guillou, F Lasserre, S Dejean, A Lan, JM Pascussi, M Sancristobal, P Legrand, P Besse & T Pineau (2007): Novel aspects of PPARalpha-mediated regulation of lipid and xenobiotic metabolism revealed through a nutrigenomic study. Hepatology 45: 767-77.
Martinez MC & R Andriantsitohaina (2009): Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. Antioxid Redox Signal 11: 669-702.
Marzinzig M, AK Nussler, J Stadler, E Marzinzig, W Barthlen, NC Nussler, HG Beger, SM Morris, Jr. & UB Bruckner (1997): Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and S-nitrosothiols. Nitric Oxide 1: 177-89.
Massaro M, A Habib, L Lubrano, S Del Turco, G Lazzerini, T Bourcier, BB Weksler & R De Caterina (2006): The omega-3 fatty acid docosahexaenoate attenuates endothelial cyclooxygenase-2 induction through both NADP(H) oxidase and PKC epsilon inhibition. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 15184-9.
Merzouk SA, M Saker, KB Reguig, N Soulimane, H Merzouk, B Guermouche, AY Berrouiguet, A Hichami, M Narce & NA Khan (2008): N-3 polyunsaturated fatty acids modulate in-vitro T cell function in type I diabetic patients. Lipids 43: 485-97.
Metges CC, YM Yu, W Cai, XM Lu, S Wong, MM Regan, A Ajami & VR Young (2000): Oxoproline kinetics and oxoproline urinary excretion during glycine- or sulfur amino acid-free diets in humans. Am J Physiol Endocrinol Metab 278: E868-76.
Meydani M, F Natiello, B Goldin, N Free, M Woods, E Schaefer, JB Blumberg & SL Gorbach (1991): Effect of long-term fish oil supplementation on vitamin E status and lipid peroxidation in women. J Nutr 121: 484-91.
Mieyal JJ, MM Gallogly, S Qanungo, EA Sabens & MD Shelton (2008): Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. Antioxid Redox Signal 10: 1941-88.
Monti LD, C Barlassina, L Citterio, E Galluccio, C Berzuini, E Setola, G Valsecchi, P Lucotti, G Pozza, L Bernardinelli, G Casari & P Piatti (2003): Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. Diabetes 52: 1270-5.
Mori TA, DQ Bao, V Burke, IB Puddey & LJ Beilin (1999): Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans. Hypertension 34: 253-60.
Mori TA, RJ Woodman, V Burke, IB Puddey, KD Croft & LJ Beilin (2003): Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects. Free Radic Biol Med 35: 772-81.
Morise A, J Mourot, C Boue, N Combe, G Amsler, D Gripois, A Quignard-Boulange, L Yvan-Charvet, E Fenart, P Weill & D Hermier (2006): Gender-related response of lipid metabolism to dietary fatty acids in the hamster. Br J Nutr 95: 709-20.
Morise A, J Mourot, M Riottot, P Weill, E Fenart & D Hermier (2005): Dose effect of alpha-linolenic acid on lipid metabolism in the hamster. Reprod Nutr Dev 45: 405-18.
Morise A, C Thomas, JF Landrier, P Besnard & D Hermier (2009): Hepatic lipid metabolism response to dietary fatty acids is differently modulated by PPARalpha in male and female mice. Eur J Nutr 48: 465-73.
Morris SM, Jr. (2004): Recent advances in arginine metabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 7: 45-51.
Morris SM, Jr. (2006): Arginine: beyond protein. Am J Clin Nutr 83: 508S-512S.

Morris SM, Jr. (2009): Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. Br J Pharmacol 157: 922-30.

Mottillo S, KB Filion, J Genest, L Joseph, L Pilote, P Poirier, S Rinfret, EL Schiffrin & MJ Eisenberg (2010): The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. J Am Coll Cardiol 56: 1113-32.

Mudd SH, JT Brosnan, ME Brosnan, RL Jacobs, SP Stabler, RH Allen, DE Vance & C Wagner (2007): Methyl balance and transmethylation fluxes in humans. Am J Clin Nutr 85: 19-25.

Mugabo Y, Y Mukaneza & G Renier (2011): Palmitate induces C-reactive protein expression in human aortic endothelial cells. Relevance to fatty acid-induced endothelial dysfunction. Metabolism 60: 640-8.

Murakami H, R Murakami, F Kambe, X Cao, R Takahashi, T Asai, T Hirai, Y Numaguchi, K Okumura, H Seo & T Murohara (2006): Fenofibrate activates AMPK and increases eNOS phosphorylation in HUVEC. Biochem Biophys Res Commun 341: 973-8.

Musaad S & EN Haynes (2007): Biomarkers of obesity and subsequent cardiovascular events. Epidemiol Rev 29: 98-114.

Musso G, R Gambino, F De Michieli, G Biroli, A Premoli, G Pagano, S Bo, M Durazzo & M Cassader (2007): Nitrosative stress predicts the presence and severity of nonalcoholic fatty liver at different stages of the development of insulin resistance and metabolic syndrome: possible role of vitamin A intake. Am J Clin Nutr 86: 661-71.

Neill MA, J Aschner, F Barr & ML Summar (2009): Quantitative RT-PCR comparison of the urea and nitric oxide cycle gene transcripts in adult human tissues. Mol Genet Metab 97: 121-7.

Newaz M, A Blanton, P Fidelis & A Oyekan (2005): NAD(P)H oxidase/nitric oxide interactions in peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)alpha-mediated cardiovascular effects. Mutat Res 579: 163-71.

Newaz MA, K Ranganna & AO Oyekan (2004): Relationship between PPARalpha activation and NO on proximal tubular Na+ transport in the rat. BMC Pharmacol 4: 1.

Newens KJ, AK Thompson, KG Jackson, J Wright & CM Williams (2011): DHA-rich fish oil reverses the detrimental effects of saturated fatty acids on postprandial vascular reactivity. Am J Clin Nutr 94: 742-8.

Nicklas BJ, W Ambrosius, SP Messier, GD Miller, BW Penninx, RF Loeser, S Palla, E Bleecker & M Pahor (2004): Diet-induced weight loss, exercise, and chronic inflammation in older, obese adults: a randomized controlled clinical trial. Am J Clin Nutr 79: 544-51.

Nielsen S, JR Halliwill, MJ Joyner & MD Jensen (2004): Vascular response to angiotensin II in upper body obesity. Hypertension 44: 435-41.

Nishimura J, Y Dewa, T Okamura, M Muguruma, M Jin, Y Saegusa, T Umemura & K Mitsumori (2008): Possible involvement of oxidative stress in fenofibrate-induced hepatocarcinogenesis in rats. Arch Toxicol 82: 641-54.

Nishimura M, A Nanbu, T Komori, K Ohtsuka, H Takahashi & M Yoshimura (2000): Eicosapentaenoic acid stimulates nitric oxide production and decreases cardiac noradrenaline in diabetic rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 27: 618-24.

Odegaard JI, RR Ricardo-Gonzalez, MH Goforth, CR Morel, V Subramanian, L Mukundan, A Red Eagle, D Vats, F Brombacher, AW Ferrante & A Chawla (2007): Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. Nature 447: 1116-20.

Oemar BS, MR Tschudi, N Godoy, V Brovkovich, T Malinski & TF Luscher (1998): Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. Circulation 97: 2494-8.

Okayasu T, A Tomizawa, K Suzuki, K Manaka & Y Hattori (2008): PPARalpha activators upregulate eNOS activity and inhibit cytokine-induced NF-kappaB activation through AMP-activated protein kinase activation. Life Sci 82: 884-91.

Okuda Y, K Kawashima, T Sawada, K Tsurumaru, M Asano, S Suzuki, M Soma, T Nakajima & K Yamashita (1997): Eicosapentaenoic acid enhances nitric oxide production by cultured human endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 232: 487-91.

Olukman M, ED Sezer, S Ulker, EY Sozmen & GM Cinar (2010): Fenofibrate treatment enhances antioxidant status and attenuates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. Exp Diabetes Res 2010: 828531.

Omura M, S Kobayashi, Y Mizukami, K Mogami, N Todoroki-Ikeda, T Miyake & M Matsuzaki (2001): Eicosapentaenoic acid (EPA) induces Ca(2+)-independent activation and translocation of endothelial nitric oxide synthase and endothelium-dependent vasorelaxation. FEBS Lett 487: 361-6.

Paschos GK, F Magkos, DB Panagiotakos, V Votteas & A Zampelas (2007): Dietary supplementation with flaxseed oil lowers blood pressure in dyslipidaemic patients. Eur J Clin Nutr 61: 1201-6.

Pastore A, G Federici, E Bertini & F Piemonte (2003): Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. Clin Chim Acta 333: 19-39.

Phelan S, TA Wadden, RI Berkowitz, DB Sarwer, LG Womble, RK Cato & R Rothman (2007): Impact of weight loss on the metabolic syndrome. Int J Obes (Lond) 31: 1442-8.

Piolot A, D Blache, L Boulet, LJ Fortin, D Dubreuil, C Marcoux, J Davignon & S Lussier-Cacan (2003): Effect of fish oil on LDL oxidation and plasma homocysteine concentrations in health. J Lab Clin Med 141: 41-9.

Pitocco D, F Zaccardi, E Di Stasio, F Romitelli, SA Santini, C Zuppi & G Ghirlanda (2010): Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. Rev Diabet Stud 7: 15-25.

Playford DA, GF Watts, JD Best & V Burke (2002): Effect of fenofibrate on brachial artery flow-mediated dilatation in type 2 diabetes mellitus. Am J Cardiol 90: 1254-7.

Poobalan A, L Aucott, WC Smith, A Avenell, R Jung, J Broom & AM Grant (2004): Effects of weight loss in overweight/obese individuals and long-term lipid outcomes--a systematic review. Obes Rev 5: 43-50.

Poudyal H, SK Panchal, V Diwan & L Brown (2011): Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. Prog Lipid Res 50: 372-387.

Poumes-Ballihaut C, B Langelier, F Houlier, JM Alessandri, G Durand, C Latge & P Guesnet (2001): Comparative bioavailability of dietary alpha-linolenic and docosahexaenoic acids in the growing rat. Lipids 36: 793-800.

Poynter ME & RA Daynes (1998): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. J Biol Chem 273: 32833-41.

Prasad K (2009): Flaxseed and cardiovascular health. J Cardiovasc Pharmacol 54: 369-77.

Rajala MW & PE Scherer (2003): Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. Endocrinology 144: 3765-73.

Rakhshandehroo M, B Knoch, M Muller & S Kersten (2010): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. PPAR Res 2010.

Ramaprasad TR, V Baskaran, TP Krishnakantha & BR Lokesh (2005): Modulation of antioxidant enzyme activities, platelet aggregation and serum prostaglandins in rats fed spray-dried milk containing n-3 fatty acid. Mol Cell Biochem 280: 9-16.

Reaven GM (1988): Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes 37: 1595-607.

Reaven GM (2000): Diet and Syndrome X. Curr Atheroscler Rep 2: 503-7.

Riccardi G, R Giacco & AA Rivellese (2004): Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. Clin Nutr 23: 447-56.

Richard D, K Kefi, U Barbe, P Bausero & F Visioli (2008): Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. Pharmacol Res 57: 451-5.

Romieu I, R Garcia-Esteban, J Sunyer, C Rios, M Alcaraz-Zubeldia, SR Velasco & F Holguin (2008): The effect of supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids on markers of oxidative stress in elderly exposed to PM(2.5). Environ Health Perspect 116: 1237-42.

Rousseau D, C Helies-Toussaint, D Moreau, D Raederstorff & A Grynberg (2003): Dietary n-3 PUFAs affect the blood pressure rise and cardiac impairments in a hyperinsulinemia rat model in vivo. Am J Physiol Heart Circ Physiol 285: H1294-302.

Russo C, O Olivieri, D Girelli, G Faccini, ML Zenari, S Lombardi & R Corrocher (1998): Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. J Hypertens 16: 1267-71.

Sanderson LM, PJ de Groot, GJ Hooiveld, A Koppen, E Kalkhoven, M Muller & S Kersten (2008): Effect of synthetic dietary triglycerides: a novel research paradigm for nutrigenomics. PLoS One 3: e1681.

Sarafidis PA & GL Bakris (2007): The antinatriuretic effect of insulin: an unappreciated mechanism for hypertension associated with insulin resistance? Am J Nephrol 27: 44-54.

Schafer FQ & GR Buettner (2001): Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. Free Radic Biol Med 30: 1191-212.

Schini-Kerth VB (1999): Vascular biosynthesis of nitric oxide: effect on hemostasis and fibrinolysis. Transfus Clin Biol 6: 355-63.

Sekine S, S Sasanuki, T Aoyama & H Takeuchi (2007): Lowering systolic blood pressure and increases in vasodilator levels in SHR with oral alpha-linolenic acid administration. J Oleo Sci 56: 341-5.

Semplicini A, G Ceolotto, M Massimino, R Valle, L Serena, R De Toni, AC Pessina & C Dal Palu (1994): Interactions between insulin and sodium homeostasis in essential hypertension. Am J Med Sci 307 Suppl 1: S43-6.

Sharma A, S Kharb, SN Chugh, R Kakkar & GP Singh (2000): Effect of glycemic control and vitamin E supplementation on total glutathione content in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Ann Nutr Metab 44: 11-3.

Sheikh K, G Camejo, B Lanne, T Halvarsson, MR Landergren & ND Oakes (2007): Beyond lipids, pharmacological PPARalpha activation has important effects on amino acid metabolism as studied in the rat. Am J Physiol Endocrinol Metab 292: E1157-65.

Siasos G, D Tousoulis, C Antoniades, E Stefanadi & C Stefanadis (2007): L-Arginine, the substrate for NO synthesis: an alternative treatment for premature atherosclerosis? Int J Cardiol 116: 300-8.

Siervo M, SJ Jackson & LJ Bluck (2011): In-vivo nitric oxide synthesis is reduced in obese patients with metabolic syndrome: application of a novel stable isotopic method. J Hypertens.

Sies H (1991): Role of reactive oxygen species in biological processes. Klin Wochenschr 69: 965-8.

Silver AE, SD Beske, DD Christou, AJ Donato, KL Moreau, I Eskurza, PE Gates & DR Seals (2007): Overweight and obese humans demonstrate increased vascular endothelial NAD(P)H oxidase-p47(phox) expression and evidence of endothelial oxidative stress. Circulation 115: 627-37.

Singh TU, K Kathirvel, S Choudhury, SK Garg & SK Mishra (2010): Eicosapentaenoic acid-induced endothelium-dependent and -independent relaxation of sheep pulmonary artery. Eur J Pharmacol 636: 108-13.

Stebbins CL, JP Stice, CM Hart, FN Mbai & AA Knowlton (2008): Effects of dietary decosahexaenoic acid (DHA) on eNOS in human coronary artery endothelial cells. J Cardiovasc Pharmacol Ther 13: 261-8.

Stevens VJ, E Obarzanek, NR Cook, IM Lee, LJ Appel, D Smith West, NC Milas, M Mattfeldt-Beman, L Belden, C Bragg, M Millstone, J Raczynski, A Brewer, B Singh & J Cohen (2001): Long-term weight loss and changes in blood pressure: results of the Trials of Hypertension Prevention, phase II. Ann Intern Med 134: 1-11.

Stipanuk MH (2004): Role of the liver in regulation of body cysteine and taurine levels: a brief review. Neurochem Res 29: 105-10.

Stipanuk MH, JE Dominy, Jr., JI Lee & RM Coloso (2006): Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism. J Nutr 136: 1652S-1659S.

Stipanuk MH, M Londono, JI Lee, M Hu & AF Yu (2002): Enzymes and metabolites of cysteine metabolism in nonhepatic tissues of rats show little response to changes in dietary protein or sulfur amino acid levels. J Nutr 132: 3369-78.

Stokes KY, D Cooper, A Tailor & DN Granger (2002): Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. Free Radic Biol Med 33: 1026-36.

Sugden MC, K Bulmer, GF Gibbons, BL Knight & MJ Holness (2002): Peroxisome-proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) deficiency leads to dysregulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism by fatty acids and insulin. Biochem J 364: 361-8.

Tabernero A, K Schoonjans, L Jesel, I Carpusca, J Auwerx & R Andriantsitohaina (2002): Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against myocardial ischaemic injury and improves endothelial vasodilatation. BMC Pharmacol 2: 10.

Takeuchi H, C Sakurai, R Noda, S Sekine, Y Murano, K Wanaka, M Kasai, S Watanabe, T Aoyama & K Kondo (2007): Antihypertensive effect and safety of dietary alpha-linolenic acid in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. J Oleo Sci 56: 347-60.

Taouis M, C Dagou, C Ster, G Durand, M Pinault & J Delarue (2002): N-3 polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 282: E664-71.

Teissier E, A Nohara, G Chinetti, R Paumelle, B Cariou, JC Fruchart, RP Brandes, A Shah & B Staels (2004): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces NADPH oxidase activity in macrophages, leading to the generation of LDL with PPAR-alpha activation properties. Circ Res 95: 1174-82.

Tesauro M & C Cardillo (2011): Obesity, Blood Vessels and Metabolic Syndrome. Acta Physiol (Oxf).

Thulin P, I Rafter, K Stockling, C Tomkiewicz, E Norjavaara, M Aggerbeck, H Hellmold, E Ehrenborg, U Andersson, I Cotgreave & B Glinghammar (2008): PPARalpha regulates the hepatotoxic biomarker alanine aminotransferase (ALT1) gene expression in human hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol 231: 1-9.

Thuraisingham RC & MM Yaqoob (2003): Oxidative consumption of nitric oxide: a potential mediator of uremic vascular disease. Kidney Int Suppl: S29-32.

Tinoco J (1982): Dietary requirements and functions of alpha-linolenic acid in animals. Prog Lipid Res 21: 1-45.

Tkac I, A Molcanyiova, M Javorsky & M Kozarova (2006): Fenofibrate treatment reduces circulating conjugated diene level and increases glutathione peroxidase activity. Pharmacol Res 53: 261-4.

Touyz RM & EL Schiffrin (2006): Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications. Vascul Pharmacol 45: 19-28.

Townsend DM, KD Tew & H Tapiero (2003): The importance of glutathione in human disease. Biomed Pharmacother 57: 145-55.

Toyama T, H Nakamura, Y Harano, N Yamauchi, A Morita, T Kirishima, M Minami, Y Itoh & T Okanoue (2004): PPARalpha ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats. Biochem Biophys Res Commun 324: 697-704.

Triggle CR, M Hollenberg, TJ Anderson, H Ding, Y Jiang, L Ceroni, WB Wiehler, ES Ng, A Ellis, K Andrews, JJ McGuire & M Pannirselvam (2003): The endothelium in health and disease--a target for therapeutic intervention. J Smooth Muscle Res 39: 249-67.

Velarde G & BC Berk (2005): Role of hypertension in the metabolic syndrome: who is affected? Curr Hypertens Rep 7: 418-26.

Walczewska A, B Dziedzic, T Stepien, E Swiatek & D Nowak (2010): Effect of dietary fats on oxidative-antioxidative status of blood in rats. J Clin Biochem Nutr 47: 18-26.

Wang Y, Y Wang, Q Yang, JT Yan, C Zhao, K Cianflone & DW Wang (2006): Effects of bezafibrate on the expression of endothelial nitric oxide synthase gene and its mechanisms in cultured bovine endothelial cells. Atherosclerosis 187: 265-73.

Watts GF & B Staels (2004): Regulation of endothelial nitric oxide synthase by PPAR agonists: molecular and clinical perspectives. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24: 619-21.

Wendland E, A Farmer, P Glasziou & A Neil (2006): Effect of alpha linolenic acid on cardiovascular risk markers: a systematic review. Heart 92: 166-9.

West IC (2000): Radicals and oxidative stress in diabetes. Diabet Med 17: 171-80.
Wijendran V & KC Hayes (2004): Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. Annu Rev Nutr 24: 597-615.
Wirfalt E, B Hedblad, B Gullberg, I Mattisson, C Andren, U Rosander, L Janzon & G Berglund (2001): Food patterns and components of the metabolic syndrome in men and women: a cross-sectional study within the Malmo Diet and Cancer cohort. Am J Epidemiol 154: 1150-9.
Wu G (2009): Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. Amino Acids 37: 1-17.
Wu G & CJ Meininger (2009): Nitric oxide and vascular insulin resistance. Biofactors 35: 21-7.
Xu HE, MH Lambert, VG Montana, KD Plunket, LB Moore, JL Collins, JA Oplinger, SA Kliewer, RT Gampe, Jr., DD McKee, JT Moore & TM Willson (2001): Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 13919-24.
Yagi K (1987): Lipid peroxides and human diseases. Chem Phys Lipids 45: 337-51.
Yamazaki RK, T Shen & GB Schade (1987): A diet rich in (n-3) fatty acids increases peroxisomal beta-oxidation activity and lowers plasma triacylglycerols without inhibiting glutathione-dependent detoxication activities in the rat liver. Biochim Biophys Acta 920: 62-7.
Yetik-Anacak G & JD Catravas (2006): Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. Vascul Pharmacol 45: 268-76.
Yoo HY, MS Chang & HM Rho (1999): Induction of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene through the peroxisome proliferator-responsive element by arachidonic acid. Gene 234: 87-91.
Yoo SH, O Park, LE Henderson, MA Abdelmegeed, KH Moon & BJ Song (2011): Lack of PPARalpha exacerbates lipopolysaccharide-induced liver toxicity through STAT1 inflammatory signaling and increased oxidative/nitrosative stress. Toxicol Lett 202: 23-9.
Yoshida K, J Hirokawa, S Tagami, Y Kawakami, Y Urata & T Kondo (1995): Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. Diabetologia 38: 201-10.
Yu YM, CM Ryan, ZW Fei, XM Lu, L Castillo, JT Schultz, RG Tompkins & VR Young (2002): Plasma L-5-oxoproline kinetics and whole blood glutathione synthesis rates in severely burned adult humans. Am J Physiol Endocrinol Metab 282: E247-58.
Zhang C, TW Hein, W Wang, CI Chang & L Kuo (2001): Constitutive expression of arginase in microvascular endothelial cells counteracts nitric oxide-mediated vasodilatory function. Faseb J 15: 1264-6.
Zhang W, R Wang, SF Han, L Bu, SW Wang, H Ma & GL Jia (2007): Alpha-linolenic acid attenuates high glucose-induced apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells via PI3K/Akt/eNOS pathway. Nutrition 23: 762-70.
Zollner S, S Aberle, SE Harvey, MA Polokoff & GM Rubanyi (2000): Changes of endothelial nitric oxide synthase level and activity during endothelial cell proliferation. Endothelium 7: 169-84.

Titre : Régulation du métabolisme secondaire de l'arginine et de la cystéine par l'acide alpha-linolénique. Implication dans la physiopathologie du syndrome métabolique

Résumé : Si l'intérêt nutritionnel des acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3 dans la prise en charge et la prévention des dysfonctions associées au syndrome métabolique, est bien établi. Les mécanismes d'action spécifiques sous-jacents aux effets bénéfiques de cette famille d'acides gras sont encore en cours d'étude. L'objectif de ces travaux était d'explorer le rôle de l'acide alpha-linolénique ALA ou 18 :3 n-3, dans la modulation des voies affectant l'homéostasie de molécules bioactives dérivant du métabolisme secondaire des acides aminés (le monoxyde d'azote -NO- et le glutathion). L'hypothèse sous-jacente est que ces modulations pourraient expliquer, du moins en partie, le rôle des AGPI n-3 dans le maintien des fonctions biologiques contrôlées par ces métabolites (telles que la fonction endothéliale et le statut oxydant) et impliquées de près dans la physiopathologie du syndrome métabolique. Notre intérêt a porté particulièrement sur la voie de régulation génique via le PPARα et sur son implication dans le contrôle des gènes du métabolisme des acides aminés par l'ALA.

Nous avons exploré chez la souris de type sauvage et invalidée pour le PPARα, l'effet de l'apport alimentaire d'ALA dans le cadre de régime normo- ou hyper-lipidiques sur les voies du métabolisme secondaire de l'arginine et de la cystéine. En parallèle nous nous sommes focalisés sur les effets de l'ALA au niveau vasculaire en utilisant un modèle de cellules endothéliales bovines en cultures.

De ce travail de thèse s'est dégagé que l'ALA module effectivement le métabolisme secondaire de l'arginine et de la cystéine. L'apport d'ALA (à hauteur de 11% et 42% de l'apport énergétique) augmente la production de NO sans affecter l'expression hépatique des enzymes contrôlant l'utilisation de l'arginine (NOS et ARG). L'apport d'ALA (11%) augmente le pool hépatique du glutathion, alors que les plus forts apports d'ALA (42%) modulent l'expression des principales enzymes impliquées dans les voies d'utilisation de la cystéine (γGCL et CDO). Le PPARα ne semble pas être directement impliqué dans les effets observés de l'ALA, néanmoins, l'invalidation du PPARα rend le métabolisme secondaire des acides aminés plus sensible à la nature des acides gras alimentaire.

Une meilleure biodisponibilité du NO et du glutathion suite à l'apport alimentaire d'ALA serait bénéfique pour la physiopathologie du syndrome métabolique. Il semble donc ineressant, à l'issus de ce travail, d'élaborer des études nutritionnelles validant ces effets de l'ALA chez l'homme dans une perspective de recommandations nutritionnelles.

Mots clés : acides gras polyinsaturés, oméga 3, acide alpha-linolénique, acides aminés, arginine, cystéine, monoxyde d'azote, glutathion, syndrome métabolique.

	NCEP/ATPIII (2001)	IDF (2005)	IDF/AHA/ NHLBI (2009)
	3 des 5 critères suivants	Tour de taille + 2 des 4 autres critères	3 des 5 critères suivants
Tour de taille élevé	≥ 102 cm/hommes > 88 cm/femmes	indispensable, avec seuils ethno-centrés ; origine européenne : > 94 cm/hommes > 80 cm/femmes	seuils ethno-centrés, reprenant les seuils IDF 2005 pour les non-européens et laissant le choix entre seuils IDF et seuils NCEP/ATP III pour ceux d'origine européenne
TG élevés	> 1,5 g/L ou traitement	> 1,5 g/L ou traitement	> 1,5 g/L ou traitement
HDLc bas	< 0,40 g/L/: hommes < 0,50 g/L: femmes	< 0,40 g/L/: hommes < 0,50 g/L: femmes	< 0,40 g/L: hommes < 0,50 g/L: femmes
PA élevées	PAS ≥ 130 mm Hg et/ou PAD > 85 mm Hg ou traitement	PAS ≥ 130 mm Hg et/ou PAD ≥ 90 mm Hg ou traitement	PAS ≥ 130 mm Hg et/ou PAD ≥ 85 mm Hg ou traitement
Glycémie à jeun élevée	≥ 1,1 g/L ou traitement	≥ 1,0 g/L ou traitement	≥ 1,0 g/L ou traitement

Tableau 1 : Quelques définitions du Syndrome métabolique.

- NCEP /ATP III: National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III.
- IDF: International Diabetes Federation.
- AHA: American Heart Association.
- NHLBI: The National Heart, Lung, and Blood Institute.
- PAS : Pression artérielle systolique.
- PAD : Pression artérielle diastolique.
- HDL : High Density lipoprotein.

D'après : (Alberti et al., 2009)

Tableau 2 : Prévalence du SyndMet en Europe.

Country and Reference	Population	Age Range (No.)	Criteria	Prevalence of MetS (% of population)		
				Men	Women	Total
France	Men women	35–64 (3359)	NCEP	23.0	16.9	
France	Men	50–59 (10 592)	NCEP	29.7		
			IDF	38.9		
			WHO	35.5		
Germany	Men women	(4816 men 2315 women)	NCEP IDF	23.5 31.6	17.6 22.6	
Netherlands	Adult men women	50–75 (1364)	NCEP WHO	19.0 26.0	32.0 26.0	
Italy	Men Women	45–64 (1877)	NCEP	24.1	23.1	22.2
Spain	Men women	35–64 (2540)	NCEP IDF	22.3 27.7	30.7 33.6	
Portugal	Men women	18–90 1436	NCEP	19.1	27.0	23.9
Greece	Men Women	Adults (9669)	NCEP IDF			24.5 43.4
Croatia	Men women	18–88 (996)	NCEP			34.0
UK	Women	60–79 (3589)	NCEP IDF WHO		29.8 47.5 20.9	
Netherlands	Men women	18–80 (1117)	NCEP			46
Greece	Men women	Adults (706)	NCEP	63.0	37.0	41.8

D'après : (Grundy, 2008)

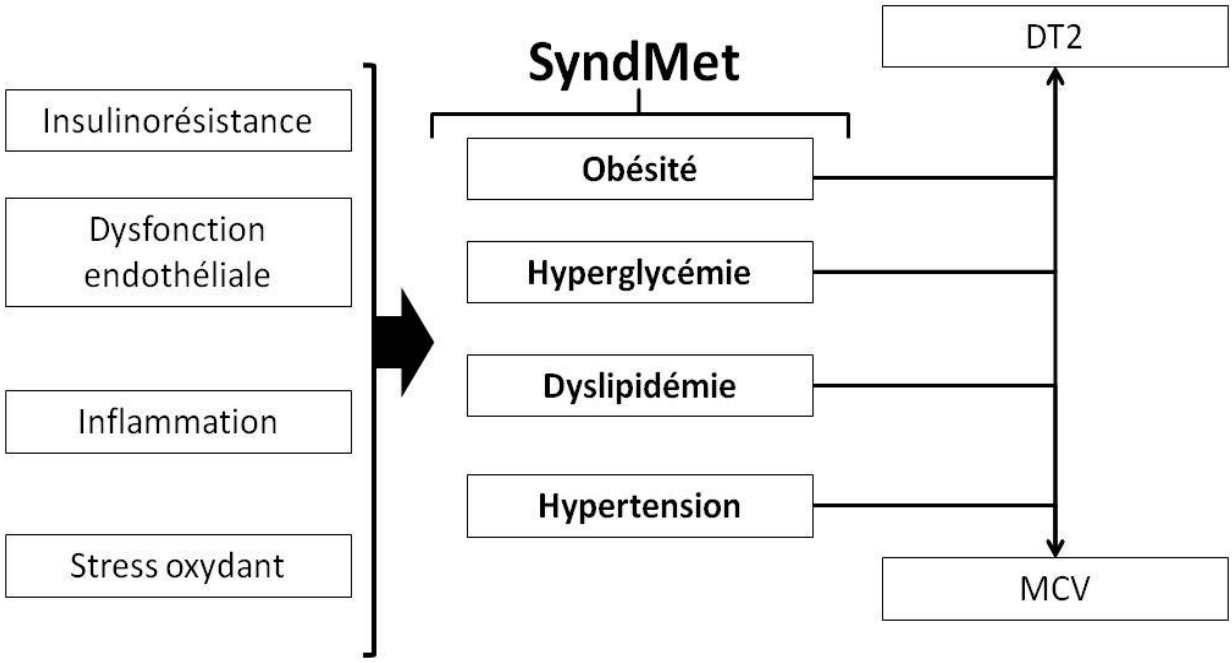


Figure 1 : Physiopathologie du syndrome métabolique.

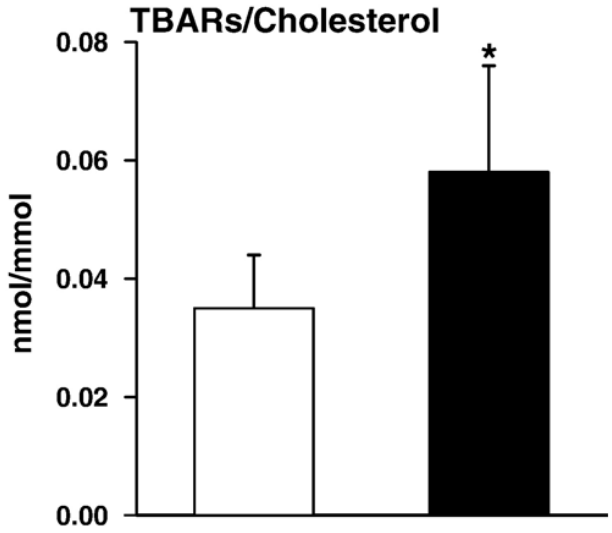


Figure 2 : Ratio plasmatique entre les TBARs (thiobarbituric acide active substances) et le cholestérol (facteur de correction) chez les individus sains (barre blanche) ou atteints de SyndMet (barre noire).
*P< 0,001
D'après : (Grattagliano et al., 2008)

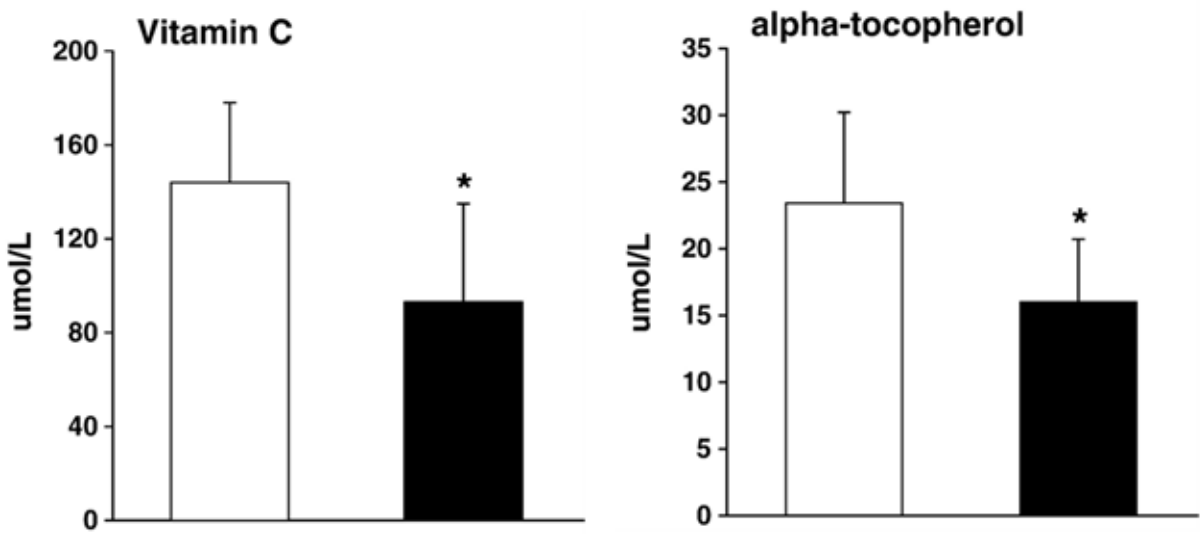


Figure 3 : Concentrations plasmatiques de vitamine C et E (alpha–tocophérol) chez les individus sains (barre blanche) ou atteints de SyndMet (barre noire).
*P< 0,001
D'après : (Grattagliano et al., 2008)

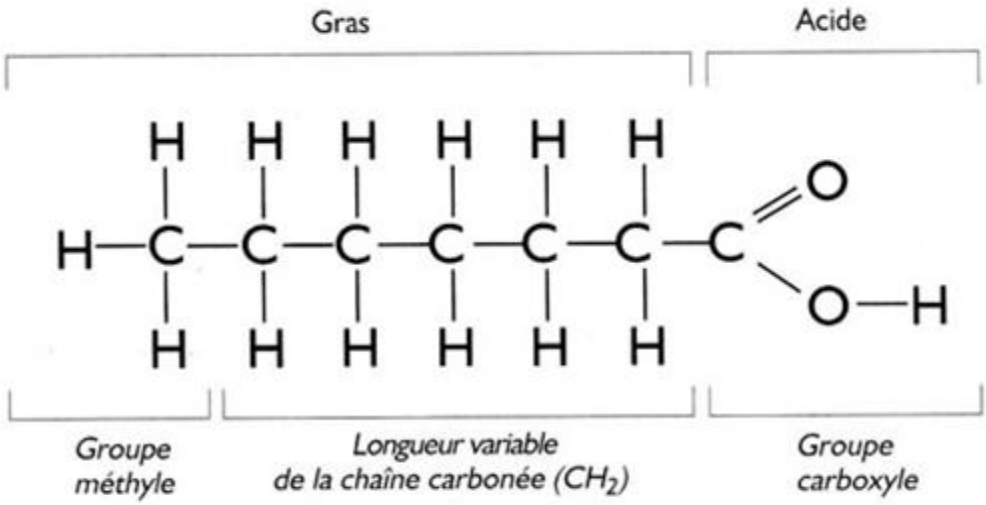


Figure 4 : Structure biochimique d'un acide gras saturé.

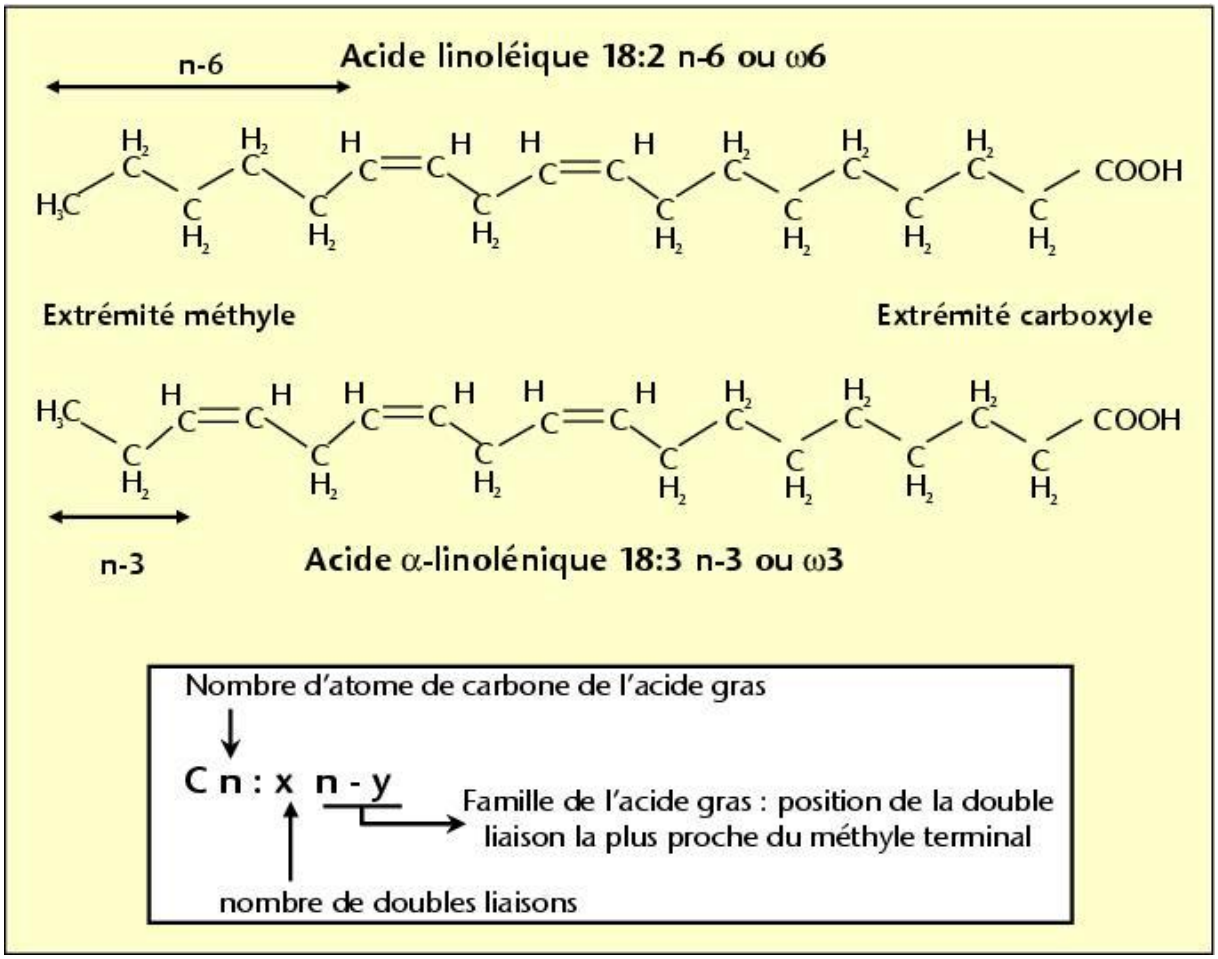
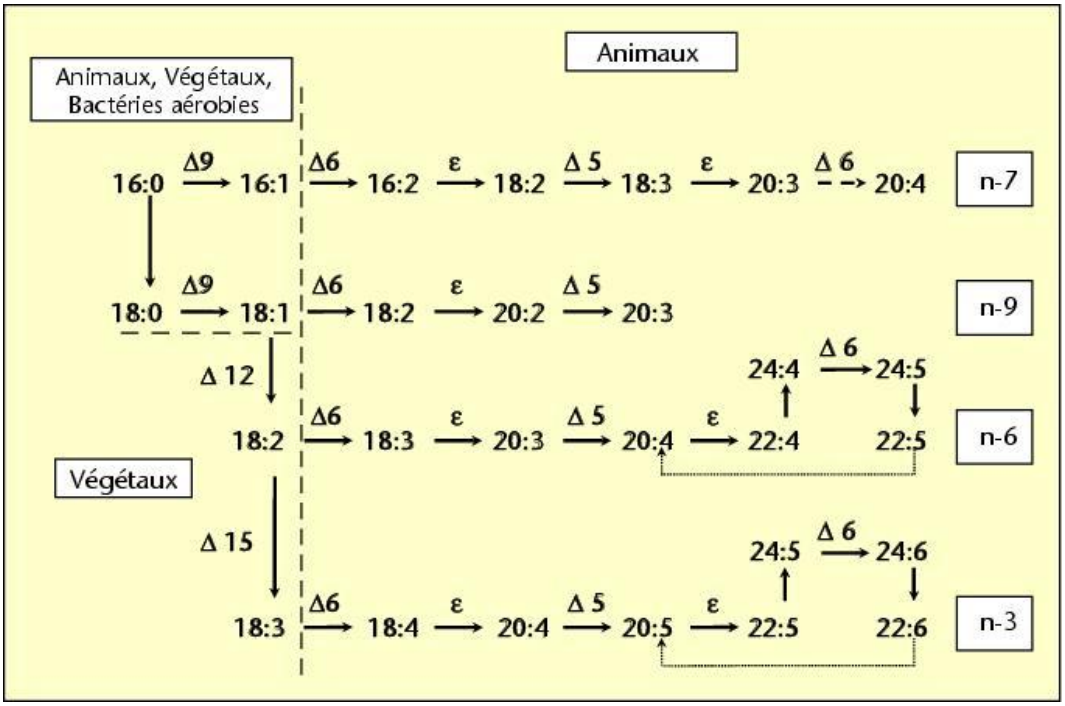


Figure 5 : Nomenclature des acides gras polyinsaturés**.**

D'après : (Legrand, 2004)



<u>Figure 6</u> : Capacités de conversion des acides gras dans les différents règnes et biosynthèse des acides gras insaturés.

Le symbole Δ indique une désaturation, avec la place de la double liaison introduite repérée à partir du groupe carboxyle COOH. Le symbole ε indique une élongation.

D'après : (Legrand, 2004)

Tableau 3 : Apport nutritionnel conseillé en lipides pour les adultes consommant 2000 Kcal (en % de l'apport énergétique journalier) ou en mg/j.

Lipides totaux		35-40
AG indispensables	Acide linoléique C18 :2 n-6	4
	Acide α-linolénique C18 :3 n-3	1
	Acide docosahexaénoïque DHA, C22 :6 n-3	250 mg
AG non indispensables	Acide eicosapentaénoïque EPA, C20 :5 n-3	250 mg
	Acide laurique (C12:0) + Acide myristique (C14:0) + Acide palmitique (C16:0)	≤ 8
	Acides gras saturés totaux	≤ 12
	Acide oléique C18 :1 n-9	15-20
	Autres AG non indispensables	–

D'après : (Afssa, 2010)

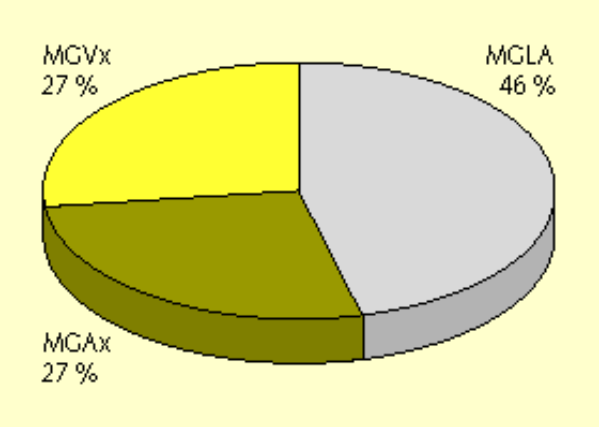


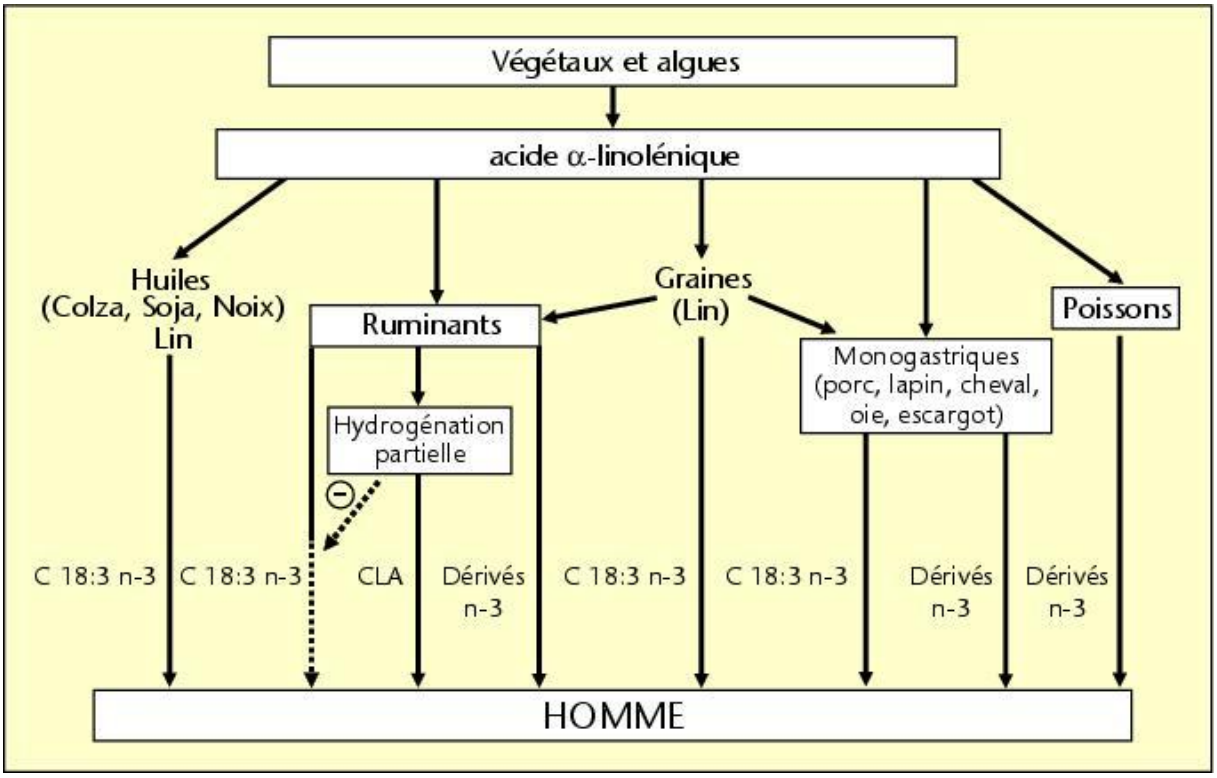
Figure 7 : Contribution (en %) des matières grasses d'origine laitière (MGLA), animale autre que laitière (MGAx) et végétale (MGVx) à l'apport quotidien en acide alpha-linolénique.

D'après : (Combe N, 2001)

Tableau 4 : ANC et Apports (liés à la consommation de poissons) en EPA et DHA (mg/j).

Age	ANC EPA	Apports en EPA	ANC DHA	Apports en DHA
3-10 ans	125	54	125	90
11-14 ans	250	68	250	110
15-17 ans	250	68	250	106
18-64 ans	250	114	250	169
65 ans et +	250	141	250	199

D'après : Etude INCA2 / données composition Calypso (Esther KALONJI)



<u>Figure 8</u> : Stratégies d'augmentation des apports nutritionnels en AGPI n-3 (précurseur et dérivés)

D'après:(Legrand, 2004)

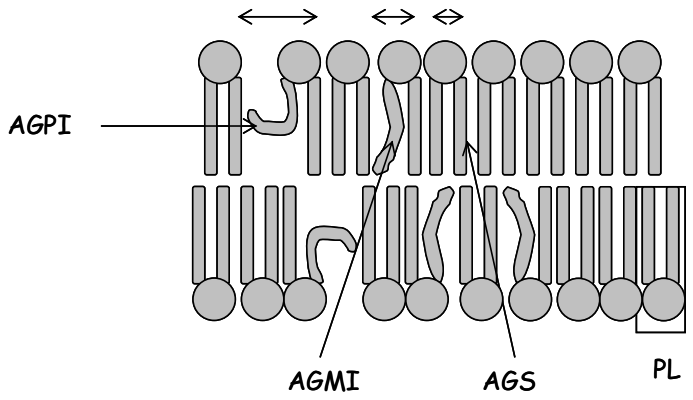


Figure 9 : Encombrement des différents types d'acides gras au sein des phospholipides membranaires.

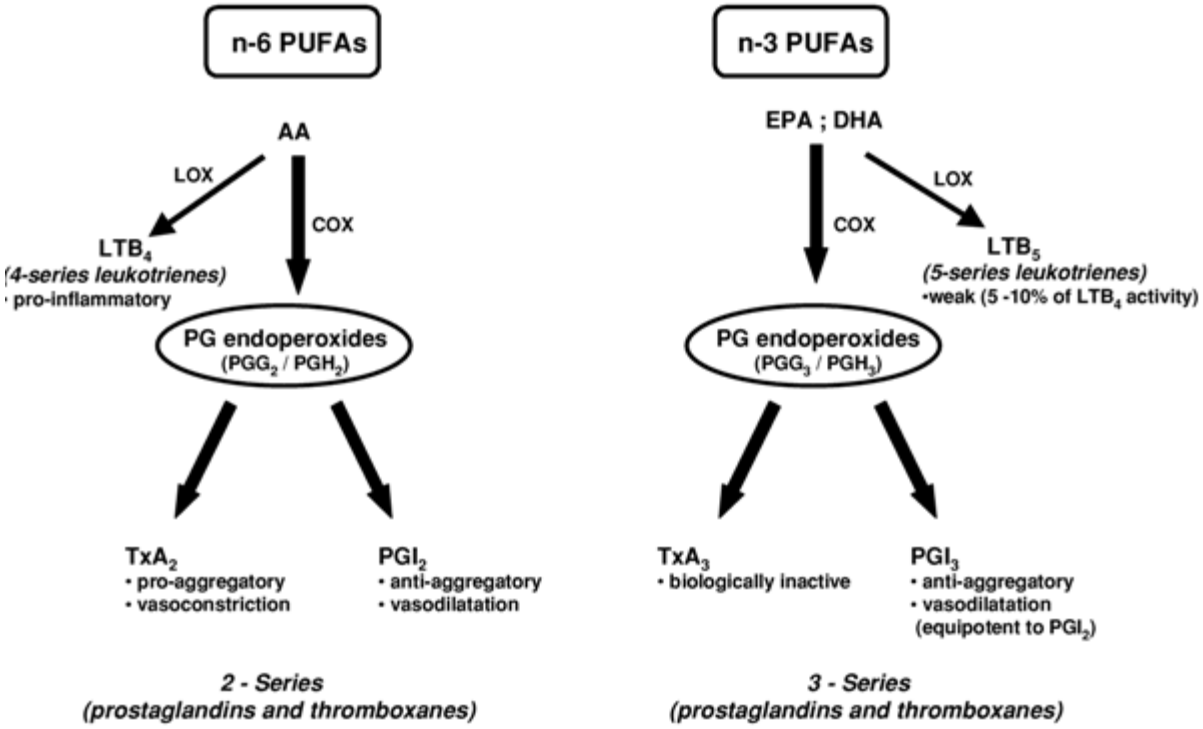


Figure 10 : Voies de synthèse des eicosanoïdes à partir les familles d'acides gras n-3 et n-6.

D'après : (Abeywardena & Head, 2001)

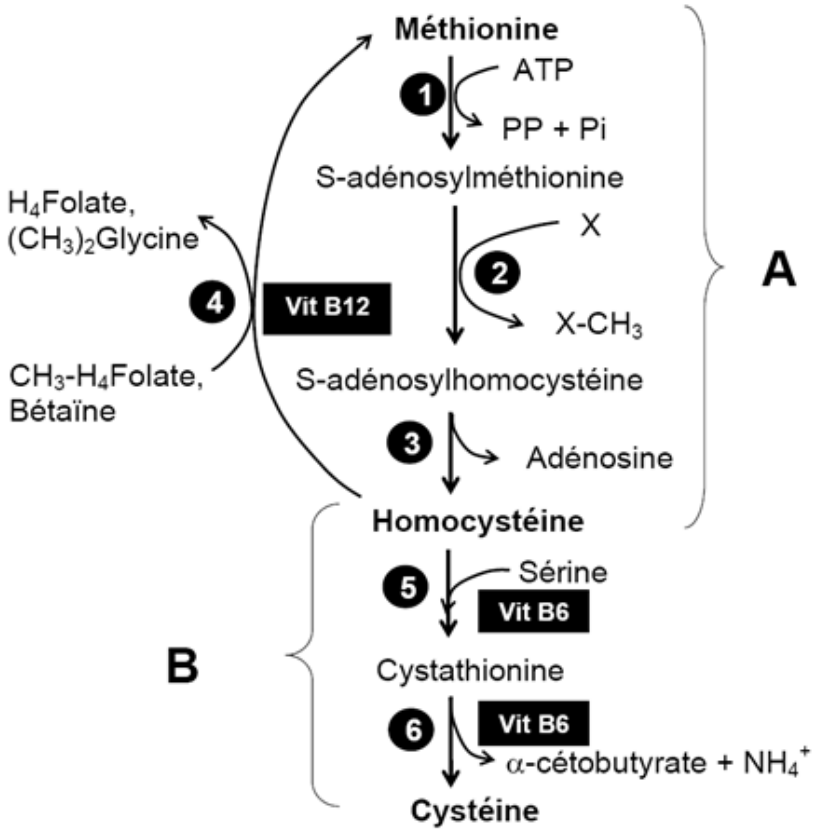


Figure 11 : Synthèse de la Cystéine.

A. Voie de transméthylation : 1-Methionine-adénosyle transférase, 2-Méthyltransférase, 3-adénosylhomocystéine hydrolase, 4-Méthionine synthase ou Bétaïne-homocystéine méthyltransférase **; B.** Voie de transulfuration : 5-Cystathionine-β-synthase, 6-Cystathionine-γ-lyase. ***D'après : (Huneau, 2008).***

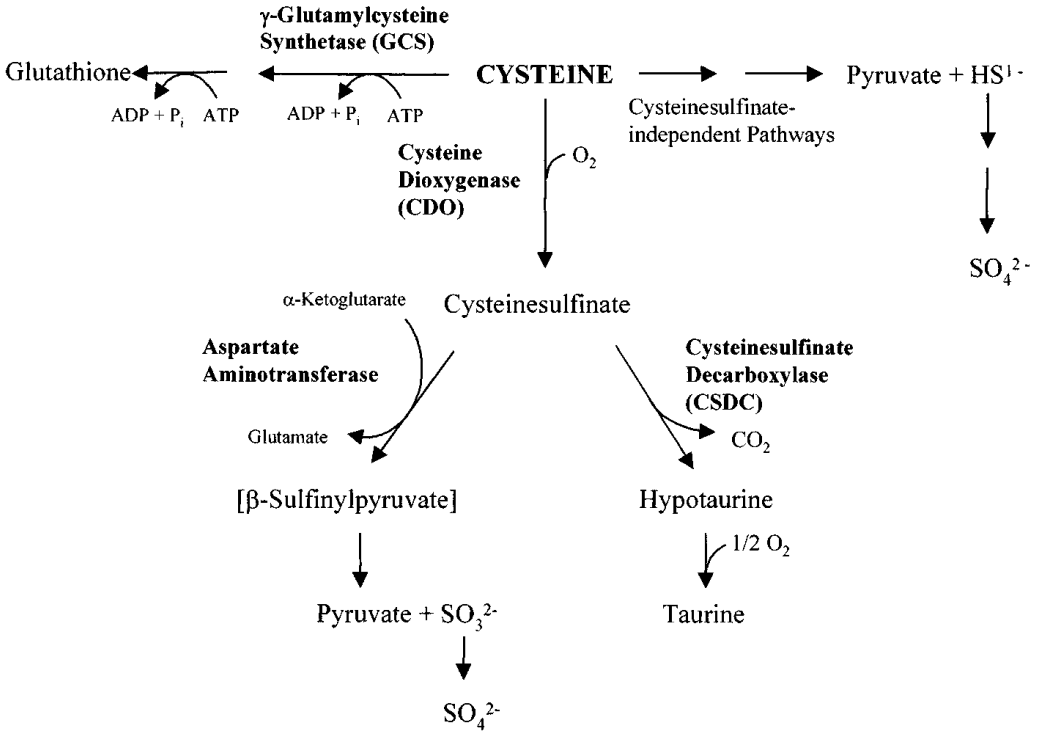
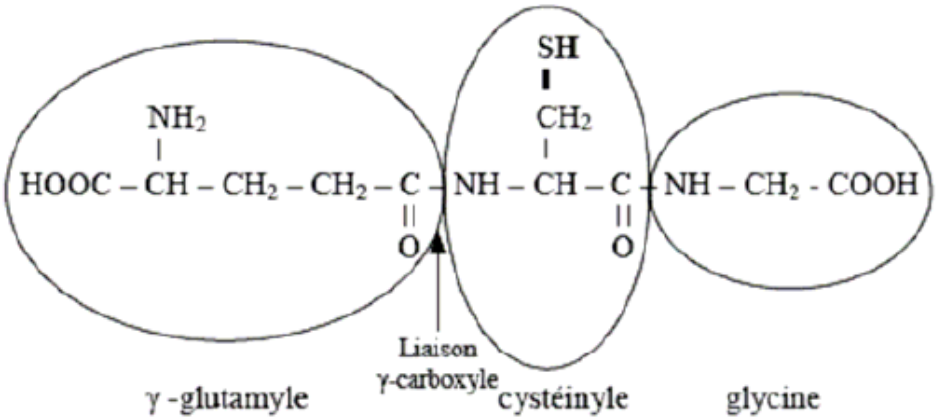


Figure 12 : Voies d'utilisation et homéostasie de la cystéine.



D'après (Bella et al., 1999).

Figure 13 : Structure biochimique du glutathion.

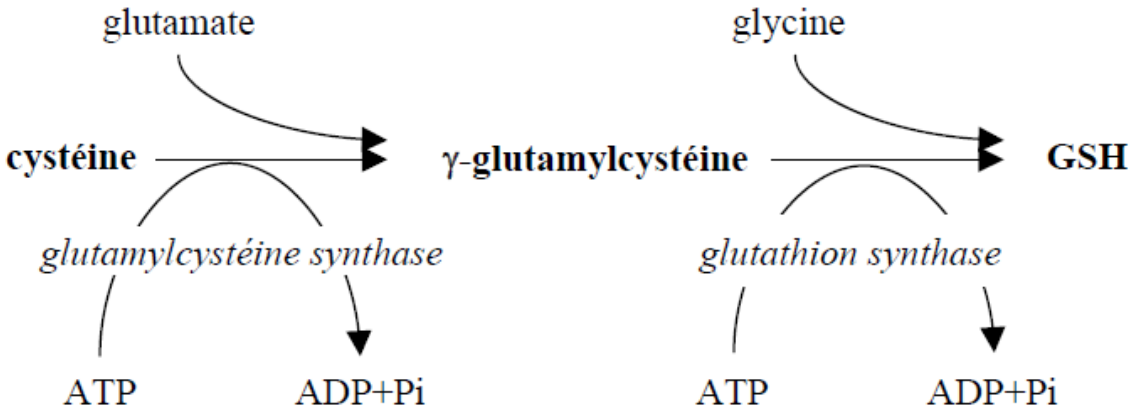


Figure 14 : Synthèse du glutathion.

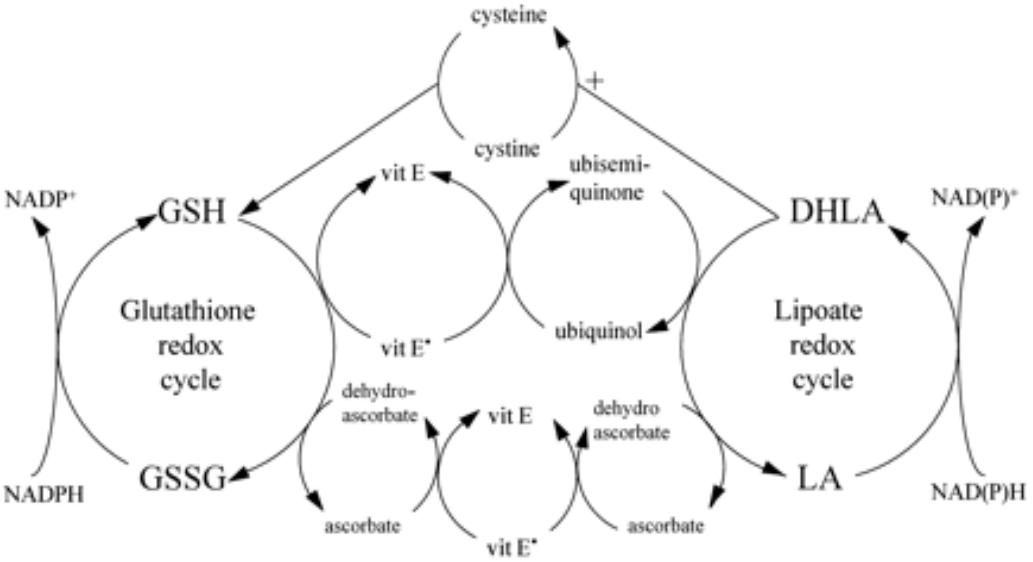


Figure 15 : Participation du couple redox du glutathion à la régénération de la forme réduite d'autres antioxydants.

LA : acide lipoïque

DHLA : acide dihydrolipoïque

D'après (Sen & Packer, 2000).

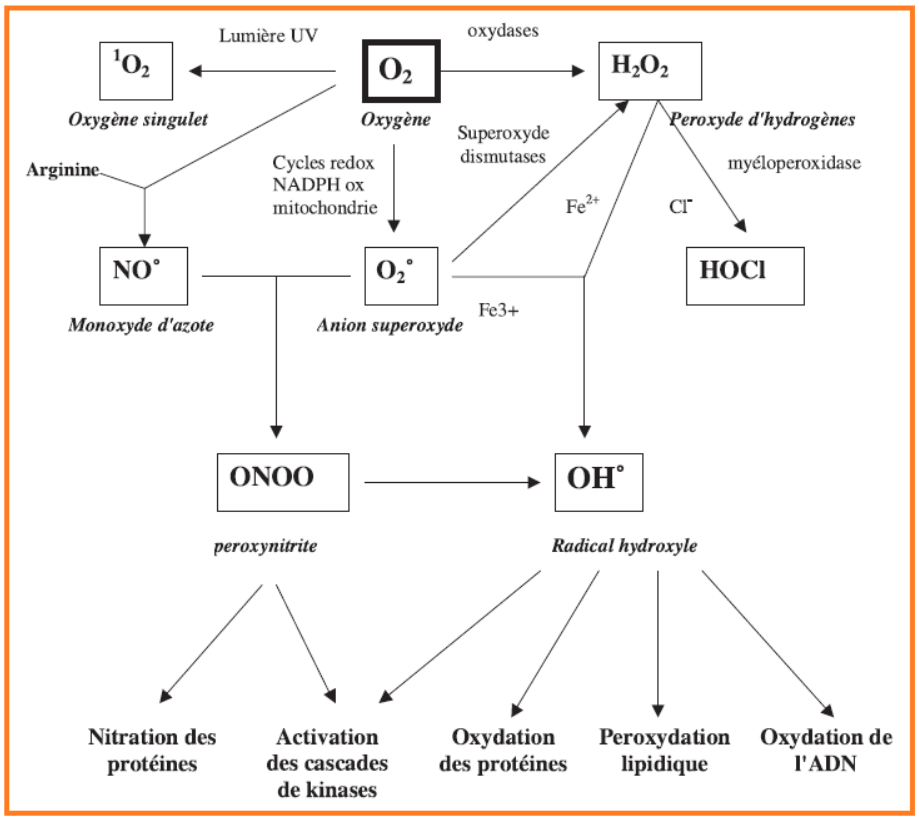
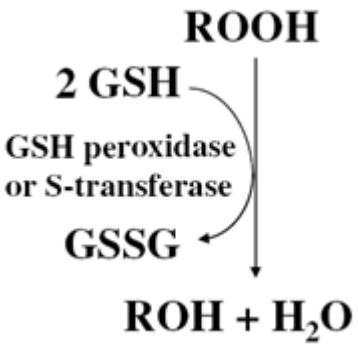


Figure 16 : Origines et effets des ROS

D'après Alain Favier, l'actualité chimique 2003

A



B

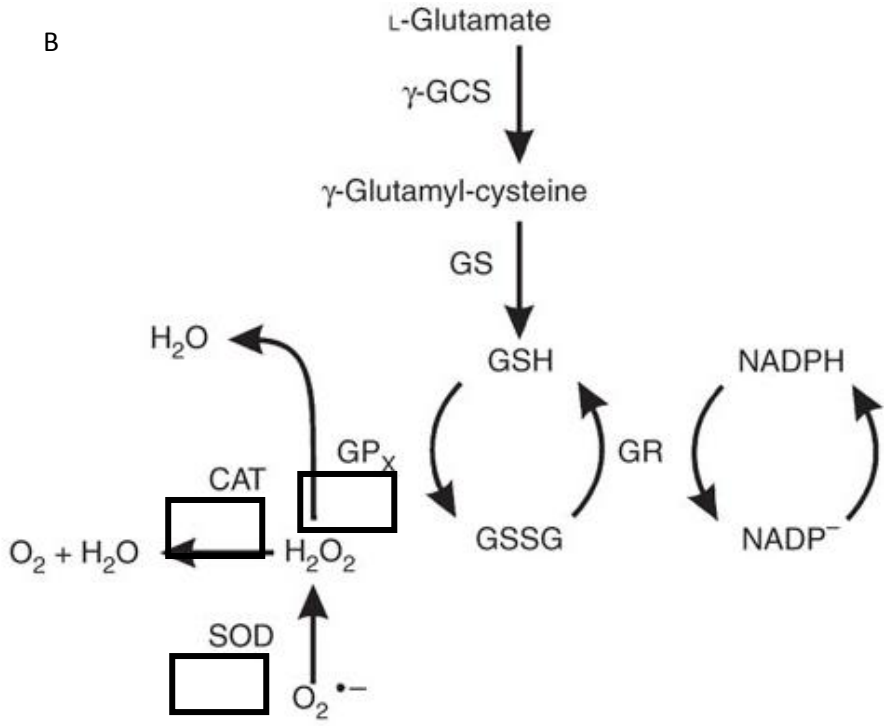


Figure 17 : Participation du glutathion aux défenses anti-oxydantes

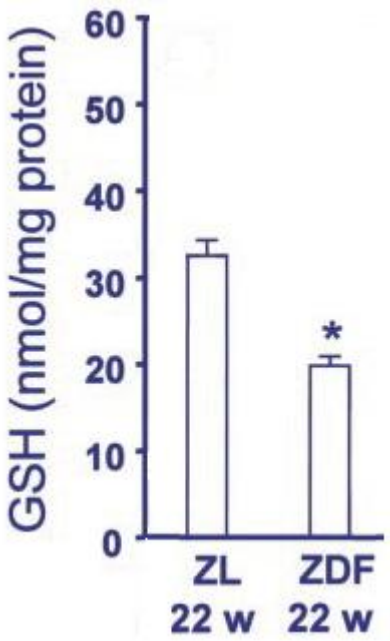


Figure 18 : Concentrations rénales en glutathion chez le rat Zucker maigre (Zucker lean (ZL)) et le rat Zucker diabétique obèse (Zucker diabetic fat (ZDF)) à 22 semaines d'âge.

*$P < 0.05$ *vs* ZL 22 w.

Modifié d'après : (Chander et al., 2004).

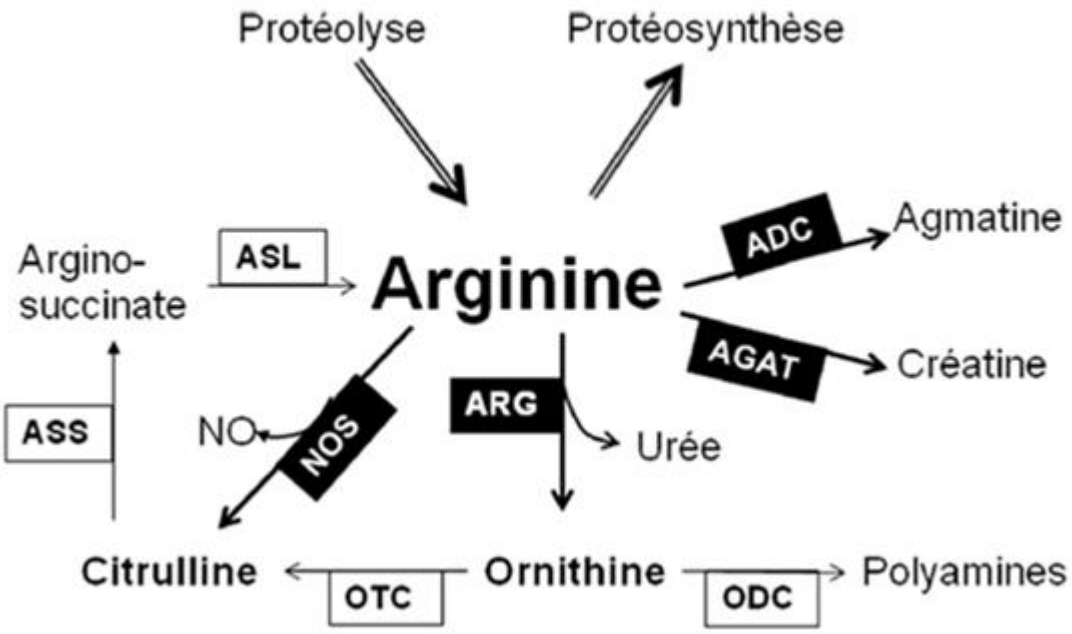


Figure 19 : Voies de synthèse et d'utilisation de l'arginine.

ADC : arginine decarboxylase ; AGAT : arginine:glycine amidinotransferase; ARG : arginase; ASL : argininosuccinate lyase; ASS : argininosuccinate synthetase; ODC : ornithine decarboxylase; OTC : ornithine transcarbamylase)

D'après (Morris, 2004).

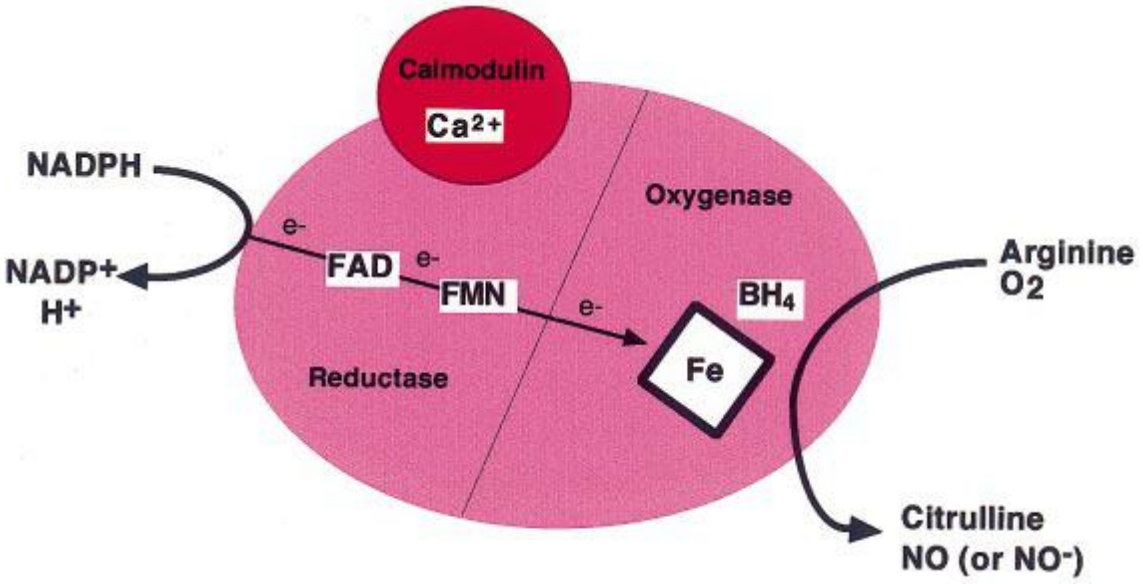


Figure 20 : cofacteur, substrat et produit de la NOS.

D'après (Alderton et al., 2001).

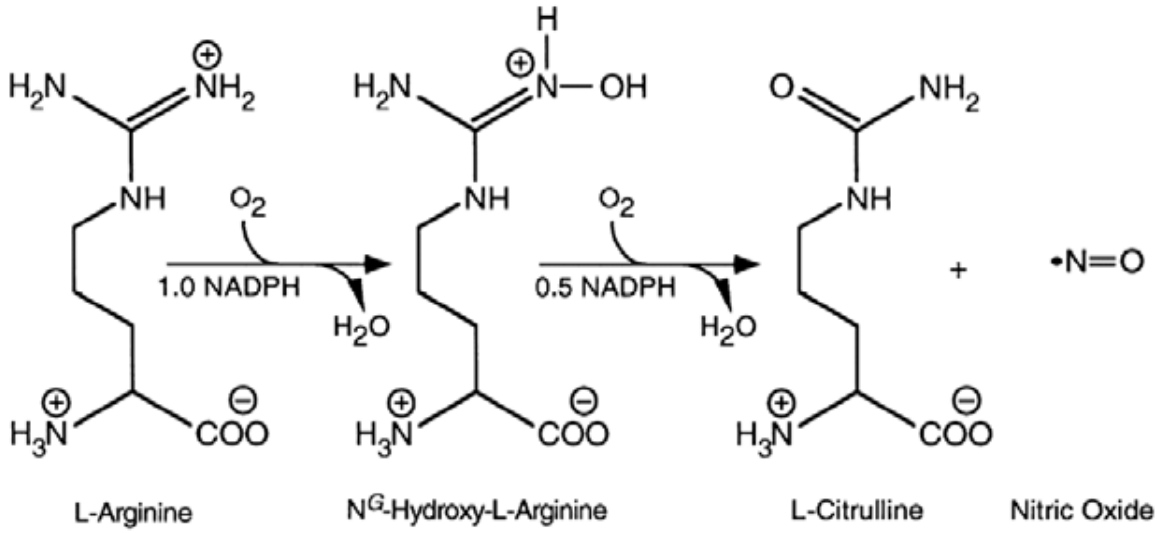


Figure 21 : Réaction catalysée par la NOS.

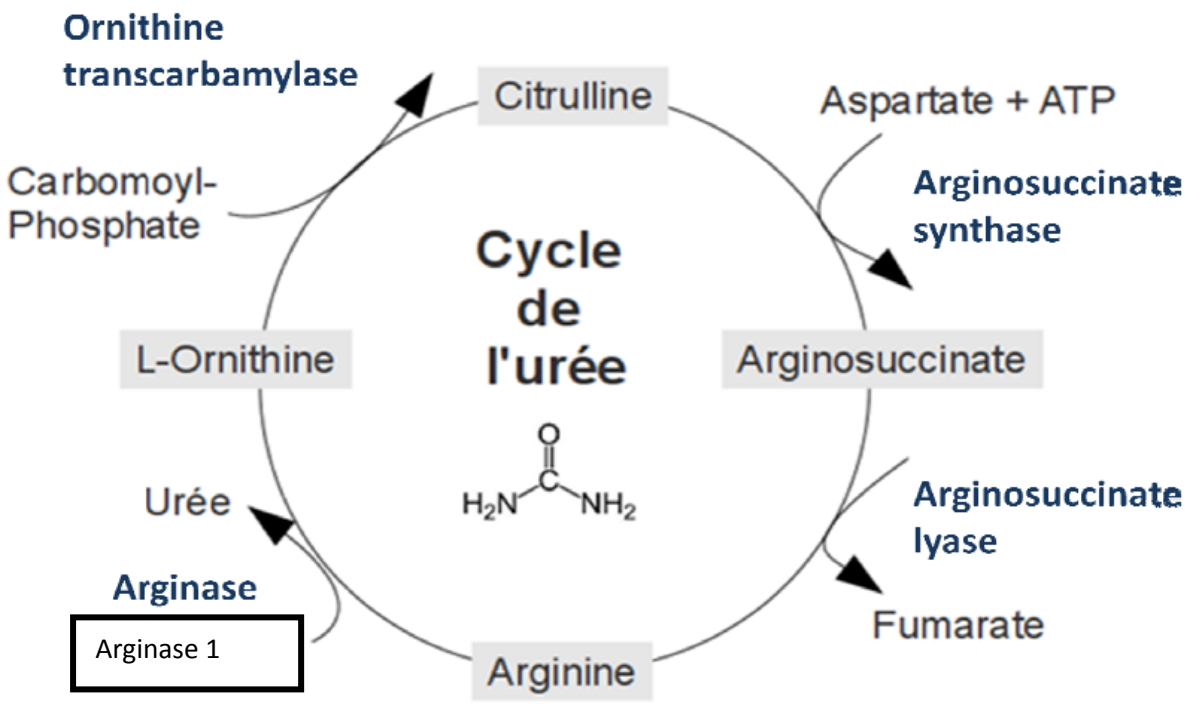


Figure 22 : Cycle de l'urée.

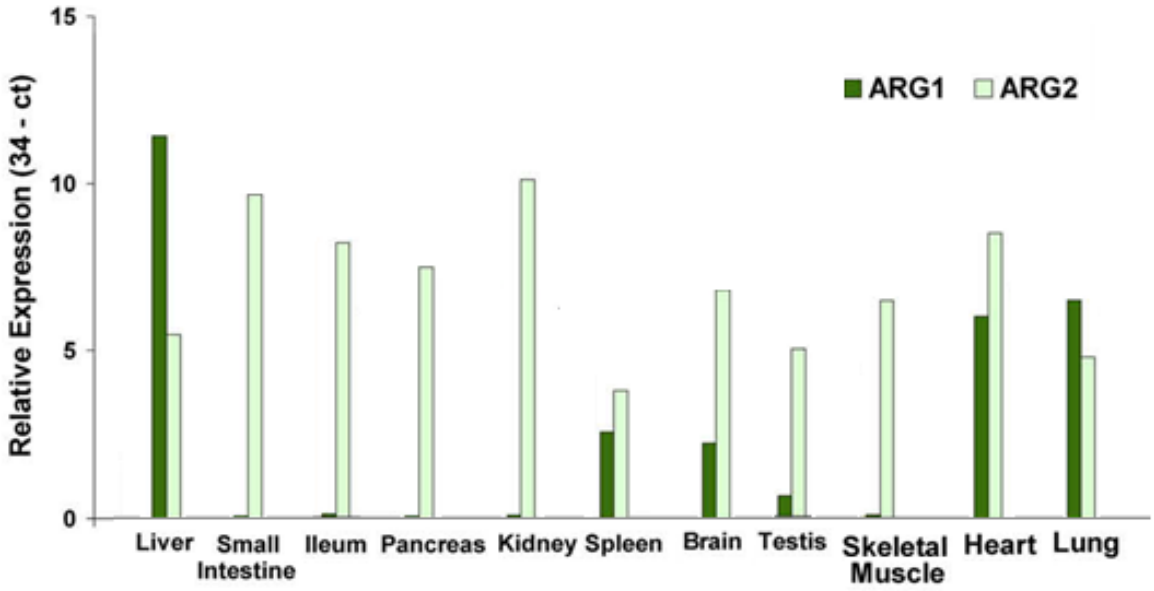


Figure 23 : Expression des arginases 1 et 2 dans les tissus humains.

Modifié d'après (Neill et al., 2009).

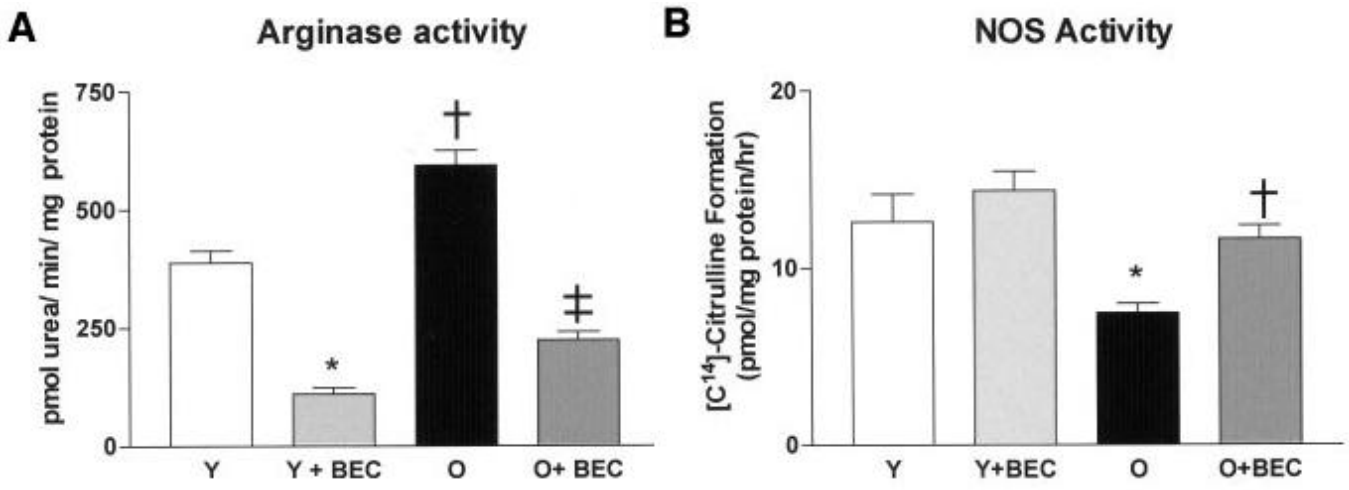


Figure 24 : Effet de l'âge et/ou de l'inhibition de l'arginase sur les activités aortiques de l'arginase et de la NOS chez le rat jeune et âgé.

Y, young ; O, old ; Inhibiteur de l'arginase :(BEC) (S)-(2-boronoethyl)-L-Cysteine-HCl. **P*<0.01, O vs Y; †*P*<0.01, O vs O+BEC

D'après (Berkowitz et al., 2003).

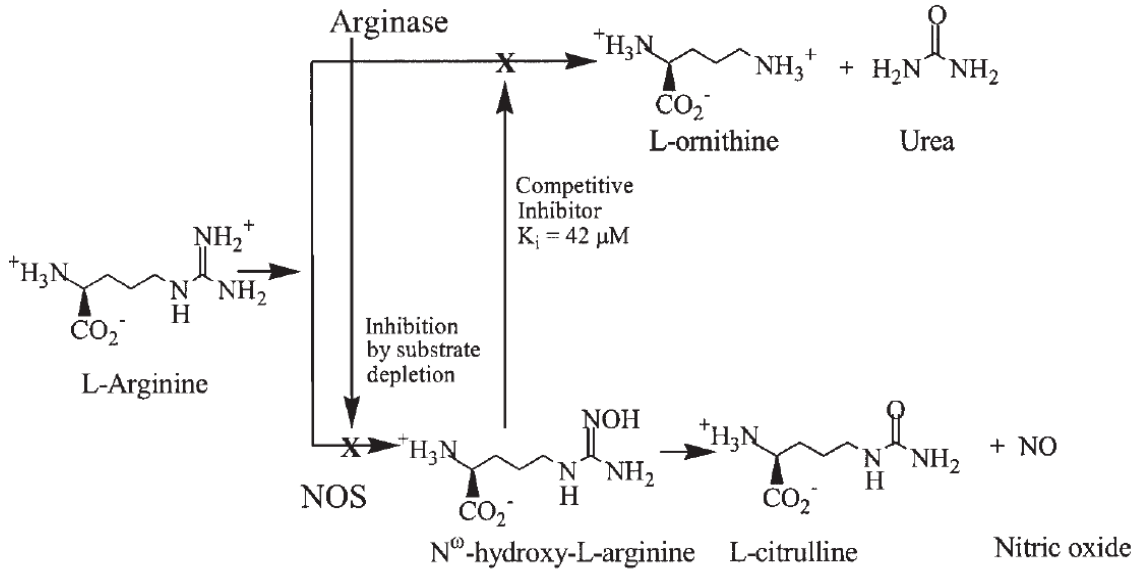


Figure 25 : Compétition entre l'arginase et la NOS.

D'après (Ash, 2004).

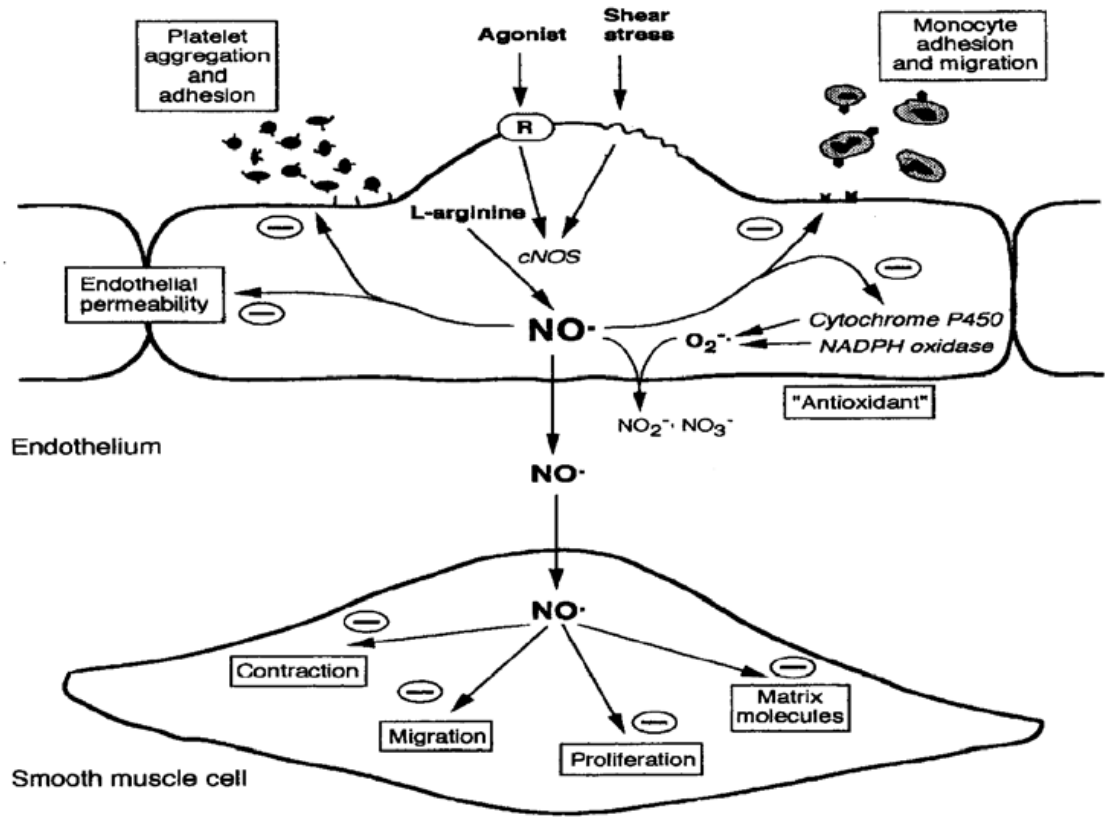
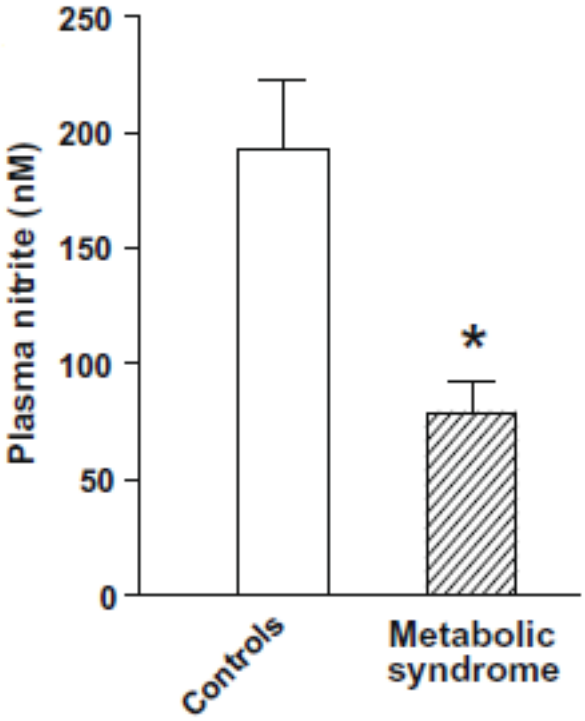


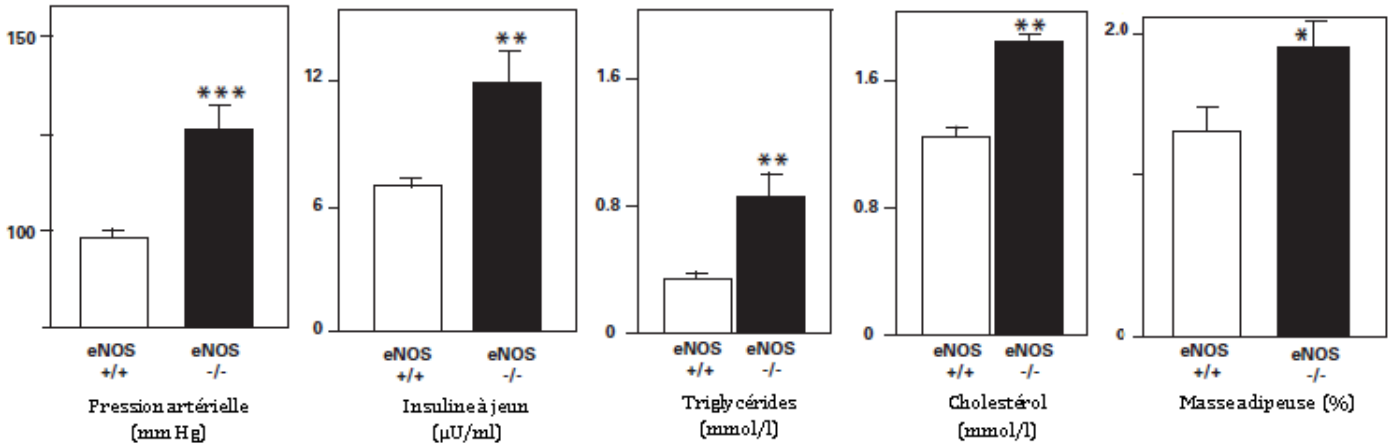
Figure 26 : Rôles du NO au niveau de l'endothélium et du muscle squelettique



<u>Figure 27</u> : Concentration de nitrites plasmatiques chez les individus sains (controls) ou atteints de SyndMet (Metabolic syndrome).

*P < 0,05.

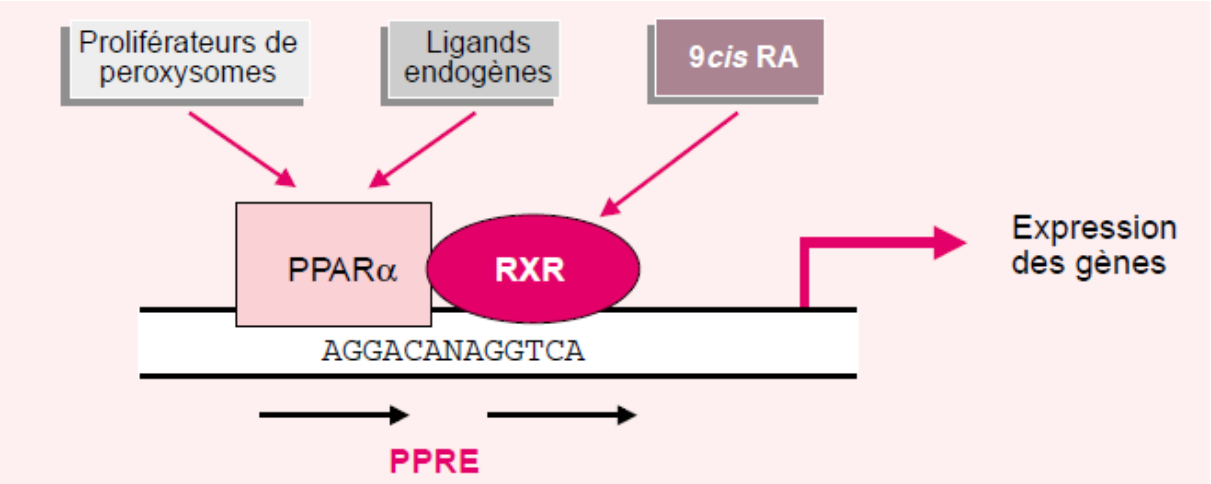
Modifié d'après : (Gomes et al., 2008)



<u>Figure 28</u> : Effet de l'invalidation du gène de la eNOs chez la souris sur les composantes du SyndMet.

*P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001.

Modifié d'après (Cook et al., 2003).



RA : acide rétinoïque.

Figure 29 : Mode d'activation des PPARs.

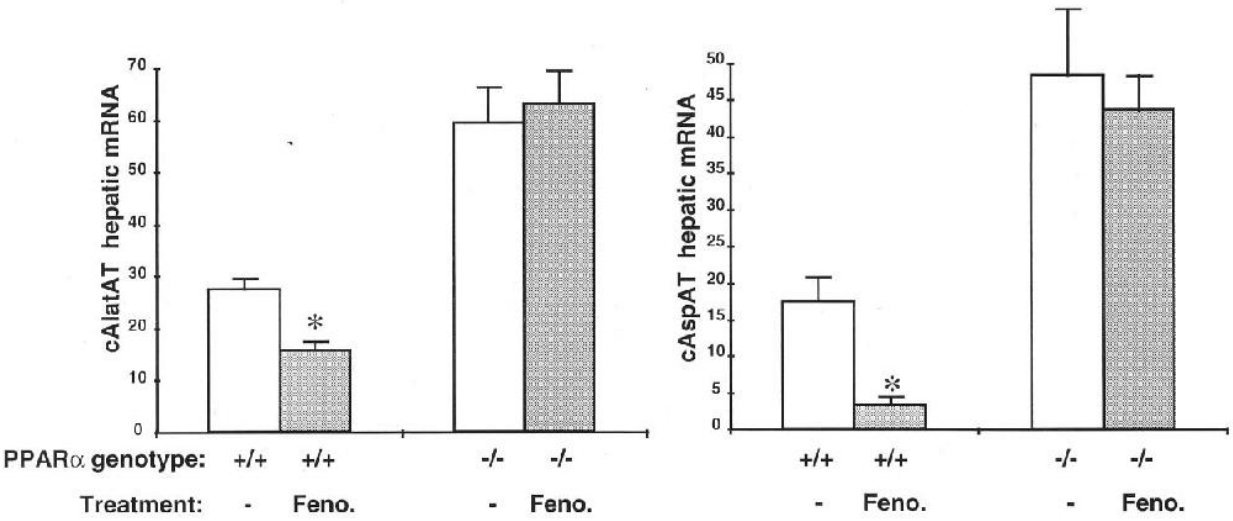


Figure 30 : Effet du fénofibrate sur les niveaux d'expression hépatique de l'ALAT et de l'ASAT chez des souris déficientes en PPARα ou témoins.

* effet genotype ($P < 0.01$) vs control.

D'après (Edgar et al., 1998).

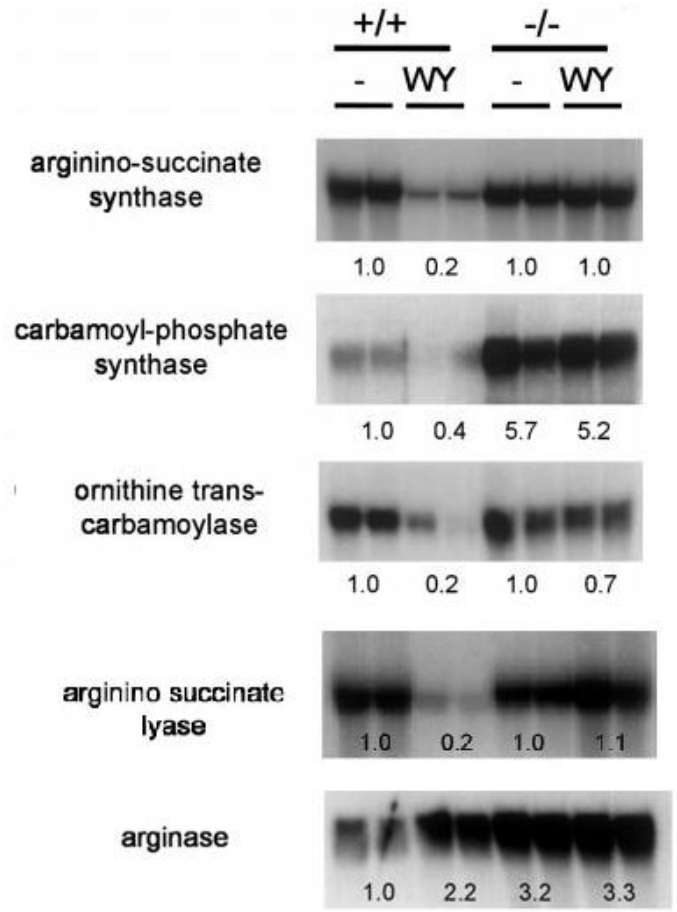


Figure 31 : Niveaux d'expression hépatique (Northern Blot) des enzymes du cycle de l'urée chez des souris déficientes en PPARα ou témoins suite à l'administration de WY14643. Les chiffres indiquent la différence l'amplitude d'expression par rapport aux souris de type sauvage non trraitées au WY14643.

Modifié d'après (Kersten et al., 2001)

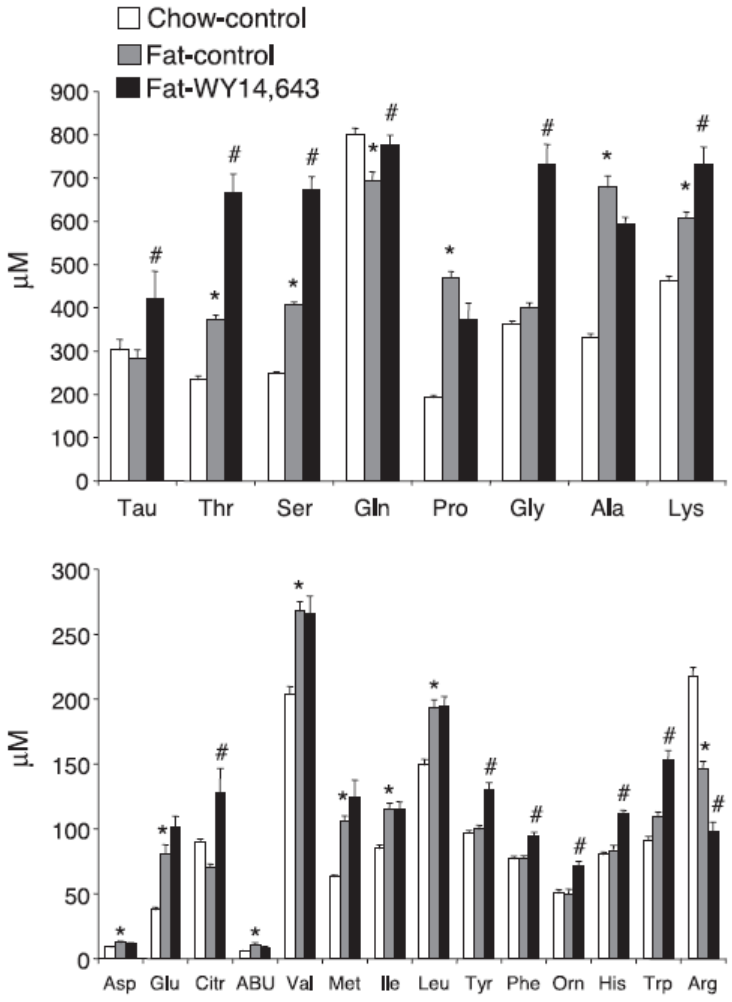


Figure 32 : Concentrations plasmatiques des acides aminés(µmol/l) chez les rats ayant reçu un régime témoin (chow control), hyperlipidique (fat-control) ou hyperlipidique aved du WY14643 (fat- WY14643)
*P < 0.05 vs control ; #P < 0.05 vs. fat control.
D'aprés (Sheikh et al., 2007)

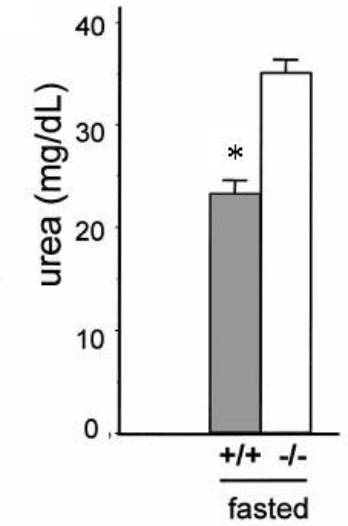


Figure 33 : Effet de l'invalidation du PPARα sur l'urémie à jeun chez la souris. Souris invalisées (barre blache) , souris de type sauvage (barre grise).
* effet genotype (P < 0,01). ***Modifié daprés :(Kersten et al., 2001).***

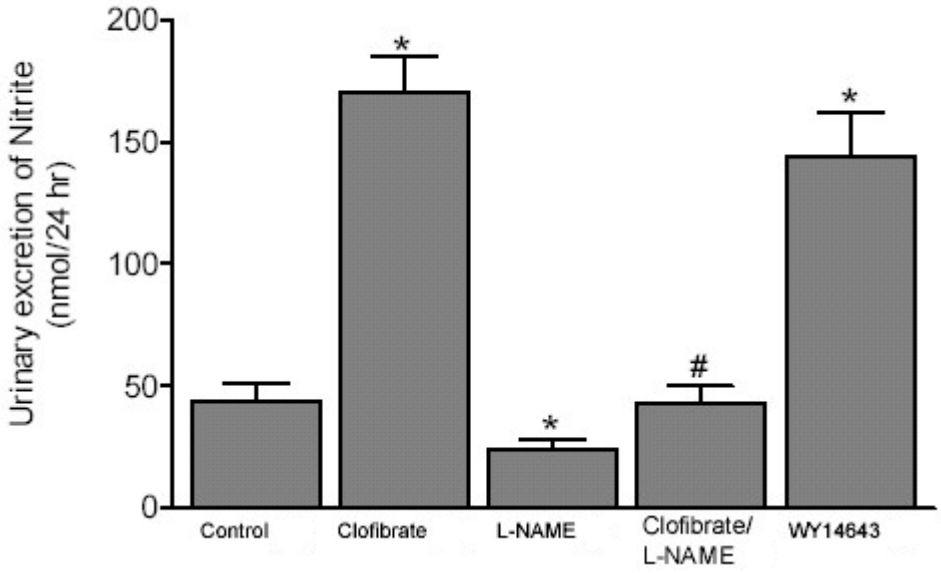


Figure 34 : Excrétion des nitrites urinaires (24h) chez le rat après 7 jours de traitement par un véhicule *(control)*, du clofibrate *(Clofibrate; 250 mg/kg; i.p.)*, du L-NAME *(L-NAME; 100 mg/kg; p.o.)*, du WY14643 *(WY14643; 45 mg/kg; i.p.)*, ou du clofibrate et L-NAME *(Clofibrate/L-NAME).*
* $p < 0.05$ vs Control, # $p < 0.05$ vs Clofibrate.
Modifié d'après (Newaz et al., 2004).

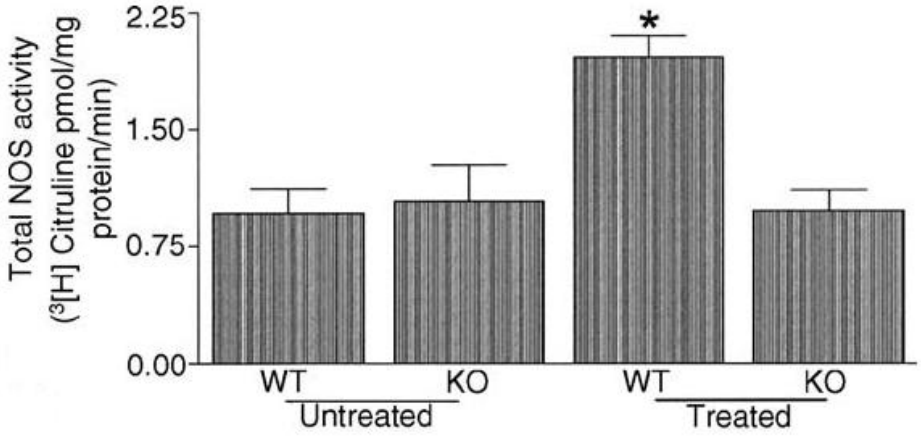


Figure 35 : Effet du clofibrate sur l'activité NOS rénale, chez des souris de type sauvages (WT) ou invalidées pour PPARα (KO).
* $p < 0.05$ vs. WT non traités.
D'après (Newaz et al., 2005)

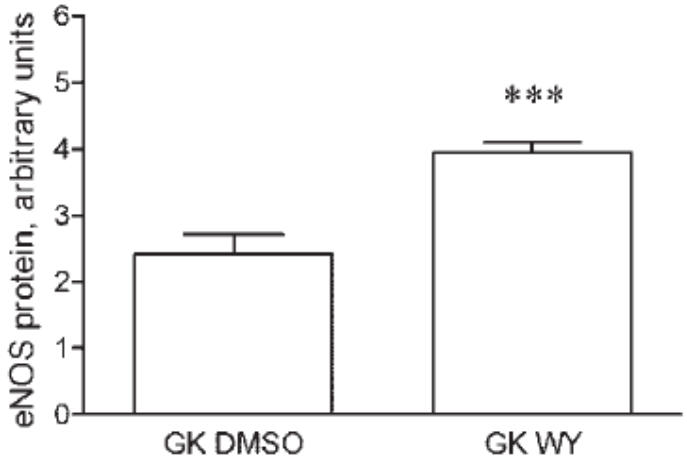


Figure 36 : Taux protéique cardiaque de la eNOS chez des rats diabétique (GK) aprés administration de DMSO ou de ligands de PPARα.
*** p < 0,001.
D'après (Bulhak et al., 2009).

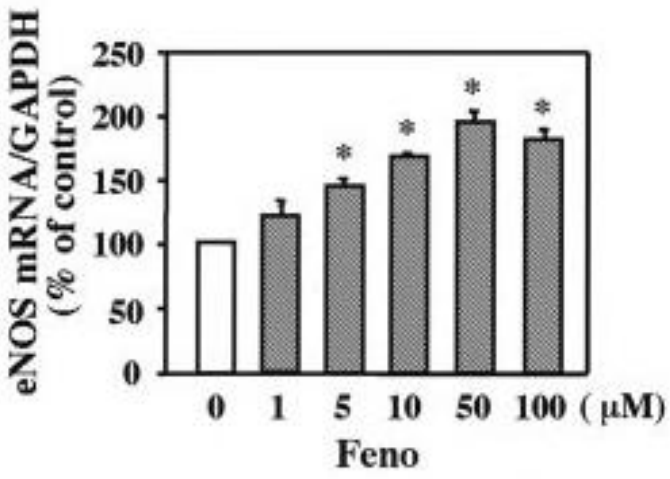


Figure 37 : Effet de doses croissantes de Fenofibrate sur l'expression de la eNOS dans des cellules BAEC, en % du control non traité. * P<0.0001 vs control.
D'après (Goya et al., 2004).

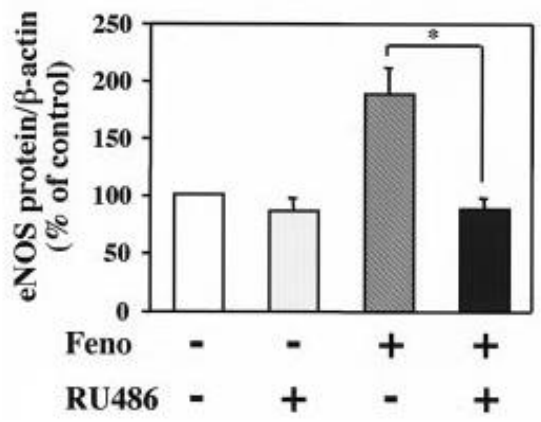


Figure 38 : Taux protéique de l'eNOs dans des cellules BAEC après traitement pendant 48h avec 50µmol/l de Fenofibrate et 10µmol/l de RU486.
**P*<0.0001 vs fenofibrate seul.
D'après (Goya et al., 2004).

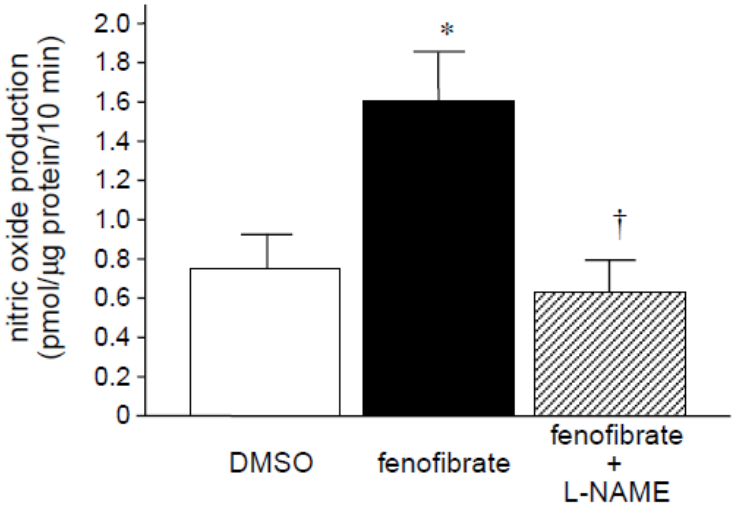


Figure 39 : Production de NO par les celulles HUVEC en culture après traitement par du DMSO (témoin), du Fenofibrate , ou du Fenofibrate + L-NAME
*p < 0.05 vs. DMSO, † p < 0.05 vs. Fenofibrate.
D'après (Murakami et al., 2006).

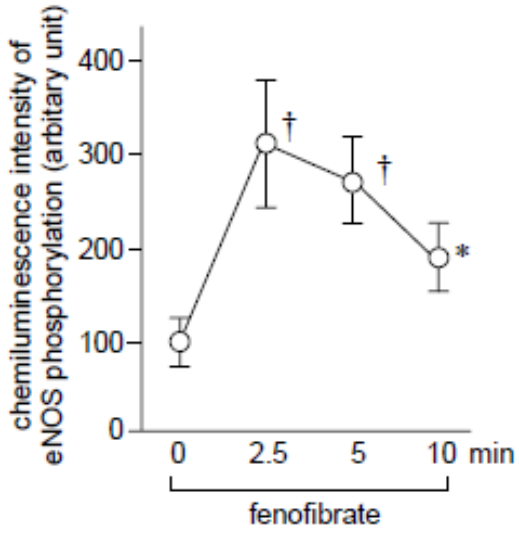


Figure 40 : Effet du traitement des HUVEC par le Fenofibrate sur la cinétique de phosphorylation de la eNOS.
*p < 0,05 vs. DMSO, † p < 0,05 vs. Fenofibrate.
D'après (Murakami et al., 2006).

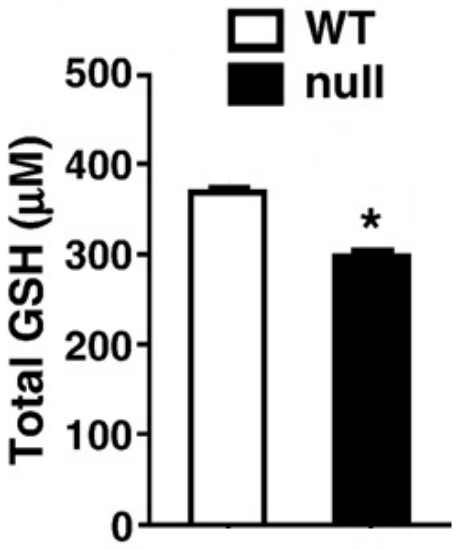


Figure 41 : Concentration hépatique de glutathion total chez la souris de type sauvage ou invalidée pour PPARα. Souris invalisées (barre noire) , souris de type sauvage (barre blanche).
* P<0,05 .
D'après (Abdelmegeed et al., 2009)

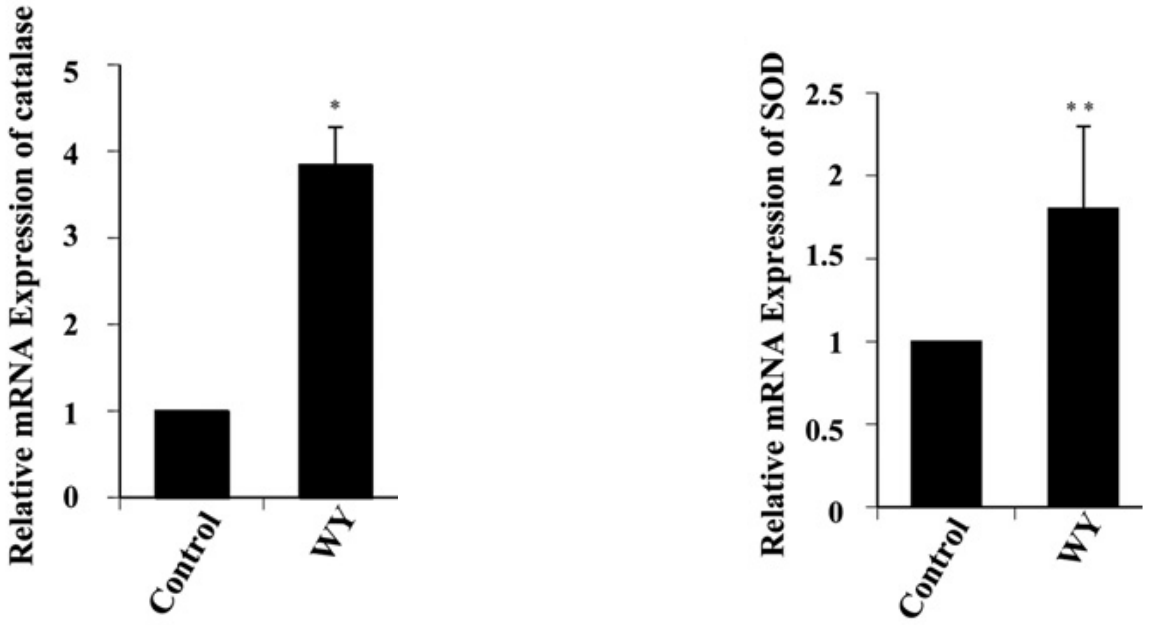


Figure 42 : Expression hépatique de la CAT et de la SOD chez le rat traité au WY 14643 (0.1% du poids de l'alimentation pendant 6 semaines).
* P<0,0001.
Modifié d'après (Toyama et al., 2004).

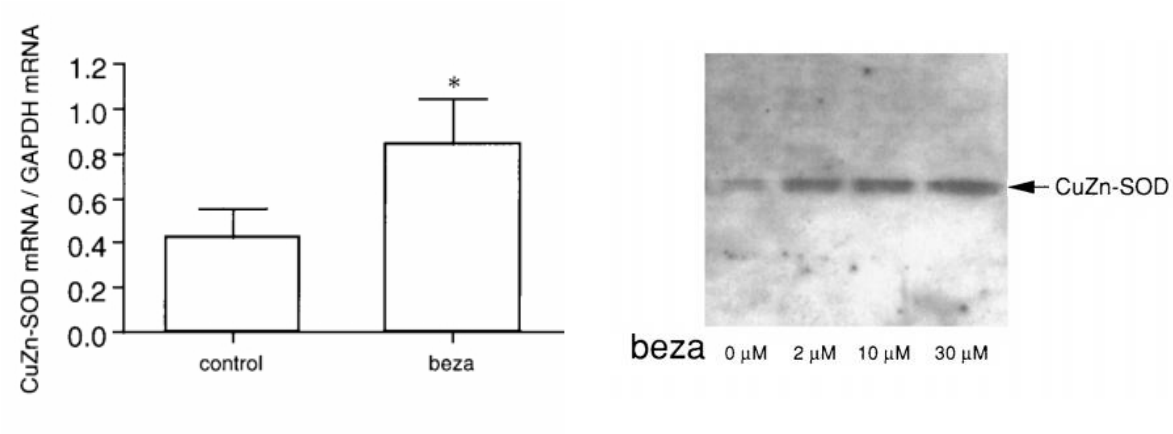


Figure 43 : Effet du traitement de cellules HUVEC par le bézafibrate sur l'expression (PCR) et le taux protéique (western blot) de la SOD1.
D'après (Inoue et al., 2001)

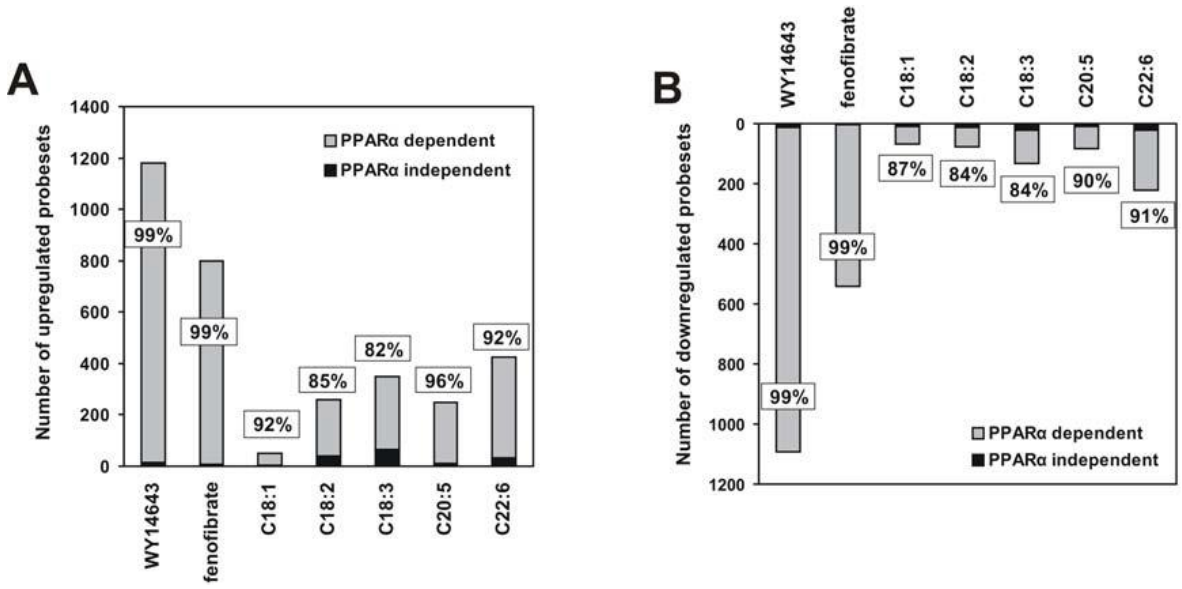


Figure 44 : Régulation de l'expression des gènes hépatiques par les AGPI alimentaires dépendante et indépendante du PPARα. Le pourcentage indiqué représente la proportion de la régulation PPARα dépendante.

D'après (Sanderson et al., 2008).

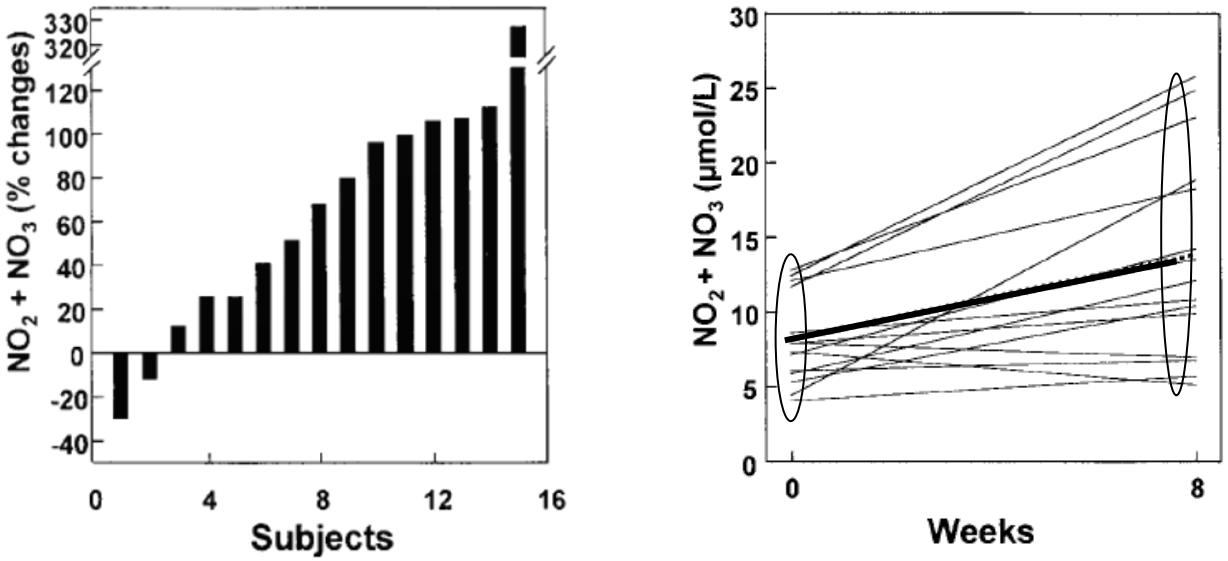


Figure 45 : Variations individuelles des concentrations plasmatiques de NOx (nitrates + nitrites) avant (0) et après 8 semaines de complémentation avec de l'huile de poisson chez l'homme sain. A gauche, en % de la valeur initiale et à droite, en valeur absolue.

D'après (Piolot et al., 2003)

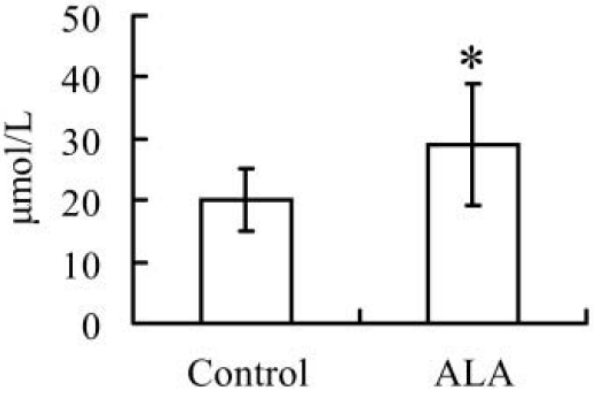


Figure 46 : Concentrations plasmatiques de NOx chez les rats hypertendus ayant reçu de l'ALA ou de l'huile de tournesol « control ».

*P<0,05. ***D'après (Sekine et al., 2007).***

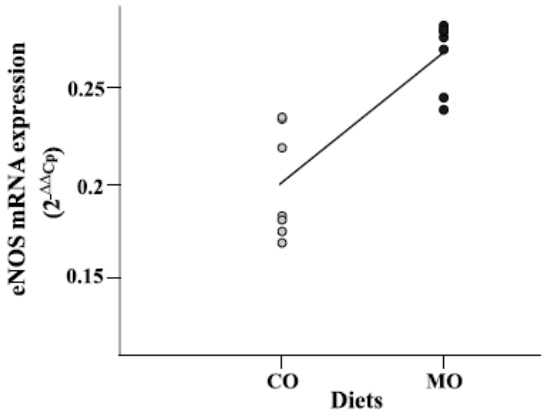


Figure 47 : Expression relative du gène de la eNOS dans les segments aortiques de rats ayant reçu un régime riche en huile de maïs (CO) ou de menhaden (MO).
D'après (Lopez et al., 2004)

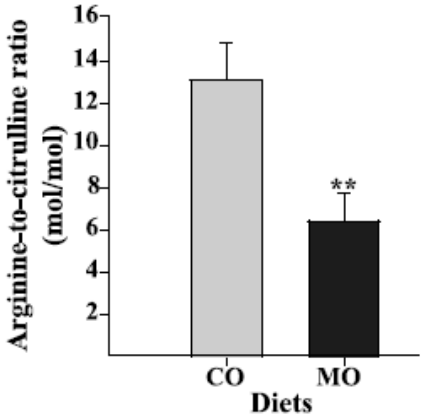


Figure 48 : Rapport des concentrations arginine /citrulline contenues dans l'homogénat de segments aortiques de rats ayant reçu un régime riche en huile de maïs (CO) ou de menhaden (MO). ***P* < 0, 01. ***D'après (Lopez et al., 2004)***

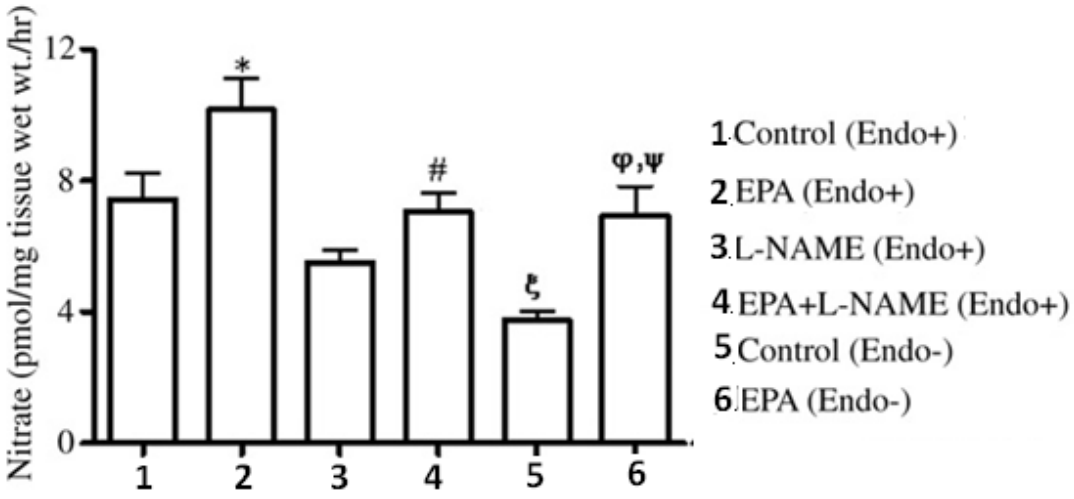


Figure 49 : Effet de l'EPA (30 μM) seul ou en combinaison avec du L-NAME (100 μM) ou avec une délétion de l'endothélium sur la production de nitrates par les anneaux d'artères de mouton. * P<0,05 pat comparaison au témoin (Endo+), # P<0,05 par comparaison au contrôle EPA (Endo+), ξ P<0.05 par comparaison au contrôle L-NAME (Endo+), φ P< 0,05 par comparaison au contrôle (Endo−) et ψ P<0.05 par comparaison à l'EPA (Endo+).

D'après (Singh et al., 2010).

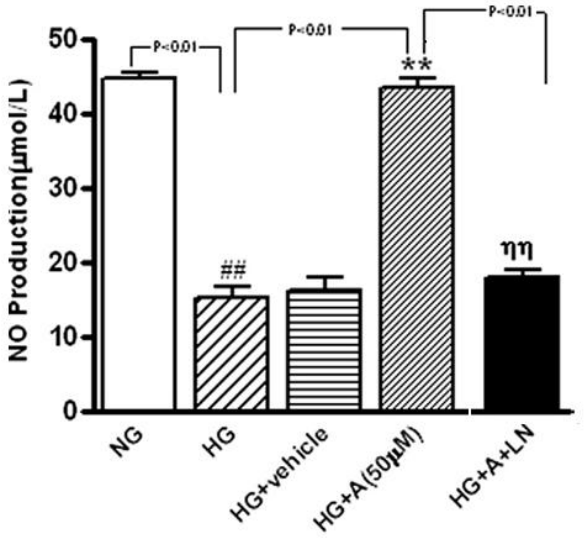


Figure 50 : Concentration de NO dans les celulles HUVEC exposées : **NG,** condition normo-glucosée (5.5 mmol/L), **HG**, condition hyper glucosée (33 mmol/L); et traitées par : **A**, ALA ; **LN**, NG-nitro-arginine methyl ester.
##P<0,01 vs NG; **P <0,01 vs HG .
Modifié d'après (Zhang *et al.*, 2007).

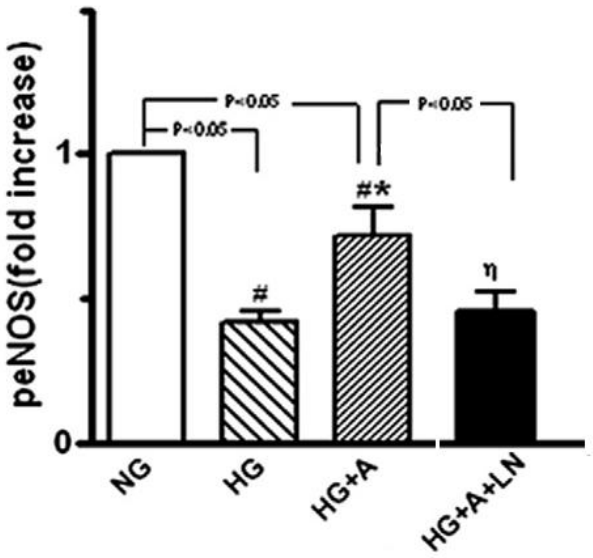


Figure 51 : Phosphorylation de la eNOS dans les celulles HUVEC exposées : **NG,** condition normo-glucosée (5.5 mmol/L), **HG**, condition hyper glucosée (33 mmol/L); et traitées par : **A**, ALA ; **LN**, NG-nitro-arginine methyl ester.
##P<0,01 vs NG; **P <0,01 vs HG
#P<0,01 vs NG; *P <0,01 vs HG; P<0,05 vs HG+A
Modifié d'après (Zhang *et al.*, 2007).

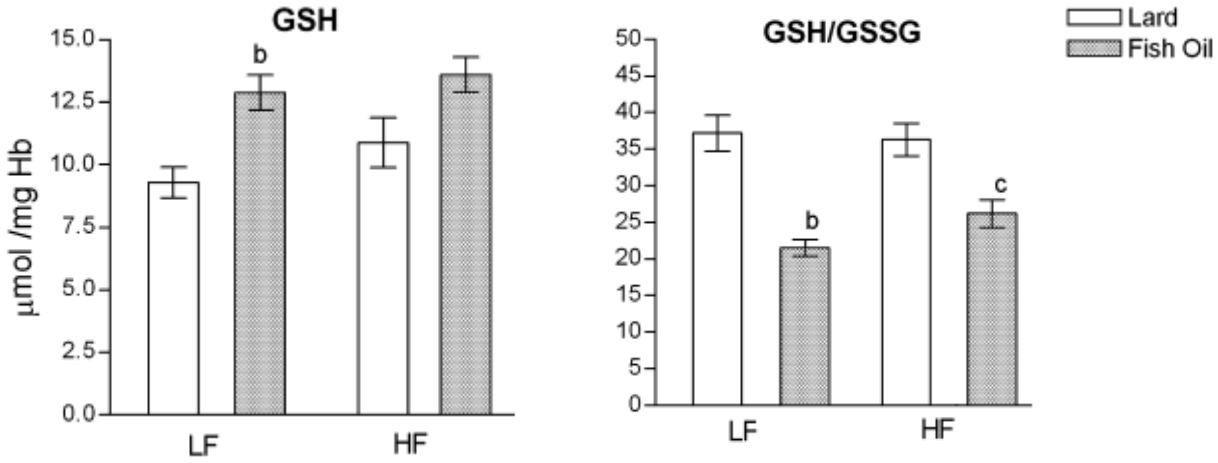


Figure 52 : Effet d'un régime pauvre en lipides (LF) ou riche en lipides (HF), contenant du saindoux (lard) ou de l'huile de pisson (fish oil) sur les concentrations de gluthation (GSH) et le rapport gluthation total/glutathion oxidé (GSH/GSSG) dans les érythrocytes de rat.
b P<0.01 vs LF lard , **c** P<0.01 vs HF lard .
Modifié d'après (Walczewska et al., 2010).

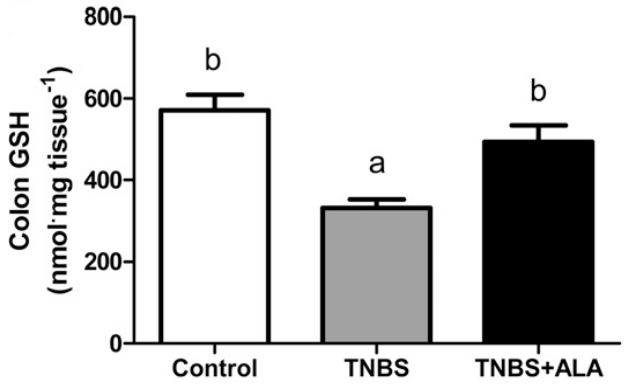


Figure 53 : Concentration de glutathion dans le colon de rat traités (TNBS) ou non (control = témoin) au TNBS pour l'induction d'une colite.
Les rats témoins et TNBS ont reçu un régime riche en huile de mais. Les rats TNBS+ALA ont reçu un régime riche en ALA.
P< 0,05 pour les histogrammes qui portent des lettres différentes.
D'après (Hassan et al., 2010)

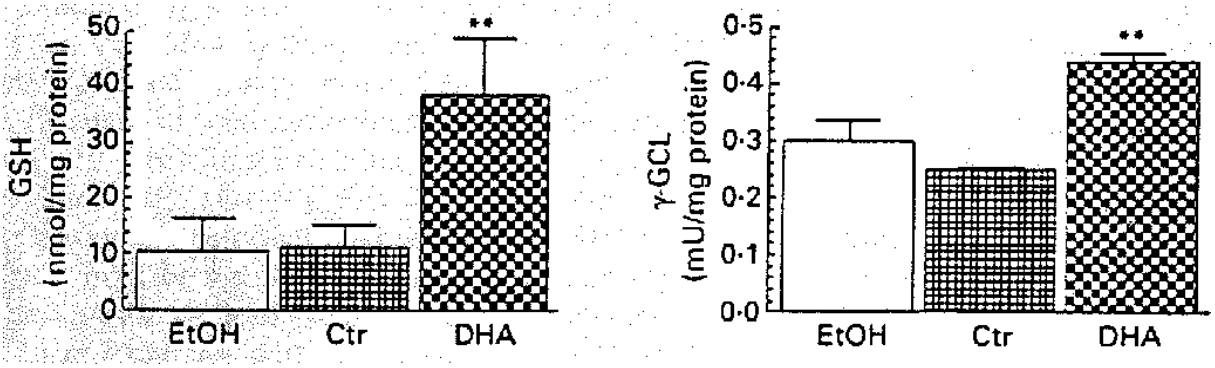
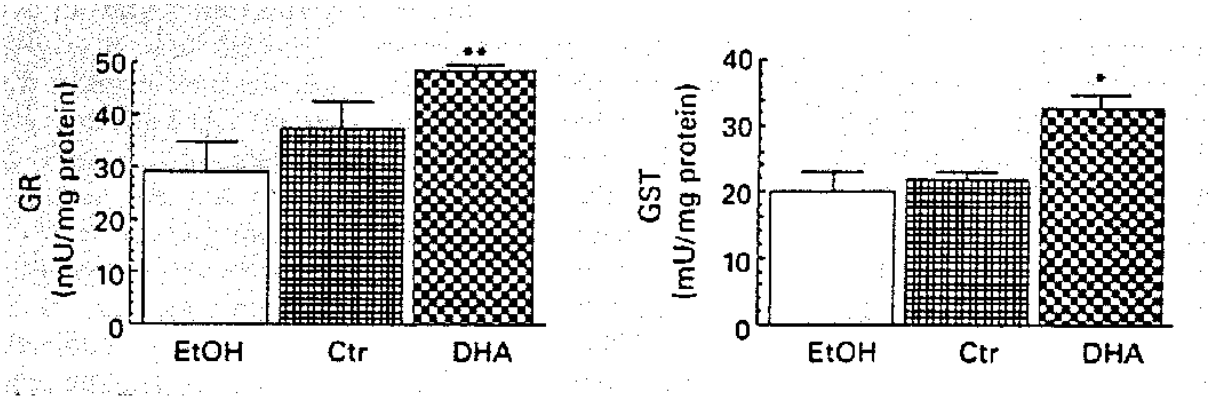


Figure 54 : Effet du traitement de fibroblastes humain par de DHA sur la concentration de glutathion intracellulaire et l'activité de la γGCL.
*P< 0,05 vs témoins (Ctr) ** P< 0,01vs témoins (Ctr).
D'après : (Arab et al., 2006).



<u>Figure 55</u> : Effet du traitement de fibroblastes humain par des doses croissantes de DHA sur l'activité de la glutathion réductase (GR) et de la glutathion transférase (GST).
*P< 0,05 vs control (Ctr) ** P< 0,01vs control (Ctr).
D'après : (Arab et al., 2006).

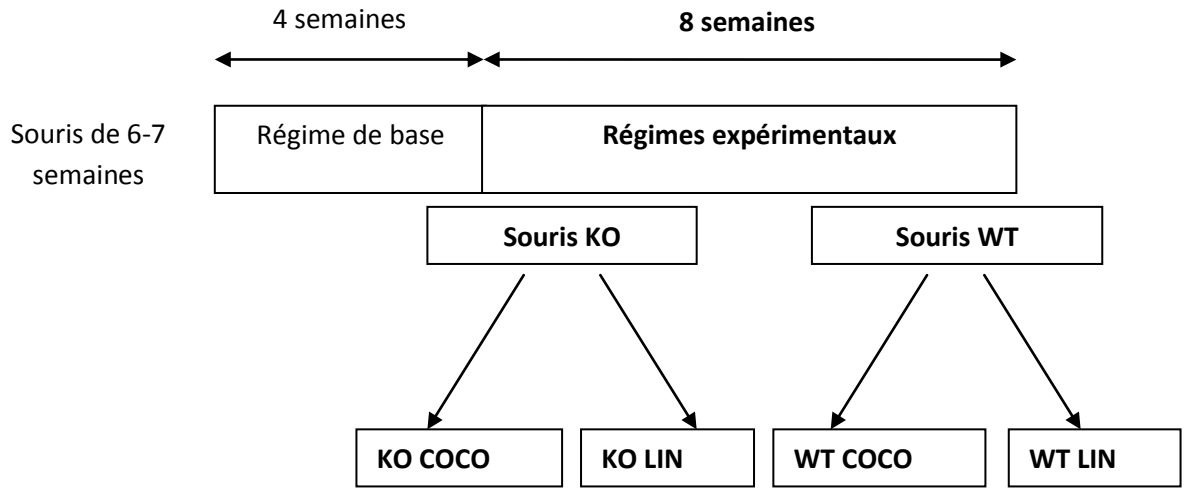


Figure 56 : Protocole expérimental

Tableau 5 : Composition des régimes

	g/ kg	kcal/kg	% calories
Caséine	210	840	22
Amidon de maïs	430	1720	45
Saccharose	212	848	22
Huile de lin/coco	48	432	11
Minéraux	40		
Vitamines	40		
Alpha-cellulose	50		
	Total (cal/kg)	**3840**	
		Protéines (% kcal)	**22**
		Glucides (% kcal)	**67**
		Lipides (% kcal)	**11**

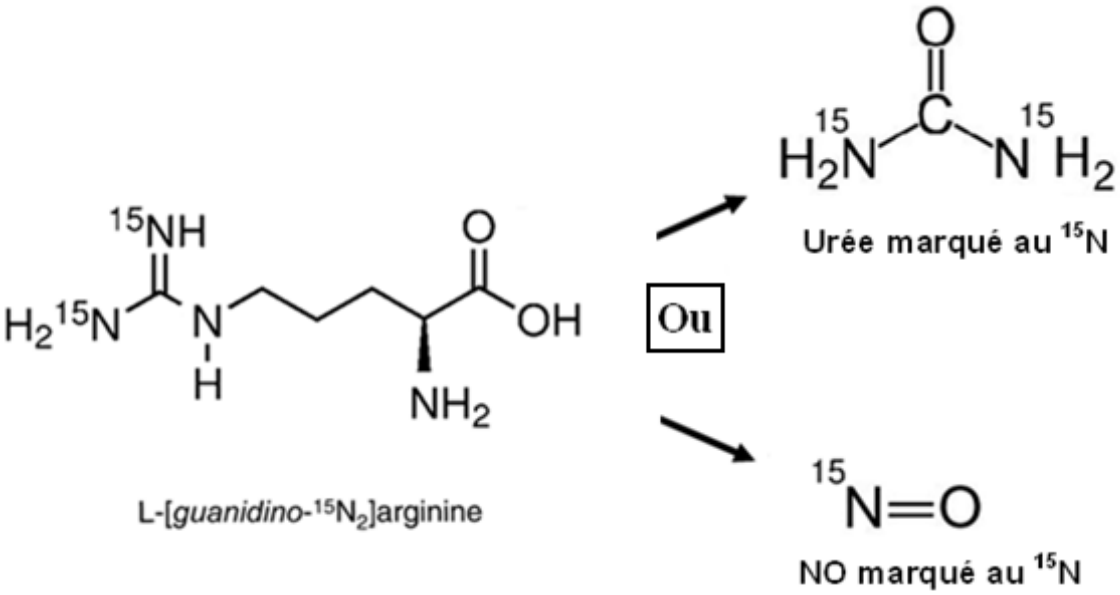


Figure 57 : Positionnement du marquage isotopique au niveau de l'arginine, de l'urée et du monoxyde d'azote

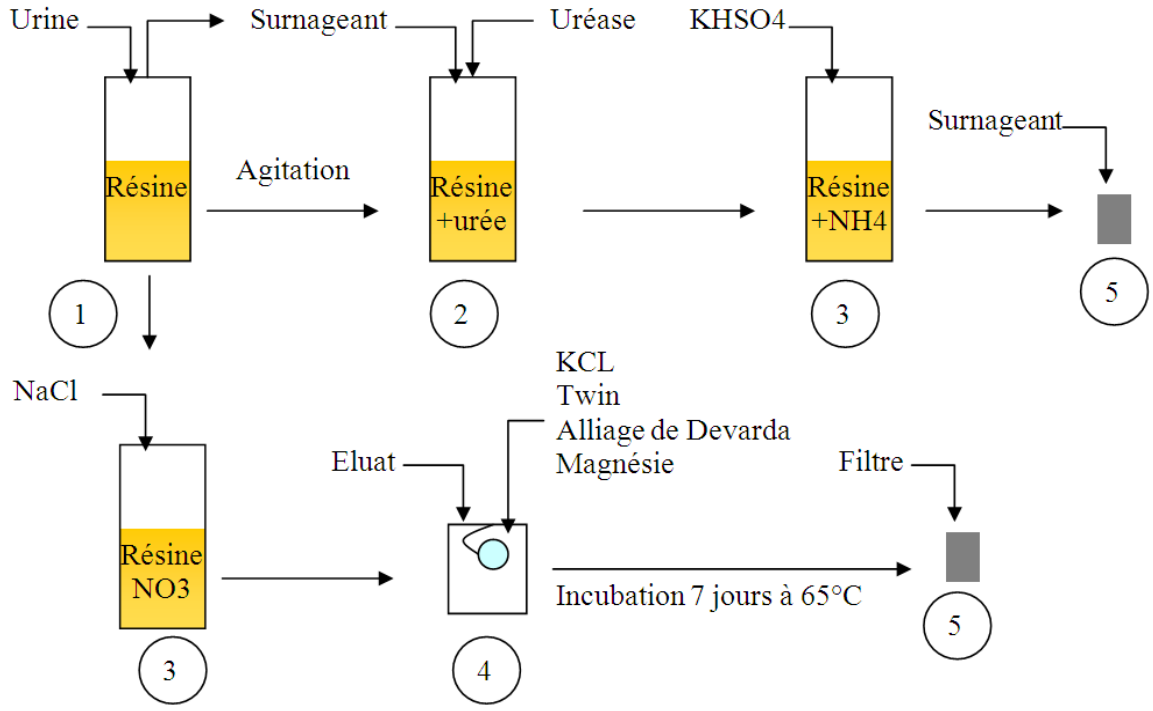


Figure 58 : Etapes de l'extraction de l'urée et des nitrates urinaires sur résine

1- Fixation des nitrates sur la résine

2- Fixation des ions ammonium issus de l'hydrolyse de l'urée par l'uréase

3- Élution de la résine

4- Fixation de l'ammoniaque sur le papier Wattman imprégné de KHSO4

5- Introduction du support dans des capsules en étain

Tableau 6 : Composition des régimes expérimentaux

Induction (Lin-Palme)	**g/kg**	**kcal/kg**	**% calories**
Caséine	210	840	16,7
Amidon de maïs	85	340	6,78
Saccharose	200	800	15,9
Maltodextrine	118	472	9,41
Huile de lin ou de Palme	235	2115	42,2
Huile de tournesol oléique	50	450	8,97
Minéraux	40		
Vitamines	10		
Alpha-cellulose	50		
Choline	2		
	Total (kcal/kg)	**5017**	
		Protéines (% kcal)	**16,7**
		Glucides (% kcal)	**32,1**
		Lipides (% kcal)	**51,1**

Témoin (Oléisol)	**g/kg**	**kcal/kg**	**% calories**
Caseine	210	840	21,9
Amidon de maïs	430	1720	44,8
Saccharose	210	840	21,9
Huile de tournesol oléique	48	432	11,3
Minéraux	40		
Vitamines	10		
Alpha-cellulose	50		
Choline	2		
	Total (kcal/kg)	**3832**	
		Protéines (% kcal)	**21,9**
		Glucides (% kcal)	**66,7**
		Lipides (% kcal)	**11,3**

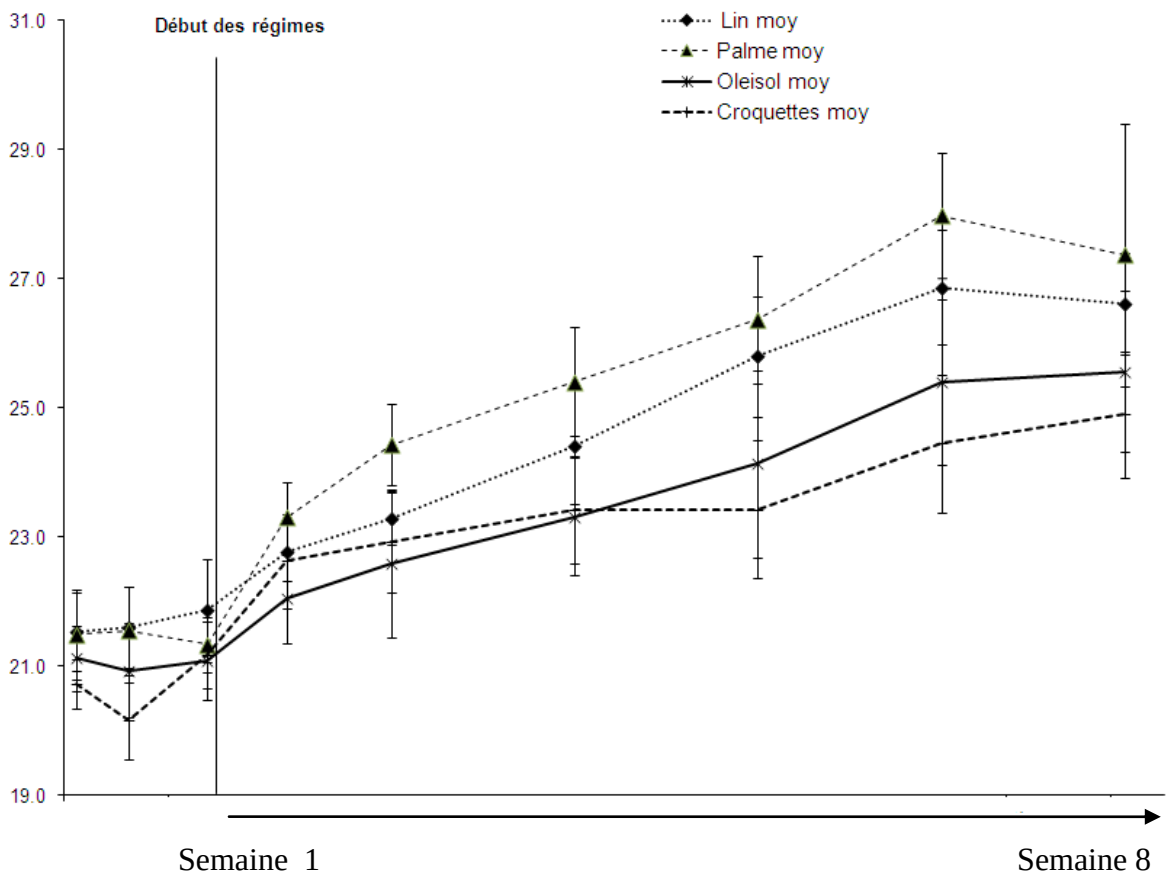


Figure 59 : Croissance des souris en fonction du régime (poids en g)

Tableau 7 : Composition corporelle

	Unité	Croquettes	Oleisol	Lin	Palme	Effet du régime
Poids Ecart-type n	g	**24,7** 0,8 4	**24,8** 1,2 6	**25,7** 0,7 10	**26,7** 0,7 10	**0,0671**
TAEpR Ecart-type n	% du poids corporel	**2,00^{b}** 0,4 4	**2,30^{bc}** 0,4 6	**3,10^{ac}** 0,7 10	**3,00^{a}** 0,4 10	**0,0014**
TAIngR Ecart-type n	% du poids corporel	**1,40^{b}** 0,2 4	**1,80^{b}** 0,3 6	**2,50^{a}** 0,5 10	**2,60^{a}** 0,5 10	**0,0004**

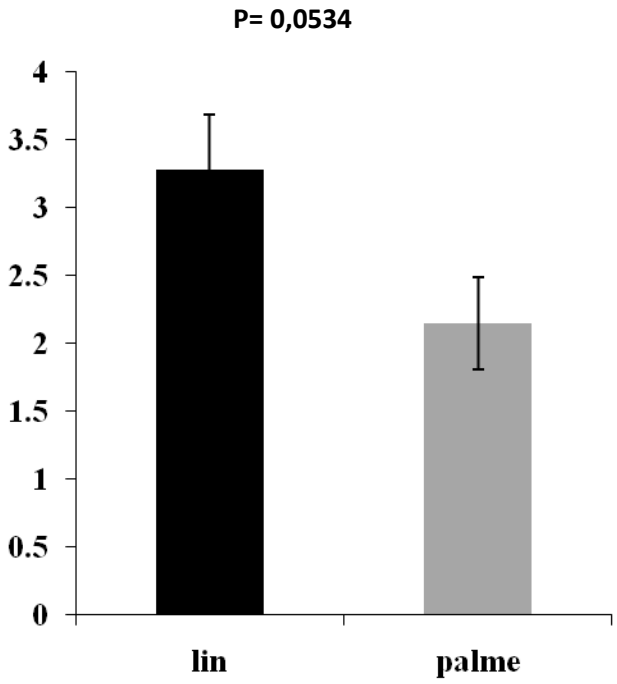
TAEpR : Tissu adipeux épidydimaire relatif ; TAIngR : Tissus adipeux Inguinal relatif
Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes à P<0,05,

Tableau 8: Paramètres sanguins lipidiques et glucidiques (g/l)

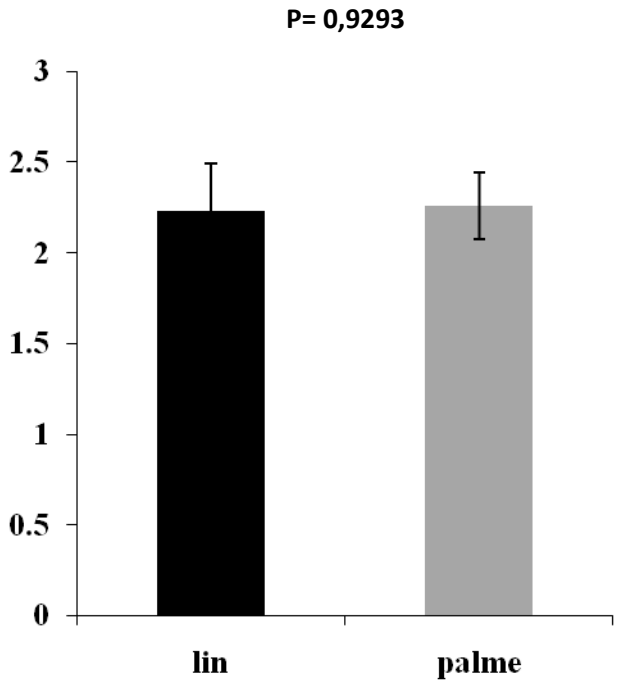
	Croquettes	Oleisol	Lin	Palme	Effet du régime
Glucose Écart-type n	**1,33^{b}** 0,16 4	**1,48^{b}** 0,16 6	**1,71^{a}** 0,18 10	**1,72^{a}** 0,20 10	**0,0019**
TG Écart-type n	**0,48** 0,16 4	**0,47** 0,06 4	**0,45** 0,08 10	**0,60*** 0,20 10	**0,1712**
Cholestérol total Écart-type n	**0,67^{b}** 0,24 4	**0,94^{ab}** 0,11 4	**0,92^{b}** 0,14 10	**1,18^{a*}** 0,21 9	**0,0008**
Cholestérol-HDL Écart-type n	**0,56^{b}** 0,19 4	**1,02^{a}** 0,09 4	**0,79^{ab}** 0,13 7	**1,05^{a*}** 0,25 8	**0,0020**
Cholestérol-Non HDL Écart-type n	**0,11^{b}** 0,06 4	**0,07^{ab}** 0,05 1	**0,19^{ab}** 0,09 7	**0,30^{a*}** 0,06 6	**0,0012**

Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes à P<0,05,
(*) Les valeurs des régimes Lin et Palme sont significativement différentes à P<0,05,

A- $^{15}N\ NO_3$ (% d'arginine ^{15}N injectée x 10^3)



B- ^{15}N Urée (% d'arginine ^{15}N injectée)



C- ^{15}N NO3 / ^{15}N Urée

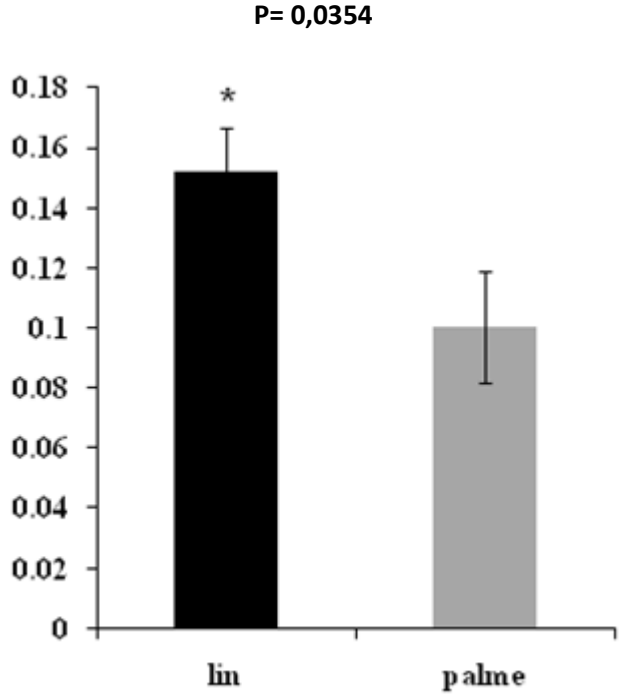


Figure 60 : Conversion systémique de l'arginine en urée et en NO
(*) Les valeurs sont significativement différentes à $P<0,05$

Tableau 9 : Marqueurs plasmatiques (pl) du métabolisme de l'arginine

	Unité	Croquettes	Oleisol	Lin	Palme	Effet du régime
Urée pl Écart-type n	mM/L	**0,67**[a] 0,03 4	**0,70**[a] 0,13 4	**0,41**[b] 0,08 10	**0,35**[b] 0,04 9	**<0,0001**
Créatinine pl Écart-type n	µM/L	**1,04** 0,50 4	**1,15** 0,55 4	**2,05** 0,72 10	**1,96** 0,68 8	**0,0305**
Nitrites pl Écart-type n	nM/L	Nd	Nd	**351**[a] 55 9	**297**[b] 47 8	**0,0492**
Nitrates pl Écart-type n	µM/L	Nd	Nd	**78,3**[a] 17,8 10	**62,3**[b] 13,6 9	**0,0440**

Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes à $P<0,05$,
Nd, non déterminé,

Tableau 10 : Métabolites urinaires (ur) liés au métabolisme de l'arginine

	Unité	Lin	Palme	Effet du régime
Nitrates ur Écart-type n	µM	**2,34** 0,77 10	**2,74** 1,00 9	**0,3378**
Urée ur Écart-type n	mM	**0,75** 0,18 10	**0,84** 0,37 9	**0,5071**
Créatinine ur Écart-type n	mM	**12,1** 1,7 10	**13,6** 2,9 9	**0,6929**

Tableau 11 : Quantités d'ARNm des enzymes-clés du métabolisme hépatique de l'arginine (Unités arbitraires)

	Lin	Palme	Effet du régime
Arginase 1 Écart-type n	**0,78**[a] 0,32 9	**0,47** [b] 0,42 7	**0,0089**
Arginase 2 Écart-type n	**0,04** 0,02 9	**0,03** 0,01 7	**0,4794**
NO synthase 2 Écart-type n	**0,63** 0,46 7	**0,94** 0,33 8	**0,2636**
NO synthase 3 Écart-type n	**0,86** 0,38 8	**0,94** 0,33 9	**0,6492**
DDAH1 Écart-type n	**1,44**[a] 0,79 9	**0,75**[b] 0,17 10	**0,0159**

Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes à $P<0,05$,

Tableau 12 : Quantification des arginases hépatiques par western-blotting (Unités arbitraires)

	Unité	Lin	Palme	Effet du régime
Arginase 1 Écart-type n	UA/actine	**70,9** 22,7 8	**66,2** 24,9 8	**0,5943**
Arginase 2 Écart-type n	UA/porine	**1,09** 0,64 10	**0,77** 0,28 8	**0,1887**

Tableau 13 : Concentrations des thiols hépatiques (µmol/g de protéines hépatiques)

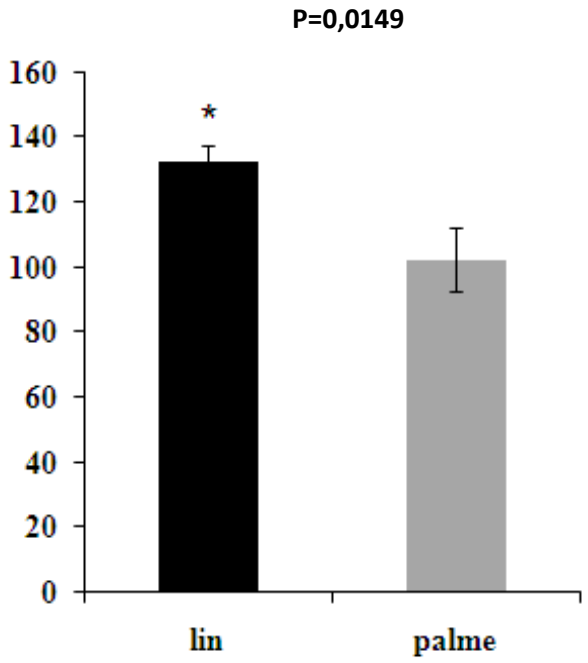
	Lin	Palme	Effet du régime
Glutathion tt	**372**	**398**	
Écart-type	50,3	106	**0,5052**
n	9	10	
GSH	**329**	**362**	
Écart-type	93,5	98.7	**0,4436**
n	10	10	
GSSG	**31,7**	**18,2**	
Écart-type	17,7	11,5	**0,0579**
n	10	10	
GSH/GSSG	**9,05[b]**	**18,9[a]**	
Écart-type	4,82	7,98	**0,0099**
n	8	8	
Cys	**143**	**151**	
Écart-type	20,7	36,4	**0,5667**
n	9	10	
CysGly	**11,6**	**13,9**	
Écart-type	3,11	2,45	**0,0874**
n	10	10	

Tableau 14: Pool des thiols hépatiques (µmol /foie)

	Lin	Palme	Effet du régime
Glutathion tt	**180**	**187**	
Écart-type	33,8	48	**0,7161**
n	10	10	
GSH	**151**	**170**	
Écart-type	34,3	44.2	**0,2966**
n	10	10	
GSSG	**30,9[a]**	**17,2[b]**	
Écart-type	17,7	11,5	**0,0491**
n	10	10	
GSH/GSSG	**4,52[a]**	**9,4[b]**	
Écart-type	2,41	3,99	**0,0099**
n	8	8	
Cys	**72**	**73**	
Écart-type	19,5	23,7	**0,9147**
n	10	10	
CysGly	**5,4**	**6,7**	
Écart-type	1,33	1,75	**0,0769**
n	10	10	

Glutathion tt : glutathion total ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé ;Cys : cystéine ; CysGly : cysteinylglycine,

A- Activité spécifique (nmol de γ-GC / mg de protéines/h)



B- Activité totale (nmol de γ-GC / foie tt)

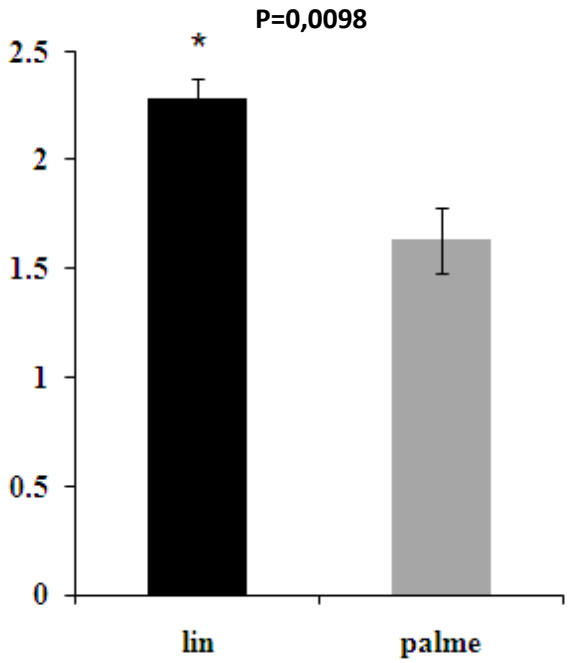


Figure 61 : Activité de la γ-GCL hépatique

Tableau 15 : Quantités d'ARNm des enzymes-clés du métabolisme hépatique de la cystéine et du statut redox (Unités arbitraires)

	Lin	Palme	Effet du régime
GCLc Écart-type n	**0,19**[a] 0,07 7	**0,11**[b] 0,04 10	**0,0012**
GCLm Écart-type n	**0,25** 0,12 9	**0,23** 0,05 10	**0,6736**
CDO Écart-type n	**1,60**[b] 0,84 9	**4,03**[a] 1,40 7	**0,0007**
GPX1 Écart-type n	**2,42** 1,83 9	**4,03** 1,66 9	**0,0684**
CAT Écart-type n	**1,62** 0,87 7	**1,43** 0,78 8	**0,6323**
SOD2 Écart-type n	**3,01**[a] 0,63 8	**2,23**[b] 0,26 9	**0,0038**
SOD3 Écart-type n	**0,73**[a] 0,17 8	**0,58**[b] 0,03 9	**0,0038**

Tableau 16 : Quantités d'ARNm des transaminases hépatiques (Unités arbitraires)

	Lin	Palme	Effet du régime
cASAT Écart-type n	**1,44** 0,83 10	**1,02** 0,44 10	**0,1808**
mASAT Écart-type n	**0,80**[a] 0,48 9	**0,35**[b] 0,06 10	**0,0290**
ALAT Écart-type n	**0,12** 0,04 9	**0,12** 0,05 10	**0,8044**

Tableau 17 : Paramètres calorimétriques

	Lin	Palme	Effet du régime
VO2 Écart-type n	**1,01** 0,41 10	**0,95** 0,42 10	**0.7027**
VCO2 Écart-type n	**0,88** 0,36 10	**0,83** 0,37 10	**0.6717**
QR Écart-type n	**0,91** 0,36 10	**0,86** 0,12 10	**0.2489**
Gox Écart-type n	**0,19** 0,10 10	**0,17** 0,10 10	**0.6043**
Lox Écart-type n	**0,12** 0,08 10	**0,12** 0,08 10	**0.9323**
Pox Écart-type n	**0,03** 0,01 10	**0,03** 0,01 10	**0.8887**

Tableau 18 : Quantités d'ARNm des protéines marqueurs de l'activation de PPARα (Unités arbitraires)

	Lin	Palme	Effet du régime
PPARα Écart-type n	**2,07** 1,16 9	**1,29** 0,47 9	**0,0791**
FAS Écart-type n	**11,19**[b] 3,50 8	**16,22** [a] 4,53 7	**0,0307**
Cyp4a14 Écart-type n	**27,8**[a] 13,42 8	**4,16**[b] 4,30 9	**0,0002**

Tableau 19 : Aminogramme plasmatique en (µMol/l)

	Huile de Lin	Huile de Palme	Effet du régime
Phosphoserine	**21,9±2,84**	**27,2 ±4,26**	**0,0067**
Taurine	377±111	364±65,8	0,7926
Acide aspartique	13,6±7,22	22,6±20,7	0,2636
Thréonine	155±23,5	137±35,4	0,2201
Serine	174±27,9	160±40,8	0,3968
Acide glutamique	247±32,9	283±43,1	0,0729
Glutamine	**461±122**	**158±49,2**	**<,0001**
Glycine	287±40,2	281±58,6	0,8189
Alanine	461±83,4	426±62,8	0,3350
Valine	167±23,7	148± 20,6	0,1026
Cystine	**8,39±3,81**	**4,07± 1,68**	**0,0492**
Méthionine	34,7±5,94	38,1±12,3	0,4743
Isoleucine	56,2± 4,06	63,2±14,0	0,1709
Leucine	**105 ±7,38**	**125±20,8**	**0,0129**
Thyrosine	38,0±15,4	53,8±16,9	0,0552
Phénylalanine	57,5 ±10,8	52,0±28,9	0,6036
Histidine	69,0±20,8	68,2±8,02	0,9200
3-methyl-histidine	12,6±5,36	14,1±5,06	0,6144
1-methylhistidine	9,20±3,45	8,32±0,68	0,6320
Tryptophane	30,8±17,2	21,5±11,7	0,2133
Ornithine	60,8 ±17,1	92,3±58,3	0,1411
Lysine	**242±29,7**	**308±45,1**	**0,0018**
Arginine	93,8±31,3	77,1±29,2	0,2942
Proline	308±17,0	319±35,3	0,4202
Citruline	70,8±16,4	66,1±20,1	0,5953
Acide α-amino-n-butyrique	6,63±2,48	7,95±1,76	0,2208
Orn/Arg	0,73±0,37	1,03±0,54	0,2348
Cit/Arg	0,83±0,41	0,88±0,32	0,8004
Orn/Cit	0,89±0,25	1,53±1,00	0,0841

En gras : Valeurs significativement différentes <0,05**.**

Souligné : P value < 0.1.

Tableau 20 : Transcriptomique hépatique (Top liste des 200 premiers gènes)
En gris : gènes dont l'expression est diminuée.

GeneName	SystematicName	logFC	P,Value	adj,P,Val
Cyp3a16	NM_007820	2,27277567	3,01E-11	3,42E-07
Cyp3a11	NM_007818	2,013460899	3,75E-11	3,42E-07
Cyp3a11	NM_007818	2,306400171	1,17E-10	7,12E-07
Cyp3a41b	NM_001105159	2,034396714	2,29E-10	1,04E-06
Cyp3a59	NM_001105160	1,395163221	4,44E-09	1,62E-05
Cyp4a14	NM_007822	2,898270215	2,45E-08	7,44E-05
Abcc3	NM_029600	1,014495574	4,95E-08	0,000128858
Orm1	NM_008768	-1,088030122	1,51E-07	0,000322697
Ddah1	NM_026993	0,645838105	1,59E-07	0,000322697
Cyp4a31	NM_201640	1,394379077	2,56E-07	0,000466905
Retsat	NM_026159	0,965674083	5,46E-07	0,000904439
Gpr64	NM_178712	0,521237006	6,53E-07	0,000991668
Cyp2c70	NM_145499	-0,660956445	8,71E-07	0,001222234
Ddah1	NM_026993	0,484286394	9,73E-07	0,001267376
Agpat9	NM_172715	1,036524703	1,16E-06	0,001381623
Slc35f2	NM_028060	0,726257012	1,28E-06	0,001381623
Cyp4a10	NM_010011	1,485105064	1,40E-06	0,001381623
Cyp4a31	NM_201640	1,326409715	1,41E-06	0,001381623
Khdrbs3	NM_010158	0,495603401	1,44E-06	0,001381623
Vldlr	NM_013703	0,697658951	2,01E-06	0,001834109
Cyp4a32	NM_001100181	1,260166123	2,42E-06	0,002100333
Ptgds	NM_008963	-0,674045886	2,90E-06	0,002399517
Aldh3a2	NM_007437	0,837451521	3,55E-06	0,002814876
Acot3	NM_134246	1,662792807	4,16E-06	0,003150912
Serpina12	NM_026535	-0,478431339	4,32E-06	0,003150912
Cidec	NM_178373	0,653489693	5,21E-06	0,003533015
G0s2	NM_008059	0,838341595	5,23E-06	0,003533015
NAP095541-001	NAP095541-001	0,305040535	6,15E-06	0,003864437
Orm2	NM_011016	-1,094265858	6,27E-06	0,003864437
Es22	NM_133660	0,652834918	6,71E-06	0,003864437
Cmas	NM_009908	0,410082413	6,91E-06	0,003864437
Nmral1	NM_026393	-0,415828747	6,96E-06	0,003864437
Vnn1	NM_011704	1,092732644	6,99E-06	0,003864437
Acot3	NM_134246	1,145944202	7,92E-06	0,004249134
A_55_P2122464	A_55_P2122464	0,640739903	8,52E-06	0,004440414
Ephx1	NM_010145	0,709407611	9,17E-06	0,004645592
Ces6	NM_133960	0,618199209	1,02E-05	0,005029923
Tff3	NM_011575	-2,110000771	1,20E-05	0,005747425
Cidec	NM_178373	1,747098778	1,28E-05	0,006001597
Ech1	NM_016772	0,516349938	1,33E-05	0,006052552
LOC673748	XM_001481151	1,583379525	1,57E-05	0,006989221
Nt5e	NM_011851	0,57922785	1,74E-05	0,007574575
Acot4	NM_134247	0,643910766	1,82E-05	0,007731014
Pafah2	NM_133880	0,273239791	1,87E-05	0,007749721
Slc25a20	NM_020520	0,410685718	1,96E-05	0,007928562

Ehhadh	NM_023737	0,773342448	2,02E-05	0,007928562
Cyp4a10	NM_010011	1,526700057	2,04E-05	0,007928562
Ephx1	NM_010145	0,724267417	2,15E-05	0,008162578
Cyp4a31	NM_201640	1,573904146	2,54E-05	0,009434596
Cyp4a10	NM_010011	1,52929155	2,59E-05	0,009448154
Pla1a	NM_134102	-0,416742694	2,89E-05	0,010317473
Krt23	NM_033373	1,442723477	3,25E-05	0,011382195
Nat8	NM_023455	-0,976469973	3,42E-05	0,011610942
Cml5	NM_023493	-0,836957833	3,48E-05	0,011610942
Syf2	NM_026780	0,358946149	3,50E-05	0,011610942
Sh3bgrl2	NM_172507	0,436212291	3,69E-05	0,012028237
Apol9b	NM_001168660	-0,461353118	3,81E-05	0,012057233
Vcp	NM_009503	0,281361663	3,84E-05	0,012057233
Cobl	NM_172496	-0,578564444	4,39E-05	0,013405732
LOC676546	XM_990990	0,409338543	4,41E-05	0,013405732
Cdkn1c	NM_009876	0,333942275	4,57E-05	0,013672615
Ces2	NM_145603	0,559243697	4,79E-05	0,014080793
Kpna3	NM_008466	0,293038318	5,28E-05	0,015277964
Cyp2c67	NM_001024719	-0,356517379	6,02E-05	0,017151844
Aox1	NM_009676	0,567530063	6,53E-05	0,018059492
A_55_P2107528	A_55_P2107528	0,600460959	6,54E-05	0,018059492
Wasf2	NM_153423	0,357070861	6,77E-05	0,018436917
Hc	NM_010406	-0,404663816	6,89E-05	0,018476788
Dhrs4	NM_030686	0,416297982	7,11E-05	0,018800736
Adora1	NM_001008533	0,568024663	7,45E-05	0,019418538
Cyp4f14	NM_022434	-0,36466603	7,68E-05	0,019713665
Tmem43	NM_028766	0,442232877	7,87E-05	0,019921888
Acaa1b	NM_146230	0,656279432	9,22E-05	0,023023807
Arrdc4	NM_025549	0,31568774	0,000102008	0,025055193
Gsta1	NM_008181	0,769667469	0,00010327	0,025055193
Tbc1d30	NM_029057	-0,399925328	0,000105682	0,025055193
Galk1	NM_016905	0,415435691	0,000105805	0,025055193
Heatr1	NM_144835	-0,347163094	0,000108428	0,025347165
Cpb2	NM_019775	-0,3428191	0,000109918	0,025366002
Hsbp1l1	NM_001136181	-0,588770711	0,000111291	0,025366002
Cdh1	NM_009864	-0,403069494	0,000118595	0,026697048
Slc46a3	NM_027872	-0,612050874	0,000126874	0,027688202
Smurf2	NM_025481	0,369147396	0,000127376	0,027688202
Slc13a3	NM_054055	-0,565180106	0,000127553	0,027688202
Impa2	NM_053261	0,371112825	0,000133028	0,028536749
Rufy4	NM_001034060	0,529914164	0,000141675	0,03003847
Rrp1	NM_010925	0,39852176	0,00014337	0,03004845
Cyp7a1	NM_007824	-0,91584525	0,000147939	0,030653658
Acot5	NM_145444	0,981060982	0,000149814	0,030675582
0610008F07Rik	NR_027970	0,837071887	0,00015141	0,030675582
Sema5b	NM_013661	0,308411112	0,000156859	0,031430359
Cyp3a59	NM_001105160	0,573066197	0,000160883	0,031886263
Gsta2	NM_008182	0,935445082	0,000166366	0,032618524
Gstm4	NM_026764	0,459866096	0,000176622	0,034260933
Blvrb	NM_144923	0,37530059	0,000188453	0,036170978

Slc4a4	NM_018760	0,404342632	0,000193426	0,036738893
Tpm2	NM_009416	0,84495123	0,000204678	0,03776695
Suclg1	NM_019879	0,246009645	0,000206841	0,03776695
Gm6940	XM_901095	-0,362899955	0,000208566	0,03776695
Raly	NM_023130	0,558021576	0,000209175	0,03776695
Creg1	NM_011804	0,510941684	0,000209195	0,03776695
Tpm2	NM_009416	0,941142605	0,000215253	0,038479646
Chkb	NM_007692	0,335900959	0,000220887	0,039103396
AU018778	NM_144930	0,29747758	0,00022433	0,039331088
Mgst3	NM_025569	0,665800339	0,000233728	0,040588514
ENSMUST00000078284	ENSMUST00000078284	-0,358749757	0,000242953	0,041679356
Chpt1	NM_144807	0,496507184	0,000246134	0,041679356
Hadh	NM_008212	0,291250527	0,000246867	0,041679356
5830454E08Rik	XM_001473897	0,291607835	0,000254085	0,042504523
A_55_P2074081	A_55_P2074081	0,292529408	0,000263805	0,043729343
Wnt5b	NM_009525	-0,479845714	0,000273472	0,044923394
Cyp2c68	NM_001039555	-0,426812237	0,000279245	0,045462078
Hsd17b6	NM_013786	1,022922654	0,000290277	0,046839929
Habp2	NM_146101	-0,394107606	0,000295941	0,047074439
LOC100047327	XM_001477908	0,487308953	0,000296894	0,047074439
Gm10639	NM_001122660	0,913624361	0,000307007	0,047834497
Egfr	NM_007912	-0,554300252	0,000307223	0,047834497
Atp11a	NM_015804	-0,535095383	0,000311061	0,047834497
Mfsd7c	NM_145447	0,51092065	0,000313152	0,047834497
Ppp2r2d	NM_026391	0,323997447	0,000314804	0,047834497
Apol9a	NM_173786	-0,445470703	0,000323132	0,048694066
Atp11a	NM_015804	-0,461539993	0,000334089	0,04993264
AI182371	NM_178885	-0,386427464	0,000339512	0,050330601
Acpp	NM_207668	-0,531353796	0,000342811	0,050409765
Slc4a4	NM_018760	0,407339349	0,000346339	0,050521146
Nmt2	NM_008708	0,214860234	0,000354805	0,050638719
Cfi	NM_007686	-0,224748568	0,000360172	0,050638719
Clcnkb	NM_019701	0,271025925	0,00036173	0,050638719
Ugt1a10	NM_201641	0,440856292	0,000363289	0,050638719
Hadhb	NM_145558	0,307327286	0,000364805	0,050638719
Meig1	NM_008579	0,28990678	0,000367637	0,050638719
A_55_P2093770	A_55_P2093770	0,62684053	0,000371402	0,050638719
Decr1	NM_026172	0,412719051	0,000373736	0,050638719
Entpd5	NM_001026214	0,39115399	0,000374045	0,050638719
Pir	NM_027153	0,431047737	0,000374916	0,050638719
Gm6911	XM_893520	0,333167066	0,000395622	0,05273222
Gm4956	NR_002858	-0,747191913	0,0003962	0,05273222
4930525G20Rik	AK029746	0,48333276	0,000399939	0,052844103
Mmadhc	NM_133839	0,271270301	0,000410302	0,053823361
ND3	ENSMUST00000082411	-0,332143956	0,000421836	0,054401641
Oxsm	NM_027695	0,248095658	0,000423684	0,054401641
Acadm	NM_007382	0,433387179	0,000427167	0,054401641
Srd5a3	NM_020611	0,247145599	0,000427574	0,054401641
Htatip2	NM_016865	0,394486068	0,000429628	0,054401641
Gm10639	NM_001122660	0,715865289	0,000442437	0,055637185

Slc6a16	XM_355900	0,304001657	0,000448621	0,055723365
Gpd1	NM_010271	0,52947754	0,000449234	0,055723365
Gstt2	NM_010361	0,563141363	0,000470958	0,05802326
Clstn3	NM_153508	1,013011783	0,000474738	0,058047064
Tbl1x	NM_020601	0,255164004	0,000477518	0,058047064
Hmgcl	NM_008254	0,371326463	0,000487025	0,058810706
Srbd1	NM_030133	-0,315206052	0,000509328	0,060275088
Igfbp4	NM_010517	-0,227946479	0,000511518	0,060275088
Adam32	NM_153397	0,420760419	0,000511653	0,060275088
ENSMUST00000099399	ENSMUST00000099399	-0,414134172	0,000512375	0,060275088
Gm5077	NM_173864	-0,291401774	0,000529056	0,061838544
RP23-195K8,6	NM_001037913	0,285542842	0,00053282	0,061881798
Mgea5	NM_023799	0,305850993	0,000538661	0,061972583
Cugbp2	NM_010160	0,309679485	0,000540937	0,061972583
Rnf11	NM_013876	0,271174824	0,000543798	0,061972583
Arhgap28	NM_172964	0,208869614	0,00054836	0,062104291
Sh3bgrl2	NM_172507	0,359113257	0,000554465	0,062363304
Spink3	NM_009258	-0,483113583	0,000557487	0,062363304
Ywhaq	NM_011739	0,311905305	0,000571975	0,063593837
Tbc1d16	NM_172443	0,336428103	0,000590433	0,065248252
Cyp3a57	NM_001100180	0,515065329	0,000611608	0,067181059
Rod1	NM_144904	0,257384849	0,000633499	0,069168977
AI428936	NM_153577	-0,547246885	0,000639671	0,06930259
Sh3bgrl2	NM_172507	0,299740149	0,000642324	0,06930259
Gsto1	NM_010362	0,369381882	0,000678443	0,072769032
Blnk	NM_008528	-0,863860309	0,000708028	0,074904613
H2-Q1	NM_010390	-0,909640057	0,000711062	0,074904613
Mblac2	NM_028372	-0,285473855	0,000711238	0,074904613
Rad51l1	NM_009014	0,823874896	0,000716067	0,074904613
6330409N04Rik	NM_025697	0,260391337	0,000719	0,074904613
Gramd1c	NM_153528	-0,385523509	0,000723002	0,074904613
Ces5	NM_172759	0,238974233	0,00073357	0,075570157
Zwint	ENSMUST00000020081	0,21719421	0,000746442	0,076089682
Acox1	NM_015729	0,318009425	0,0007521	0,076089682
Htatsf1	NM_028242	0,335941818	0,000755651	0,076089682
Ifitm3	NM_025378	-0,344176449	0,000759305	0,076089682
Atg16l2	NM_001111111	-0,592823322	0,000759478	0,076089682
Rdh9	NM_153133	0,457091957	0,000772535	0,07697493
F11	NM_028066	-0,444364032	0,000780432	0,077339137
Gsta4	NM_010357	0,498209953	0,000790924	0,077955165
1110006G14Rik	XM_989766	0,384948358	0,000799124	0,078339934
Mpp1	NM_008621	0,211514299	0,000818611	0,079766757
Slc25a10	NM_013770	0,469206525	0,000822428	0,079766757
Map1lc3a	NM_025735	0,422360986	0,000835371	0,080267276
Pmm1	NM_013872	0,391626514	0,000836393	0,080267276
2410001C21Rik	NM_025542	0,520824952	0,000842902	0,080429865
Tmem25	NM_027865	-0,428153101	0,000853647	0,080429865
Lrp6	NM_008514	0,230177944	0,000854773	0,080429865
Rhbg	NM_021375	-0,488053344	0,000855731	0,080429865
Gulo	NM_178747	-0,357692926	0,000874234	0,081559732

Gm16439	XM_001478188	0,298332602	0,000876698	0,081559732
Mgst3	NM_025569	0,707397133	0,000892688	0,082625709
Cml2	NM_053096	-0,346333384	0,000905647	0,083401833
D4Wsu53e	NM_023665	-0,366723374	0,000943713	0,08638999
Ccdc91	NM_025911	0,232007028	0,00094757	0,08638999

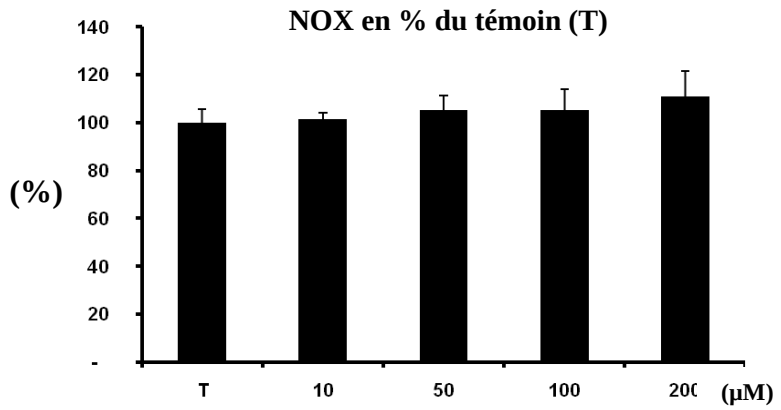


Figure 62: Effet des doses croissantes de Bézafibrate sur la production de NOx (nitrates+nitrites) dans le milieu de culture (Moy+SEM n=4).

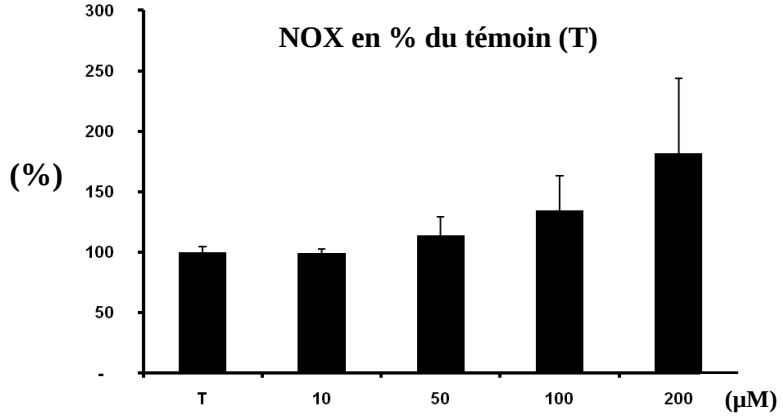


Figure 63: Effet des doses croissantes d'ALA sur la production de NOx (nitrates+nitrites) dans le milieu de culture (Moy+SEM n=4).

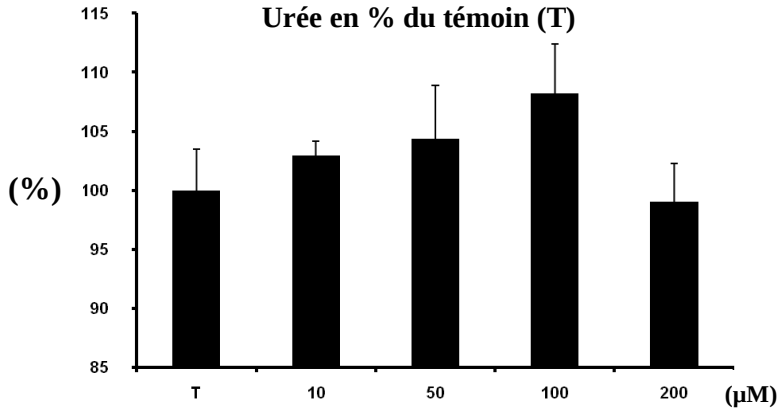


Figure 64: Effet des doses croissantes d'ALA sur la production d'urée dans le milieu de culture (Moy+SEM n=4)

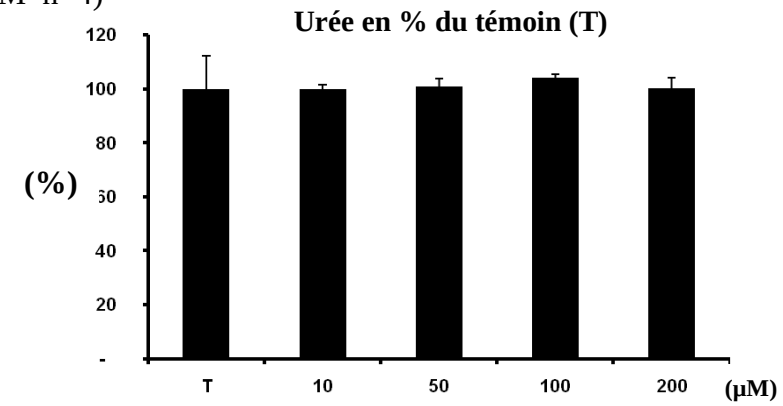


Figure 65: Effet des doses croissantes de Bézafibrate sur la production d'urée dans le milieu de culture (Moy+SEM n=4).

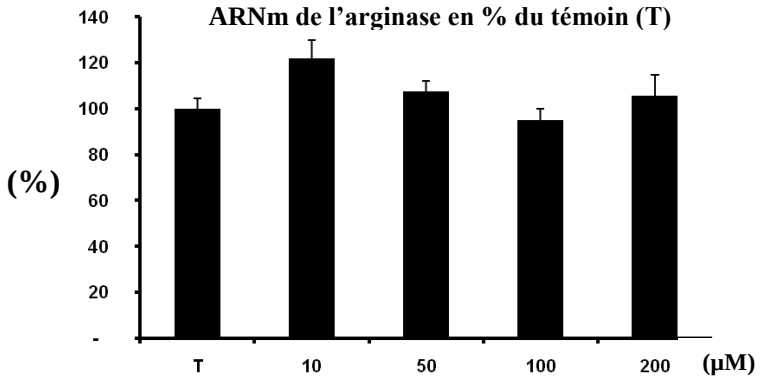


Figure 66: Effet des doses croissantes de Bézafibrate sur l'expression de l'arginase dans les cellules BAEC (Moy+SEM n=11).

.

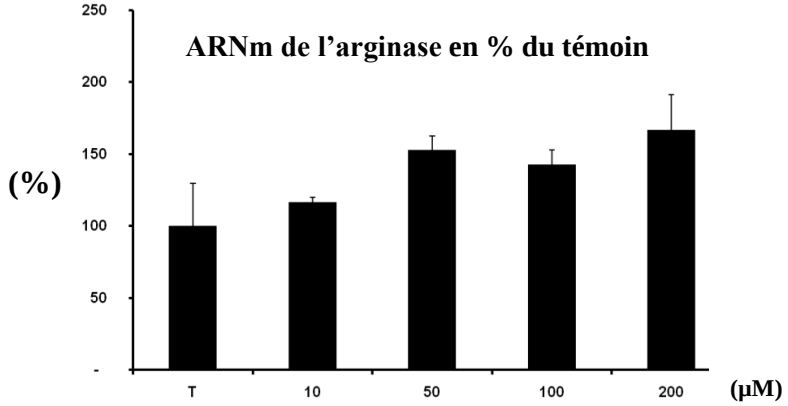


Figure 67: Effet des doses croissantes d'ALA sur l'expression de l'arginase dans les cellules BAEC (Moy+SEM n= 8).

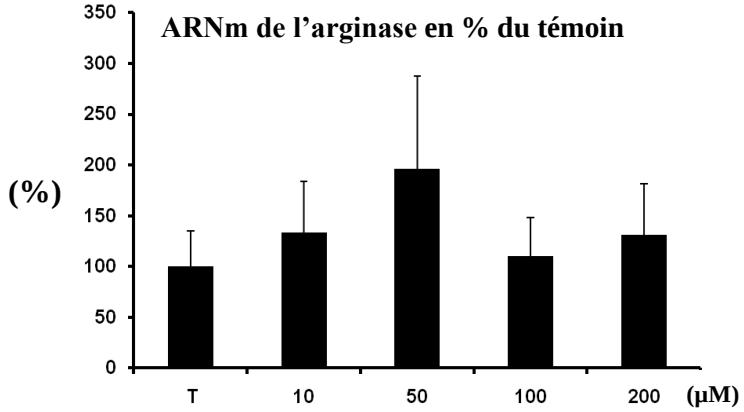


Figure 68: Effet des doses croissantes d'ALA sur l'activité de l'arginase dans les cellules BAEC (Moy+SEM n= 4).

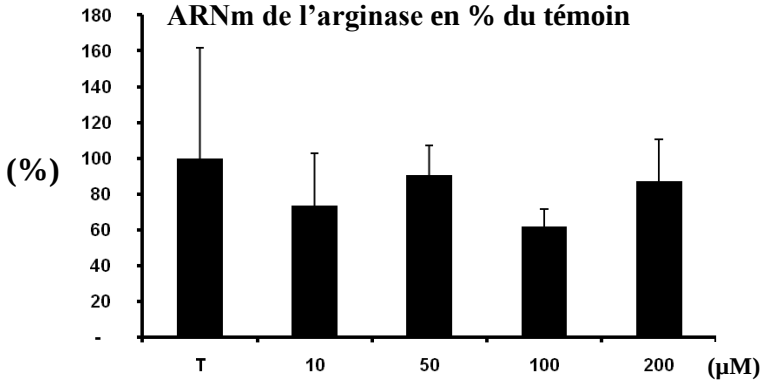


Figure 69: Effet des doses croissantes de Bézafibrate sur l'activité de l'arginase dans les cellules BAEC (Moy+SEM n=2).

Tableau 21 : Résumé des études mettant en évidence les effets des AGPI n-3 sur le métabolisme du NO

Etudes	Année	Modèles	Sources d'AGPI n-3	Dose/Durée/Concentration	Paramètres Mesurés	Résultats
Harris et al.	1997	Hommes sains	HP (41%EPA & 24% DHA) ou EPA (91%)	3g/j EPA et 5 g/jHP 3 semaines	NOx & urée urinaires	HP =>↑ NOx pas effet sur l'urée EPA =>Aucun effet
Pilot et al.	2003	Hommes sains	HP (30% EPA & 20% DHA)	6 g/j HP 8 semaines	NOx plasmatiques	↑NOX plasmatiques
Tagawa et al .	1999	Patients avec maladie coronaires	EPA	1,8g/j 6semaines	Production de NO	↑Production de NO
Erdogan et al.	2004	Rat	HP (35% AGPI n-3) Vs régime standard pour animal	0.4 g/kg 30 jours	NOx plasmatique	↑NOx plasmatiques
Sekine et al.	2007	Rat hypertensifs	500 mg d'ALA	1 charge Le premier et le 5éme jour	NOx plasmatique	↑NOx plasmatiques
Nishimura et al.	2000	Rat sains & diabétiques	EPA purifié Vs charge d'eau distillé	100mg/kg/j 6 semaines	Nitrite urinaire excrété en 24 h	↑Nitrites urinaire chez les rats sains et diabétiques
LopeZ Det al	2001 2008	Anneaux aortiques de Rat in situ	HP (Menhaden) Vs huile de maïs	8 semaines	Production aortique de NO	↑ Production de NO
LopeZ D et al.	2004	Anneaux aortiques de rat In situ	HP (Menhaden) Vs huile de maïs	8 semaines	Production aortique de NO	↑Production de NO
Singh et al.	2010	Anneaux aortiques de mouton isolé	EPA	30µM 5 min	Production de nitrites	↑ Production de nitrites
Okuda et al.	1997	HUVEC	EPA	0.3 mM 24 h	Production de nitrites	↑ Production de nitrites
Omura et al.	2000	HUVEC	EPA ou DHA	30 à 60µM 5min	Production de nitrites	EPA =>↑ Production de nitrites DHA => aucun effet
Stebbins et al.	2008	HCAEC	DHA	50nM 7 jours	Production de NOx	↑Production de NOx
Zang et al.	2007	HUVEC	ALA	10 à 200µM 18h	Production de NOx	Préviens la↓ production de NOx