

**Mécanismes et régulation de la phase absorptive des lipides  
dans des conditions normales et pathologiques**

par  
Noël PERETTI

Thèse de doctorat effectuée en cotutelle  
au  
Département de Nutrition, Faculté de Médecine  
Université de Montréal

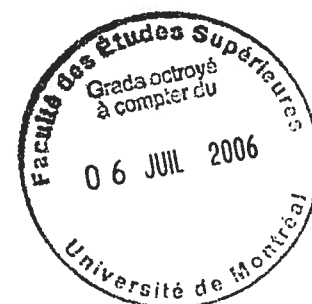
et

Faculté de Médecine  
Université Claude Bernard, Lyon I

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en Nutrition  
et à  
la Faculté de Médecine, Université Claude Bernard Lyon I  
en vue de l'obtention du grade de Docteur (thèse de science)

mai, 2006

© Noël PERETTI, 2006



QU  
145  
U58  
2006  
V.012

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Page d'identification du jury  
Université de Montréal  
Faculté des études supérieures  
et  
Faculté de Médecine  
Université Claude Bernard, Lyon I

Cette thèse intitulée :  
Mécanismes et régulation de la phase absorptive des lipides  
dans des conditions normales et pathologiques

présentée et soutenue à l'Université de Montréal par :  
Noël PERETTI

a été évaluée par un jury de cotutelle composé des personnes suivantes :

Dr Dominique Garrel, MD, PhD,  
Département de Nutrition, Université de Montréal  
-----  
président-rapporteur

Dr Emile Levy, MD, PhD,  
Département de Nutrition, Université de Montréal  
-----  
directeur de recherche (Université de Montréal)

Dr Martine Laville, MD, PhD,  
Faculté de Médecine, Université Claude Bernard Lyon I  
-----  
directeur de recherche (Université de Lyon)

Dr Alain Lachaux, MD, PhD,  
Faculté de Médecine, Université Claude Bernard Lyon I  
-----  
membre du jury

Dr Pierre Julien, PhD,  
CHUQ, Université Laval  
-----  
examineur externe

Dr Alexandre Lapillonne, MD, PhD,  
Faculté de Médecine, Université René Descartes, ParisV  
-----  
examineur externe

-----  
représentant du doyen de la FES



## RÉSUMÉ

**Introduction :** L'absorption intestinale est désormais considérée comme un processus complexe qui requiert plusieurs évènements successifs. On peut les résumer en trois grandes étapes principales séquentielles : 1) la phase apicale qui correspond à la captation des lipides alimentaires à partir de la lumière intestinale et à travers la bordure en brosse ; 2) la phase intracellulaire pendant laquelle les lipides sont acheminés au réticulum endoplasmique et incorporés dans les lipoprotéines ; et enfin 3) la phase d'exocytose qui correspond à la sécrétion par la membrane basolatérale des lipides dans la circulation systémique. Malgré l'importance extrême des lipides tant pour la physiologie de l'organisme que pour la physiopathologie des maladies cardiovasculaires comme exemple, les différentes étapes de l'absorption restent encore mal caractérisées. **Objectifs :** Les objectifs principaux de ce projet sont, d'une part, de faire une synthèse des connaissances actuelles sur l'absorption intestinale des lipides, et d'autre part, d'étudier les aspects spécifiques à chacune des 3 phases principales précédemment citées. Nous souhaitons également allier une approche de recherche fondamentale et de recherche clinique en pédiatrie, ce qui fut fait grâce à l'utilisation des techniques de culture cellulaire, culture organotypique, Western Blot et Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) associées à l'étude de patients atteints de fibrose kystique ou d'hypocholestérolémie familiale. **Résultats :** 1) Pour l'absorption au pôle apical, nous avons démontré dans le modèle cellulaire humain Caco2 que plusieurs facteurs nutritionnels, hormonaux, inflammatoires ou médicamenteux connus pour diminuer l'absorption intestinale du cholestérol influencent l'expression d'un transporteur, le Scavenger Receptor Classe B Type I (SR-BI). De plus, cette régulation est polarisée, c'est-à-dire qu'un même effecteur est capable d'induire une régulation différente de SR-BI selon le pôle de la cellule par lequel il aborde l'entérocyte (apical versus basolatéral). Les modifications de l'expression de SR-BI induites par l'effecteur ont lieu essentiellement au pôle cellulaire orienté vers la lumière intestinale (pôle apical) quelque soit le pôle par lequel l'effecteur entre en contact avec l'entérocyte, ce qui suggère que SR-BI serait impliqué principalement dans l'absorption du cholestérol alimentaire dans cette cellule. Enfin, la diminution de ce transporteur au pôle apical entérocytaire s'accompagne d'une baisse de l'absorption du cholestérol démontrant son rôle effectif. 2) Pour le transport intraentérocytaire, nous avons

démontré pour la première fois que la malabsorption des lipides au cours de la fibrose kystique (FK) ne résultait pas seulement de perturbations des phases intraluminales de la digestion des graisses (lipolyse et micellisation principalement), mais aussi d'anomalies de la phase intraentérocytaire. En effet, grâce à la technique de la culture des explants intestinaux provenant de patients atteints de mucoviscidose, nous avons mis en évidence que l'absorption des lipides et la synthèse des apolipoprotéines ainsi que la sécrétion des lipoprotéines et des lipides étaient fortement diminuées. 3) Pour la sécrétion au pôle basolatéral, nous avons réuni la cohorte la plus importante actuellement d'une hypocholestérolémie familiale rare : la rétention de chylomicrons afin d'étudier la corrélation génotype-phénotype, décrit 3 nouvelles mutations et proposé des recommandations pour le suivi et le traitement de cette maladie rare en comparant un groupe de patients suivis au Canada (Hôpital Ste Justine) et un autre suivi en France (Hôpital Edouard Herriot). **Conclusions** : Grâce à ce projet nous avons pu aborder l'ensemble des processus digestifs au niveau entérocytaire et caractériser de nouveaux aspects pour chacune des trois phases principales qui sont l'absorption apicale, le transport intraentérocytaire et la sécrétion basolatérale. Chacun de ces trois volets nous conduit à de nouvelles perspectives de recherche qui devraient nous permettre d'apporter des réponses complémentaires aux questions soulevées lors de l'étude de la physiologie de l'absorption intestinale des lipides.

Mots clefs : intestin, absorption, sécrétion, lipides, lipoprotéines, Caco2, SR-BI, régulation, transporteur, fibrose kystique, acides gras essentiels, rétention de chylomicrons, Maladie d'Anderson, Sar1, SARA2.

## ABSTRACT

**Introduction :** Intestinal absorption of lipids has previously been assumed to result only from passive diffusion. However, new data indicate that transporters are involved in this important process. Three main phases are crucial in fat transport: 1) the apical phase, which corresponds to the uptake of lipids from the lumen to the enterocyte through the brush border membrane; 2) the intracellular phase in which the lipids are carried to the endoplasmic reticulum in order to be incorporated into lipoproteins; and finally 3) the basolateral phase where lipids are secreted into blood circulation via lymphatics. Despite the pivotal role of lipids in different pathologies, these successive steps of intestinal absorption are poorly characterized. **Objectifs:** our aims were to thoroughly scrutinize these specific processes pertaining the absorptive transport of lipids. Our efforts were dedicated to use a fundamental approach and clinical research to investigate pediatric pathologies such as cystic fibrosis or familial hypocholesterolemia. **Results:** 1) For the apical phase, we demonstrated in the human cell Caco2 cells that many effectors (nutrients, hormones, pro-inflammatory molecules and drugs) were able to regulate the expression of Scavenger Receptor class B type I (SR-BI). Furthermore, this modulation was “polarized”, i.e., the same effectors induced a specific control depending on the cellular side of effector incubation. The modifications of SR-BI were essentially localized at the apical side of the enterocyte and associated with decreased up-take of radioactive cholesterol, which suggest that SR-BI is essentially involved in dietary cholesterol absorption. 2) In the intracellular phase, we demonstrated for the first time, that lipid malabsorption in cystic fibrosis resulted, not only from the intraluminal abnormalities (pancreatic insufficiency or biliary impairments), but also from intra-enterocyte dysfunctions. Indeed, we highlighted that lipid absorption, apolipoprotein synthesis and lipoprotein secretion were dramatically decreased in cystic fibrosis intestinal explants in culture. 3) As to the basolateral phase, we characterized the most important cohort so far recruited related to Chylomicron Retention Disease (CRD). We found three new mutations of the SARA2 gene encoding for the Sar1 GTPase protein involved in chylomicrons secretion. We provided new data on the clinical expression of this disease, compared phenotype with genotype and proposed recommendations for the diagnosis, follow up and treatment in CRD.

Key words: intestine, absorption, secretion, lipid, lipoprotein, Caco2 cells, SR-BI, regulation, transporter, cystic fibrosis, essential fatty acids, chylomicrons retention disease, Anderson disease, Sar1, SARA2.

## TABLE DES MATIERES

<b>PARTIE A : DONNÉES DE LA LITTÉRATURE, HYPOTHÈSES ET MÉTHODOLOGIE .....</b>		<b>1</b>
<b>I)</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1-1)	Importance physiologique des lipides.....	1
1-2)	Origines des lipides intraluminaux .....	2
1-3)	Étapes de l'absorption intestinale des lipides.....	3
	1-3-1) Digestion des lipides.....	4
	1-3-2) Absorption intestinale des lipides.....	5
	1-3-3) Assemblage des lipoprotéines.....	8
1-4)	Objectifs.....	11
<b>II)</b>	<b>PÔLE APICAL : ÉTUDE DE LA RÉGULATION DE L'ABSORPTION INTESTINALE DU CHOLESTÉROL DANS LE MODÈLE CELLULAIRE HUMAIN CACO2.....</b>	<b>13</b>
2-1)	Introduction.....	13
2-2)	Protéines membranaires candidates .....	15
	2-2-1) Scavenger receptor class B, type I (SR-BI).....	16
	2-2-2) CD36.....	19
	2-2-3) ATP binding cassette class A type 1 (ABCA1).....	20
	2-2-4) ABCG5 et ABCG8 .....	21
	2-2-5) Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1).....	23
	2-2-6) CD13.....	24
2-3)	Voies de régulation de ces transporteurs au niveau entérocytaire .....	26
	2-3-1) Différentes voies impliquées .....	26
	2-3-2) Régulation nutritionnelle et hormonale de l'absorption intestinale du cholestérol.....	33
	2-3-3) Coordination de l'expression des transporteurs.....	38
2-4)	Influence des facteurs intra luminaux et entérocytaires.....	43
	2-4-1) Facteurs intraluminaux .....	43
	2-4-2) Facteurs intraentérocytaires .....	45
2-5)	Hypothèses.....	47
<b>III)</b>	<b>TRANSPORT INTRAENTÉROCYTAIRE DES LIPIDES : RECHERCHE D'ANOMALIES DE LA PHASE INTRAENTÉROCYTAIRE DE L'ABSORPTION DES LIPIDES CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE. ....</b>	<b>50</b>
3-1)	Introduction.....	50
	3-1-1) Généralités sur la Fibrose Kystique.....	50
	3-1-2) Généralités sur les Acides Gras Essentiels .....	50
	3-1-3) Statut en acides gras essentiels des patients atteints de fibrose kystique.....	52
	3-1-4) Relations entre CFTR et acides gras essentiels .....	53
	3-1-5) Importance du statut nutritionnel pour le pronostic dans la fibrose kystique.....	54
3-2)	Malabsorption intestinale des lipides au cours de la mucoviscidose.....	55
	3-2-1) Anomalies de la phase lipolytique.....	55

3-2-2) Anomalies de la phase micellaire .....	56
3-2-3) Autres anomalies.....	56
3-3) Hypothèses .....	57
<b>IV) PÔLE BASOLATÉRAL : ÉTUDE DES CONSÉQUENCES CLINIQUES D'UN DÉFICIT DE SÉCRÉTION DES CHYLOMICRONS AU COURS DE LA MALADIE DE RÉTENTION DES CHYLOMICRONS, CORRÉLATION GÉNOTYPE – PHÉNOTYPE.....</b>	<b>58</b>
4-1) Introduction.....	58
4-2) Génétique et physiopathologie des hypocholestérolémies familiales .....	59
4-2-1) Abétalipoprotéïnémie.....	59
4-2-2) Hypobétalipoprotéïnémie.....	59
4-2-3) Rétention de chylomicrons ou maladie d'Anderson.....	61
4-3) Anomalies biologiques des hypocholestérolémies familiales :.....	63
4-3-1) Bilan lipidique.....	63
4-3-2) Vitamines liposolubles.....	65
4-3-3) Acides gras essentiels .....	66
4-3-4) Acanthocytose.....	66
4-4) Signes cliniques.....	67
4-4-1) Physiopathologie des anomalies cliniques.....	67
4-4-2) Formes cliniques classiques.....	68
4-4-3) Hétérogénéité clinique : .....	69
4-5) Hypothèses .....	71
<b>PARTIE B : ARTICLES .....</b>	
<b>72</b>	
ARTICLE 1 .....	72
ARTICLE 2 .....	107
ARTICLE 3 .....	138
ARTICLE 4 .....	191
ARTICLE 5 .....	231
<b>PARTIE C : DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	
<b>262</b>	
<b>I) INTRODUCTION.....</b>	<b>262</b>
<b>II) PHASE APICALE .....</b>	<b>264</b>
2-1) Introduction.....	264
2-2) Matériel et méthode.....	264
2-3) Résultats actuels .....	265
2-3-1) Nutriments .....	266
2-3-2) Hormones.....	268
2-3-3) Fibrates.....	270
2-3-4) Facteurs pro-inflammatoires .....	271
2-4) Perspectives.....	272
<b>III) TRANSPORT INTRAENTÉROCYTAIRE .....</b>	<b>273</b>
3-1) Introduction.....	273
3-2) Matériel et méthode.....	273
3-3) Résultats actuels .....	274
3-4) Perspectives.....	276

<b>IV) SÉCRÉTION AU PÔLE BASO-LATÉRAL .....</b>	<b>277</b>
4-1) Introduction.....	277
4-2) Matériel et méthode.....	278
4-3) Résultats actuels.....	279
4-4) Perspectives.....	283
<b>V) CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>285</b>
<b>PARTIE D : BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>286</b>

**LISTE DES FIGURES**

Figure 1 Travail de recherche en 3 volets .....	12
Figure 2 Mécanisme d'activation de SREBP .....	28
Figure 3 Mécanisme d'activation de PPAR.....	32
Figure 4 Insuline et diminution d'absorption du cholestérol.....	37
Figure 5 Théorie actuelle sur les flux de cholestérol à travers l'entérocyte .....	41
Figure 6 PPARs et diminution d'absorption du cholestérol .....	42
Figure 7 LXR et diminution d'absorption du cholestérol.....	42
Figure 8 Ezétimibe et diminution d'absorption du cholestérol .....	43
Figure 9 Voies métaboliques des acides gras essentiels .....	51
Figure 10 Étapes initiales d'activation de Sar1b .....	62
Figure 11 Étape de bourgeonnement de la membrane du RE.....	62
Figure 12 Technique de culture sur filtre et d'incubation sélective .....	265
Figure 13 Technique d'incubation d'explants intestinaux .....	274
Figure 14 Recrutement et inclusion des patients avec rétention de chylomicron.....	279
Figure 15 Conséquences hypothétiques des mutations.....	281



**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I	Variabilité selon les espèces du niveau de l'absorption intestinale du cholestérol en réponse à l'Ezétimibe .....	15
Tableau II	Composition des micelles utilisées par Levy et Cai dans leurs publications .....	18
Tableau III	Variations de l'absorption du cholestérol en fonction des modifications des gènes d'ABCG5 et ABCG8.....	22
Tableau IV	Principaux gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol et activés par SREBP .....	27
Tableau V	Gènes transactivés par LXR et impliqués dans le métabolisme du cholestérol .....	30
Tableau VI	Impact des variations d'insulinémie sur l'absorption intestinale du cholestérol dans différents modèles expérimentaux ou chez l'humain.....	36
Tableau VII	Facteurs de transcriptions et transporteurs entérocytaires du cholestérol....	39
Tableau VIII	Effet des inhibiteurs de l'ACAT sur les lipides plasmatiques selon les espèces et les diètes.....	46
Tableau IX	Modulation de la quantité totale de SR-BI par différents AG dans les Caco2.....	268
Tableau X	Aspect des inclusions lipidiques au niveau des biopsies intestinales .....	283

**ABRÉVIATIONS**

AA :	Acide arachidonique
AB :	Abétalipoprotéinémie
ABCA1 :	ATP Binding Cassette transporter A1
ABCG5/G8 :	ATP Binding Cassette transporter G5, G8
ACAT :	Acyl CoA cholestérol acyltransférase
ADN :	Acide déoxyribonucléique
AG:	Acide Gras
AGCC:	Acide Gras à Chaîne Courte
AGCL :	Acide Gras à Chaîne Longue
AGCM :	Acide Gras à Chaîne Moyenne
AGE :	Acides gras essentiels
AGL :	Acides gras libres
ALA :	Acide $\alpha$ -linoléique
Apo :	Apolipoprotéine
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
Ca :	Calcium
CCK :	Cholecystokinine
CE :	Cholestérol estérifié
CETP :	Cholesteryl ester transfer protein
CFTR :	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHOL:	Cholestérol
CL :	Cholestérol libre
CLA-I:	CD36- and LIMPII-analogous-1
CM:	Chylomicron
DG :	Diglycérides ou Diacylglycérol
DGAT :	Diacylglycérol acyltransférase
DHA :	Acide docosahexaénoïque
EPA :	Acide eicosapentaénoïque
Ezet :	Ezétimibe
FABP:	Fatty Acid Binding Protein

FABPc:	Fatty Acid Binding Protein Cytosolique
FATP:	Fatty Acid Transport Protein
FK :	Fibrose kystique
g :	Gramme
GR :	Globules rouges
HB :	Hypobétalipoprotéïnémie
HDL:	High Density Lipoprotein
IDL:	Intermediary density lipoprotein
I-FABP:	Intestinal-Fatty Acid Binding Protein
kDa:	Kilodalton
kg:	Kilogramme
L:	Litre
LCAT:	Lécithine: cholesterol acyltransférase
LDL:	Low Density Lipoprotein
L-FABP:	Liver-Fatty Acid Binding Protein
LH:	Lipase hépatique
LHS:	Lipase hormonosensible
LPL:	Lipoprotéine lipase
LPS :	lipopolysaccharides
Lyso-PC:	Lyso-Phosphatidylcholine
LXR:	Liver X receptor
m:	Mètres
MG :	Monoglycérides
mg:	Milligramme
MG:	Monoacylglycérol
MGAT:	Monoacylglycérol acyltransferase
MRC :	Maladie de rétention des chylomicrons
MTP:	Microsomal Triglyceride Transfer Protein
NPC1L1 :	Niemann-Pick Like 1
pb :	Paires de bases
PC:	Phosphatidylcholine

PDI:	Protein Disulfide Isomerase
PL :	Phospholipides
PLA <sub>1</sub> , PLA <sub>2</sub> :	Phospholipase A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub>
PLTP:	Phospholipid Transfer Protein
PPAR :	Peroxisome proliferator-activated receptor
RE:	Reticulum endoplasmique
RT-PCR :	Reverse transcription-Polymerase chain reaction
RXR:	Retinoic R receptor
SCP-2:	Sterol Carrier Protein-2
SR-B1:	Scavenger Receptor-class B type 1
SREBP:	Sterol regulatory element binding proteins
TG :	Triglycérides ou Triacylglycérol
TNF $\alpha$ :	Tumor necrosing factor- $\alpha$
VLDL:	Very Low Density Lipoprotein
$\mu$ g:	Microgramme
$\mu$ m:	Micromètre
$\omega$ 3 :	Oméga 3
$\omega$ 6:	Oméga 6

## REMERCIEMENTS

Cette thèse est une occasion privilégiée pour remercier ceux qui m'ont aidé dans mon acquisition de compétences dans le domaine de la nutrition humaine. En tout premier lieu, le Dr Emile Levy qui m'a accueilli si généreusement dans son laboratoire. Son accueil a non seulement été attentif pour m'orienter vers les projets pertinents et porteurs en nutrition ; mais surtout son hospitalité a toujours été marquée d'une chaleur humaine et d'une confiance particulièrement importantes pour moi. Enfin, son enthousiasme à mener les projets de recherche, son activité débordante, sa curiosité intellectuelle et son esprit d'entreprise exceptionnel me font dire qu'il a été et restera pour moi un mentor. J'espère que nous parviendrons à prolonger ces travaux par une collaboration future fructueuse.

Je remercie sincèrement le Dr Martine Laville pour sa présence et son soutien fidèles tout au long de ce parcours. Ses conseils dans mes choix professionnels ont été précieux. Je me réjouis de pouvoir continuer à collaborer avec elle après mon retour en France.

Ce projet a pu aboutir en grande partie grâce au soutien acharné du Dr Alain Lachaux. Je l'en remercie sincèrement. Nous commençons une collaboration prochainement, je souhaite qu'elle soit sereine et riche. Mes remerciements vont également au Dr Agnès Sassolas pour sa participation bienveillante aux travaux sur les hypocholestérolémies familiales.

D'autre part je tiens particulièrement à remercier le Dr Dominique Garrel d'assurer la présidence du jury après avoir suivi mon examen de synthèse pré doctoral. De même, je suis reconnaissant au Dr Pierre Julien et au Dr Alexandre Lapillonne d'avoir accepté les rôles de rapporteurs externes, de prendre du temps pour lire ces travaux et se déplacer à ma soutenance.

Je ne pourrais pas oublier les personnes qui ont activement participé à ces travaux, en tout premier lieu Zola Schohraya Spahis sans qui ces articles n'aurait pas été aussi rapidement publiés ; Carole Garofalo qui m'a appris les techniques d'expérimentation et a toujours su être attentive et présente. Il est juste aussi de remercier les autres membres du laboratoire qui ont collaboré à ces études : Valérie Marcil, Manon Chartre, Alain Montoudis, et Emilie Grenier. Merci à Nicole Thériault pour ce travail rapide.

Enfin, je suis reconnaissant au Centre de Recherche de l'hôpital Ste Justine et à l'Association Canadienne de Gastroentérologie (CAG) pour l'aide financière et le cadre exceptionnel sans lesquels ce travail n'aurait pas été possible.

## **Partie A : Données de la littérature, hypothèses et méthodologie**

### **I) INTRODUCTION**

#### **1-1) IMPORTANCE PHYSIOLOGIQUE DES LIPIDES**

On distingue 4 types de lipides : acides gras (AG), glycérides, phospholipides (PL) et cholestérol.

Les AG sont des composés organiques formés d'une chaîne carbonée ayant un groupement carboxyle à une des extrémités (appelée C terminale) et un méthyle terminal à l'autre (N terminale). Ce sont des acides organiques faibles. On peut les classer selon : i) la longueur de la chaîne carbonée qui comporte toujours un nombre pair de carbones (C) (4 à 6 C : chaîne courte, 8 à 12 C : moyenne, > 12 C : longue, >20 C) ; ii) le nombre d'insaturations (AG saturés, monosaturé ou polyinsaturé quand il y a plus d'une double liaison), iii) la position des doubles liaisons par rapport à l'extrémité N terminale, iv) la forme isomérique de la double liaison, la forme naturelle étant presque toujours cis qui procure une forme incurvée à la chaîne carbonée augmentant ainsi sa souplesse, mais on peut aussi produire des formes trans par hydrogénation catalytique qui ont une rigidité plus élevée puisque la chaîne carbonée est alors rectiligne (margarines) ; v) leur origine : la majorité des AG peut être synthétisée par l'organisme, cependant certains sont appelés essentiels (AGE), car non synthétisables. Nous reviendrons plus en détail sur ces AGE au chapitre III). Les AG sont les composants de plusieurs autres classes de lipides, ils sont ainsi les lipides les plus abondants et sont responsables de la plupart des propriétés physicochimiques, métaboliques et nutritionnelles des lipides composés.

Les glycérides sont des composés formés d'une molécule de glycérol dont les 3 hydroxyles peuvent être estérifiés par un AG produisant un (monoglycéride, MG), deux AG générant un (diglycéride DG) ou trois AG formant un (triglycéride ou triacylglycérol TG). Les TG sont les plus abondants dans notre alimentation puisqu'ils représentent plus de 90% des lipides diététiques, ils sont composés d'acides gras à longue chaîne dans 92 à 96% [Carey 1992]. Ils jouent de nombreux rôles : constituant la principale réserve énergétique, influençant la structure des membranes cellulaires et donc la fonctionnalité des protéines

membranaires (récepteurs, transporteurs, enzymes), précurseurs de molécules modulant l'inflammation et la coagulation (AGE → éicosanoïdes → thromboxanes, leucotriènes et prostaglandines).

Les phospholipides (ou glycérophospholipides) sont formés d'un diglycéride dont une fonction alcool est estérifiée par une molécule d'acide phosphorique, lui-même lié à une autre molécule (choline dans la lécithine ou phosphatidylcholine ; sérine ; inositol ou éthanolamine). Les PL sont des molécules amphipatiques, c'est-à-dire qu'elles possèdent un pôle hydrophile (partie liée à l'acide phosphorique) et un pôle hydrophobe (les 2 AG), ce qui leur confère la propriété de s'organiser soit en monocouche pour solubiliser d'autres molécules hydrophobes en les incorporant dans leur core hydrophobe, soit en bicouche dans les membranes cellulaires. Ils représentent environ 5 à 8% des lipides alimentaires, mais jouent des rôles essentiels dans la structure tissulaire, notamment au niveau du système nerveux central et de la peau (étanchéité intercellulaire grâce aux céramides). Ils sont les précurseurs de certains neurotransmetteurs. Ils peuvent participer à la solubilisation des lipides biliaires et alimentaires. Comme les AG contenus dans les TG, les PL peuvent servir comme substrats énergétiques.

Le cholestérol est le principal stérol de l'organisme humain. Il est formé de 26 carbones organisés sous forme de 4 cycles carbonés et porte une fonction alcool sur son 3<sup>e</sup> carbone. Il peut être synthétisé par presque toutes les cellules de l'organisme et se présente sous forme soit libre, soit estérifiée à un acide gras au niveau de sa fonction alcool. Il devient alors nettement plus hydrophobe. La majorité du cholestérol alimentaire est sous forme estérifiée. Le cholestérol ne représente que 3 à 5% des lipides alimentaires, mais il est un composé essentiel des membranes cellulaires en augmentant leur rigidité, ce qui peut influencer aussi les fonctions protéiques de ces membranes. Il est aussi le précurseur des hormones stéroïdiennes, de la vitamine D et des acides biliaires.

## **1-2) ORIGINES DES LIPIDES INTRALUMINAUX**

Les lipides alimentaires représentent environ 35% de l'apport calorique total d'une diète occidentale, soit entre 100 et 150g/j [Ros 2000]. Habituellement, environ 40% des lipides sont ajoutés à l'alimentation lors de la préparation culinaire (graisses dites



d'assaisonnement), alors que les 60% restant font partie intégrante des aliments (graisses constitutives). La teneur en graisse varie de manière importante selon les types d'aliments.

Les lipides retrouvés dans la lumière intestinale et qui vont être absorbés ont plusieurs origines. Ainsi, le cholestérol provient non seulement de la diète (300 à 500 mg/j), mais surtout de la bile (800 à 1200 mg/j) et aussi de la desquamation des entérocytes pour une quantité proche de celle retrouvée dans la diète (250-400 mg/j). Donc, seulement 1/3 du cholestérol intraluminal est d'origine alimentaire. De même la bile est une source importante de PL puisqu'elle en apporte 10 à 20g/j alors qu'on en retrouve seulement 5 à 8g/j dans la diète. Enfin, les TG représentent la très grande majorité des lipides alimentaires (>90%).

### 1-3) ÉTAPES DE L'ABSORPTION INTESTINALE DES LIPIDES

L'absorption intestinale des lipides rencontre 2 problèmes principaux : l'hydrophobicité et la taille importante de ces molécules.

Les lipides sont par nature des molécules hydrophobes. Ils vont avoir à traverser successivement 3 phases riches en eau avant d'atteindre les cellules cibles périphériques : le milieu intraluminal riche en sucs digestifs, puis le cytosol de la cellule entérocytaire et enfin la circulation sanguine. L'organisme répond à ce problème en élaborant des complexes capables d'augmenter la solubilité des lipides à chacune de ces étapes : les micelles composées de sels biliaires amphipatiques solubilisent les lipides dans la lumière intestinale ; des transporteurs cytosoliques permettent aux graisses de se rendre aux différents organelles entérocytaires pour y être métabolisés, et les lipoprotéines élaborées par l'entérocyte vont véhiculer les graisses dans la circulation sanguine jusqu'à leurs cellules cibles périphériques.

D'autre part, certains lipides ont une taille trop importante pour être absorbés tels que TG, DG, cholestérol ester et PL, l'organisme va devoir les hydrolyser dans la lumière intestinale pour permettre leur absorption. En plus de diminuer leur taille, cette hydrolyse va produire des composés moins hydrophobes.

Ce sont les étapes successives de ces procédés que nous allons détailler maintenant.

### 1-3-1) Digestion des lipides

- **Hydrolyse des Lipides**

L'hydrolyse des TG débute dans l'estomac par l'action de la lipase gastrique. Cette enzyme agit principalement sur les liens en position sn-1 et sn-3 pour les AGCL alors qu'elle hydrolyse les AGCM également en position sn-2 [Tobey 1985]. La lipase gastrique est sécrétée principalement par le fundus de l'estomac et elle requiert un pH se situant entre 3.0 et 6.0 pour avoir une action hydrolytique optimale [Naim 1988], d'où l'importance de la sécrétion des ions HCl par l'estomac. Notons qu'au pH 5-6, elle agit plus efficacement sur les AGCM que sur les AGCL [Carriere 1993]. Cette digestion gastrique des TG est une étape essentielle au processus de lipolyse intestinale pour trois raisons : i) Les AG libérés stimulent la libération de cholecystokinine (CCK) de la muqueuse duodénale, ce qui provoque l'excrétion des enzymes pancréatiques et de la bile, elle même composée essentiellement d'acides biliaires, de cholestérol et de PL [Naim 1988] ; ii) l'efficacité de la lipase pancréatique est augmentée en présence de TG partiellement hydrolysés ; et enfin iii) les AG libérés augmentent l'affinité de la lipase pancréatique pour son cofacteur, la colipase, dont nous reparlerons plus loin.

L'étape suivante a lieu dans le duodénum et implique la lipase pancréatique qui est l'enzyme principale pour la digestion des TG, puisqu'elle assure 70 à 75% de l'hydrolyse des TG et des diglycérides. Elle scinde les AGCL en position sn-1 ou sn-3 libérant ainsi des AG libres et du MG ayant donc son AG en position sn-2, ce qui représente la forme prédominante des MG absorbés au niveau intestinal [Tobey 1985]. La lipase pancréatique agit à pH 8 et est inactivée à pH acide, à la différence de la lipase gastrique, d'où l'importance de la sécrétion d'ions bicarbonates par le pancréas et le foie. La colipase est nécessaire pour stabiliser la lipase pancréatique en lien avec les gouttelettes lipidiques, assurant ainsi une hydrolyse optimale des TG. Cette co enzyme est sécrétée également par le pancréas, mais par des cellules différentes de celles élaborant la lipase pancréatique.

Les PL, principalement les phosphatidylcholines (PC), sont hydrolysés dans l'intestin grêle par l'action des phospholipases A1 et A2 (PLA1 et PLA<sub>2</sub>) pancréatiques. Ces enzymes sont sécrétées sous leur forme zymogène et sont activées par la trypsine lors de leur entrée dans le duodénum. La PLA<sub>2</sub> hydrolyse préférentiellement l'AG de la

phosphatidylcholine (PC) qui est le plus abondant des phospholipides de la diète. Elle coupe le lien de l'AG situé en position 2 seulement, libérant ainsi un AG et un lyso-PC, des composés plus hydrosolubles, qui tiennent un rôle important dans la solubilisation des autres produits de la digestion lipidique [Naim 1988] [Tobey 1985] [Ahnen 1983].

Seulement 10 à 15% du cholestérol alimentaire est sous forme de CE [Tobey 1985]. Ce dernier doit d'abord être hydrolysé dans l'intestin par la cholestérol estérase (CET) pancréatique afin que le cholestérol libre soit absorbé. La CET hydrolyse aussi les esters de rétinol et le Lyso-PC, mais est 100 fois moins efficace que la lipase pancréatique pour l'hydrolyse des TG [Borgstrom 1980].

- **Émulsification et Solubilisation Micellaire**

Les TG sont insolubles dans l'eau, s'agrègent en grosses gouttelettes lipidiques, limitant ainsi la surface d'action des enzymes lipolytiques. L'émulsification est le processus de dispersion de ces grosses gouttelettes en petites particules et est initiée par les sels biliaires déversés dans le duodénum. Les acides biliaires sont des molécules amphipatiques synthétisées par le foie. Ils augmentent la solubilité en phase aqueuse des lipides en permettant l'agrégation des produits de l'hydrolyse (MG et AG) avec eux pour former de petites gouttelettes émulsifiées appelées micelles. Ainsi, les micelles permettent de garder en solution les produits provenant de la digestion des lipides qui seraient autrement insolubles [Farquhar 1963] [Naim 1988] [Tobey 1985] [Ahnen 1983], augmentant de 100 à 1000 fois la concentration aqueuse des MG et des AG. Donc, la micellisation est une étape indispensable à l'absorption optimale des graisses alimentaires, ce qui est illustré par la réduction de 30% de l'absorption des lipides chez les patients atteints d'atrésie des voies biliaires [Kobayashi 1983].

### 1-3-2) Absorption intestinale des lipides

- **Passage Transmembranaire**

Pour que les lipides contenus dans les micelles soient absorbés par la cellule intestinale, ils doivent être séparés des sels biliaires. À la surface de la bordure en brosse

des entérocytes existe un microclimat acide (pH 5.3 – 6.0) créé par les échanges  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrane. Cette acidité entraîne une diminution de la solubilité des micelles. Les AG sont alors dissociés des micelles et protonés, ce qui permet leur passage à travers la membrane microvillositaire de l'entérocyte [Naim 1988] [Levy 2001]. Les MG en position sn-2, les lyso-PC et le cholestérol sont aussi transférés à travers les microvillosités, mais les acides biliaires sont pour la plupart absorbés au niveau de l'iléum terminal grâce à un transporteur spécifique, puis transportés dans la veine porte jusqu'au foie [Ahnén 1983].

Au niveau de l'entérocyte, il semble que deux mécanismes agissent en complémentarité pour permettre aux lipides de traverser la membrane microvillositaire : la diffusion simple et le transport actif qui implique des transporteurs membranaires [Thomson 1986] [Wilson 1994]. Ainsi, les AG non chargés se déplacent de façon rapide et spontanée à travers la membrane plasmique, grâce à un mouvement de "flip-flop" non énergie-dépendant. De même, une diffusion passive du cholestérol libre est le modèle classique proposé [Sternby 1991]. Cette diffusion simple serait le résultat du gradient de concentrations, créé par l'abondance de lipides dans la lumière intestinale et leur faible concentration dans le milieu cytosolique [Istvan 2000]. Les arguments en faveur de l'existence d'un transport dépendant de protéines, ainsi que les principales protéines candidates seront détaillés au chapitre II.

### • **Transport Cytosolique**

Le transfert des lipides depuis la bordure en brosse jusqu'au réticulum endoplasmique (RE) à travers le milieu cytosolique aqueux requiert l'implication de transporteurs protéiques, afin de contrer le caractère hydrophobe des lipides. Deux "Fatty Acid Binding Protein cytosoliques" (FABPc) semblent être impliqués dans le transport navette des AG, des MG et des lyso-PL à l'intérieur du cytosol : I-FABP et L-FABP [Westergaard 1976]. L'I-FABP, une protéine de 15 kDa composée de 132 acides aminés, est exclusivement exprimée dans le grêle, tandis que "Liver-FABP" (L-FABP) (14.3 kDa et 127 acides aminés), est exprimée aussi dans le foie et les reins [Wilson 1971]. Il est possible que ces deux protéines jouent des rôles physiologiques différents [Thomson 1980]. D'autres transporteurs cytosoliques font aussi l'objet d'études, telle la "Phospholipid Transfer Protein" (PLTP), 9 kDa, présente chez la majorité des mammifères et qui

permettrait le transfert des PL entre les interfaces membranaires [Thomson 1993]. Le "Sterol Carrier Protein-2" (SCP-2) (13 kDa) serait impliqué dans le transport intracellulaire du cholestérol ainsi que dans son estérification [Levy 2000]. Finalement, l'"Acyl-CoA Binding Protein" (10 kDa), distribuée de façon ubiquitaire dans les organes, possède une affinité de liaison élevée pour les esters acyl-CoA à chaînes moyennes et longues [Besnard 1996].

- **Réestérification des Lipides**

Les produits lipolytiques transportés jusqu'à la membrane du RE y sont réesterifiés, c'est-à-dire qu'il y a synthèse de TG, PL et CE.

La synthèse des TG peut s'effectuer selon deux mécanismes d'action. La première voie de synthèse est la voie du monoacylglycérol [Hamilton 1999]. Par l'action de l'enzyme monoacylglycerol acyltransferase, le MG en position sn-2 est tout d'abord acylé en diglycéride qui subit à son tour une acylation en TG par l'action de la diacylglycerol acyltransferase [Farquhar 1963] [Naim 1988] [Ahnen 1983]. La deuxième voie de synthèse des TG est appelée la voie de l' $\alpha$ -glycérophosphate. Elle implique tout d'abord l'acylation du glycérol-3-phosphate par l'action de l'enzyme glycérophosphate acyltransférase, afin de former l'acide phosphatidique. Ce dernier est hydrolysé en diglycéride en présence de la phosphatidate phosphohydrolase, puis le diglycéride est converti en TG. Cette deuxième voie s'active lorsque les MG ne sont pas disponibles ou lors du jeûne, car il a été démontré que durant l'absorption normale des lipides, la voie du monoacylglycérol est largement privilégiée [Farquhar 1963] [Ahnen 1983].

C'est aussi à travers la voie du monoacylglycérol que de nombreuses molécules de lyso-PC absorbées sont réacétylées pour former le PC, impliquant l'enzyme lysophosphatidylcholine acyltransférase [Naim 1988]. Une autre portion du lyso-PC absorbé peut être hydrolysée pour former le glycéro-3-phosphorylcholine. L'AG ainsi libéré peut être utilisé pour la synthèse de TG et le glycéro-3-phosphorylcholine est transporté vers le foie pour utilisation [Tobey 1985].

Les deux enzymes impliquées dans la réestérification du cholestérol sont la cholestérol estérase et la "Acyl-CoA Cholesterol Acyl Transferase" (ACAT). La première

facilite le déplacement des lipides dans l'entérocyte en les dirigeant vers leur site fonctionnel intracellulaire et est possiblement impliquée dans la captation microvillositaire du cholestérol [Naim 1988]. La deuxième catalyse la synthèse de CE à partir du cholestérol libre et de l'acyl CoA [Schaffer 2002]. Approximativement, 75% du cholestérol nouvellement absorbé est retrouvé dans les chylomicrons (CM) sous forme estérifiée [Hofmann 1963].

Deux formes de ACAT, appelées ACAT1 et ACAT2 ont été identifiées dans différents tissus. L'ACAT1 est une protéine membranaire (~65 kDa) ubiquitairement distribuée dans les tissus et principalement localisée au niveau du RE (29). Chez l'humain, on la retrouve en grandes concentrations dans les macrophages et les cellules productrices d'hormones stéroïdiennes, mais elle est aussi détectable dans les hépatocytes et les entérocytes. L'ACAT2, qui possède environ 40% d'identité avec l'ACAT1, est principalement exprimée dans le foie et l'intestin grêle et elle semble être la forme prédominante dans les cellules de l'épithélium intestinal humain. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que l'ACAT1 aurait pour fonction principale la synthèse du CE utilisé dans la mise en réserve de gouttelettes cytosoliques de cholestérol et que l'ACAT2 serait fonctionnellement associée au CE contenu dans les particules lipoprotéiques [Schaffer 2002].

### **1-3-3) Assemblage des lipoprotéines**

Afin d'être libérés dans la circulation, les lipides non polaires ayant été resynthétisés doivent être incorporés dans les lipoprotéines, des particules de transport pouvant interagir avec le milieu aqueux. L'intestin grêle a la capacité de sécréter la plupart des lipoprotéines : les CM, les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL). Toutefois, les CM sont les lipoprotéines majoritairement et exclusivement sécrétées par les entérocytes, constituant ainsi les principaux véhicules des graisses alimentaires et des vitamines liposolubles (10). Les CM sont principalement composés de TG (85-88%), de PL (~ 8%) et de cholestérol (~ 5%) [Farquhar 1963] [Naim 1988] [Ahnen 1983]. Les protéines associées aux CM nouvellement synthétisés par la cellule sont les apolipoprotéines (Apo) B48, A-I, A-IV et C-III. Toutefois, c'est l'ApoB48 qui constitue la

protéine structurale des CM indispensable à son assemblage ainsi qu'à son exocytose cellulaire [Veerkamp 1993].

- **Synthèse de l'ApoB**

L'ApoB est une large glycoprotéine essentielle pour l'assemblage et la sécrétion des lipides dans le foie et l'intestin. Deux formes d'ApoB existent chez les mammifères : 1) l'ApoB100, une protéine de 4536 acides aminés qui, chez l'humain, est synthétisée principalement dans le foie et 2) l'ApoB48, synthétisée exclusivement dans l'intestin grêle et formée des 2152 résidus amino terminal de l'ApoB100 [Stahl 1999]. L'ApoB48 est le résultat d'une modification post-transcriptionnelle de l'ARNm qui s'effectue dans l'intestin des mammifères et qui est appelée "editing" de l'ApoB. Un complexe enzymatique incluant l'APOBEC-1 (ApoB mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-1) entraîne la désamination d'une cytidine spécifique (position 6666) formant ainsi une uridine et entraînant, au codon 2153, la conversion d'une glutamine (CAA) en un codon stop (UAA) d'où la forme « tronquée » de l'ApoB, soit l'Apo B-48.

- **Lipidation de l'ApoB et Formation des chylomicrons**

Lors de la formation des lipoprotéines, les TG positionnés sur la membrane externe du RE sont internalisés et forment des gouttelettes lipidiques. Par un mécanisme encore inconnu, les gouttelettes s'associent aux PL et aux Apo. Il est important de noter que les lipides sont synthétisés dans le RE lisse, tandis que les Apo le sont dans le RE rugueux [Ahnen 1983]. Le transfert des TG, des PL et du CE à l'ApoB48 nécessite l'action de la "Microsomal Triglyceride Transfer Protein" (MTP). La MTP est une protéine hétérodimère composée d'une large sous-unité de 97 kDa, qui confère au complexe son activité de transfert des lipides, et de la "Protein Disulfide Isomerase" (PDI), une enzyme multifonctionnelle de 58 kDa nécessaire à la formation d'un complexe soluble et actif [Naim 1988] [Alpers 2000]. Cette protéine soluble a été isolée initialement dans la lumière du microsome, mais est également retrouvée dans le RE. Elle possède un site de liaison pour les lipides neutres et 2 ou 3 sites pour les PL, ces sites ayant entre eux des propriétés différentes pour le transport des PL [Atzel 1994]. Chez l'animal, elle est majoritairement exprimée dans l'intestin et à un moindre degré dans le foie [Lin 1994], ainsi que dans

d'autres tissus (cœur, rein et testicule). Le long de l'intestin, il existe un gradient décroissant d'expression de la MTP avec dans le colon un niveau d'ARNm d'environ 5% de celui retrouvé dans le duodénum. Le rôle de la MTP a été démontré au cours de la première étape d'assemblage des chylomicrons et des VLDL. Elle est indispensable à la formation de particules lipoprotéiques primordiales contenant l'ApoB [Gordon 1994]. Il existe à l'extrémité N-terminale de l'ApoB 2 domaines d'interaction avec la MTP. L'ApoB doit être lipidée en cours de synthèse pour ne pas être dégradée [Veerkamp 1993]. Cette dégradation pouvant avoir lieu soit directement dans le RE, soit dans le protéasome cytosolique via la voie de l'ubiquitine. La MTP assure ce rôle de lipidation, transférant les lipides de la membrane du RE jusqu'à l'ApoB en cours de synthèse. Après la lipidation de l'ApoB, les autres Apo sont ajoutées à la surface des particules riches en TG qui sont transportées jusqu'à l'appareil de Golgi.

Une fois la LP assemblée, sa sécrétion du RE vers l'appareil de Golgi, puis vers la membrane baso-latérale, requiert l'intervention de protéines cargos. Le Coat Protein complex II (COPII), en se polymérisant à la surface du RE, recrute certaines de ces protéines cargos, entraîne une déformation membranaire, puis la formation de vésicules contenant les LP et son exportation vers le Golgi. La première étape d'assemblage de COPII nécessite l'activation d'une protéine de la membrane du réticulum endoplasmique, soit la Sar1- GTPase.

Des modifications importantes sont apportées aux pré-CM dans l'appareil de Golgi, quoique leur déroulement ne soit pas encore bien défini. Lors de leur passage dans le Golgi, la composition en PL des particules est modifiée et la glycosylation des Apo, entamée dans le RE rugueux, est complétée, ce qui confère au CM sa maturité et permet son exocytose [Ahnen 1983].

Afin d'être sécrétés, les CM sont acheminés à travers le cytosol dans des vésicules dérivées de l'appareil de Golgi. Les vésicules golgiennes migrent vers la membrane basolatérale et les lipoprotéines peuvent alors être déchargées dans l'espace intracellulaire. Elles sont ensuite déversées dans le canal chylifère, transportées dans la lymphe et aboutissent dans la circulation sanguine où les TG des CM subissent une hydrolyse. Les



AG libérés lors de la lipolyse sont utilisés comme source d'énergie par le muscle et de nombreux organes ou sont mis en réserve dans les tissus adipeux.

- **Autres lipoprotéines intestinales**

En période de jeûne, l'entérocyte produit les VLDL intestinaux qui transportent principalement des lipides endogènes provenant de la dégradation des cellules dans la lumière intestinale, de la bile et des AG dérivés du plasma et qui sont composés des mêmes apos que les CM [Naim 1988] [Veerkamp 1993]. Ainsi, ces lipoprotéines ont une composition chimique et un catabolisme se rapprochant plus des CM que des VLDL d'origine hépatique [Naim 1988].

En plus de la production de lipoprotéines riches en TG, l'intestin grêle a la capacité de synthétiser de petites particules de haute densité (<1.21 g/ml) de forme discoïdale. Leur métabolisme est encore peu connu, mais elles sont considérées comme des HDL naissantes et sont principalement composées de PL, de CE et des apos A-I et A-IV [Naim 1988].

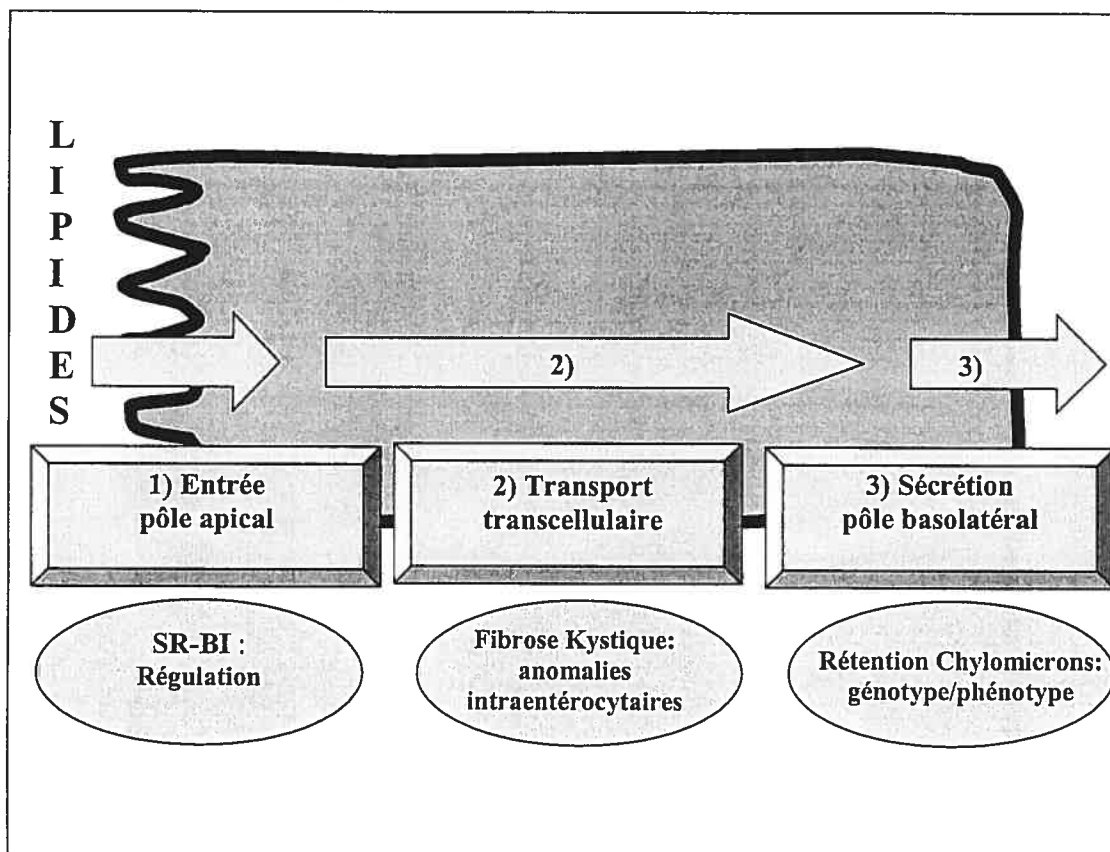
#### 1-4) OBJECTIFS

Le travail de ce doctorat porte sur l'absorption intestinale des lipides. Les objectifs de cette thèse sont les suivants : i) faire une synthèse des connaissances actuelles sur l'absorption intestinale des lipides ; ii) aborder à la fois des techniques de recherche fondamentale en lipidologie et réaliser des protocoles de recherche clinique sur des pathologies qui comportent une malabsorption intestinale des lipides ; iii) afin de caractériser un aspect spécifique de chacune des 3 grandes étapes de l'absorption intestinale, c'est à dire l'absorption au pôle apical, le transport entérocytaire et la sécrétion au pôle basolatéral de l'entérocyte.

Pour l'absorption au pôle apical, nous avons choisi d'étudier la régulation de l'expression du transporteur Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) car il s'agit d'une protéine impliquée dans l'absorption du cholestérol dont le rôle et la régulation au niveau entérocytaire demeurent mal compris. Pour le transport entérocytaire, nous avons recherché l'existence d'anomalies intra cellulaires pouvant participer à la malabsorption des lipides

présente au cours de la fibrose kystique (mucoviscidose), puisque certains patients présentent une stéatorrhée persistante malgré la supplémentation en enzymes pancréatiques. Enfin, pour la sécrétion au pôle basolatéral, nous avons étudié une autre maladie génétique : la rétention de chylomicrons puisqu'elle se caractérise par un défaut majeur de sécrétion des lipoprotéines entérocytaires et qu'il s'agit d'une maladie orpheline peu étudiée jusqu'à présent.

**Figure 1 Travail de recherche en 3 volets**



Légende : Étude d'un aspect spécifique pour chacune des trois étapes de l'absorption intestinale des lipides.

## II) PÔLE APICAL : ÉTUDE DE LA RÉGULATION DE L'ABSORPTION INTESTINALE DU CHOLESTÉROL DANS LE MODÈLE CELLULAIRE HUMAIN CACO2

### 2-1) INTRODUCTION

Jusqu'à récemment l'absorption intestinale du cholestérol était considérée comme résultant d'un phénomène de diffusion passive. Cependant, les arguments en faveur de l'implication de protéines dans cette absorption apparaissent de plus en plus nombreux. Les taux de diffusion du cholestérol ont été la plupart du temps mesurés dans des modèles simplifiés comme les vésicules de membranes de bordure en brosse qui sont très éloignées de la complexité des entérocytes in vivo. La régulation des flux entrants et sortants est une propriété partagée par la très grande majorité des molécules biologiques. Il paraît très peu probable que le cholestérol fasse exception à cette règle, compte tenu de son importance vitale pour le métabolisme cellulaire. De plus, le taux de diffusion rapide des lipides à travers les membranes biologiques est peu compatible avec le métabolisme cellulaire qui peut fluctuer grandement selon l'état dans lequel se trouve l'entérocyte (à jeun, en période post prandiale, en phase d'agression virale ou inflammatoire...). A ces raisons d'ordre général, s'ajoutent des arguments épidémiologiques et expérimentaux. La variabilité de l'absorption intestinale du cholestérol permet de supposer qu'il existe des mécanismes de régulation, et donc aussi probablement des transporteurs régulables. En effet, l'absorption intestinale du cholestérol varie grandement selon les espèces ; ainsi parmi 7 souches de souris testées, le coefficient d'absorption du cholestérol peut varier du simple au double (de 30% à presque 70%) [Schwartz 2001]. De plus, il existe une variabilité interindividuelle importante ; chez l'homme, l'efficacité moyenne d'absorption du cholestérol est de 50%, mais peut varier de 25% à 85% selon les individus [Miettinen 1990] [Sehayek 1998] [Sudhop 2002]. L'origine ethnique influence aussi l'absorption intestinale du cholestérol : les sujets américains d'origine africaine ont une absorption significativement plus efficace que les caucasiens ( $63 \pm 12\%$  vs  $55 \pm 12\%$ ,  $p=0.027$ ) [Bosler 1999]. D'autre part, l'absorption intestinale du cholestérol survient préférentiellement au niveau de l'intestin grêle proximal et dans les entérocytes matures au sommet des villosités [Schwartz 1998] ; cette spécialisation implique l'existence de molécules particulières dans ces sites. Le traitement

de vésicules formées à partir de membranes de bordure en brosse de lapin par des protéases diminue l'absorption du cholestérol par ces vésicules [Compassi 1995]. De plus, le surnageant recueilli après cette protéolyse rend possible l'échange de cholestérol entre vésicules unilamellaires de phospholipides [Compassi 1995]. Ce résultat suggère donc l'existence de protéines facilitatrices à la surface de la bordure en brosse. L'intestin absorbe de manière préférentielle le cholestérol comparativement aux phytostérols (coefficient d'absorption moyen chez l'homme : 50% versus 5%) [Salen 1970] [Sylvén 1969], ces molécules étant pourtant structurellement très proches. La perte de cette sélectivité d'absorption provoque une maladie autosomique récessive : la sitostérolémie dont nous reparlerons ultérieurement. Enfin pour conclure, l'Ezétimibe est une molécule qui inhibe spécifiquement l'absorption intestinale des stérols ; elle n'agit pas à des doses stoechiométriques (chaque molécule du composé L-166,143 bloque l'entrée de 500 molécules de cholestérol [Hernandez 2000]) et son action varie selon les espèces comme résumé dans le tableau ci-dessous.

Toutes ces raisons plaident donc pour un transport du cholestérol qui dépendrait, en partie du moins, de protéines de transport.

**Tableau I Variabilité selon les espèces du niveau de l'absorption intestinale du cholestérol en réponse à l'Ezétimibe**

Espèce	Inhibiteur/dose mg/kg/j	Régime	↓ Absorption intestinale Chol (%)	Référence
Humain	Ezet / 0.1	?	↓ 55%	Sudhop 2002;106:1943
Singe	SCH48461 / 3	Riche Chol (0.25%)	↓ 70%	Salisbury 1995;115:45
Rongeurs	Ezet / 1-10	?	↓ 92-96%	Van Heek 1997.238/157 Van Heek 2001;134:409
Hamster	SCH48461 / 10	Riche Chol (0.25%)	↓ 68%	Salisbury 1995;115:45
Rat	SCH48461 / 10	Riche Chol (0.25%)	↓ 95%	Salisbury 1995;115:45

## 2-2) PROTÉINES MEMBRANAIRES CANDIDATES

Des protéines de la membrane apicale entérocytaire ayant une affinité élevée pour les stérols et/ou les inhibiteurs de l'absorption du cholestérol [Compassi 1995] [Kramer 2003] ont été isolées mais pas toujours caractérisées, leur identification est un défi majeur pour la compréhension des mécanismes de l'absorption intestinale du cholestérol.

L'isolation et la purification des protéines libérées par protéolyse de vésicules de membranes de bordure en brosse de lapin a permis d'isoler deux protéines principales ayant des poids moléculaires de 57kDa et 96kDa [Compassi 1995]. Les anticorps générés à partir de ces protéines sont capables d'inhiber partiellement l'absorption de cholestérol avec le modèle des vésicules. Par ailleurs, le marquage photoréactif de cholestérol et d'un dérivé de l'Ezétimibe a permis d'isoler deux autres protéines de la bordure en brosse de lapin : une de 80kda située dans le grêle proximal qui fixe le cholestérol ou les phytostérols de manière compétitive, mais n'interagit pas avec l'Ezétimibe ni les sels biliaires ; l'autre de 145kDa

qui n'a d'affinité que pour le dérivé de l'Ezétimibe et qui n'interagit pas avec les stérols ni les sels biliaires [Kramer 2003]. Ces deux protéines sont intra membranaires et monomériques puisque résistantes aux différents traitements dénaturants testés. Un analogue de l'Ezétimibe radioactif se fixe au sommet apical des villosités du grêle proximal de hamster et bloque précocement l'absorption du cholestérol dès l'étape d'absorption [Detmers 2000].

Nous allons maintenant passer en revue les différentes protéines candidates pouvant jouer un rôle de transporteur intestinal du cholestérol, puis nous les comparerons à ces protéines isolées à partir de la bordure en brosse qui ne sont pas encore complètement caractérisées. Nous avons centré nos expériences sur le transporteur SR-BI pour des raisons que nous détaillerons dans le chapitre suivant.

### **2-2-1) Scavenger receptor class B, type I (SR-BI)**

SR-BI appartient à la famille des récepteurs scavenger (éboueurs ou nettoyeurs) de la famille des protéines CD36. Sa principale fonction étudiée est celle de récepteur de surface hépatocytaire capable non seulement de se lier aux lipoprotéines HDL, mais aussi de promouvoir l'entrée de cholestérol ester vers la cellule ainsi que la sortie de cholestérol libre vers les HDL. Il s'exprime majoritairement dans le foie et les organes stéroïdiens, mais on le retrouve aussi dans l'entérocyte que ce soit dans les cellules Caco2, chez l'animal ou chez l'homme [Cai 2001] [Lobo 2001] [Levy 2003]. Sa distribution concorde avec les sites préférentiels d'absorption des lipides: il est majoritairement présent dans l'intestin grêle proximal, au sommet des villosités et au pôle apical des entérocytes [Levy 2003]. Cependant, chez la souris sa localisation entérocytaire varie selon le segment d'intestin grêle étudié : dans le duodénum il est majoritaire au pôle apical, dans le jéjunum il est en quantité égale aux deux pôles cellulaires, alors que dans l'iléon il est faiblement exprimé en apical comme en basolatéral [Cai 2001]. De plus chez le cochon, la prise alimentaire de lipides induit une endocytose de SR-BI depuis le pôle apical de la bordure en brosse vers des gouttelettes lipidiques intra-cytoplasmiques liées à la clathrine [Hansen 2003] et non pas à la cavéoline comme c'est le cas dans l'hépatocyte [Malerod 2002], démontrant ainsi que le fonctionnement de SR-BI est tissu dépendant.

SR-BI est capable de lier non seulement les lipoprotéines (HDL, LDL et VLDL natifs ou modifiées), mais aussi des molécules très différentes entre elles dont plusieurs se retrouvent dans la lumière intestinale comme le cholestérol, les oxystérols, les phospholipides anioniques, les acides biliaires ou les cellules apoptotiques [Rigotti 1995][Murao 1997] [Jian 1998]. Rappelons que la muqueuse intestinale présente un taux élevé de renouvellement cellulaire qui implique des processus d'apoptose et de desquamation importants.

Son rôle précis dans l'absorption intestinale du cholestérol reste débattu. Les premières études faites sur des vésicules de bordure en brosse d'intestin grêle proximal de lapin démontrent que SR-BI facilite l'absorption du cholestérol [Hauser 1998]. Des résultats récents vont également dans ce sens : si des cellules n'exprimant pas SR-BI et absorbant peu le cholestérol (cellules rénales) sont transfectées avec le gène humain de SR-BI, alors elles acquièrent les caractéristiques d'absorption de l'entérocyte [Van Bennekum 2005]. Ces résultats sont confirmés par les travaux de notre laboratoire : la suppression moléculaire ou biochimique de SR-BI au niveau entérocytaire diminue la captation du cholestérol libre, que ce soit par transfection de cellules Caco2 avec son c-DNA antisens, par l'ajout d'anticorps anti-SR-BI ou par sa neutralisation par de l'apo-AI purifiée ou complexée à des HDL [Levy 2003] [Hauser 1998] [Werder 2001]. Ces résultats s'opposent à ceux d'une autre équipe qui retrouvent une absorption par les cellules Caco2 uniquement à partir de micelles sur-saturés en cholestérol (1.5mmol/L), cette incubation s'accompagnant d'une baisse du niveau de SR-BI ; alors que des micelles sans cholestérol entraînent un efflux de cholestérol depuis l'entérocyte et une augmentation d'expression de SR-BI. De plus, l'incubation des entérocytes avec des anticorps bloquants ou de courts RNA inhibiteurs spécifiques de SR-BI, entraîne une augmentation de cette protéine [Cai 2004]. La conclusion des auteurs est que SR-BI ne jouerait pas de rôle direct dans l'absorption intestinale du cholestérol mais plutôt dans l'efflux de cholestérol vers la lumière. Il semble difficile de concilier les études de Levy et Cai qui utilisent le même modèle cellulaire et des méthodologies proches (inactivation pré et post traductionnelle de SR-BI). Cependant, la différence de concentration entre les micelles utilisées dans les deux études (cf tableau ci-dessous) pourrait interférer avec l'absorption du cholestérol.

**Tableau II Composition des micelles utilisées par Levy et Cai dans leurs publications**

	Cholestérol	Taurocholate	Acide gras	Phosphatidylcholine
Levy 2004	0.1 mmol/L	6.6 mmol/L	Acide oléique 1 mmol/L	0.6 mmol/L
Cai 2004	0, 0.5, 1.5 mmol/L	9.7 mmol/L	aucun	6.5 mmol/L

En effet, les phospholipides peuvent se lier à BI et être ainsi absorbés [Hauser 1998]. De plus, la sphingomyéline peut diminuer l'absorption entérocytaire du cholestérol [Nyberg 2000] [Eckhardt 2002] [Noh 2004]. Donc, la concentration élevée de phosphatidylcholine dans les micelles de Cai pourrait gêner l'absorption du cholestérol par SR-BI. De plus, il existe aussi un phénomène de diffusion passive qui permet à l'entérocyte de capter le cholestérol présent dans la lumière intestinale selon un gradient de concentration. Ainsi, la sur-saturation des micelles à 1.5 mmol/L est susceptible de favoriser l'entrée du cholestérol dans l'entérocyte même si SR-BI n'est plus fonctionnel.

L'invalidation du gène de SR-BI induit une athérosclérose sévère chez la souris [Rigotti 1997]. Au niveau digestif, cette invalidation diminue la sécrétion biliaire de cholestérol, réduit le cholestérol intraentérocytaire [Trigatti 1999], mais ne modifie pas l'absorption intestinale du cholestérol [Altmann 2002] [Wang 2002], ou même l'augmente significativement [Mardones 2001]. Par contre, la surexpression de SR-BI spécifiquement au niveau intestinal augmente l'absorption du cholestérol [Bietrix 2006].

#### • Conclusion

Ces résultats suggèrent que i) SR-BI est impliqué dans l'absorption intestinale du cholestérol mais que son expression n'est pas indispensable à ce processus ; il participerait à 25% de l'absorption du cholestérol par l'intestin grêle [Werder 2001] ; ii) il pourrait jouer des rôles différents selon les segments intestinaux : captation du cholestérol intestinal par l'intestin proximal mais influx à partir des lipoprotéines par l'intestin grêle distal ; iii) SR-BI pourrait être aussi impliqué dans l'efflux de cholestérol vers la lumière intestinale ; iiiii) les constituants de la bile, dont le cholestérol biliaire, seraient de puissants régulateurs de son expression entérocytaire tant au niveau transcriptionnel que post transcriptionnel.



Enfin, les données contradictoires entre les études sur le rôle précis de SR-BI pourraient indiquer qu'il joue plusieurs rôles dans l'absorption intestinale du cholestérol ou que sa régulation varie selon les conditions expérimentales. Ceci explique probablement l'absence de revue de littérature faite spécifiquement sur le rôle de SR-BI dans l'absorption intestinale du cholestérol malgré l'existence de plus d'une dizaine d'articles sur le sujet.

### 2-2-2) CD36

CD36 partage 30% d'homologie avec SR-BI. Il est retrouvé dans le tractus digestif humain au niveau du pôle apical des entérocytes du duodénum et du jéjunum. Cependant, contrairement à SR-BI, il n'est pas détecté dans l'iléon et le côlon [Lobo 2001] ; ce qui explique son absence dans les cultures Caco2 qui dérivent d'une lignée cellulaire de carcinome colique. Il partage plusieurs ligands communs avec SR-BI dont les LDL oxydées, les phospholipides anioniques et les cellules apoptotiques [Acton 1994]. Le rôle de CD36 dans l'absorption intestinale du cholestérol reste incertain. Ce transporteur semblerait plutôt jouer un rôle dans l'absorption intestinale des acides gras. En effet, les souris CD36(-/-) ont une absorption intestinale de cholestérol comparable à celle des souris contrôles [Goudriaan 2002], mais la sécrétion des chylomicrons est perturbée de même que la clearance plasmatique de ces lipoprotéines, ce qui renforce l'idée d'une implication de CD36 préférentiellement dans le métabolisme des acides gras [Drover 2005]. Pourtant, une étude récente indique que, comme pour SR-BI, des cellules n'exprimant pas normalement CD36 (cellules rénales COS-7) sont capables après transfection du gène humain de ce transporteur d'absorber le cholestérol libre et le cholestérol esterifiée avec la même efficacité que des entérocytes ou des vésicules de membrane de bordure en brosse, de plus cet effet positif est annulé par l'Ezétimibe [Van Bennekum 2005]. Ces résultats suggèrent donc que CD36, comme SR-BI, est capable par lui-même de faciliter l'absorption intestinale du cholestérol, pouvant être responsable jusqu'à 30% de cette absorption [Werder 2001], mais que sa présence n'est pas obligatoire.

### 2-2-3) ATP binding cassette class A type 1 (ABCA1)

ABCA1 appartient à la famille des ATP binding cassette qui regroupe plusieurs dizaines de protéines transmembranaires impliquées dans le transport de plusieurs types de lipides comme les stérols, les phospholipides et les acides biliaries [Dean 2001] [Schmitz 2000]. Sa mutation est responsable de la maladie de Tangier qui se caractérise par l'altération du métabolisme des HDL et la survenue précoce d'une athérosclérose.

Dans le tractus digestif, les niveaux d'ARNm et de protéines sont plus élevés dans l'estomac et le petit intestin [Wellington 2002]. Au niveau cellulaire, l'ARNm est retrouvé surtout dans les cryptes alors que la protéine est présente tout le long de la villosité [Wellington 2002], démontrant ainsi que ce transporteur est stable tout au long du cycle cellulaire de l'entérocyte.

Le rôle hypothétique d'ABCA1 dans l'entérocyte pourrait être de favoriser l'efflux du cholestérol soit vers la lumière intestinale, soit par le pôle basolatéral vers les lipoprotéines circulantes, ou éventuellement les deux à la fois. Les conséquences de l'invalidation d'ABCA1 sur l'absorption intestinale du cholestérol sont très variables selon les études : diminution pour certains auteurs avec une amplitude qui varie selon les espèces (-13% chez la souris contre -80% chez le poulet) [Drobnik 2001]; augmentation pour d'autres de 10% à 30% selon le type de diète [McNeish 2000] ; enfin, aucune variation de l'absorption intestinale n'est notée ni chez les sujets avec maladie de Tangier, ni chez une espèce animale porteuse naturellement d'une mutation du gène d'ABCA1 (poulet) [Mulligan 2003]. L'implication de ABCA1 dans l'efflux de cholestérol au pôle basolatéral est suggérée par : i) l'augmentation d'expression de ABCA1 au pôle basolatéral des Caco2 après stimulation par LXR/RXR [Ohama 2002], ii) l'augmentation de l'efflux de cholestérol par ce pôle [Murthy 2002], et enfin iii) par l'utilisation d'un modèle animal de la maladie de Tangier (le poulet WHAM [Attie 2002]) qui absorbe normalement le cholestérol marqué, mais accumule du cholestérol estérifié dans son intestin et fait chuter de 80% la sécrétion de cholestérol dans la circulation systémique [Mulligan 2003].

Par conséquent, ABCA1 semble responsable d'efflux de cholestérol au pôle basolatéral de l'entérocyte ; sa capacité à rejeter du cholestérol vers la lumière intestinale reste à confirmer.

#### 2-2-4) ABCG5 et ABCG8

Ces deux autres transporteurs ont été découverts récemment [Berge 2000] [Lee 2001]. Leur structure est semblable à celle des autres ABC transporteurs, mais leurs expressions respectives semblent étroitement coordonnées. En effet, les deux gènes sont orientés tête-bêche et séparés par le même promoteur [Remaley 2002]. De plus, certains facteurs de transcription sont communs à ces deux transporteurs, tels que LXR ou LXR-1 [Repa 2002] [Freeman 2004]. Enfin, leur co-expression est indispensable pour leur transport vers la surface apicale des hépatocytes sous forme d'hétérodimère [Graf 2003]. Cependant, l'inactivation d'ABCG8 seulement n'empêche pas la présence d'ABCG5 au pôle apical de l'entérocyte [Klett 2004]. La distribution de leur expression est identique selon les tissus de l'organisme [Remaley 2002]. Néanmoins, au niveau cellulaire, ils ne sont pas complètement contigus. Ainsi, dans des lipides d'intestin humain ABCG5 et ABCG8 sont détectés à la surface apicale des entérocytes. Cependant, au niveau cellulaire, la distribution d'ABCG5 apparaît plus diffuse, alors qu'ABCG8 est exprimé presque exclusivement au pôle apical de l'entérocyte [Klett 2004]. L'enrichissement en cholestérol de l'alimentation augmente l'expression intestinale de ces deux protéines [Berge 2000].

Les variations polymorphiques des gènes d'ABCG5 et d'ABCG8 peuvent influencer l'efficacité de l'absorption intestinale du cholestérol [Gylling 2004] [Miwa 2005]. De plus, la mutation de l'un de ces deux gènes suffit pour provoquer chez l'homme une maladie autosomique récessive grave : la sitostérolémie (MIM 210250) [Berge 2000] [Lee 2001] [Lu 2001]. Cette maladie se caractérise par une augmentation importante de l'absorption intestinale des phytostérols principalement, mais aussi du cholestérol, associée à une diminution de sécrétion biliaire de ces stérols [Lutjohann 1995]. Cependant, chez certains patients, l'absorption intestinale est normale. Aucune tentative de corrélation génotype / phénotype pour la capacité absorptive intestinale n'a été faite à notre connaissance. L'augmentation des taux de phytostérols et de cholestérol entraîne une athérosclérose précoce. L'inactivation des gènes de ces transporteurs est responsable des mêmes anomalies chez la souris, bien que les taux d'absorption intestinale soit assez peu perturbés [Yu 2002] [Plosch 2004] [Yu 2004]. Par contre, leur surexpression diminue l'absorption intestinale du cholestérol de moitié [Yu 2002]. L'influence de ces

modifications génétiques sur l'absorption intestinale du cholestérol est résumée dans le tableau ci-dessous.

**Tableau III Variations de l'absorption du cholestérol en fonction des modifications des gènes d'ABCG5 et ABCG8**

Type de modification génétique	Variation de l'absorption intestinale du cholestérol	
	ABCG5	ABCG8
<b>Animal</b> <b>Invalidation</b>	[Plosch 2004]	<b>Non évalué</b> [Klett 2004]
	(ABCG5 + G8) [Yu 2002]; [Yu 2003]	
<b>Surexpression</b>	↑ 50% (ABCG5 + G8) [Yu 2002]	
<b>Humain</b> <b>Mutation (sitostérolémie)</b>	↑ ou →	↑ ou →
<b>Polymorphismes</b>	→ [Miwa 2005]	↓ D19H ; T400K [Gylling 2004]
		→ [Miwa 2005]
		↑ M429V [Miwa 2005]

Soulignons que si ABCG5 et ABCG8 sont capables d'exporter les stérols vers la lumière intestinale lorsqu'ils coopèrent sous forme d'hétérodimère, chacune de ces protéines pourrait aussi jouer d'autres rôles individuellement au niveau de l'intestin. En effet, dans le foie de souris, les invalidations d'ABCG5 ou d'ABCG8 seulement, ou des deux ensemble, induisent chacune des modifications particulières dans la composition biliaire [Plosch 2004] [Klett 2004]. D'autre part, la compartimentation différente de ces

deux protéines dans l'entérocyte et la possibilité pour ABCG5 d'être transportée au pôle apical entérocytaire malgré l'invalidation d'ABCG8 sont des arguments en faveur de l'existence d'autres fonctions [Klett 2004].

En conclusion, bien que ABCG5 et ABCG8 soient essentielles pour réguler l'efflux des phytostérols vers la lumière intestinale, et qu'ils jouent probablement un rôle aussi dans l'efflux du cholestérol, ils ne semblent pas indispensables au contrôle de l'absorption intestinale du cholestérol dans les conditions physiologiques.

### **2-2-5) Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1)**

L'identification de NPC1L1 a été possible grâce à son rôle dans l'absorption intestinale du cholestérol [Altmann 2004] [Davis 2004]. Cette protéine partage 50% d'homologie avec la protéine Niemann-Pick C1 (NPC1) dont la mutation est responsable de la maladie de Niemann-Pick. Cette maladie autosomique récessive se caractérise par des anomalies du trafic intracellulaire du cholestérol provoquant son accumulation dans les lysosomes mais l'absorption intestinale du cholestérol est normale chez ces patients.

NPC1L1 est surtout exprimé dans l'intestin. Son expression diminue progressivement depuis l'intestin grêle proximal jusqu'à l'iléon. Au niveau entérocytaire, ce transporteur est localisé au pôle apical [Altmann 2004]. C'est une protéine de 165kDa richement glycosylée dont le poids moléculaire chute à 140kDa une fois déglycosylée.

L'invalidation du gène de NPC1L1 chez la souris diminue dramatiquement l'absorption intestinale du cholestérol (jusqu'à 70%) [Altmann 2004]. Le mécanisme exact par lequel NPC1L1 favorise l'entrée du cholestérol dans l'entérocyte demeure inconnu. Cependant, il est démontré que ce mécanisme emprunte la voie de l'Ezétimibe, une molécule capable de diminuer également de 70% l'absorption intestinale du cholestérol. En effet, l'Ezétimibe n'entraîne pas de diminution supplémentaire de l'absorption du cholestérol chez la souris NPC1L1 (-/-). Bien que plusieurs données suggèrent que l'Ezétimibe se fixe à NPC1L1 [Garcia-Calvo 2005], aucune liaison directe n'a pu être formellement démontrée jusqu'à présent. Cependant, comme nous l'avons déjà mentionné,

une protéine de 145kDa fixant spécifiquement l'Ezétimibe (145kDa) a été isolée de la bordure en brosse [Kramer 2000] [Kramer 2003].

En conclusion, si l'importance de NPC1L1 dans l'absorption intestinale du cholestérol est clairement établie, son mécanisme d'action précis demeure incompris. Un rôle indirect via le contrôle du transport intraentérocytaire du cholestérol absorbé peut être proposé. En effet, nous avons déjà souligné l'homologie qui existe entre cette protéine et NPC1, ou encore avec d'autres protéines impliquées dans le trafic vésiculaire intracellulaire et qui contiennent un sterol-sensing domaine comme HMG CoA-R et SREBP cleavage activating protein (SCAP) dont nous parlerons plus loin [Ko 2001] [Nohturfft 2000] [Strutt 2001].

#### **2-2-6) CD13**

Récemment, la protéine cible de l'Ezétimibe aurait été caractérisée au niveau de la bordure en brosse : l'aminopeptidase N, aussi appelée antigène CD13 [Kramer 2005]. Sa spécificité de liaison pour l'Ezétimibe avait déjà été documentée par cette même équipe, sans qu'il soit alors possible de caractériser cette protéine de 145kDa [Kramer 2000] [Thiele 2000] [Kramer 2003]. Le CD13 est une exopeptidase fixée à la surface externe des cellules, grâce à un domaine transmembranaire et une courte séquence N terminale intra cytoplasmique. La molécule monomérique glycosylée a un poids moléculaire de 160kDa, elle se retrouve au niveau membranaire le plus souvent sous forme d'homodimère, cette dimérisation ayant lieu dans le réticulum endoplasmique avant son exportation à l'appareil de Golgi pour y subir les dernières glycosylations. Sa distribution est assez large dans l'organisme avec cependant une localisation préférentielle dans les bordures en brosses (intestin, rein, placenta) et la membrane cellulaire des différents leucocytes. Elle joue de multiples fonctions : dégradation des peptides et internalisation des acides aminés au niveau de la bordure en brosse ; clivage de peptides circulants (neuropeptides) pour les activer ou les inactiver ; contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire ; ou encore participation à la transduction de signaux cellulaires [Riemann 1999]. Son rôle dans l'absorption intestinale du cholestérol reste encore énigmatique. On peut toutefois faire un rapprochement avec son implication dans le phénomène d'endocytose de certains virus

[Yeager 1992] [Delmas 1992] [Söderberg 1993]. En effet, le coronavirus peut se fixer directement au CD13, provoquant alors un recrutement d'autres molécules CD13. Cet enrichissement membranaire localisé est associé à une augmentation du taux d'endocytose des particules virales possiblement via la caveoline 1 et l'activation de filaments d'actine [Nomura 2004]. L'appauvrissement en cholestérol de la membrane cellulaire n'inhibe pas la fixation du virus mais bloque l'endocytose, permettant de supposer que les rafts (microdomaines membranaires) jouent un rôle important dans le fonctionnement de CD13 [Nomura 2004] [Navarrette 2000]. En effet, CD13 est préférentiellement localisé au niveau des rafts dans différents types tissulaires comme la bordure en brosse, ou les synoviocytes [Nomura 2004] [Riemann 2001]. De plus, au niveau ultrastructural, CD13 est retrouvée associée aux cavéoles dont l'implication dans l'absorption du cholestérol est bien démontrée dans certains tissus. C'est pourquoi nous aborderons au chapitre 2-4-2) le rôle que pourrait jouer le complexe Cavéoline 1-Annexine 2 dans l'inhibition de l'absorption du cholestérol. Enfin, comme pour NPC1L1, la localisation cellulaire de CD13 dépend du pool intracellulaire de cholestérol : lors d'une déplétion en cholestérol par la cyclodextrine, l'expression du récepteur CD13 augmente à la surface de la cellule, alors qu'il est majoritairement présent dans les compartiments intracellulaires quand la cellule est riche en cholestérol [Hansen 2003-b] [Danielsen 2003].

En conclusion, le CD13 pourrait être un intermédiaire important entre l'Ezétimibe et le transporteur NPC1L1. Cependant, les mécanismes impliqués sont actuellement incompris et nécessitent des travaux de recherche complémentaires. On peut s'étonner de l'absence de publication sur ce sujet depuis plus d'une année laissant supposer que les mécanismes sont particulièrement complexes ou que l'implication effective de CD13 comme récepteur à l'Ezétimibe est douteuse.

- **Conclusion**

Certains transporteurs candidats, comme SR-BI ou CD36, sont capables de faciliter l'absorption entérocytaire du cholestérol dans des modèles cellulaires. Cependant, leur invalidation génique n'entraîne aucune modification de l'absorption intestinale. D'autres, comme ABCA1, ABCG5 et ABCG8, sont impliqués dans des maladies génétiques où existe une altération de l'absorption intestinale du cholestérol. Pourtant, leur invalidation ne

compromet pas non plus cette fonction dans les modèles animaux. Ces discordances peuvent refléter la complexité des mécanismes qui régulent l'absorption intestinale du cholestérol, la baisse d'un transporteur pouvant être totalement compensée par l'augmentation d'un autre ou par la mise en place de mécanismes compensateurs dans la cellule elle-même (synthèse du cholestérol) ou dans les autres organes (synthèse et sécrétion biliaire par exemple). Nous aborderons cette question dans le prochain paragraphe.

Parmi ces protéines candidates que nous venons de décrire, seule NPC1L1 et CD13 possèdent des caractéristiques proches de celles des protéines isolées à partir des membranes de bordure en brosse (cf paragraphe 1-2) : poids moléculaires proches, protéine pouvant être monomérique. Cependant, la liaison directe de l'Ezétimibe au NPC1L1 (forme longue) n'a pas pu être démontrée et il n'y a pas eu d'autres publications confirmant la liaison de CD13 avec l'Ezétimibe depuis plus d'une année. Il s'agit donc d'un champ d'exploration essentiel pour permettre d'avancer dans la compréhension des mécanismes d'action de l'Ezétimibe.

## **2-3) VOIES DE RÉGULATION DE CES TRANSPORTEURS AU NIVEAU ENTÉROCYTAIRE**

### **2-3-1) Différentes voies impliquées**

- **Sterol regulatory element binding proteins (SREBP)**

Les SREBP sont des protéines retrouvées sur la membrane de nombreuses cellules dont l'entérocyte humain [During 2005]. Il existe trois SREBP différentes : d'une part SREBP-1a et 1c, des isoformes issus du même gène, et d'autre part SREBP-2 produit par un gène différent [Hua 1993] [Yokoyama 1993]. Ces protéines agissent comme facteurs de transcription capables d'activer plus d'une trentaine de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol et des lipides (cf tableau ci-dessous).

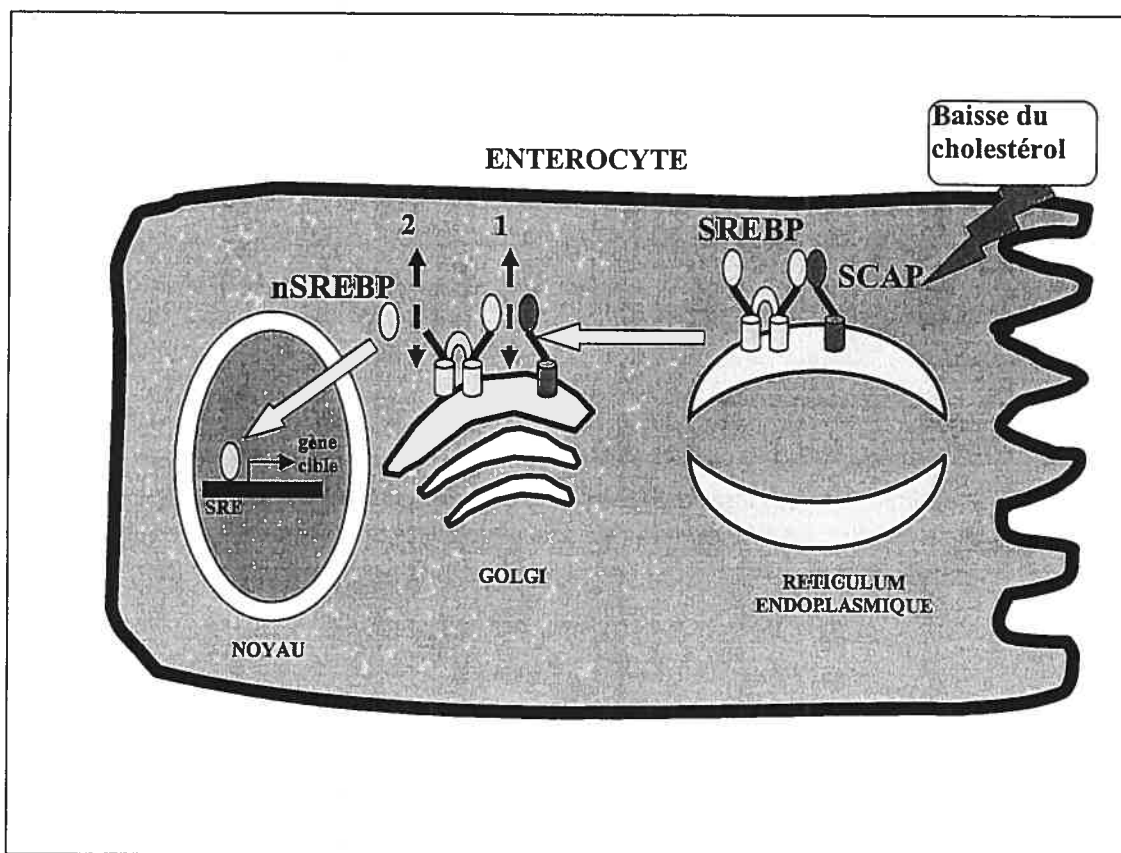


**Tableau IV Principaux gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol et activés par SREBP**

Gène transactivé par SREBP	Effet métabolique obtenu
ATP citrate lyase	↑ synthèse du chol
Acetoacetyl CoA thiolasa	
HMG CoA Synthase	
HMG CoA Reductase	
Mevalonate kinase	
Phosphomevalonate kinase	
Mevalonate PP decarboxylase	
Geranylgeranyl pyrophosphate synthase	
IPP isomerase	
Farnesyl diphosphate synthase	
Squalène synthase	
CYP 51	
Lanosterol synthase	
7 dehydrocholesterol reductase	
Récepteur LDL	↑ absorption du cholestérol

L'activation de SREBP est résumée dans la figure ci-dessous. SREBP est synthétisée sous forme d'un précurseur associé à la membrane du réticulum endoplasmique et du noyau, où elle est liée à une protéine qui lui sert de « sensor » et de chaperonne pour son activation : la SREBP cleavage activating proteine (SCAP). Cette protéine peut être activée par les stérols puisqu'elle comporte un sterol sensory domain (SSD). En présence d'une concentration élevée de stérol, cet hétérodimère reste prisonnier du réticulum ; mais lorsque la concentration baisse, la SCAP accompagne la SREBP vers l'appareil de Golgi pour y subir une protéolyse activatrice. La forme mature alors obtenue (nuclear SREBP ou nSREBP) est transloquée dans le noyau pour se fixer au sterol response element (SRE) situé dans les régions promotrices des gènes cibles. nSREBP ne peut influencer l'expression génique qu'en présence de cofacteurs transcriptionnels. Il est important de noter que la protéolyse activatrice peut être régulée différemment selon le type de SREBP. Ainsi dans le foie, les statines réduisent l'activation des SREBP-1 mais augmentent celle de SREBP-2. [Sheng 1995]. De même, les acides gras polyinsaturés inhibent l'activation de SREBP-1 mais n'ont pas d'effet sur SREBP-2 [Yahagi 1999].

**Figure 2 Mécanisme d'activation de SREBP**



Légende : Lorsque la quantité de cholestérol diminue dans la cellule, le SCAP transporte le SREBP depuis le RE jusqu'au Golgi, deux protéases vont agir succesivement pour séparer le SREBP du SCAP, puis le domaine N terminal de SREBP, aussi appelé nSREBP nuclear SREBP (nSREBP), qui va alors pouvoir entrer dans le noyau, se lier au « sterol response element » (SRE) dans la région promotrice des gènes cibles et activer leur transcription.

SREBP contrôle les voies métaboliques de la synthèse du cholestérol, des acides gras, des triglycérides, des phospholipides et de la lipogénèse. Il module l'absorption cellulaire du cholestérol, notamment en favorisant la transcription du gène du récepteur des LDL. Ce dernier est présent au pôle basolatéral des entérocytes humains et dans les Caco2 et ses niveaux d'ARNm sont comparables dans ces deux types de cellules intestinales [Sviridov 2003]. Au niveau intestinal, SREBP-1a ne jouerait qu'un rôle très accessoire dans le contrôle du métabolisme du cholestérol [Field 2001]; SREBP-1c contrôlerait plutôt la synthèse des acides gras alors que SREBP-2 serait impliqué plus particulièrement dans la synthèse du cholestérol [Brown 1997]. Ainsi dans le foie, la surexpression de SREBP-2 induit l'expression de toutes les enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol,

notamment de l'HMGCoA-R [Sakakura 2001] [Horton 1998]. Inversement, l'inactivation dirigée qui permet de supprimer l'expression de SREBP-1 et 2 uniquement à l'âge adulte (l'inactivation complète de SREBP-2 est létale), entraîne une baisse de 70 à 80% du cholestérol et des acides gras dans le foie de ces souris [Horton 2002]. Il est donc logique que dans l'intestin grêle le SREBP-2 soit exprimé majoritairement là où les apports en cholestérol sont les plus faibles : i) dans l'iléon où l'absorption du cholestérol est limitée [Sylvén 1970] ; ii) dans les cellules cryptiques puisque l'absorption a lieu au sommet des villosités tandis que les cellules prolifératives de la crypte ont des besoins élevés en cholestérol pour l'élaboration des membranes [Field 2001]. Dans l'intestin humain, le niveau d'expression du gène de SREBP-1 semble plus élevé que celui de SREBP-2. Cette prédominance de SREBP-1 est retrouvée aussi chez le hamster où de plus la forme SREBP-1c est 3 à 4 fois plus importante que la SREBP-1a [During 2005] [Field 2001]. Enfin, la quantité d'ARNm de SREBP-2 est inversement corrélée à la quantité de cholestérol absorbé par l'entérocyte, l'influx de cholestérol diminuant la transcription du gène de SREBP-2 [Field 2001]. Le promoteur du gène de SREBP-2 comporte bien un « sterol response element » expliquant cette régulation [Sato 1996]. De manière surprenante, la même équipe rapporte qu'une diète enrichie en cholestérol ne diminue que faiblement la quantité de SREBP-2 dans l'intestin de hamster. La raison de cette absence d'inhibition n'est pas clairement expliquée [Field 2001].

En conclusion, une carence de cholestérol est susceptible non seulement d'augmenter l'expression de SREBP-2 (régulation transcriptionnelle) mais aussi de promouvoir la protéolyse activatrice (régulation post transcriptionnelle) comme nous l'avons décrit précédemment. Par contre, un excès d'apport ne diminue que peu son ARNm sans que cela soit encore bien expliqué. D'autre part, SREBP-1a et 1c ne semblent pas contrôler la synthèse du cholestérol.

- **Retinoic R receptor (RXR)**

Le principal ligand de RXR est l'acide rétinoïque tout-trans. Ce récepteur nucléaire est le ligand obligatoire de tous les autres membres de la super famille des récepteurs nucléaires dits orphelins. Les trois formes (RXR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) sont transcrits dans l'entérocyte humain avec des taux assez comparables entre eux [During 2005].

- **Liver X receptor (LXR)**

On dénombre actuellement deux formes de LXR : LXR $\alpha$  abondamment présent dans l'intestin [Willy 1995], et LXR $\beta$  qui a une répartition plus ubiquitaire [Repa 2000]. Ces facteurs de transcription sont déjà attachés à l'ADN au niveau de l'élément de réponse (LXR element response) situé dans le promoteur des gènes cibles ; ils existent sous forme d'hétérodimère RXR. De plus, ils sont inactivés par la présence de cofacteurs répresseurs. La liaison de leur ligand (ou de celui de RXR) va détacher les corépresseurs, activer LXR et entraîner la lecture du gène régulé. Dans l'intestin humain, les niveaux d'ARNm de RXR sont relativement élevés. Les activateurs les plus puissants de LXR sont des molécules produites au cours du métabolisme du cholestérol, comme les oxystérols. Par contre, le cholestérol libre ou estérifié ne peut pas se lier directement à LXR. Enfin, les phytostérols sont également des ligands activateurs de LXR [Quinet 2004] [Kaneko 2003].

Les gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol qui sont transactivés par LXR lors d'augmentation du cholestérol sont résumés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau V Gènes transactivés par LXR et impliqués dans le métabolisme du cholestérol**

Voie métabolique impliquée	Gène transactivé par LXR	Effet métabolique obtenu
Transport des stérols	ABCA1	Efflux chol en basolatéral (HDL) $\pm$ vers lumière intestinale
	ABCG1	?
	ABCG5/G8	Efflux chol vers lumière intestinale
Métabolisme des lipoprotéines	ApoA1	Sécrétion chol via HDL
	ApoE	Captation lipoprotéines
	CETP	Transfert chol ester - HDL
	PLTP	Transfert chol ester - HDL
Dégradation des stérols	7 $\alpha$ hydroxylase	Élimination chol via bile
Régulation synthèse stérols	XXX	Synthèse AG $\rightarrow$ estérification CL sous forme CE

Ainsi LXR protège la cellule intestinale de la toxicité d'un excès de cholestérol libre en favorisant sa sortie, sa dégradation ou sa transformation en cholestérol ester. Les ligands de LXR ou de RXR diminuent l'absorption intestinale du cholestérol chez la souris ; cet effet est annulé par la double invalidation de  $LXR\alpha$  et  $LXR\beta$  [Repa 2000], ce qui permet de penser que parmi leurs gènes cibles existent des acteurs essentiels à l'absorption du cholestérol. Il est démontré que l'effet de LXR sur l'absorption du cholestérol ne dépend pas directement (ou exclusivement) d'ABCA1 [Freeman 2004] puisque les animaux ayant une protéine ABCA1 mutée non fonctionnelle absorbent normalement en apical le cholestérol et que l'administration d'un agoniste de LXR diminue l'absorption intestinale du cholestérol de manière identique chez les animaux avec ou sans mutation d'ABCA1. Par contre, les transporteurs ABCG5-G8 semblent directement impliqués dans l'effet facilitateur de LXR sur l'absorption intestinale du cholestérol comme nous l'avons évoqué au paragraphe relativement à ces deux transporteurs.

Les agonistes de LXR ont été testés dans le but de réduire l'absorption intestinale du cholestérol, mais ils provoquent aussi une stéatose hépatique par induction de la synthèse des TG, ce qui constitue un obstacle majeur à leur utilisation. C'est pour contrer ce problème qu'ont été développés récemment des agonistes LXR spécifiques pour les transporteurs ABC intestinaux [Kaneko 2003] [Quinet 2004].

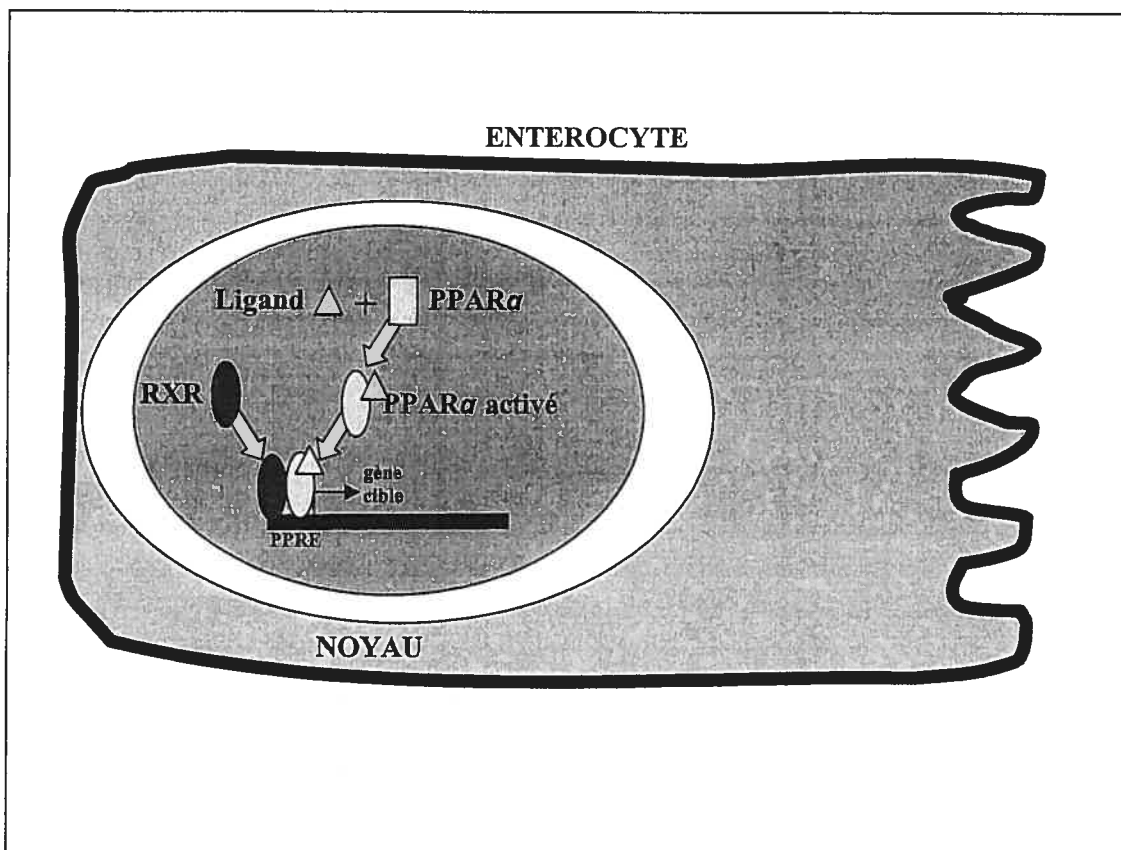
- **Peroxisome proliferators-activating factor (PPAR)**

Trois types de PPAR sont connus actuellement :  $PPAR\alpha$  est la forme la plus abondante dans l'intestin alors que  $PPAR\delta$  a une répartition ubiquitaire [Pineda torra 1999].

Les PPAR sont activables par les acides gras selon un mécanisme résumé dans la figure ci-dessous. Les PPAR sont surtout considérés comme des facteurs régulant le métabolisme des acides gras :  $PPAR\alpha$  induisant leur catabolisme,  $PPAR\gamma$  favorisant l'adipogénèse alors que le rôle de  $PPAR\delta$  est moins bien connu. Pourtant, leur implication également dans le métabolisme du cholestérol apparaît de plus en plus clair : les fibrates, des médicaments hypocholestérolémiant et des agonistes de  $PPAR\alpha$ , diminuent l'absorption intestinale du cholestérol chez le rat [Umeda 2001]. L'invalidation du gène de  $PPAR\alpha$  perturbe la régulation de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol

[Patel 2001]. Enfin, PPAR module l'expression de RXR et de SREBP dont nous avons précisé l'implication dans le métabolisme du cholestérol.

**Figure 3 Mécanisme d'activation de PPAR**



Légende : Le ligand (acide gras par exemple) se lie au PPAR, l'activant. La forme activée de PPAR s'associe à RXR pour former un hétérodimère capable de se lier au PPAR Response Element (PPRE) du promoteur des gènes cibles pour activer leur transcription.

- **Perspectives pour les facteurs de transcription :**

Parmi les autres facteurs de transcription qui pourraient jouer un rôle dans l'absorption intestinale du cholestérol, nous pouvons citer le « liver receptor homologue 1 » (LRH-1) et le « farnesoid X receptor » (FXR).

LRH-1 a été initialement décrit dans le foie où il régule la synthèse des acides biliaires, cependant il est aussi présent dans les cellules Caco2 [Freeman 2004]. LRH-1 est capable de réguler l'expression de SR-BI dans le foie [Malerod 2005] ; aucune donnée

précise n'existe actuellement pour l'entérocyte. Ce champ d'étude mériterait sûrement d'être exploré davantage.

FXR est présent en grande quantité dans l'entérocyte [Forman 1995]. Il peut former un hétérodimère avec RXR qui vient activer les gènes dont le promoteur contient soit un « FXR response element », soit un « bile acid response element ». En effet, FXR semble surtout impliqué dans le métabolisme des acides biliaires, agissant comme un « sensor » pour activer ou inhiber la synthèse et la sécrétion des acides biliaires [Sinal 2000]. Récemment, un homologue de FXR, dénommé FXR $\beta$ , a été identifié ; il lie un précurseur du cholestérol (le lanostérol), ce qui suggère qu'il pourrait être impliqué dans la régulation de la synthèse du cholestérol. Cependant FXR $\beta$  n'est pas retrouvé chez les primates [Otte 2003]. Cette découverte soulève quand même la question de l'existence chez l'homme d'autres membres de la famille FXR non identifiés et pouvant être impliqués directement dans le métabolisme du cholestérol. D'autre part, FXR interagit avec d'autres facteurs régulateurs qui sont impliqués dans l'absorption ou le métabolisme du cholestérol comme RXR, PPAR $\alpha$ , SREBP-1c ou LRH-1. Il régule aussi l'expression de transporteurs de la famille ABC dans l'entérocyte [Zollner 2003] ; et il diminue l'expression de SR-BI dans le foie [Malerod 2005], aucune étude n'a porté sur la régulation par FXR de SR-BI dans l'entérocyte à notre connaissance. Une approche génomique pourrait comparer les gènes candidats susceptibles d'intervenir dans l'absorption du cholestérol dans la cellule Caco2 sans et avec stimulation par un puissant ligand de FXR comme le fexaramine [Downes 2003]. Ceci permettrait de mettre en évidence les voies activées par ce facteur de transcription

### **2-3-2) Régulation nutritionnelle et hormonale de l'absorption intestinale du cholestérol**

- **La régulation nutritionnelle**

L'absorption intestinale du cholestérol peut être influencée par de nombreux facteurs nutritionnels. Ainsi, le taux d'absorption intestinale diminue lorsque les apports en cholestérol d'origine biliaire augmentent quand le cholestérol alimentaire semblent avoir un

effet inhibiteur moindre [Duan 2004] [Wang 2001] [Wang 2003] [Quintao 1971] [Bhattacharyya 1987]. Cette autorégulation négative demeure mal expliquée. Les stérols d'origine végétale, appelés phytostérols, sont capables d'abaisser de plus de 80% l'absorption intestinale humaine du cholestérol [Heineman 1993]. Notre alimentation occidentale en procure entre 200 et 300 mg par jour [Miettinen 1990]. Leur mécanisme d'action pourrait être une compétition avec le cholestérol soit lors de l'incorporation dans les micelles, soit au niveau du transporteur de la bordure en brosse, soit lors de l'estérification par l'ACAT. De manière intéressante, l'effet inhibiteur des phytostérols ne semble pas être médié par les transporteurs ABCA1, ABCG5, ABCG8 et NPC1L1 [Calpe-Berdiel 2005]. D'autres lipides comme les acides gras monoinsaturés, les oméga 3 ou certains phospholipides influencent également l'absorption du cholestérol [Johnson 1985] [Chen 1987] [Eckhardt 2002]. Leurs mécanismes d'action restent hypothétiques, mais les acides gras peuvent agir en tant que facteurs de transcription. De plus, les acides gras polyinsaturés peuvent phosphoryler et déstabiliser le transporteur ABCA1, et altérer ainsi l'efflux du cholestérol [Wang 2005].

- **La régulation hormonale**

L'absorption intestinale du cholestérol est perturbée dans plusieurs maladies endocriniennes humaines. Les hormones impliquées pourraient, en partie du moins, contrôler l'absorption du cholestérol. Parmi ces maladies, nous pouvons citer le diabète de type 1 dû à une carence insulinique, et le diabète de type 2 résultant d'une résistance tissulaire à l'action de l'insuline. L'entérocyte possède des récepteurs pour l'insuline [Zimmerman 1985] et est capable de l'acheminer d'un pôle à l'autre par transcytose [Shah 1996]. Chez les diabétiques avec insulino-résistance, l'absorption intestinale est diminuée [Sutherland 1992] [Pihlajamaki 2004] alors qu'elle serait augmentée chez les diabétiques avec insulino-pénie [Bloks 2004]. De même, les rats insulino-péniques après streptozotocine ont une augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol, qui est partiellement corrigée par l'injection d'insuline (un tiers de l'augmentation) [Maechler 1992] [Jiao 1988], mais complètement normalisée par les inhibiteurs de l'ACAT [Maechler 1993]. Ces variations de l'absorption intestinale sont associées à une hausse importante de l'ACAT entérocytaire chez les rats diabétiques, mais sans variation de la cholestérol estérase [Jiao



1989]. Cette augmentation est atténuée si un traitement insulinique est administré aux animaux [Jiao 1988] [Maechler 1992] [Maechler 1993]. Inversement, maintenir des rats en hyperinsulinémie (pompe insulinique et gavage de dextrose), ou incuber des Caco2 avec de l'insuline, diminue l'ACAT entérocytaire [Yang 1994] [Jiao 1989]. Par contre, une étude plus récente qui utilise aussi des rats sous streptozotocine, retrouve une augmentation importante de la synthèse du cholestérol mais sans variation de son absorption [Gleeson 2000]. Il paraît difficile de concilier cette étude avec les précédentes.

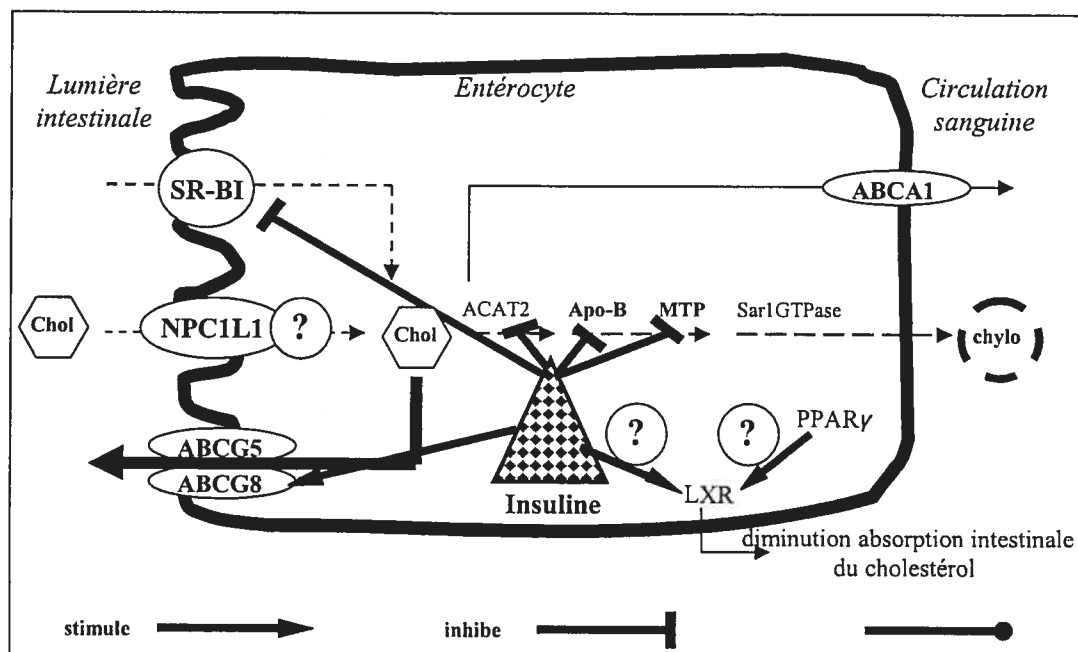
L'insuline pourrait également faire baisser l'absorption du cholestérol en diminuant la synthèse et la sécrétion des chylomicrons. En effet, l'expression de la MTP diminue sous insuline, le promoteur de la MTP contenant un élément de réponse inhibiteur à l'insuline [Hagan 1994]. De plus, l'Apo-B 48 pourrait aussi être diminué comme cela est retrouvé dans les explants de jéjunum humain [Levy 1996] mais non dans les cellules Caco2 [Allister 2004]. Par ailleurs, la diminution d'ABCG5 et ABCG8 observée lors d'une carence en insuline chez le rat pourrait aussi expliquer en partie l'augmentation d'absorption du cholestérol [Bloks 2004], selon un mécanisme similaire à celui présent dans la sitostérolémie. Enfin, nos expériences dans les cellules Caco2 démontrent un effet inhibiteur de l'insuline sur les niveaux de SR-BI qui pourrait ainsi participer à la baisse d'absorption en diminuant l'influx apical (tableau et schéma ci-dessous). Notons que l'insuline est capable d'induire l'expression de LXR $\alpha$  dans l'hépatocyte, d'autre part les agonistes de PPAR $\gamma$  améliorent l'insulinosensibilité et stimulent aussi LXR $\alpha$  [Steffensen 2004]. Enfin, la stimulation de LXR diminue l'absorption intestinale du cholestérol permettant de supposer que l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'absorption intestinale du cholestérol pourrait être médié par LXR.

La persistance d'une absorption basse dans le diabète de type 2 suggère que l'insulinorésistance au niveau de la cellule intestinale n'est pas suffisamment importante pour antagoniser l'effet inhibiteur de cette hormone, ou qu'il existe une anomalie commune entre les voies de signalisation de l'insuline et de l'absorption du cholestérol. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats qui restent peu nombreux et parfois contredits par d'autres travaux [Gylling 1994].

**Tableau VI Impact des variations d'insulinémie sur l'absorption intestinale du cholestérol dans différents modèles expérimentaux ou chez l'humain**

Variation insuline	Modèle étudié	Absorption intestinale chol	Régulation étudiée	Référence
↑ mais Résistance	Humain D2M	↓	↑ synthèse chol	Pihlajamaki 2004
↓	Humain D1M	↑	-	Miettinen 2004
↓	Rat + SZT +insuline	? ?	↑ ACAT, → CET Normalise	Jiao 1988
↓	Rat + SZT + insuline	↑ ?	↑ ACAT Normalise	Maechler 1992
↓	Rat + SZT + insuline + inhib ACAT	↑ Abaisse partiel Normalise	↑ ACAT	Maechler 1993
↑	Rat + insuline	?	↓ ACAT	Yang 1994
↑	Caco2+insuline	?	↓ ACAT	Jiao 1989
↓	Rat + SZT +insuline	↑ Abaisse partiel	↓ ABCG5-G8 Remonte partiel	Bloks 2004
↓	Rat + SZT	→	↑ synthese chol	Gleeson 2000
↑	Humain explants	?	↓ Apo-B48	Levy 1996
↑	Caco2	?	→ Apo-B48	Allister 2004
↑	Caco2	?	↓ SR-BI	Données perso

**Figure 4 Insuline et diminution d'absorption du cholestérol**



Légende : L'insuline peut induire une diminution de l'absorption du cholestérol en i) diminuant l'entrée au pôle apical par inhibition des récepteurs et par stimulation de ceux responsable de l'efflux ; ii) en diminuant la synthèse des chylomicrons par inhibition de l'ACAT et de la synthèse d'ApoB, ainsi qu'en favorisant la dégradation de l'ApoB par blocage de la MTP.

Parmi les autres régulations hormonales nous pouvons citer l'hormone de croissance (GH) qui pourrait faciliter l'absorption intestinale dans le syndrome de grêle court. L'entérocyte humain exprime le récepteur à la GH [Simard 1996] [Nagano 1995]. Le traitement par GH augmente l'absorption intestinale du cholestérol chez le cochon mais pas chez l'homme [Pakarinen 2004] [Leonsson 1999]. En dehors de nos travaux qui démontrent que la GH diminue l'expression de SR-BI dans les Caco2, ce qui devrait diminuer l'absorption intestinale du cholestérol, aucune autre voie de régulation de l'absorption du cholestérol par la GH n'a été étudiée à notre connaissance dans l'entérocyte.

Les patients ayant un hypercorticisme par maladie de Cushing, ou qui sont traités oralement par hydrocortisone, présentent une absorption intestinale accrue des lipides. De plus, l'incubation d'explants intestinaux humains avec cette hormone stéroïde augmente la synthèse d'Apo-B48 ce qui pourrait favoriser l'absorption intestinale [Levy 1997]. Le récepteur de l'hydrocortisone est bien présent dans les cellules Caco2, mais leur incubation avec cette hormone ne modifie ni leur contenu en cholestérol [Jindrichova 2003], ni

l'expression de SR-BI [données personnelles]. Une étude récente apporte un élément nouveau susceptible d'expliquer cette apparente discordance : l'absorption intestinale des lipides est modifiée différemment selon le type de corticoïde utilisé : le budésonide n'influence pas l'absorption du cholestérol alors que la prednisone l'augmente [Thiesen 2002]. Cette augmentation n'est pas accompagnée de modification de FABP. Les autres transporteurs et facteurs de transcription n'ont malheureusement pas été étudiés

### **2-3-3) Coordination de l'expression des transporteurs**

En plus d'identifier les transporteurs membranaires, un effort de réflexion doit être mené sur la coordination de leur expression au sein de la cellule intestinale. L'évaluation simultanée des modifications de transcription de plusieurs gènes candidats lors du phénomène d'absorption intestinale est une approche qui donne une vue d'ensemble du processus absorbif. Ainsi, l'incubation de cellules Caco2 avec du cholestérol induit une hausse des ARNm de LXR et de FXR qui s'accompagne d'une transcription augmentée d'ABCA1, d'Apo-A1, mais d'une diminution de moitié d'Apo-E. Les phytostérols ont une action synergique à celle du cholestérol sur la transcription de ces gènes : l'ARNm d'ABCA1 augmente de 1.4 fois avec le cholestérol seul mais de 5.7 fois avec cholestérol et phytostérol [Cantàfora 2003]. Dans cet article, aucune précision n'est donnée pour les autres transporteurs. Nous avons résumé dans le tableau ci-dessous les facteurs de transcription connus pour moduler dans l'entérocyte l'expression des transporteurs membranaires.

**Tableau VII Facteurs de transcriptions et transporteurs entérocytaires du cholestérol**

	SR-BI	ABCA1	ABCG5	ABCG8	NPC1L1
<b>SREBP1 et 2</b>	+	+	?	?	+
<b>RXR<math>\alpha</math></b>	+	+	+	+	+
<b>LXR<math>\beta</math></b>	+	+ $\uparrow$	+ $\uparrow$	+ $\uparrow$	+
<b>PPARs</b>	+ ( $\alpha$ ) $\downarrow$	+ ( $\alpha$ ) $\downarrow$	- ( $\gamma$ ) $\rightarrow$	- ( $\gamma$ ) $\rightarrow$	+ ( $\gamma$ ) $\uparrow$
<b>LRH1</b>	?	?	+	+	?
Références	Cao 1997 Malerod 2002 PPAR :don . perso	Santamaria- Fojo 2000 Costet 2000 Knight 2003 Van der Veen 2005	Repa 2002	Repa 2002 Freeman 2004	Davies 2000 Van der Veen 2005

Légende : Existence d'une régulation du gène du transporteur : + pour régulation présente (positive ou négative) et - pour absence de régulation. Induction du gène du transporteur :  $\rightarrow$  pas d'effet,  $\downarrow$  diminution,  $\uparrow$  augmentation. Donnée manquante : ?

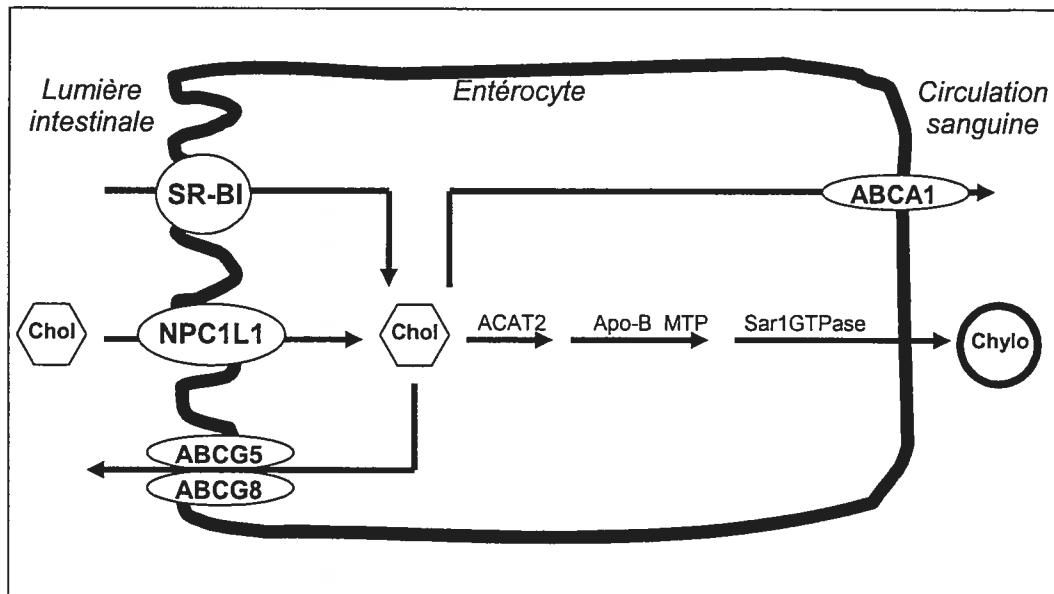
Les fibrates et les thiazolidinediones sont des molécules hypolipémiantes qui se lient respectivement aux récepteurs PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  présents dans l'entérocyte. De plus, le cholestérol est capable d'induire l'expression de PPAR $\gamma$  dans l'intestin [Gazzola 2004]. Pourtant, la régulation de l'absorption intestinale du cholestérol par les PPAR a été peu étudiée jusqu'à présent. Deux mécanismes pourraient favoriser une diminution de l'absorption du cholestérol. Tout d'abord, les PPAR $\alpha$  augmentent l'expression d'ABCA1 pouvant ainsi favoriser l'efflux de cholestérol par le pôle basal de l'entérocyte [Knight 2003]. D'autre part, PPAR $\gamma$  diminue l'expression de NPC1L1 et fait chuter l'absorption intestinale du cholestérol [Van der Veen 2005]. La coordination de ces deux voies de régulation reste à démontrer. Il n'existe pas de données publiées sur la régulation de SR-BI par les PPAR. Cependant, des résultats de notre laboratoire montrent que les agonistes de PPAR $\alpha$  diminuent les niveaux de ce transporteur lors d'une incubation au pôle apical de la cellule, ce qui pourrait favoriser une baisse d'absorption du cholestérol au pôle luminal de l'entérocyte (cf schéma ci-dessous).

Le facteur de transcription LXR tient une place centrale dans la régulation des transporteurs étudiés. En effet, comme résumé dans le schéma ci-dessous, LXR est capable d'induire l'expression des trois transporteurs ABCA1, G5 et G8 dans l'entérocyte, favorisant ainsi l'efflux de cholestérol hors de la cellule par les deux pôles à la fois. Les autres transporteurs SR-BI et NPC1L1 sont connus pour être régulés également par LXR dans d'autres lignées cellulaires, mais cette régulation n'a pas été étudiée spécifiquement dans l'entérocyte à notre connaissance. Cependant, l'utilisation d'Ezitimibe dans la cellule Caco2 diminue à la fois les niveaux de LXR $\beta$  et de SREBP et ceux de SR-BI et de NPC1L1 [During 2005], ce qui permet de supposer que LXR pourrait également induire l'expression de ces deux transporteurs. Ces deux régulations paraissent en contradiction : augmentation de l'efflux ( $\uparrow$  ABCA1, G5 et G8) et aussi de la captation ( $\uparrow$  SR-BI et NPC1L1). Cependant, d'une part les régulations de SR-BI et de NPC1L1 par LXR n'ont pas été étudiées directement, rendant incertain une régulation de type induction. D'autre part, l'absorption est la résultante des flux entrant et sortant. Donc, si la stimulation de l'entrée de cholestérol est moins puissante que celle de l'efflux, alors l'absorption peut être abaissée. Par ailleurs, la quantité d'ARNm des transporteurs ABCA1, G5 et G8 n'est diminuée par l'Ezétimibe que lors d'une diète riche en lipides chez l'animal [Repa 2002]. Or, les souris utilisées (129/SV) appartiennent à une souche qui présente congénitalement une hyper absorption intestinale du cholestérol [Jolley 1999]. On peut se poser la question de la pertinence d'une telle souche de souris hyperabsorbante chez laquelle les transporteurs du cholestérol ont nécessairement un fonctionnement et/ou une régulation particulière. Enfin, l'existence de cofacteurs régulateurs pour les effecteurs nucléaires peut modifier le type de régulation induite par LXR. Soulignons que l'étude de During ne prend pas en compte ABCG5, ni ABCG8, cet oubli est très étonnant.

En conclusion, l'étude des actions synergiques des PPAR pour diminuer l'absorption intestinale, et le rôle central occupé par LXR dans les différentes voies du transport du cholestérol, ainsi que son interaction avec l'Ezétimibe devraient permettre prochainement de faire avancer notre compréhension de l'absorption du cholestérol. Les effets des facteurs nucléaires étant tissu spécifiques, on ne peut extrapoler à l'entérocyte les résultats obtenus dans d'autres types cellulaires. Nous avons présenté sous forme de

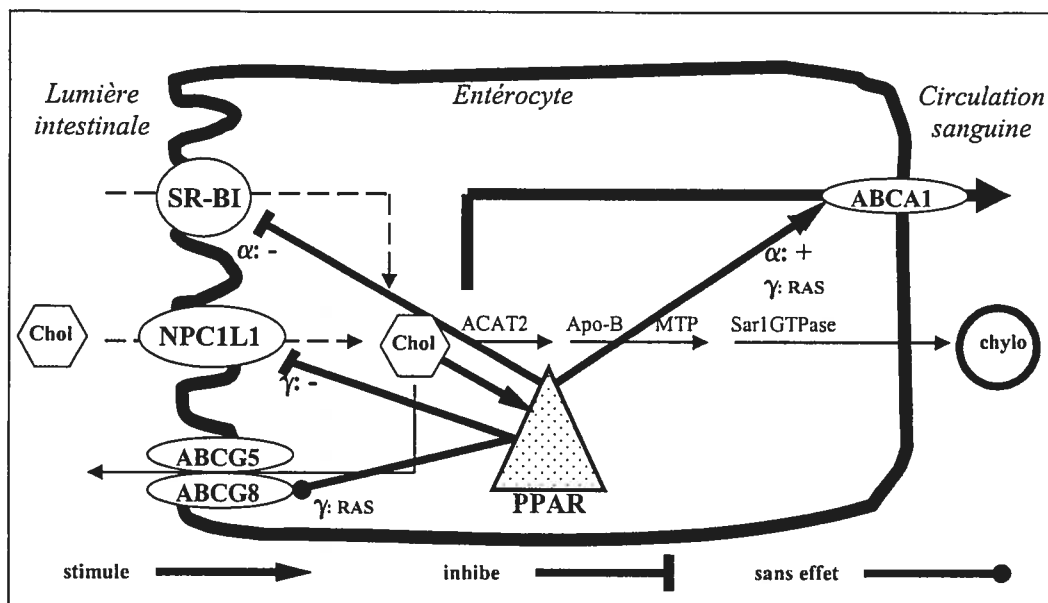
schémas intégratifs les régulations des transporteurs par les facteurs de croissance PPAR et LXR, ainsi que les actions de l'Ezétimibe au niveau entérocytaire.

**Figure 5 Théorie actuelle sur les flux de cholestérol à travers l'entérocyte**



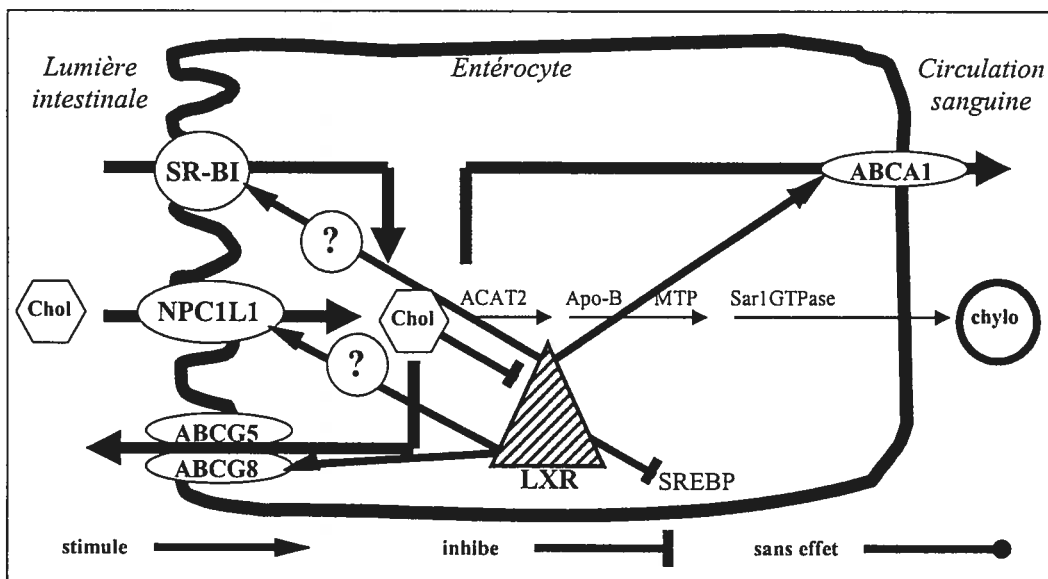
Légende : Absorption du cholestérol (Chol) au pôle apical de l'entérocyte par les transporteurs SRB1 et NPC1L1. Efflux de Chol vers la lumière intestinale par ABCG5/G8. Sortie de Chol vers la circulation sanguine principalement par la voie de sécrétion des chylomicrons (chylo) qui implique l'action de l'acetyl CoA cholestérol Acyl Transférase (ACAT2), de l'Apolipoprotéines B (ApoB) de la Microsomal Triglyceride Transfert Protein (MTP) et de Sar1GTPase.

Figure 6 PPARs et diminution d'absorption du cholestérol



Légende : Les PPAR peuvent diminuer l'absorption entérocytaire du cholestérol en diminuant l'entrée du pôle apical par inhibition des transporteurs SRB1 et NPC1L1. Ils peuvent aussi promouvoir la sortie au pôle basolatéral du cholestérol vers les lipoprotéines circulantes en stimulant l'ABCA1.

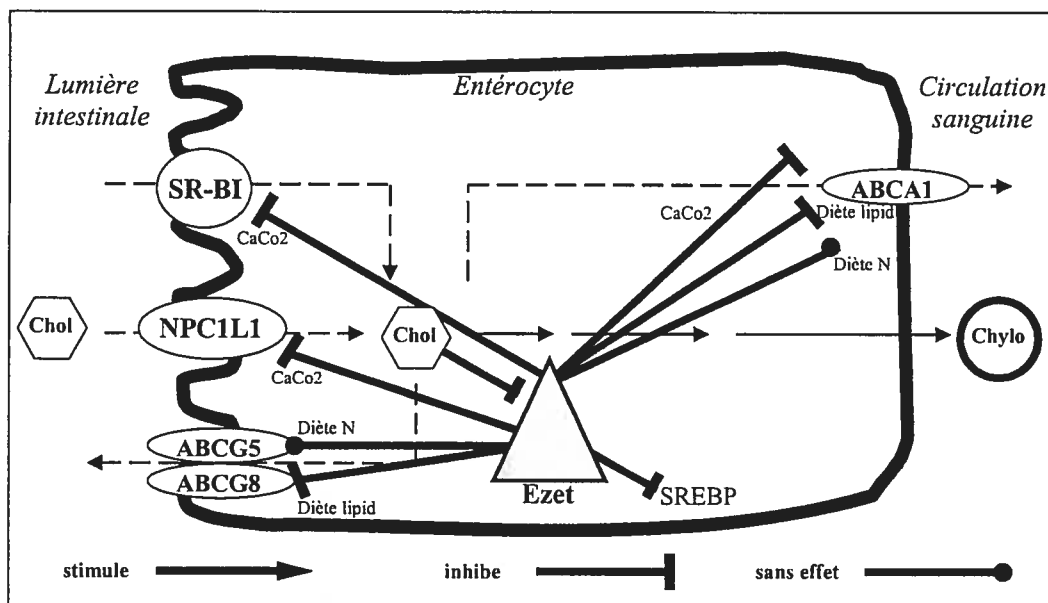
Figure 7 LXR et diminution d'absorption du cholestérol



Légende : LXR peut diminuer l'absorption entérocytaire du cholestérol en augmentant le retour du cholestérol vers la lumière intestinale par stimulation des transporteurs ABCG5/G8. Mais il peut aussi stimuler la sortie de cholestérol vers la circulation sanguine en stimulant l'ABCA1.



**Figure 8 Ezétimibe et diminution d'absorption du cholestérol**



Légende : L'Ezétimibe (Ezet) peut diminuer l'absorption entérocytaire du cholestérol en bloquant les transporteurs SR-B1 et NPC1L1 responsables de l'entrée du cholestérol depuis la lumière intestinale. Il peut aussi bloquer la sortie du cholestérol vers la circulation sanguine en inhibant l'ABCA1 mais seulement lors d'une diète riche en lipides. De même, l'inhibition de l'efflux vers la lumière intestinale via ABCG5/G8 n'a lieu que lors d'un régime riche en lipides.

#### 2-4) INFLUENCE DES FACTEURS INTRA LUMINAUX ET ENTÉROCYTAIRES

On peut distinguer deux modes d'action pour les inhibiteurs de l'absorption intestinale du cholestérol : par diminution de la biodisponibilité du cholestérol intraluminal et par inhibition du trafic intraentérocytaire du cholestérol, ce dernier mécanisme pouvant résulter d'une inhibition de la captation, ou d'une altération du métabolisme intracellulaire des lipoprotéines.

##### 2-4-1) Facteurs intraluminaux

La diminution de la biodisponibilité du cholestérol peut être obtenue en interférant avec le processus de micellisation, l'hydrolyse des lipides ou la qualité du mucus qui tapisse la surface de la bordure en brosse.

Les chélateurs des acides biliaires (résines et cholestéramine) diminuent l'absorption intestinale du cholestérol en interrompant le cycle entérohépatique. Les saponines (ou sterols glycosides) étaient supposées agir en se liant de manière irréversible au cholestérol dans la lumière intestinale. Cependant, une protéine membranaire des villosités de l'intestin grêle est capable de se lier aux saponines et à l'Ezétimibe, ce qui laisse supposer que l'action des saponines serait plutôt de réguler directement un transport membranaire au niveau de la bordure en brosse [Detmers 2000].

L'hydrolyse des lipides dans la lumière intestinale est une autre étape indispensable à l'absorption du cholestérol. La carboxyl ester lipase (CEL) hydrolyse le cholestérol estérifié présent dans la lumière intestinale et favorise ainsi son absorption. L'expression de la CEL influence donc indirectement l'absorption du cholestérol. Par ailleurs, l'inhibiteur de la lipase pancréatique (Orlistat) en bloquant l'hydrolyse des triglycérides altère la capacité des micelles à délivrer le cholestérol à la bordure en brosse [Erdmann 2004].

Enfin, la modification de la composition du mucus qui recouvre la bordure en brosse peut altérer l'absorption intestinale du cholestérol. Ce mécanisme a été évoqué depuis longtemps dans la fibrose kystique [Schutt 1968] [Wesley 1983] [Kent 1996]. Récemment, l'invalidation du gène d'un des composant essentiel du mucus (mucine-1) a confirmé l'importance de cette barrière protéique. En effet, cette mutation diminue significativement l'absorption intestinale du cholestérol [Wang 2004]. De manière très intéressante, cette modification de la mucine altère uniquement l'absorption du cholestérol sans modifier celle des acides gras. Par conséquent, la modification des propriétés physicochimiques de la membrane plasmique (fluidité membranaire) peut entraîner des troubles d'absorption spécifiques, soit à cause des caractères propres à chaque molécule lipidique (taille, conformation ou indice d'hydrophobicité), soit par interaction direct avec les transporteurs membranaires.

## 2-4-2) Facteurs intraentérocytaires

- **Surface apicale et inhibiteurs du transport transmembranaire**

Plusieurs étapes intraentérocytaires de l'absorption du cholestérol peuvent être bloquées par des agents pharmacologiques. Voyons tout d'abord, l'entrée du cholestérol au niveau de la bordure en brosse. Nous avons déjà mentionné l'Ezétimibe au paragraphe 1-7). Cette 2-azetidionone diminue l'absorption du cholestérol de moitié [Rosenblum 1998] [Knopp 2003] en se fixant au pôle apical de l'entérocyte, chez la souris du moins. Notons qu'après absorption, la molécule est glucuronée dans l'entérocyte ; le métabolite obtenu abaisse encore plus l'absorption du cholestérol que la molécule mère [Van Heek 2001]. L'action de l'Ezétimibe ne modifie pas l'expression des transporteurs ABCG5 ni ABCG8 [Repa 2002], alors que l'expression de SR-BI et NPC1L1 est diminuée [During 2005]. Notons que l'impact de cette molécule sur ABCA1 diffère selon les études : stabilité ou diminution [Repa 2002] [During 2005]. Pourtant, si l'on regarde précisément les résultats de Repa et al, on constate que les niveaux d'ARNm d'ABCA1 diminuent lorsque l'Ezétimibe est introduit à la diète standard (cholestérol 0.02%). De plus, il s'agit d'un modèle murin alors que l'autre étude s'intéresse aux Caco2. L'effet inhibiteur de l'Ezétimibe implique de manière certaine NPC1L1, bien que le mécanisme exact ne soit pas encore connu comme déjà mentionné [Altman 2004] [Davis 2004] [Smart 2004]. Des données récentes démontrent que, d'une part le complexe annexine 2 – caveoline 1 serait impliqué dans l'absorption intestinale du cholestérol chez la souris, et que d'autre part l'Ezétimibe induirait un clivage de cet hétérocomplexe [Smart 2004], ce qui laisse penser que ces deux protéines associées réguleraient, en partie du moins, l'entrée du cholestérol dans l'entérocyte. Cependant, l'invalidation du gène de la cavéoline 1 n'altère ni l'absorption du cholestérol, ni l'efficacité de l'Ezétimibe ; elle n'induit pas non plus de modifications spécifiques dans la transcription de plusieurs transporteurs comme NPC1L1, ABCA1 ou ABCG5, ce qui amène les auteurs à conclure que la caveoline-1 n'est pas indispensable pour l'absorption intestinale du cholestérol. Par ailleurs, SR-BI non plus ne semble interagir avec la caveoline-1 puisqu'il ne lui est pas associé dans l'entérocyte humain [Levy 2004]. Il est intéressant de noter que l'action de l'Ezétimibe sur ce complexe protéique annexine 2–caveoline 1 ne survient que chez les animaux

hypercholestérolémiques [Smart 2004], ce qui démontre que les événements survenant au pôle vasculaire influencent aussi directement l'absorption du cholestérol au pôle opposé de l'entérocyte.

- **ACAT et inhibiteurs de l'ACAT**

Une fois rentré dans l'entérocyte, le cholestérol doit être estérifié par l'ACAT pour être stocké et transporté au pôle vasculaire. Les inhibiteurs de cette enzyme, comme l'avasimibe, ont un effet modeste sur l'absorption intestinale du cholestérol chez l'homme comme indiqué dans le tableau ci-dessous. Cependant, leur capacité à diminuer la sécrétion hépatique des LDL, et à pouvoir agir en théorie directement sur le macrophage dans la plaque d'athérome [Delsing 2001], font de ces molécules des candidats intéressants pour le traitement des hypercholestérolémies.

**Tableau VIII Effet des inhibiteurs de l'ACAT sur les lipides plasmatiques selon les espèces et les diètes**

Espèce	Diète	↓ Chol total	Autres effets	Référence
Rat	Nale	16-30%	↓ TG 44-66%	Wilcox ATVB 1999
Lapin	Chol free	15-37%		Wilcox ATVB 1999
Singe	Nal	27%	↓ Lip(a) 32% ↓ HDL 23%	Ramharack Atherosclerosis 1998
Porc	Chol rich	35%	↓ TG 31-40% ↓ LDL 51%	Burnett J Lip Res 1999
<b>Humain hyperchol</b>	Nale	RAS	↓ TG 16-23% ↓ VLDL 20-30% HDL-LDL: RAS	Insull Atherosclerosis 2001
<b>Humain hyperchol + Statine</b>	Nale	Statin / Statin+inhib: -18% / -22%	↓ TG -13% / -24% ↓ VLDL -13% / -24% ↓ HDL -6% / -11%	Raal Atherosclerosis 2003

- **MTP et inhibiteurs de la MTP**

Une fois estérifié, le cholestérol doit être incorporé aux lipoprotéines pour être rejeté dans la circulation. Les inhibiteurs de la MTP, en empêchant le transfert de lipides sur l'Apo-B en cours de synthèse, favorisent sa dégradation. Or l'Apo-B est indispensable à l'élaboration et au maintien de l'intégrité des chylomicrons. L'importance de l'Apo-B et de la MTP est démontrée par la sévérité de la malabsorption intestinale des lipides qui survient lors de la mutation de leur gène, entraînant respectivement l'hypobétalipoprotéïnémie [Young 1988] et l'abétalipoprotéïnémie. [Wetterau 1992]. A notre connaissance, aucune étude n'a évaluée spécifiquement l'absorption intestinale du cholestérol lors de l'inhibition de la MTP ; pourtant, l'augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol constatée chez des animaux nourris par une diète de type occidentale est associée à une augmentation d'expression de la MTP [Ueshima 2004]. L'utilisation des inhibiteurs de la MTP est limitée par la stéatose qu'ils induisent. C'est pour cette raison qu'une nouvelle molécule agissant spécifiquement sur l'intestin a été récemment développée : les résultats chez la souris démontrent un effet hypotriglycéridémiant et hypocholestérolémiant certain sans effet délétère sur le foie [Aggarwal 2005]. Les essais cliniques chez l'homme sont encore trop peu nombreux pour pouvoir conclure définitivement sur l'efficacité de cette classe médicamenteuse.

## 2-5) HYPOTHÈSES

Parmi les protéines candidates, nous avons choisi de travailler sur le SR-BI pour les raisons suivantes : premièrement sa localisation intestinale concorde avec le site préférentiel de l'absorption du cholestérol, [Cai 2001] [Lobo 2001] [Levy 2003] ; deuxièmement sa présence ou sa surexpression augmentent l'absorption du cholestérol in vitro et plus récemment in vivo [Hauser 1998] [Van Bennekum 2005] [Bietrix 2006] ; troisièmement, son invalidation diminue l'absorption du cholestérol dans les cultures d'entérocytes [Levy 2003] [Hauser 1998] [Werder 2001]. Par contre son invalidation chez l'animal ne semble pas diminuer significativement l'absorption intestinale [Altmann 2002] [Wang 2002] [Mardones 2001]. Cette dernière donnée peu compatible avec les précédentes souligne l'importance de travaux complémentaires.

- **Hypothèse 1**

*Si le SR-BI est impliqué dans l'absorption intestinale du cholestérol, alors son expression devrait être modulée par le degré de différenciation cellulaire et par les effecteurs potentiels qui influencent l'absorption intestinale du cholestérol.*

Les effecteurs potentiels choisis devaient répondre aux critères suivants : être présents dans la lumière intestinale et la circulation sanguine en conditions physiologiques ou dans certaines maladies ; être connus pour influencer le métabolisme du cholestérol et d'autres lipides, et éventuellement être impliqués dans des pathologies affectant le tractus digestif ; et enfin avoir démontré leur capacité régulatrice sur le SR-BI dans divers modèles cellulaires ou animaux. Nous avons donc choisi : i) des nutriments comme le cholestérol, les oxystérols et plusieurs acides gras qui sont déjà connus pour influencer certaines étapes intraentérocytaires de l'absorption des lipides comme la sécrétion des lipoprotéines par exemple [Fluiter 1998] [Chong 1987] [Judd 2002] ; ii) des hormones comme l'insuline, l'Epidermal Growth Factor (EGF) et l'hormone de croissance (GH) qui ont un rôle trophique sur les cellules de la muqueuse intestinale et modulent certaines étapes clés intraentérocytaires de l'absorption des lipides [Reaven 1998] [Levy 1996-a] [Levy 1996-b] ; iii) des facteurs inflammatoires comme le  $TNF\alpha$  ou l' $IFN\gamma$  dont les taux sont augmentés au cours des maladies inflammatoires de l'intestin comme la maladie de Crohn [Bernotti 2003] [Courtois 2003] [Levy 2003], et le LPS qui est un composant essentiel de la membrane des bacilles gram négatifs qui jouent un rôle dans la physiopathologie de la maladie de Crohn [Buechler 1999] [Khovidhunkit 2001] ; enfin, iiiii) des médicaments comme les fibrates qui sont des agonistes des  $PPAR\alpha$  et qui possèdent une action hypolipémiante ainsi que la capacité de diminuer l'absorption intestinale du cholestérol.

- **Hypothèse 2**

*S'il existe une modulation de l'expression de SR-BI, alors cette régulation pourrait être « polarisée » ; c'est-à-dire qu'un même effecteur pourrait faire varier l'expression de SR-BI différemment selon le compartiment par lequel il entre en contact avec la cellule (pôle apical correspondant à la lumière intestinale ou pôle basolatéral orienté vers la circulation lymphatique et sanguine).*

L'entérocyte est une cellule polarisée à plusieurs niveaux. Elle est morphologiquement polarisée avec des microvillosités à son pôle apical exclusivement, une localisation du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi principalement au pôle apical et un noyau au tiers inférieur [Trier 1981]. Une polarité fonctionnelle existe également, puisque l'absorption des acides gras à longue chaîne par la cellule Caco2 est jusqu'à 6 fois plus importante au pôle apical qu'au pôle basolatéral [Trotter 1991]. A cette polarité fonctionnelle s'ajoute une polarité métabolique, en effet un même substrat aura une destinée métabolique différente suivant qu'il pénètre la cellule par un pôle ou par l'autre. Ainsi, les acides gras libres qui sont absorbés au pôle apical seront orientés vers la resynthèse de TG, alors que s'ils pénètrent par le pôle basolatéral, ils seront majoritairement oxydés ou incorporés aux phospholipides. Ces résultats se retrouvant chez le rongeur comme chez l'homme [Gangl 1975] [Gangl 1978]. Il en est de même lorsque les acides gras sont absorbés sous forme de monoglycérides : la sn-2 monooléine est incorporée préférentiellement aux TG lors d'une incubation au pôle apical mais majoritairement aux phospholipides lors d'une incubation au pôle basolatéral [Ho 2002]. Il semble donc plausible que les transporteurs comme le SR-BI qui existent aux deux faces de l'entérocytes aient aussi une polarité régulatoire.

- **Hypothèse 3**

*De même, la réponse de SR-BI pourrait être « polarisée » ; autrement dit, la variation d'expression de SR-BI pourrait avoir lieu préférentiellement sur l'un des deux pôles de la cellule.*

Une coordination dans la régulation entre les deux pôles de l'entérocyte est indispensable au fonctionnement optimal de la cellule comme l'illustre les travaux récents sur l'adressage de l'ApoB sous l'influence des lipides. Lors d'une incubation dans un milieu carencé en lipides, les cellules Caco2 n'expriment pas d'ApoB au pôle apical. L'incubation au pôle apical avec du cholestérol, de l'acide oléique ou de l'acide palmitique combinés entraîne l'exportation d'ApoB depuis le réticulum endoplasmique vers le pôle apical, y créant un pool d'ApoB. L'incubation avec ces mêmes lipides mais sous forme de micelles au pôle apical provoque la migration de l'ApoB depuis cette face luminale vers le pôle basolatéral pour la sécrétion de lipoprotéines riches en TG [Morel 2004]. Ainsi, il

semble logique qu'une régulation différente puisse exister avec la même protéine et le même effecteur selon le pôle de l'entérocyte.

### **III) TRANSPORT INTRAENTÉROCYTAIRE DES LIPIDES : RECHERCHE D'ANOMALIES DE LA PHASE INTRAENTÉROCYTAIRE DE L'ABSORPTION DES LIPIDES CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE.**

#### **3-1) INTRODUCTION**

##### **3-1-1) Généralités sur la Fibrose Kystique**

La Fibrose Kystique (FK) est la maladie autosomique récessive la plus fréquente au sein de la population caucasienne (prévalence 1/2000 individus aux USA) [MacLusky 1990]. Ces patients souffrent principalement de troubles pulmonaires, gastro-intestinaux, métaboliques et nutritionnels [Khan TZ 1995] [Konstan 1994]. La FK est causée par la mutation d'un seul gène qui code pour le Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). Cette protéine se localise normalement sur la membrane apicale de différents épithéliums dont l'épithélium intestinal. La fonction principale du CFTR est celle de canal-chlore, mais d'autres fonctions lui sont attribuées dont certaines interfèrent directement avec le métabolisme des Acides Gras Essentiels (AGE) comme nous le détaillerons ultérieurement. Actuellement, l'espérance de vie pour ces patients n'est que d'une trentaine d'années malgré de nombreux progrès dans la prise en charge pneumologique, nutritionnelle et dans l'antibiothérapie.

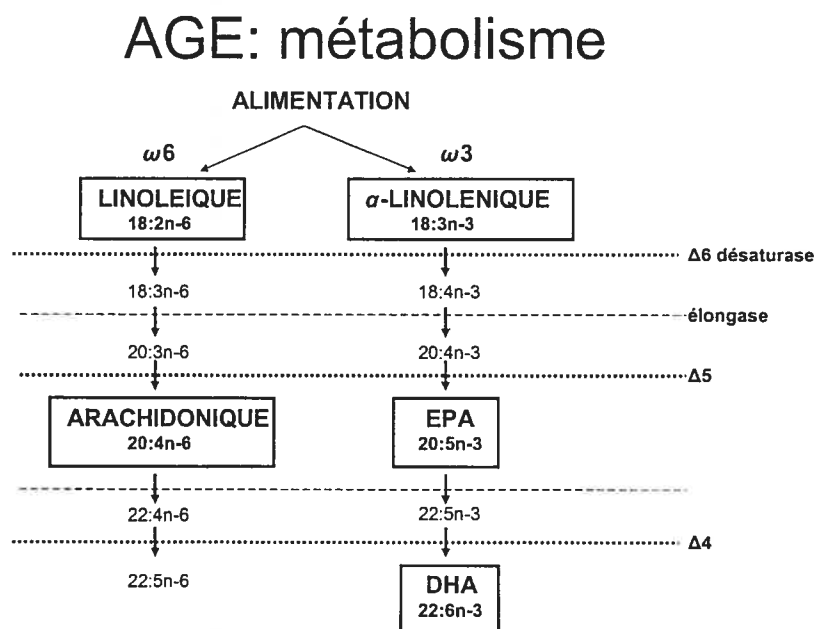
##### **3-1-2) Généralités sur les Acides Gras Essentiels**

Les AGE sont l'acide linoléique (C18 :2n-6) et linoléique (C18 :3n-3). Ils sont qualifiés d'essentiels car ils ne peuvent pas être synthétisés de novo chez l'humain. Ils sont présents dans les TG, les PL et les esters de cholestérol (CE). Les AG insaturés sont classés selon la place de la première double liaison par rapport au groupement carboxyle terminal. Ainsi l'acide linoléique appartient à la famille n-6 (ou oméga 6, noté  $\omega 6$ ) alors que l'acide



linoléique appartient à la famille n-3 (ou oméga 3, noté  $\omega 3$ ). Une fois absorbés, les AGE peuvent être métabolisés en acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPLC) par l'action successive de désaturases et d'élongases (cf schéma AGE métabolisme). Ces enzymes sont communes aux différentes familles d'AG insaturés ce qui explique le phénomène de compétition qui peut exister entre les différents AGE pour ces enzymes en raison des apports excessifs des uns vis-à-vis des autres. Les principaux métabolites de la famille  $\omega 3$  sont l'acide eicosapentaénoïque (EPA (C20:5 n-3)) et l'acide docosahexaénoïque (DHA (C22 :6n-3)). Pour la famille  $\omega 6$ , on relèvera simplement comme métabolite l'acide arachidonique (AA (C20 :4n-6)) car nous développerons les aspects pertinents aux rôles potentiels de ces métabolites ultérieurement.

**Figure 9 Voies métaboliques des acides gras essentiels**



Légende : Les 2 voies métaboliques des AGE omega 3( $\omega 3$ ) et omega 6 ( $\omega 6$ ) sont en compétition pour les mêmes enzymes (désaturases et élongases).

### 3-1-3) Statut en acides gras essentiels des patients atteints de fibrose kystique

- **Niveaux plasmatiques et tissulaires des  $\omega 3$**

Les taux d'EPA plasmatiques reflètent les apports nutritionnels des jours précédents, alors que leurs taux dans les membranes érythrocytaires reflètent davantage les entrées nutritionnelles des semaines ou des mois antérieurs [Katan 1991]. L'étude d'Henderson démontre bien cette différence puisque les taux plasmatiques d' $\omega 3$  reviennent à leurs valeurs basales après un wash-out de 6 semaines [Henderson 1994].

La majorité des études chez les sujets FK retrouvent dans le plasma des taux normaux de 18 :3n-3 et des taux abaissés d'EPA et de DHA. On peut noter que chez les patients FK, bien que le taux d'absorption intestinale des  $\omega 3$  soit abaissé par rapport aux sujets normaux, la supplémentation permet quand même d'augmenter significativement les taux d' $\omega 3$  (10 fois chez les FK versus 23 fois chez les contrôles sains) [Henderson 1994].

- **Niveaux plasmatiques et tissulaires des  $\omega 6$**

Des taux plasmatiques abaissés C18 :2n-6 se retrouvent dans la majorité des études concernant les patients FK [Katz 1996] [Tuxen-Mengedoht 1999] [Van Egmond 1996]. Cependant, l'absorption intestinale de cet AGE est normale chez les patients FK en termes de pourcentage d'acide linoléique, mais avec une plus grande variabilité et un retard d'absorption d'environ 2h par rapport aux sujets sains [Van Hubbard 1987]. Il est important de souligner ici le rôle facilitateur que pourraient jouer les TG à chaîne moyenne (MCT) lorsqu'ils sont ajoutés à l'acide linoléique : le délai d'absorption est aboli avec les MCT par rapport à l'huile de carthame, et de manière étonnante, le pourcentage d'absorption est même supérieur à celui des sujets contrôles, sans que cela ait été clairement expliqué [Van Hubbard 1987]. La supplémentation par voie orale en  $\omega 6$  entraîne une augmentation significative des acides dihomogamma-linolénique (C20 :3n-6) dans la fraction PL et CE alors que le DHA décroît dans la fraction CE suite à 4 semaines de supplémentation en C18 :2n-6 [Christophe 1994] ou après 3 mois d'une association de C18 :3n-6 et de C18 :2n-6 [Steinkamp 2000]. Cependant, les taux plasmatiques ne rejoignent jamais la normale, et cette augmentation semble surtout n'être que transitoire, le maximum étant atteint après 6 mois de supplémentation pour diminuer progressivement ensuite entre le 6<sup>e</sup> et le 12<sup>e</sup> mois

de la supplémentation. Après arrêt de toute supplémentation, il faut attendre 4 mois pour rejoindre les taux initiaux [Dodge 1990]. Ce résultat intéressant est confirmé par l'échec d'une supplémentation en C18 :2n-6 d'une année pour normaliser le statut anormal en AGE d'une douzaine d'enfants FK ayant une insuffisance pancréatique [Lloyd-Still 1980]. L'ensemble de ces résultats (absorption normale et échec pour normaliser les taux d'AGE) sont en faveur d'une anomalie intrinsèque du métabolisme des AGE plutôt que d'une carence classique par malabsorption intestinale, d'autant plus que les autres anomalies lipidiques ont pu être corrigées sous traitement (par exemple normalisation des taux élevés d'AG Monosaturés).

### **3-1-4) Relations entre CFTR et acides gras essentiels**

Plusieurs résultats suggèrent qu'en dehors de la malabsorption, d'autres facteurs pourraient aggraver l'état déficitaire en AGE : l'état d'inflammation chronique qui augmenterait la consommation de certains AGE comme l'AA (20 :4n-6) précurseur des médiateurs de l'inflammation (leukotriènes, prostaglandines, prostacyclines) [Strandvik 1996] ; ou bien un turn-over accéléré des lipides membranaires [Rogiers 1984]. Cependant, ces éléments ne semblent pas suffisants pour expliquer la fréquence et l'importance de la carence.

C'est pourquoi, un défaut intrinsèque du métabolisme des AGE lié à une protéine CFTR non fonctionnelle a été évoqué. Plusieurs données de la littérature suggèrent ce point particulier. Tout d'abord la carence en AGE apparaît très précocement chez les enfants, dès les premières semaines de vie [Steinkamp. 2000] et est présente chez des enfants atteints de FK mais bien nourris, sans stéatorrhée ou sous traitement substitutif d'enzymes pancréatiques soulignant ainsi en partie son indépendance vis-à-vis de la seule malabsorption intestinale [Clandinin 1995] [Lloyd-Still 1981] [Parsons 1988] [Roulet 1997], [Chan 1992]. De plus, une corrélation a été rapportée entre le statut en EFA et le génotype : les patients CF homozygotes sont plus carencés en acides gras que les hétérozygotes, eux même plus déficients que les sujets non atteints de FK [Christophe 1994]. De même, les taux plasmatiques d'AGE sont plus abaissés chez les patients ayant les mutations les plus graves comme la  $\Delta F508$  [Strandvik 2001]. Enfin, le profil des AGE

plasmatiques ou tissulaires ne correspond pas toujours avec celui d'un déficit classique en AGE par carence d'apport ou d'absorption puisque des taux élevés d'AA ont été rapportés [Carlstedt-Duke 1986] [Lloyd-Still 1981] [Stead 1986] [Strandvik 1996]. Des études in vitro montrent que l'AA est capable d'altérer la fonction du canal CFTR suggérant un possible effet délétère de taux élevés de cet acide gras [Linsdell 2000]. On peut souligner la limite des modèles animaux CFTR knock-out pour répondre à la question posée puisque le déficit en AGE qui accompagne la mutation du CFTR varie selon l'espèce animale. Les tissus de certaines souris mutantes sont déficitaires surtout en AGE de la famille n-3 [Linsdell 2000], alors que d'autres espèces sont carencées principalement en AGE n-6 [Dombrowsky 2003], rendant impossible l'extrapolation à l'humain.

### **3-1-5) Importance du statut nutritionnel pour le pronostic dans la fibrose kystique**

De nombreuses études ont insisté sur la corrélation existante entre un mauvais statut nutritionnel et un pronostic défavorable chez les patients atteints de FK [Ramsey 1992]. Une dénutrition chronique est associée à un retard staturo-pondéral chez l'enfant FK ainsi qu'à une maladie pulmonaire plus grave [Ramsey 1992] [Kraemer 1978]. Les patients sans stéatorrhée présentent une détérioration plus lente de leur fonction pulmonaire [Gaskin 1982]. Cependant, les taux bas d'AGE ou de leurs métabolites ne sont pas toujours corrélés avec les mesures anthropométriques ou la fonction pulmonaire [Strandvik 2001], ce qui peut en partie s'expliquer par la génétique comme nous le détaillerons dans ce travail. Les taux de survie et la qualité de vie des patients FK sont aussi corrélés avec la malnutrition dans la FK [Corey 1988]. Ces corrélations positives entre un bon état nutritionnel et un meilleur devenir clinique à long terme soulignent l'importance d'une prise en charge nutritionnelle optimale, particulièrement d'une optimisation des apports diététiques en AGE, d'une balance énergétique positive puisque les AGE peuvent servir aussi de substrat énergétique en situation de carence calorique et d'une absorption intestinale efficace des lipides.

### 3-2) MALABSORPTION INTESTINALE DES LIPIDES AU COURS DE LA MUCOVISCIDOSE

La malabsorption des lipides au cours de la FK résulte de plusieurs anomalies au cours des différentes étapes de la digestion.

#### 3-2-1) Anomalies de la phase lipolytique

- **Déficit en lipase pancréatique**

L'insuffisance pancréatique externe est la cause principale de la malabsorption des lipides comme le démontre la nette diminution de la stéatorrhée sous enzymes pancréatiques. Pour qu'une stéatorrhée apparaisse, le pancréas doit être détruit à plus de 90% [DiMagno 1973], ce qui explique que la mesure des graisses dans les selles soit un indicateur peu sensible de la fonction pancréatique. Cependant, cette mesure est la technique la plus couramment utilisée car la moins agressive et permettant d'évaluer le besoin principal du malade : la correction de la malabsorption des graisses par une opothérapie substitutive. La grande majorité des patients atteints de FK présente une insuffisance pancréatique (90% d'entre eux). Chez les patients conservant une sécrétion pancréatique, il existe un continuum à parir de ceux ayant une fonction pancréatique presque nulle (2%) jusqu'à ceux qui conservent une sécrétion totalement normale. L'insuffisance pancréatique externe entraîne non seulement un défaut de sécrétion de lipase pancréatique, mais également son inactivation prématurée en milieu acide à cause de la baisse de sécrétion d'ions bicarbonates. En effet, la sécrétion de bicarbonate peut atteindre des valeurs inférieures à 10% de la normale [Gaskin 1982]. Enfin, le déficit en co-lipase qui existe aussi durant la FK altère également la fonction de la lipase pancréatique. Cependant, les données de la littérature sur cette co-enzyme au cours de la FK sont rares [Gaskin 1984] [Blackberg 1979].

La lipase gastrique peut compenser en partie le déficit en lipase pancréatique au cours de la fibrose kystique. En effet, son activité lipolytique après repas test est environ trois fois supérieure chez les patients [Roulet 1987] alors que l'activité basale est comparable entre ces deux groupes [Abrams 1984]. Cette capacité accrue de lipolyse

s'explique par la persistance prolongée de son activité puisque cette enzyme est résistante dans le milieu anormalement acide du duodénum et ne peut être inactivée par les acides biliaires qui font défaut. Cette activité lipolytique persistante est capable d'assurer entre 40 et 70% de la digestion des lipides alimentaires [Hamosh 1990] [Fredrikzon 1980].

- **Déficit en Phospholipase et Cholestérol-Estérase**

Les autres enzymes lipolytiques sont aussi altérées : les activités des phospholipases (A1 et A2) et de la cholestérol-estérase sont dramatiquement diminuées au cours de cette maladie, diminuant l'absorption intestinale des PL et du cholestérol [Nouri-Sorkhabi 2000] [Mathias 1981].

### **3-2-2) Anomalies de la phase micellaire**

La sécrétion biliaire est également touchée quantitativement avec un flux biliaire diminué : un tiers des enfants FK présentent des taux d'acides biliaires diminués dans le duodénum [Robb 1985]. De plus, il existe des anomalies qualitatives avec une composition altérée de la bile (augmentation du rapport Glycine/Taurine) [Robb 1985] d'où des propriétés de solubilisation modifiées chez les patients FK puisque les acides biliaires conjugués à la taurine sont plus efficaces pour solubiliser les graisses. Enfin, il existe une malabsorption intestinale des acides biliaires compromettant l'efficacité du cycle entérohépatique des acides biliaires [Weber 1973] [Goodchild 1975] [O'Brien 1993] [Walters 1998].

### **3-2-3) Autres anomalies**

Enfin, bien que la majorité des patients présente une histologie de la muqueuse intestinale normale [Freye 1964], quelques anomalies à type d'atrophie duodénale et d'hyperplasie jéjunale ont été décrites chez l'animal et chez l'humain [Kent 1996] [Cox 1982] [Van Biervliet 2003]. De plus, on peut noter fréquemment la présence d'un mucus

épaissi recouvrant la bordure en brosse, ce qui pourrait interférer avec la phase absorptive [Freye 1964].

### 3-3) HYPOTHÈSES

Dans la FK, la malabsorption des graisses est donc multifactorielle comme nous venons de le détailler. Cependant, ces facteurs intraluminaux, en particulier l'insuffisance pancréatique, ne suffisent pas à expliquer l'ensemble de la malabsorption intestinale. En effet, 95% des patients FK présentent une stéatorrhée au moment du diagnostic malgré les importantes capacités fonctionnelles du pancréas et la grande efficacité de sa lipase [Zentler-Munro 1985]. D'autre part, la malabsorption des graisses touche plus de la moitié des enfants dès l'âge de 2 mois [Bronstein 1992]. Cette précocité suggère que l'insuffisance pancréatique n'est pas seule responsable de la stéatorrhée. Les traitements substitutifs par enzymes pancréatiques, bien qu'ayant grandement amélioré la stéatorrhée, ne réussissent pas à la corriger totalement : 10 à 20% des graisses consommées ne sont toujours pas absorbées chez certains patients [Zentler-Munro 1985] [Carroccio 1992].

- **Hypothèse 1**

*En plus des anomalies intraluminales (insuffisance pancréatique et anomalies biliaires), des anomalies intraentérocytaires pourraient participer activement à la malabsorption intestinale des lipides au cours de la fibrose kystique.*

D'où notre hypothèse principale qu'il existe chez les patients FK carencés en AGE une altération des étapes intraentérocytaires régulant l'absorption des lipides, notamment de l'estérification des triglycérides, des phospholipides, des esters de cholestérols en plus de la biosynthèse des apolipoprotéines. L'ensemble de ces anomalies intracellulaires pourrait entraîner une altération de l'assemblage et de la sécrétion des chylomicrons, augmentant la malabsorption des graisses. Ces anomalies pourraient être particulièrement observées chez des patients FK déjà carencés en AGE.

- **Hypothèse 2**

*S'il existe des anomalies de la phase intraentérocytaire de l'absorption des lipides, un dysfonctionnement de la MTP pourrait éventuellement être impliqué.*

En effet, le rôle essentiel de la MTP dans l'absorption intestinale des lipides est clairement démontré par sa mutation dans l'abétalipoprotéïnémie qui s'accompagne d'une stéatorrhée massive, d'une hypocholestérolémie et d'une hypotriglycémie.

#### **IV) PÔLE BASOLATÉRAL : ÉTUDE DES CONSÉQUENCES CLINIQUES D'UN DÉFICIT DE SÉCRÉTION DES CHYLOMICRONS AU COURS DE LA MALADIE DE RÉTENTION DES CHYLOMICRONS, CORRÉLATION GÉNOTYPE – PHÉNOTYPE**

##### **4-1) INTRODUCTION**

Après avoir étudié la phase absorptive du pôle apical, puis les mécanismes intraentérocytaires, nous aborderons la dernière étape : la sécrétion des lipides au pôle basolatéral. Comme nous l'avons souligné dans l'introduction, les lipoprotéines (LP) contenant l'ApoB occupent une place centrale dans le transport des lipides alimentaires. Si le foie produit essentiellement des VLDL contenant de l'ApoB 100, l'intestin humain synthétise principalement des chylomicrons qui possèdent l'ApoB48. Ce sont ces chylomicrons qui vont nous intéresser plus particulièrement dans ce chapitre. Nous avons déjà abordé au chapitre 1-3-3) les 3 étapes clefs de la sécrétion des chylomicrons : i) synthèse de l'ApoB 48 sans laquelle le chylomicron ne peut s'assembler ; ii) lipidation de l'ApoB 48 par la MTP pour protéger cette apolipoprotéine d'une dégradation ; et enfin, iii) le transport du préchylomicron par les vésicules COPII, sous la dépendance de la protéine Sar1 GTPase, depuis le réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi, où les lipoprotéines subiront les dernières étapes de maturation (glycosylation) qui permettront leur sécrétion dans le système lymphatique. La perturbation d'une seule de ces 3 étapes entraîne une diminution de la sécrétion d'ApoB 48 et des chylomicrons, résultant en une malabsorption des lipides.



## **4-2) GÉNÉTIQUE ET PHYSIOPATHOLOGIE DES HYPOCHOLESTÉROLÉMIES FAMILIALES**

### **4-2-1) Abétalipoprotéïnémie**

Dans les biopsies intestinales de patients atteints de AB, la grande sous-unité de 97kD de la MTP est absente alors que la PDI reste détectable [Wetterau 1992] et l'activité de transfert des TG est annulée. Le gène de la MTP est situé sur le chromosome 4 et organisé en 18 exons [Sharp 1994]. Il est exprimé à un niveau élevé dans l'entérocyte et l'hépatocyte, à un niveau moyen dans le sac vitellin pendant l'embryogénèse et à un niveau faible dans le rein et le muscle cardiaque [Wetterau 1992] [Nielsen 1998]. Une trentaine de mutations sur le gène de la grosse sous-unité ont été décrites, entraînant le plus souvent une protéine tronquée [Berriot-Varoqueaux 2000]. La conséquence est une absence complète des lipoprotéines contenant l'ApoB : chylomicrons, VLDL et LDL.

L'étude des familles démontre un mode de transmission autosomique récessif, le bilan lipidique des sujets hétérozygotes étant normal dans la plupart des cas.

L'AB se manifeste dès l'enfance et peut revêtir des formes variées. La présentation la plus commune associée : malabsorption intestinale des lipides avec diarrhée, rétinite pigmentaire, acanthocytose, dégénérescence spinocérébelleuse, profonde hypocholestérolémie, hypotriglycémie et déficit en vitamines liposolubles.

### **4-2-2) Hypobétalipoprotéïnémie**

Cette maladie se transmet sur un mode autosomique dominant, ce qui explique la présence d'anomalies lipidiques chez l'un des parents du sujet atteint. Notons que la moitié environ des cas d'hypobétalipoprotéïnémies n'a pas de cause génétique identifiée [Wu 1999]. Cependant, des anomalies ont été identifiées au cours des dernières années. Plus de 40 mutations du gène de l'ApoB localisé sur le chromosome 2 ont été décrites [Schonfeld 2003]. Ces mutations entraînent le plus souvent l'apparition d'un codon stop qui provoque la synthèse d'une protéine tronquée. Les troncatures sont exprimées en pourcentage de la longueur de l'ApoB100, elles varient de ApoB2 à ApoB89 et sont identiques à la partie

amino-terminale de l'ApoB100. Ainsi, dans le plasma de ces patients on peut retrouver en même temps 3 types de LP distinctes contenant soit l'ApoB100, soit l'ApoB48, soit enfin l'ApoB tronquée [Wagner 1991]. Il est intéressant de noter que les Apo inférieures à l'ApoB27.6 ne sont pas détectables dans le plasma du fait d'un taux de production faible et d'un taux de clearance élevé [Huang 1989] [Collins 1988]. L'entérocyte ne produit que des tronçatures d'une taille inférieure à l'ApoB48, alors que l'hépatocyte peut synthétiser toutes les longueurs. Cette différence est très certainement liée à l'existence du processus d'édition de l'ARNm de l'ApoB100 qui n'existe que dans l'intestin [Krul 1992]. Au niveau du métabolisme on peut souligner que le taux de sécrétion de l'ApoB tronquée est plus faible que celui de l'ApoB100. Cette diminution est d'autant plus marquée que la forme tronquée est courte. La production d'ApoB100 diminue de 15% lors de la ApoB89 mais elle est abaissée de 85% lorsqu'il s'agit de la ApoB40. De plus, la mutation entraîne également une baisse du taux de sécrétion de l'ApoB100 elle-même par rapport à des sujets contrôles. Ces deux anomalies de sécrétion provoquent une baisse de l'ApoB totale chez ces patients hétérozygotes. Cependant, de manière étonnante, il ne semble pas exister le plus souvent de corrélation entre le phénotype et la longueur de l'ApoB tronquée, bien que certains cas cliniques suggèrent le contraire [Wagner 1991].

Il existe une hétérogénéité génétique dans cette maladie. Chez 7 familles de patients atteints d'hypoB mais ne présentant pas d'ApoB tronquée, les études génétiques retrouvent un locus de susceptibilité sur le chromosome 3, donc hors du gène de l'ApoB, sans qu'un gène précis soit encore identifié [Pulai 1998] [Yuan 2000] [Neuman 2002]. Enfin d'autres patients n'ont aucune liaison avec ces deux chromosomes (2 et 3) [Schonfeld 2003].

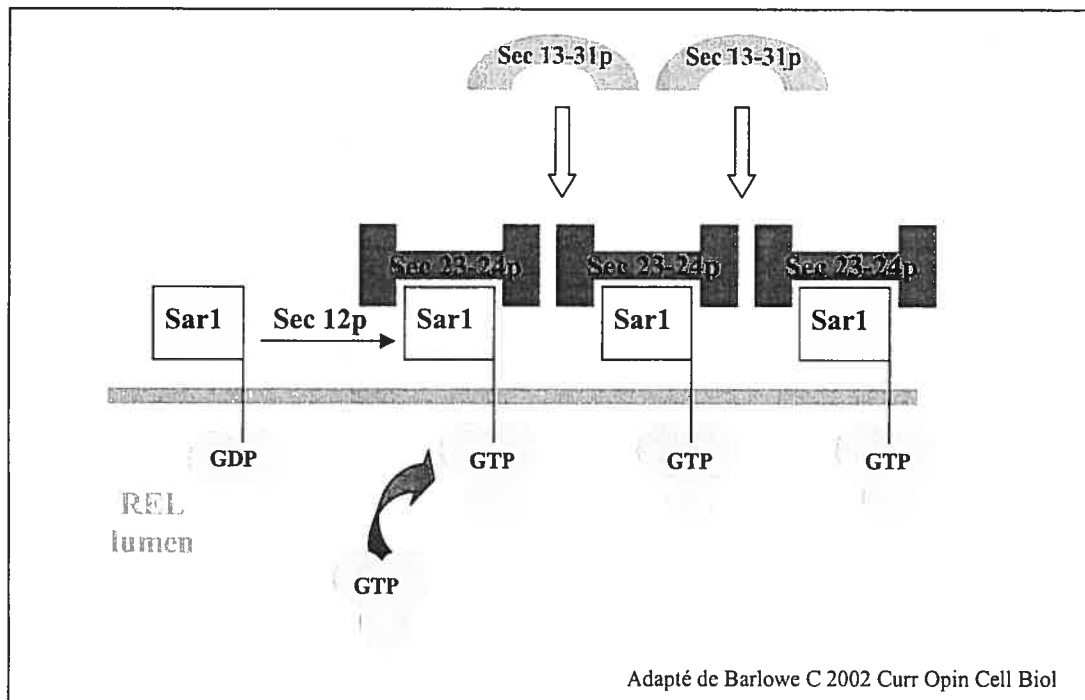
Cliniquement, on distingue d'une part les patients homozygotes « allèle nul » chez lesquels l'ApoB est totalement absente et qui ont un phénotype proche de celui de l'AB bien que les signes neurologiques apparaissent un peu plus tardivement ; d'autre part, les patients homozygotes mais ayant une ApoB tronquée plasmatique détectable. Ces derniers, tout comme les patients hétérozygotes, sont généralement asymptomatiques mais leur LDL-Cholestérol est quand même abaissé. La forme hétérozygote est fréquente, estimée entre 1/500 et 1/1000 en occident [Linton 1993]. Soulignons que l'ensemble des patients hétérozygotes avec mutation prouvée du gène de l'ApoB ne présente aucune stéatorrhée, ni complication neuro-ophtalmique, ni muqueuse duodénale blanchâtre à l'endoscopie.

L'hypocholestérolémie résulte, non pas d'une malabsorption intestinale des graisses, mais d'anomalies du métabolisme des lipoprotéines : diminution de synthèse et de sécrétion et/ou augmentation du catabolisme des apolipoprotéines [Parhofer 1991], ainsi que diminution de la charge lipidique des LP circulantes [Graham 1991] [McLeod 1994] [Spring 1992]. Notons, cependant, que certaines familles qui se présentent comme des HypoB hétérozygotes mais sans anomalie du gène de l'ApoB, ont des troubles neurologiques bien que parfois différents des troubles observés lors de carence en vitamine E [Aggerbeck 1974] [Andersen 1979] [Araki 1991] [Brown 1979] [Mawatari 1972] [Tamir 1976] [Welty 1991]. Il est particulièrement intéressant de noter que les patients hétérozygotes ont une espérance de vie allongée et un taux de morbidité plus bas que la population générale [Granot 1989] [Levy 1994]. Cependant, d'autres études rapportent une incidence augmentée pour certains types de cancers ou de maladies pulmonaires et digestives sans qu'une explication puisse être identifiée pour l'instant [Simes 1994] [Iso 1994]. Le déficit en anti-oxydants liposolubles (vitamine E) pourrait être évoqué comme une cause favorisante.

#### **4-2-3) Rétention de chylomicrons ou maladie d'Anderson**

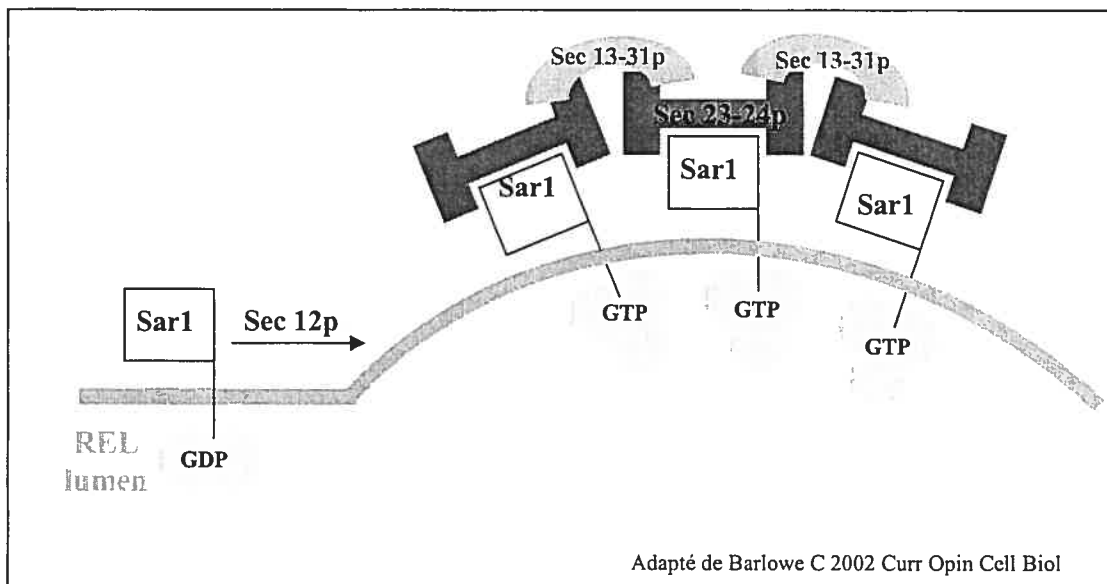
Les études génétiques de patients souffrant de rétention de chylomicrons permirent récemment de trouver un locus anormal sur le chromosome 5 correspondant au gène SARA2 codant la protéine Sar1-GTPase qui contrôle le trafic intracellulaire de protéines via les vésicules COP dépendantes [Jones 2003]. Les 8 mutations décrites entraînent une diminution d'affinité de la protéine Sar1 pour les nucléotides de guanine, d'où une baisse d'affinité aussi pour son substrat le GTP. Sar1 n'étant plus fonctionnel, la formation des vésicules COPII dépendantes ne peut être initiée et la membrane du RE devient incapable de bourgeonner. Les étapes de formation des vésicules CopII sont résumées dans les 2 figures ci-dessous. Ainsi apparaît un déficit sélectif en ApoB48, non par défaut de synthèse ou dégradation prématurée, mais par diminution de sécrétion.

**Figure 10 Étapes initiales d'activation de Sar1b**



Légende : L'échange du GDP pour GTP permet le recrutement d'un premier complexe protéique (Sec 23-24p). Ce complexe induit la polymérisation avec d'autres Sar1-Cec 23-24p et permet le recrutemtn d'un autre complexe (Sec 13-31p).

**Figure 11 Étape de bourgeonnement de la membrane du RE**



Légende : Le recrutement du complexe Sec 13-31p induit la polymérisation des autres complexes et la déformation de la membrane du réticulum endoplasmique.

Ces patients présentent communément une malabsorption intestinale avec stéatorrhée, un aspect de la muqueuse duodénale en « gelée blanche » à la gastroscopie, un retard staturo-pondéral, des signes neurologiques très variables dont le plus commun est une aréflexie, mais pas de rétinite pigmentaire. Les LP contenant l'ApoB100 sont présents mais diminuées alors que celles contenant l'ApoB48 sont totalement absentes. Le HDL-Cholestérol est diminué, ainsi que les lipides totaux, le cholestérol, les PL et les vitamines liposolubles. Les TG à jeun sont normaux mais ne s'élèvent pas après repas gras.

SARA2 est exprimé dans de nombreux tissus comme le petit intestin et le foie, mais aussi le muscle et le cerveau. Ainsi des anomalies de Sar1, qui est impliqué dans le trafic intracellulaire de plusieurs protéines autres que les apolipoprotéines, pourraient être responsables, en partie du moins, des anomalies musculaires et neurologiques rencontrées chez les patients souffrant de rétention chylomicrons. Cette possibilité peut être une des explications possibles à l'hétérogénéité clinique des atteintes neurologiques rencontrées.

#### 4-3) ANOMALIES BIOLOGIQUES DES HYPOCHOLESTÉROLÉMIES FAMILIALES :

##### 4-3-1) Bilan lipidique

Si ces trois maladies génétiques partagent certaines anomalies communes du bilan lipidique, chacune présente des particularités dans l'intensité ou le type de ces anomalies. Parmi les troubles communs, nous relevons une baisse générale des lipides ; abaissement du cholestérol total, de l'apoB et une diminution du LDL-C plus importante que celle du HDL-C. Enfin, les TG et les PL sont bas également sauf exception comme nous allons le voir. Un élément diagnostique essentiel est l'absence d'augmentation après charge orale en graisse des chylomicrons, ApoB et TG.

Dans l'AB et dans l'hypoB homozygote sans ApoB tronquée, les anomalies sont les plus sévères. Les taux de cholestérol total sont effondrés et l'ApoB est soit indétectable, soit se retrouve à des taux extrêmement faibles. Les TG sont le plus souvent inférieurs à 10 mg/dL et les PL à 100 mg/dL. Après épreuve de charge orale en graisse, les chylomicrons, l'ApoB et les TG n'augmentent pas. La seule population lipoprotéique présente dans le plasma est la fraction HDL, bien que les taux circulants soient plus bas que dans la

population générale. Ces HDL assurent alors le transport des lipides d'où leur composition anormalement riche en cholestérol, PL, TG et vitamine E, ce qui explique leur taille habituellement augmentée. Ces HDL présentent des anomalies quantitatives mais aussi qualitatives de leur composition en lipides et en apolipoprotéines, comme un enrichissement en ApoE de deux fois la normale [Blum 1982] [Deckelbaum 1982] [Ikewaki 1994]. Ainsi, les niveaux plasmatiques d'ApoE sont normaux alors que ceux d'ApoAI et AII sont abaissés d'un tiers ou de la moitié [Shepherd 1977]. Enfin, les autres Apo (AIV, CI, CII et CIII) sont également abaissés [Glickman 1991] [Illingworth 1981].

Dans l'HypoB homozygote avec ApoB tronquée, bien que les taux de cholestérol total et de LDL-C soient aussi effondrés que dans la forme homozygote sans troncature, l'ApoB par contre est mesurable bien que très faible (souvent < 10 mg/dL), on peut détecter les deux formes (ApoB100 + ApoB tronquée). Les TG sont normaux à jeun et peuvent augmenter après épreuve de charge [Gabelli 1996 1996 11189 Baggio]. Enfin, les niveaux de HDL sont très variables selon les patients (de 20 à 80 mg/dL).

Dans l'HypoB hétérozygote, le cholestérol total, le LDL-C et l'ApoB sont diminués environ de moitié par rapport aux sujets contrôles. Les TG sont abaissés mais de manière variable selon les études. Les HDL varient selon le type de mutation, pouvant être abaissés, normaux ou même augmentés [Farese 1992 33 569 Pierotti] [Ruotolo 1998 137 125 Zanelli].

Dans la MRC, le cholestérol total est diminué mais pas effondré (>50 mg/dL). Les LP contenant l'ApoB48 sont absentes (CM) alors que celles synthétisées avec l'ApoB100 sont présentes mais abaissées (VLDL, LDL). Le HDL-C est abaissé de moitié, ainsi que l'ApoAI. Enfin, les TG à jeun sont normaux mais n'augmentent pas après la charge orale en graisse, et il n'y a pas de CM, ni d'ApoB48 sécrétés dans la circulation. Les PL sont aussi diminués et n'augmentent pas non plus après le repas gras. Enfin, les HDL sont abaissés.

#### 4-3-2) Vitamines liposolubles

Les troubles dans le statut en vitamines liposolubles retrouvés dans ces 3 maladies sont la conséquence de la malabsorption intestinale des lipides et de la baisse des LP capables de transporter ces vitamines. Cependant, le degré de carence n'est pas le même pour toutes ces vitamines. En effet, si les taux plasmatiques de vitamine E et de  $\beta$ -carotène sont toujours très bas chez les patients avec AB ou hypoB homozygote, les autres vitamines A, K et D ont des taux proportionnellement plus élevés. Cette différence peut s'expliquer par l'existence de transporteurs sériques spécifiques indépendants des LP pour les vitamines A, et D ; ainsi que par la synthèse endogène cutanée pour la vitamine D par exemple.

La vitamine E est toujours basse en plasmatique dans l'AB, une diminution est observée dès la naissance [Muller 1983], démontrant que la carence est secondaire surtout à des anomalies de transport [Kayden 1993]. Ceci explique pourquoi les complications de la carence apparaissent plus tôt que dans les pathologies où prédomine une carence par malabsorption intestinale pure, comme la fibrose kystique par exemple. En effet, l'absorption intestinale, la sécrétion et le transport plasmatique de la vitamine E est dépendante tout d'abord des chylomicrons, cette vitamine n'ayant pas de transporteur plasmatique spécifique connu. Au cours de la lipolyse des chylomicrons, une partie de la vitamine E est distribuée aux tissus, puis la vitamine restante est internalisée dans le foie avec les remnants avant d'être resécrétée dans les VLDL pour être acheminée à nouveau aux tissus via essentiellement les LDL. Cette resécrétion semble être un phénomène continu. Il est intéressant de noter que l'absorption intestinale de la vitamine E, comme son incorporation aux chylomicrons, ne sont pas spécifiques d'une forme particulière ( $\alpha$  ou  $\gamma$ -tocophérol, RRR ou SSR- $\alpha$ -tocophérol). Par contre, le foie rejette préférentiellement l' $\alpha$ -tocophérol lors de la sécrétion des VLDL. Cette incorporation sélective explique le maintien d' $\alpha$ -tocophérol plasmatique à des taux constants chez le sujet sain : 80 à 90% de la vitamine E sérique est sous forme d' $\alpha$ -tocophérol, 5 à 18% de  $\gamma$ -tocophérol et 3 à 9% de  $\beta$ -tocophérol [Traber 1990]. Dans les pathologies où l'ApoB est absente, les HDL deviennent la seule source de vitamine E et ils s'enrichissent à des taux supra physiologiques.

Cependant, les taux de HDL étant souvent abaissés ils ne peuvent compenser complètement la carence des LP riches en apoB.

#### 4-3-3) Acides gras essentiels

Les anomalies des acides gras les plus fréquemment rapportées comprennent une diminution de l'acide linoléique au niveau plasmatique et tissulaire (membrane des GR, tissu adipeux et foie) mais sans diminution de son métabolite, l'AA du moins au niveau plasmatique [Frezal 1961] [Jones 1967] [Ways 1963] [Isselbacher 1964]. Pourtant, ces sujets ne présentent habituellement pas de déficit important en AGE puisqu'ils ne démontrent pas de signes cliniques de carence, et que leur ratio triène / tétraène est habituellement non augmenté. Soulignons que, d'une part, le coefficient d'absorption intestinal des graisses est diminué de moitié mais non nul, et que, d'autre part, la supplémentation orale en AGE (18 :2  $\omega$ 6) permet d'augmenter les taux plasmatiques sans toutefois les normaliser [Jones 1967] [Kayden 1980] [MacGilchrist 1988]. Ainsi, des voies de sécrétion des AGE indépendantes de l'ApoB semblent probables.

Notons que les différences dans le statut en AGE entre les différentes hypocholestérolémies familiales sont assez mal documentées à travers la littérature. Nous pouvons noter en ce qui concerne la MRC que la plupart des cas rapportés ne présentent pas d'anomalies sauf dans une cohorte canadienne où existe un déficit en acide linoléique et AA [Levy 1987].

#### 4-3-4) Acanthocytose

L'acanthocytose désigne la déformation en spicules de la membrane des érythrocytes. Les acanthocytes sont pathologiques lorsqu'ils touchent plus de 5% des globules rouges (GR). Dans l'AB et l'hypoB homozygote sans apoB tronquée, cette déformation se retrouve de manière constante, le plus souvent à des taux élevés (de la moitié à deux tiers des GR sont touchés) et est irréversible. Par contre dans les autres formes d'hypoB, l'acanthocytose est exceptionnelle et seulement à des taux bas. Enfin, elle



existe aussi exceptionnellement dans la MRC. Notons, cependant, que cette déformation des membranes érythrocytaires n'est pas spécifique aux hypocholestérolémies familiales puisqu'on la retrouve dans d'autres pathologies comme des syndromes sévères de carence en vitamine E ou certaines maladies neurologiques d'origine génétiques [Danek 2005]. Cette anomalie pourrait être due à une diminution de la fluidité de la membrane des GR suite aux modifications de ses PL (augmentation du rapport sphingomyéline/lécithine, diminution en acide linoléique et arachidoniques, augmentation en acides gras saturés) [Bach 1967] [Phillips 1962] [Ways 1963]. Cependant, le rôle direct du déficit en vitamine E dans la physiopathogenèse des acanthocytes demeure controversé [Cooper 1977].

#### **4-4) SIGNES CLINIQUES**

##### **4-4-1) Physiopathologie des anomalies cliniques**

Le déficit en vitamines liposolubles (A, D, E, K) s'observe le plus souvent chez des patients qui souffrent d'une malabsorption intestinale des lipides : fibrose kystique, cholestase, grêle court, AB, hypoB et rétention de chylomicrons. Parmi ces vitamines, la vitamine E est particulièrement abaissée chez les patients souffrant d'hypocholestérolémie familiale. La vitamine E est l'un des principaux antioxydants liposolubles protégeant l'intégrité des membranes cellulaires contre la peroxydation ; elle agit aussi pour stabiliser les membranes biologiques et intervient dans la régulation de différents systèmes enzymatiques. Plus récemment a été identifié un rôle de régulation spécifique des fonctions structurales de la cellule : adhésion, prolifération et apoptose [Stocker 2000]. L'importance du rôle antioxydant de la vitamine E dans la physiopathologie des symptômes cliniques est suggérée par la présence de dépôts de lipofuscine dans différents tissus : muscle strié squelettique, muscle lisse de la paroi intestinale et du myocarde, foie, rétine, moelle épinière [Berriot-Varoqueaux 2000]. En effet, ce pigment est un indicateur de la peroxydation lipidique et peut résulter de l'attaque de la membrane mitochondriale par des radicaux libres secondairement à une carence en antioxydant comme la vitamine E [Bieri 1984].

#### 4-4-2) Formes cliniques classiques

Les signes cliniques varient selon les 3 maladies étudiées comme nous l'avons rapidement évoqué dans la première partie. On peut cependant relever les signes suivants qui surviennent avec des intensités variables selon les patients :

- **Les signes gastrointestinaux**

Une intolérance aux graisses avec stéatorrhée et diarrhée est le premier signe à apparaître chez l'enfant après sa naissance. La malabsorption entraîne une cassure staturo-pondérale dès la petite enfance pour l'AB, l'hypoB homozygote et la MRC.

Le foie est le plus souvent normal, mais une hépatomégalie avec stéatose et éventuellement une légère cytolyse peut se rencontrer. A noter, de rares cas de cirrhose ont été rapportés [Partin 1974] [Illingworth 1980] [Avigan 1984].

- **Les signes neurologiques et musculaires**

La carence en vitamine E entraîne une diminution de sa concentration dans les fibres nerveuses périphériques [Traber 1987]. Cette diminution semble précéder la dégénérescence axonale. Les signes neurologiques principaux sont les plus marqués dans l'AB et l'hypoB homozygote : vers l'âge de 5 ans, perte des réflexes achilléens; puis entre 10 et 20 ans démyélinisation périphérique et centrale provoquant une diminution de la proprioception, une dysarthrie et une ataxie. Les potentiels évoqués et l'électromyogramme retrouvent une baisse des potentiels d'action sensoriels précédant les signes cliniques.

Une atteinte musculaire peut survenir. Il s'agit non seulement d'une atteinte neurologique mais aussi d'une myopathie primitive avec anomalie structurelle des fibres musculaires, faiblesse musculaire et augmentation plasmatique des enzymes (Créatine Kinase) [Hegele 1985]. Elle se retrouve dans les 2 formes sévères d'hypocholestérolémie ainsi que dans la MRC.

Enfin, dans l'AB et l'hypoB homozygote, une dégénérescence rétinienne pigmentaire décelable au rétinogramme dès l'âge de 1 an [Muller 1977] et au fond d'œil

dès 2 ou 3 ans est responsable d'une diminution de l'acuité visuelle, de la vision nocturne entre 0 et 10 ans, elle évolue rarement jusqu'à la cécité.

- **Les signes hématologiques**

Une acanthocytose est toujours retrouvée dans l'AB et l'HypoB homozygote et elle touche plus de la moitié des érythrocytes, mais elle est moins fréquente et moins prononcée dans la rétention de chylomicrons. Elle constitue une aide au diagnostic précieuse dans certains cas.

Des anomalies de la coagulation vitamine K sensibles peuvent survenir y compris dans l'enfance pour les cas d'AB [Caballero 1980].

- **Les signes cardiaques**

Une cardiomyopathie dont la fréquence n'est pas connue se retrouve chez certains patients avec AB, ainsi qu'une fibrose myocardique ou péricardique avec accumulation de lipofushine.

#### 4-4-3) Hétérogénéité clinique :

Pour expliquer les différences observées tant en intensité que dans la nature des symptômes neurologiques observés on peut proposer plusieurs hypothèses : des apports nutritionnels ainsi qu'une compliance au traitement substitutif variables. Ces deux données s'avèrent très difficiles à mesurer en pratique.

A l'état physiologique, la voie principale d'apport en vitamine E se fait par les LDL via leur récepteur membranaire. En l'absence de LDL, le transfert d' $\alpha$ -tocopherol à partir des HDL ou après leur internalisation est probable. Cette voie serait surtout importante pour le foie et les surrénales [Kayden 1993]. Des anomalies ou un polymorphisme du récepteur ApoE des HDL pourrait rendre compte de variation entre individus atteints d'une même maladie hypocholestérolémiant.

Des variations dans l'efficacité des protéines cytosoliques impliquées dans le métabolisme de la vitamine E pourraient également expliquer partiellement l'hétérogénéité

des signes cliniques. Ainsi l' $\alpha$ -Tocopherol Transfert Protein ( $\alpha$ TTP) joue un rôle dans la sécrétion sélective de l' $\alpha$ -Tocopherol par le foie [Yoshida 1992], et une mutation à son niveau est susceptible d'entraîner une ataxie par carence en vitamine E [Ouahchi 1995]. Aucune information sur son rôle potentiel dans l'incorporation de l' $\alpha$ -tocopherol aux HDL n'est disponible, mais si des sujets présentaient une capacité accrue d'incorporation ceci pourrait compenser partiellement le défaut en LDL. Cette protéine de liaison est localisée non seulement dans le foie, mais aussi dans le cerveau de patients atteints de différentes pathologie : AB, ataxie-déficit en vitamine E, et des maladies neurodégénératives causées par le stress oxydatif comme la maladie d'Alzheimer ou le syndrome de Down [Copp 1999]. Cette protéine est localisée plus précisément dans les cellules de Purkinje qui jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'équilibre au niveau cérébelleux, or ces patients présentent une ataxie indiquant que l' $\alpha$ TTP pourrait être impliquée dans la sémiologie neurologique des carences en vitamine E. Plus récemment, une autre protéine de liaison avec la vitamine E a été identifiée : la Tocopherol-Associated Protein (TAP). Son rôle exact n'est pas encore connu mais elle interviendrait dans le métabolisme intracellulaire de la vitamine et, fait particulièrement intéressant, elle est aussi hautement exprimée dans le cerveau [Stocker 1999].

D'autres carences susceptibles d'affecter le système nerveux central peuvent également contribuer au tableau clinique. Ainsi, un défaut bioénergétique au niveau cérébral et musculaire est mis en évidence chez des patients hypoB avec un taux plasmatique bas en Coenzyme Q10 associé à une altération des fonctions mitochondriales indispensables à un fonctionnement neurologique normal [Lodi 1997].

Enfin, il y a un rôle direct de la protéine mutée Sar1 qui est présente dans plusieurs tissus comme le muscle. Une corrélation entre le type de mutation et le phénotype aurait alors un impact direct possible.

#### 4-5) HYPOTHÈSES

- **Hypothèse 1**

*Compte tenu du faible nombre de mutations publiées, il est probable que de nouvelles mutations de SARA2 restent à découvrir.*

- **Hypothèse 2**

*Une corrélation entre génotype et phénotype n'a jamais été recherchée. La mise en évidence de mutations entraînant une expression clinique plus sévère pourrait aider à déterminer les parties fonctionnelles essentielles de la protéine mutée, et orienter la prise en charge clinique.*

- **Hypothèse 3**

*Il n'existe pas actuellement de recommandations spécifiques pour la prise en charge de cette maladie rare. Comparer deux cohortes (une française et une canadienne) ayant eu des prises en charge thérapeutiques différentes apporterait des éléments permettant d'élaborer de telles recommandations.*

**Partie B : Articles**

**Article 1 accepté dans:**

**Journal of Cellular Biochemistry**

Asymmetrical Regulation of Scavenger Receptor Class B Type I by Apical and Basolateral Stimuli Using Caco-2 Cells

**Peretti N<sup>(1,2)</sup>, Delvin E<sup>(1,3)</sup>, Sinnett D<sup>(1,4)</sup>, Marciel V<sup>(1,2)</sup>, Garofalo C<sup>(1,2)</sup> and Levy E<sup>(1,2)</sup>\***

<sup>(1)</sup>Centre de Recherche, CHU-Sainte-Justine, Departments of <sup>(2)</sup>Nutrition, <sup>(3)</sup>Biochemistry and <sup>(4)</sup>Hematology & Oncology, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada, H3T

1C5

**Running Head:** SR-BI regulation in intestinal cells

**Key words:** SR-BI, Intestine, Cytokines, Fatty acids, Hormones, Fibrates.

**Number of Figures:** 9

**Address correspondence to:**

Dr. Emile Levy

Centre de Recherche


CHU-Sainte-Justine

3175 Côte Ste-Catherine

Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

Tel.: (514) 345-4626

Fax: (514) 345-4999



**ABSTRACT**

Cholesterol uptake and the mechanisms that regulate cholesterol translocation from the intestinal lumen into enterocytes remain for the most part unclear. Since scavenger receptor class B type I (SR-BI) has been suggested to play a role in cholesterol absorption, we investigated cellular SR-BI modulation by various potential effectors administered in both apical and basolateral sides of Caco-2 cells. With differentiation, Caco-2 cells increased SR-BI protein expression. Western blot analysis showed the ability of cholesterol and oxysterols in both cell compartments to reduce SR-BI protein expression. Among the n-3, n-6 and n-9 fatty acid families, only eicosapentaenoic acid was able to lower SR-BI protein expression on both sides, whereas apical  $\alpha$ -linolenic acid decreased SR-BI abundance and basolateral arachidonic acid raised it. Epidermal growth factor and growth hormone, either in the apical or basolateral medium, diminished SR-BI cellular content, while insulin displayed the same effect only on the basolateral side. In the presence of proinflammatory agents (LPS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), Caco-2 cells exhibited differential behavior. SR-BI was downregulated by lipopolysaccharide on both sides. Finally, WY-14643 fibrate diminished SR-BI protein expression when it was added to the apical medium. Biotinylation studies in response to selected stimuli revealed that regulatory modifications in SR-BI protein expression occurred for the most part at the apical cell surface irrespective of the effector location. Our data indicate that various effectors supplied to the apical and basolateral compartments may impacted on SR-BI at the apical membrane, thus suggesting potential regulation of intestinal cholesterol absorption and distribution in various intracellular pools.



## **INTRODUCTION**

Cholesterol is an essential constituent of cellular membranes and also serves as a precursor of bile acids and steroid hormones (Soccio et al., 2004). In fact, cholesterol is needed for normal physiologic processes, but excess cholesterol production or intestinal absorption can influence the progression of atherosclerosis by increasing plasma cholesterol levels or by modifying the composition of lipoproteins (Mancini et al., 1991; Turley et al., 2003). Until a few years ago, it was thought that passive diffusion governs intestinal cholesterol uptake. However, several findings have very recently supported the involvement of a protein-mediated specific process (Dawson et al., 1999). Therefore, new impetus has been given to defining the influence of genetics, environment, hormones and drugs on dietary cholesterol absorption with the confidence that growing knowledge on the regulation will shed light on the inherent mechanisms and the delineation of effective pharmacological treatments for hypercholesterolemia and the prevention of atherosclerosis.

In the small intestine, SR-BI has been found in the brush border membrane of enterocytes (Cai et al., 2001; Hauser et al., 1998; Lobo et al., 2001), raising the possibility that it plays a role in dietary/biliary cholesterol absorption (Krieger, 2001; Schulthess et al., 2000; Werder et al., 2001). We recently utilized immunofluorescence staining and demonstrated that the distribution of SR-BI appeared as a gradient, increasing from the developing crypt to the tip of the villus (Levy et al., 2004d). In an effort to better understand the cellular localization of SR-BI, protein A-gold immunocytochemical techniques were applied to thin sections incubated with specific antibodies to disclose SR-BI in the human intestine. These electron microscopic immunocytochemical studies revealed significant immunogold labelling in the luminal region of enterocytes, particularly associated with the apical plasma membrane lining the microvilli. The labelling of SR-BI by gold particles was also present in endosomal invaginations and vesicles. Within the cell, this labelling, although of lower intensity, was present in the rough endoplasmic reticulum (ER), the Golgi apparatus and the basolateral membrane. In order to define the role of SR-BI in intestinal cholesterol absorption, Caco-2 cells were transfected with a constitutive expression vector (pZeoSV) containing human SR-BI cDNA inserted in the antisense orientation. As noted by immunoblotting and Protein A-gold techniques, stable transformants contained 40, 60 and 80% the SR-BI level of control Caco-2 cells and exhibited a proportional drop in free

cholesterol uptake without altering the captation of phospholipids (PL) or Cholesteryl Esters (CE). Confirmation of these data was obtained in intestinal organ culture where SR-BI antibodies significantly lowered cholesterol uptake. These observations suggest that the human intestine possesses a developmental and regional SR-BI pattern of distribution and they extend our knowledge of SR-BI-mediated cholesterol transport.

As mentioned above, SR-BI is expressed more in the apical than the basolateral membrane. It is possible that apical SR-BI may allow the uptake of lumenally-derived cholesterol, whereas basolateral SR-BI may interact with lipoproteins originating from the circulation. In support of the latter assumption, early observations documented that intestinal epithelial cells bind apolipoprotein A-I and High-Density Lipoproteins (HDL) via a receptor-mediated process at the basolateral membrane (Kagami et al., 1984; Suzuki et al., 1983; Sviridov et al., 1986). In this case, the vectorial distribution of SR-BI would contribute to the cellular polarity of enterocyte lipid metabolism. For example, previous studies reported that plasma free fatty acids (FAs) were primarily oxidized or incorporated into PL in rats and human small gut mucosa (Gangl et al., 1975b; Gangl et al., 1978), whereas free FA absorbed from the intestinal tract were mainly incorporated into triacylglycerols (TG) (Gangl et al., 1975a). This may be related to several factors, including differences in the plasma membrane composition between the apical and basolateral domains of the enterocytes (Brasitus et al., 1980; Trotter et al., 1991). To our knowledge, neither the modulation of SR-BI in intestinal cells, nor the asymmetrical regulation of protein expression has been addressed.

The purpose of the present investigation was to test the hypothesis that the protein expression of SR-BI in intestinal epithelial cells is highly modulated by various stimuli. This study attempted in particular to detail cellular SR-BI regulation in response to the administration of various effectors in the apical and basolateral sites, including nutrients (sterols and FAs), hormones known as modulators of brush border digestive functions [epidermal growth factor (EGF), insulin, growth hormone (GH)], the microbial glycolipid lipopolysaccharide (LPS), an essential constituent of the outer cell membrane of all Gram-negative bacteria localized in the intestinal lumen, which plays a central role in the

transcriptional activation of host defence mechanisms, and inflammatory cytokines and drugs capable of influencing cholesterol metabolism. To this end, we used the Caco-2 cells that differentiate as enterocytes in culture, can be grown as a polarized monolayer when seeded on porous filters on Transwell and allow access to both sides of the bipolar intestinal epithelium. Additionally, experiments were performed to determine whether a number of effectors favor asymmetry with respect to the apico-basal distribution of SR-BI using the biotinylation technique and simultaneously impact on cholesterol uptake.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Cell culture***

Caco-2 cells were grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in minimum essential medium (MEM; GIBCO-BRL, Grand Island, NY), containing penicillin/streptomycin (100 kU/L) and MEM nonessential amino acids (0.1 mmol/L), and supplemented with 10% decomplexed fetal bovine serum (FBS; Flow, McLean, VA). Caco-2 cells (passages 30-40) were maintained in 17.5 cm<sup>2</sup> flasks (Corning, NY). Cultures were split (1:3 to 1:6) when they reached 70-90% confluence, using trypsin-EDTA (50 g/L-0.5 mmol/L; GIBCO-BRL). For individual experiments, cells were plated at a density of  $1 \times 10^6$  cells/well on 24.5 mm polycarbonate Transwell filter inserts with 0.4 μm pores (Costar, Cambridge, MA), in MEM supplemented with 5% FBS. The inserts were placed into six-well culture plates, permitting separate access to the upper and lower compartments of the monolayers. Cells were cultured for 21 days, at which time the Caco-2 cells are highly differentiated and suitable for lipid transport, synthesis and metabolism (Courtois et al., 2000; Levy et al., 1995). The medium was refreshed every second day. Transepithelial resistance, an index of cell confluence and tight junction formation, was evaluated using a Millicel-ERS apparatus (Millipore, Bedford, MA).

### ***Cell-Surface Biotinylation of Caco-2 Cells***

All stages of this procedure were performed at 4°C. Following incubation with various stimuli in the apical and basolateral compartments, Caco-2 cells on filters were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (containing 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> and 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) and biotinylated for 1 h through exposure to 1 mg/ml biotinamidocaproate *N*-hydroxysuccinimide ester (Sulfo-NHS-biotin, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) in dimethylformamide (40 mmol/L) present in the medium bathing the apical or basolateral surfaces. At the end of the incubation period, cells were washed twice in ice-cold PB and twice more with iodoacetamide buffer (50 mmol/L iodoacetamide in PBS) to remove excess biotin from the cell surface and quench its activity, respectively. Cells were subsequently lysed with 0.5 ml of precipitation assay buffer (pH 8.0) consisting of 50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.5% (v/v) deoxycholic acid,

0.1% (v/v) SDS, and EDTA-free complete protease inhibitor mixture, which included 0.2 mmol/L PMSF, 0.002 mmol/L pepstatin A, and 0.01 mmol/L leupeptin. The collected lysate (1 mg/ml) was centrifuged at 10,000 x g for 30 min to pellet debris. Biotinylated proteins were recovered by rotating the clear lysate for 2 h with 200 µl of streptavidin-agarose beads (ImmunoPure® Immobilized Streptavidin; Pierce) suspended in 0.01 mol/L NaPO<sub>4</sub>, 0.15 mol/L NaCl (pH 7.2). The beads were recovered by centrifugation for 1 min at 10,000 x g and washed twice in phosphate-buffered saline using rotation and centrifugation. Bound proteins were eluted from the beads in Laemmli sample buffer by repeated rounds of agitation and boiling, separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes as described later in this section. Transfers were probed with antibody SR-BI. Specific staining was visualized by the Enhanced Chemiluminescence technique (Amersham Corp.). For quantitation of the biotinylation experiments, bands were scanned with a laser densitometer.

#### ***Western Blot Analysis***

Cells were harvested after incubation with cholesterol (50 µmol/L), 7-ketocholesterol (50 µmol/L), methyl β-cyclodextrin (5 mmol/L), oleic acid (0.5 mmol/L), linoleic acid (0.5 mmol/L), arachidonic acid (0.5 mmol/L), α-linolenic acid (0.5 mmol/L), eicosapentanoic acid (0.5 mmol/L), docosahexaenoic acid (0.5 mmol/L), insulin (30 mU/ml), EGF (50 ng/ml), GH (5 ng/ml), LPS (5 ng/ml), Interferon-γ (IFN-γ) (5 IU/ml), TNF-α (10 ng/ml), and Fibrate WY-14643 (100 µmol/L) applied either to the apical or the basolateral side. Cells were lysed and rinsed in phosphate-buffered saline (PBS). Lysis buffer consists of TBS, 5 mmol/L EDTA, 0.2% SDS, 1% Triton, 0.5% sodium desoxycholate and a cocktail of protease inhibitors (PMSF, BHT and pepstatin). The buffer was added to the cells and placed on ice for 10 min. All lysates were sonificated for 10 sec and then centrifuged for 10 min at 4°C. The supernatant was collected and stored at -80°C. The protein concentration was measured spectrophotometrically using protein standard (Biorad). To assess the presence of SR-BI and evaluate its mass, Caco-2 cells were homogenized and adequately prepared for Western blotting as described previously (Levy et al., 2001; Levy et al., 2002). Proteins were denatured in sample buffer containing SDS and β-mercaptoethanol, separated on a 4-20% gradient SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose

membranes. Non-specific binding sites of the membranes were blocked using defatted milk proteins followed by the addition of primary antibodies directed against SR-BI. The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. One of the most commonly used reference proteins is  $\beta$ -actin for endogenous controls. In the present study,  $\beta$ -actin has been scrutinized under the influence of the various stimuli employed for the regulation of SR-BI and was found constant irrespective of the stimuli tested, which allowed us to assume that no significant, quantitative changes occurred at the different experimental conditions. Blots were developed and the mass of SR-BI was quantitated using an HP ScanJet scanner equipped with a transparency adapter and software. Control SR-BI values were set at about 4000 arbitrary units after the background was substrated from control and test measurements.

#### *[<sup>14</sup>C]-Cholesterol Uptake*

To study cholesterol uptake, [<sup>14</sup>C]-cholesterol (10  $\mu$ Ci), was added as a mixed bile salt micelle (6.6 mmol/L sodium taurocholate, 1 mmol/L oleic acid, 0.5 mmol/L monoolein, 0.1 mmol/L cholesterol and 0.6 mmol/L phosphatidylcholine) (Levy et al., 2004c). Caco-2 cells were incubated at 37°C for 4 h.

#### *Statistical Analysis*

Results are reported as mean  $\pm$  SEM of at least triplicate samples representative of not less than three separate experiments. Statistical analyses were performed using a Student's *t*-test.

## **RESULTS**

The first issue addressed by our studies was to explore whether a difference could be noted in the expression of SR-BI amount depending on the maturity of cell differentiation. Indeed, a higher level of SR-BI was found in confluent, more differentiated cells than that in the dividing 50% confluent cells (Figure 1). Thus, increased intestinal epithelial cell differentiation could upregulate the protein expression of SR-BI. Therefore, we decided to carry out the next experiments, aimed at evaluating SR-BI regulation, using fully differentiated Caco-2 cells. Interestingly, the membrane distribution of SR-BI in differentiated Caco-2 cells showed that 58% was located in the apical site versus 42% in the basolateral membrane.

We also established the experimental conditions to examine SR-BI modulation in differentiated Caco-2 cells. Preliminary data with different periods of incubation and concentrations of effectors revealed that the time length of 4-h culture and the quantities of stimuli indicated in the present work were suitable for the study of SR-BI regulation (Results not shown). SR-BI values for most stimuli were situated at the initial linear portions of the activity curves when various concentrations were tested.

To determine the effects of sterols on SR-BI protein expression, Caco-2 cells were separately cultured with cholesterol (50  $\mu\text{mol/L}$ ) and 7-ketocholesterol (50  $\mu\text{mol/L}$ ) for 4 h at 37°C. Sterol-containing micelles were added to the apical compartment, whereas identical concentrations of sterols in albumin solution were administered to the basolateral chamber. At the end of the incubation period, cell lysates were generated, resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with SR-BI-specific antibodies. Regardless of the site of supplementation, both cholesterol and 7-ketocholesterol down-regulated SR-BI protein expression compared with control cells (Figure 2). A similar trend in SR-BI expression was observed following exposure of Caco-2 cells to methyl  $\beta$ -cyclodextrin, a cholesterol-sequestering agent from membranes (Figure 3).

We next tested the influence of FAs on SR-BI protein expression. In particular, it was of interest to ascertain whether different polyunsaturated FA families display distinct effects on SR-BI. The supplementation of intestinal cells with arachidonic acid (AA, 20:4n-6) in

the basolateral compartment raised SR-BI expression (Figure 4), while oleic acid (18:1n-9) and linoleic acid (18:2n-6) did not alter the amount of SR-BI protein in comparison with untreated Caco-2 cells (data not shown). Similarly, a variation in SR-BI protein expression was also observed in response to n-3 FAs, depending on the route of supplementation.  $\alpha$ -linolenic acid (ALA, 18:3n-3) decreased SR-BI abundance only when it was added to the apical compartment, whereas eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) was able to reduce SR-BI protein expression on both sides (Figure 4). Moreover, docosahexaenoic acid (DHA, 22:5n-3) could not change SR-BI protein quantity. These data point out the divergence in SR-BI protein expression by n-3 FAs.

SR-BI protein expression was then evaluated as a function of fibrates, agonists of the orphan nuclear receptors, i.e. peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) that control the expression of genes involved in lipid metabolism. WY-14643, a known potent ligand of PPAR $_{\alpha}$ , at the concentration of 100  $\mu$ mol/L decreased SR-BI protein expression only when it was added to the apical compartment of Caco-2 cells (Figure 5). Therefore, these data suggest that PPAR $_{\alpha}$  is an important regulator of SR-BI protein content in the intestine.

Since LPS produced by gram-negative bacteria is a profuse product of the normal flora that can induce innate immune responses and may be involved in normal physiological processes, we assessed its action on SR-BI expression. Figure 6 displays representative Western blots of SR-BI lysates from Caco-2 cells incubated with LPS. The addition of LPS to the apical and basolateral culture medium for 4 h at 37°C diminished SR-BI levels.

Similarly, given the potency of the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in inducing inflammatory and physiological responses in intestinal epithelial cells, we investigated their effects on SR-BI protein expression. Caco-2 cells cultured with 10 ng/ml of TNF- $\alpha$  exhibited opposite SR-BI outcomes depending on the location of TNF- $\alpha$  supply (Figure 6). A marked decrease in SR-BI cell content was noted only when IFN- $\gamma$  (5 IU/ml) was supplied to the apical side.



To assess the role of hormones in SR-BI regulation, Caco-2 cells were incubated with EGF, GH and insulin. The presence of EGF and GH in the apical and basolateral media resulted in a significant reduction in SR-BI protein quantity (Figure 7). In contrast, insulin displayed a negative effect on SR-BI content in human Caco-2 cells only when it was administered to the basolateral side.

As the above findings show, many stimuli were able to alter the total amount of the SR-BI protein in Caco-2 cells. In order to determine whether alterations in SR-BI protein levels were membrane domain specific, we repeated the experiments with the effectors making a substantial impact on SR-BI expression. The apical and basolateral cell surface proteins were then biotinylated separately and processed for immunoprecipitation, gel electrophoresis and Western blotting. The incubation of Caco-2 cells with apical EPA, EGF and IFN- $\gamma$  markedly reduced SR-BI protein mass at the apical membrane (Figure 8). Similarly, the treatment of the intestinal cells with basolateral EPA, EGF and IFN- $\gamma$  lowered SR-BI levels at the apical membrane. Limited changes were noted at the basolateral membrane, suggesting that the regulatory modifications in SR-BI protein expression mainly occur at the apical cell surface.

To further study the functional outcome of SR-BI modulation, [ $^{14}\text{C}$ ]-free cholesterol uptake was appraised following the treatment of Caco-2 cells with apical EPA, EGF and IFN- $\gamma$ . The apical compartment was chosen, since most stimuli regulated SR-BI at this site. A decreasing trend was observed in cellular cholesterol content in the presence of EPA, EGF and IFN- $\gamma$  (Figure 9).

## DISCUSSION

The major transport functions expressed by gut epithelial cells are the absorption of nutrients by apical membrane transporters and the intimate exchange with the blood circulation via the basolateral membrane. Human intestinal epithelium is a polarized tissue in which enterocytes have access to both an apical and a basolateral nutrient supply from the intestinal lumen and the serosal circulation, respectively. Since SR-BI protein is mainly associated with the apical membrane of the enterocytes and is less pronounced in the basolateral membrane, we hypothesized that its regulation may be different depending on the stimulus location. We, therefore, used an experimental model that makes it possible to mimic the prevailing *in vivo* conditions and to determine whether the effects of different stimuli on SR-BI protein expression are dependent on their route (apical vs. basolateral) of delivery. With Caco-2 cells granting access to both sides of the bipolar intestinal epithelium, not only could we demonstrate the modulation of SR-BI protein content by lipids, hormones, chemical agents and cytokines, but we were also able to underline the importance of the site of the stimulus in the regulation of SR-BI.

In view of the small intestine's high capacity to absorb lipids and elaborate most of the major lipoprotein classes and considering the well-known actions of a number of nutrients and hormones on lipid metabolism and transport at the intestinal level, the lack of knowledge about the modulation of SR-BI in the gut is perplexing. For the first time, the present work attempted to detail the modulation of SR-BI in intestinal cells. According to our data, there is a discrete regulation of SR-BI from stimuli, originating from apical and basolateral media, such as n-3 and n-6 FAs, fibrates, cholesterol, 7-ketocholesterol, methyl  $\beta$ -cyclodextrin, LPS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , insulin, GH and EGF. These hormonal, pharmacological and nutritional effectors have been selected in our experiments, since they have been demonstrated: (i) to be present in the intestinal lumen and blood circulation with the ability to play a central role in enterocyte cholesterol homeostasis; (ii) to influence lipid transport and metabolism; and (iii) to regulate SR-BI and its preferential HDL ligand in various cells and organs. The rationalization for the utilization of each modulator is notified underneath. They also provide further insight into the parallel modulation of SR-BI protein expression in the apical membrane of Caco-2 cells and cholesterol absorption.

There has been speculation that SR-BI expression could be sensitive to cellular cholesterol content, with some of the most persuasive evidence coming from cholesterol feeding studies (Fluiter et al., 1999). A high cholesterol diet was found to simultaneously suppress SR-BI expression in rat liver parenchymal cells and to induce it in Kupffer cells (Fluiter et al., 1998b). The observations that in some cases dietary treatments can induce SR-BI expression in some tissues or cell types and suppress it in others clearly indicate that there are cell type-dependent differences in the systems that regulate SR-BI expression (Fluiter et al., 1998a), which prompted us to explore the effects of sterols in intestinal epithelial cells. The results of the present study showed that SR-BI protein expression was responsive to cholesterol and oxysterols in Caco-2 cells. The down-regulation of SR-BI by these molecules suggests that dietary sterol intake or their subsequent metabolism affects intestinal SR-BI expression. Further analysis of the molecular and cellular bases of SR-BI regulation and function should provide new insight into the physiology and pathophysiology of intestinal cholesterol metabolism.

Diets rich in dietary polyunsaturated FAs may lower plasma HDL-C concentrations (Chong et al., 1987; Shepherd et al., 1978), whereas oleic acid-enriched diets were shown either to have no significant consequence (Mensink et al., 1989) or to elevate the levels of HDL-C (De La Cruz et al., 2000; Judd et al., 2002). The mechanisms responsible for this effect and the implications they have for reverse cholesterol transport and atherogenesis are not fully understood. Although the role of dietary fat in modulating the expression of SR-BI is not completely clear, Spady *et al.* suggested that polyunsaturated FAs might increase the hepatic expression of SR-BI in hamsters (Spady et al., 1999), thereby augmenting HDL-CE delivery to the liver and lowering plasma HDL-C. However, seemingly inconsistent results were reported by other investigators (Hatahet et al., 2003) and urge us to define SR-BI protein expression in response to different fatty acids in intestinal epithelial cells. Under our experimental conditions, oleic acid, linoleic acid and DHA caused little change in SR-BI protein expression in Caco-2 cells. Conversely, basolateral AA increased and apical ALA decreased SR-BI protein expression, while EPA lowered it when administered either in the apical or basolateral compartments. It is not the first time that independent effects of

distinct FA families or individual n-3 FA have been recorded. In fact, dietary fish oil was found to markedly reduce plasma TG levels in normal and hypertriglyceridemic individuals, whereas vegetable oils containing predominantly n-6 polyunsaturated FAs had no impact (Connor, 1988; Harris et al., 1983; Harris, 1989; Phillipson et al., 1985). Furthermore, data from another study in rats also suggested that dietary EPA and DHA may have differential effects on plasma cholesterol and TG levels (Kobatake et al., 1984). An examination of the mechanisms underlying the SR-BI protein expression differences in response to dietary FAs may provide insights into how these FAs influence intestinal cholesterol transport as well as plasma cholesterol metabolism.

A role for PPAR $_{\alpha}$  in modulating intestinal cholesterol metabolism was suggested by the observation that Gemfibrozil, a pharmacological ligand of PPAR $_{\alpha}$ , inhibited cholesterol absorption from the gut into mesenteric lymph in rats (Umeda et al., 2001). More recently, firm evidence was obtained in WY-14643-fed animals in which the activation of intestinal PPAR $_{\alpha}$  decreased dietary cholesterol absorption through a mechanism that involved an increase in intestinal ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) levels (Knight et al., 2003). Accordingly, our data revealed the down-regulation of SR-BI protein expression by WY-14643 that was added to the apical side of Caco-2 cells. Our understanding of SR-BI and ABCA1 is still in its early stages and additional information is required in order to propose a model of intestinal cholesterol trafficking.

Most studies have focused only on the hormonal regulation of SR-BI in steroidogenic tissues. The expression of SR-BI appears to be coordinately regulated with steroidogenesis in the adrenal gland, ovary and testis (Reaven et al., 1998). However, little is known about the hormonal modulation of SR-BI in the human intestine. In order to unravel whether SR-BI is hormonally regulated in the intestine, we incubated Caco-2 cells with three powerful effectors that are known as modulators of brush border membrane digestive functions and the synthesis and secretion of lipoproteins in humans (Levy et al., 1992; Levy et al., 1996b; Levy et al., 1996a). The addition of EGF and GH to both sides of Caco-2 cells, as well as basolateral insulin produced a significant decrease in SR-BI protein expression in the present investigation. Identification of the endocrine, paracrine and autocrine factors

involved in the modulation of SR-BI and intestinal cholesterol transport remains to be fully elucidated in future experiments.

Pro-inflammatory mediators such as lipopolysaccharide (LPS) have been shown to down-regulate the mRNA and protein levels of SR-BI in the monocyte and macrophage (Buechler et al., 1999) as well as in hamster liver (Khovidhunkit et al., 2001). In addition, treatment of hamsters with TNF or IL-1 produced a reduction in hepatic mRNA levels of SR-BI. Previous studies have documented the participation of TNF- $\alpha$  and LPS in the disturbance of lipid metabolism in the gastrointestinal tract and blood circulation (Bernotti et al., 2003; Courtois et al., 2003; Dube et al., 2001; Levy et al., 2003; Mehran et al., 1995; Murthy et al., 1996; Murthy et al., 2000). The results of our study confirm these *in vitro* observations and demonstrate for the first time the down-regulation of SR-BI protein expression by basolateral TNF- $\alpha$ , apical IFN- $\gamma$  and LPS on both sides. Therefore, intestinal mucosa that is constantly exposed to commensal bacteria and their inflammatory components or the invasion of pathogenic bacteria or mechanical breaks in the continuous epithelial monolayer barrier may undergo alterations in SR-BI levels and cholesterol transport.

Recent studies on luminal cholesterol transport have shown that SR-BI represented a facet of this lipid trafficking (Levy et al., 2004b). In fact, the reduction of endogenous SR-BI protein expression by antisense cDNA affected the ability of Caco-2 cells to capture exogenous cholesterol (Levy et al., 2004a). In the present investigation, the regulation of SR-BI content in Caco-2 by various stimuli essentially reflected changes in apical SR-BI protein amounts. Additionally, cholesterol uptake followed the pattern of apical protein expression modulated by the specified effectors EPA, EGF and IFN- $\gamma$ . These results support the hypothesis that SR-BI at the microvillous membrane of intestinal polarized epithelial cells may undergo a thorough regulation, which may impact on cholesterol absorption.

In summary, our data suggest that specific nutrients, hormones and cytokines may exert a significant impact on SR-BI protein expression depending on the route of supply. The alterations of SR-BI protein expression following the treatment of Caco-2 cells with the

numerous effectors, examined in our study, may have several consequences on cholesterol absorption. Future exploration is undoubtedly necessary to decipher the role of SR-BI on the apical and basolateral sides of the enterocyte and the intracellular mechanisms triggered by regulatory effectors.

**ACKNOWLEDGMENTS**

This paper was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Canadian Gastroenterology Association / Ferring Pharmaceuticals Fellowship Award (CAG/Ferring). All the authors have contributed to the preparation of this manuscript. The authors thank Mrs Schohraya Spahis for her technical assistance.

## Reference List

- Bernotti,S, Seidman,E, Sinnett,D, Brunet,S, Dionne,S, Delvin,E, Levy,E. 2003. Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in Caco-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Am J Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 285:G898-G906.
- Brasitus,TA, Schachter,D. 1980. Lipid dynamics and lipid-protein interactions in rat enterocyte basolateral and microvillus membranes. *Biochemistry* 19:2763-2769.
- Buechler,C, Ritter,M, Quoc,CD, Agildere,A, Schmitz,G. 1999. Lipopolysaccharide inhibits the expression of the scavenger receptor Cla-1 in human monocytes and macrophages. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 262:251-254.
- Cai,SF, Kirby,RJ, Howles,PN, Hui,DY. 2001. Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine. *J.Lipid Res.* 42:902-909.
- Chong,KS, Nicolosi,RJ, Rodger,RF, Arrigo,DA, Yuan,RW, MacKey,JJ, Georas,S, Herbert,PN. 1987. Effect of dietary fat saturation on plasma lipoproteins and high density lipoprotein metabolism of the rhesus monkey. *J Clin.Invest* 79:675-683.
- Connor,WE. 1988. Effects of omega-3 fatty acids in hypertriglyceridemic states. *Semin.Thromb.Hemost.* 14:271-284.
- Courtois,F, Seidman,EG, Delvin,E, Asselin,C, Bernotti,S, Ledoux,M, Levy,E. 2003. Membrane peroxidation by lipopolysaccharide and iron-ascorbate adversely affects Caco-2 cell function: beneficial role of butyric acid. *Am J Clin.Nutr* 77:744-750.
- Courtois,F, Suc,I, Garofalo,C, Ledoux,M, Seidman,E, Levy,E. 2000. Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 279:G12-G19.
- Dawson,PA, Rudel,LL. 1999. Intestinal cholesterol absorption. *Curr.Opin.Lipidol.* 10:315-320.
- De La Cruz,JP, Villalobos,MA, Carmona,JA, Martin-Romero,M, Smith-Agreda,JM, de la Cuesta,FS. 2000. Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol. *Thromb.Res.* 100:305-315.
- Dube,N, Delvin,E, Yotov,W, Garofalo,C, Bendayan,M, Veerkamp,JH, Levy,E. 2001. Modulation of intestinal and liver fatty acid-binding proteins in Caco-2 cells by lipids, hormones and cytokines. *J Cell Biochem.* 81:613-620.



Fluiter,K, Sattler,W, De Beer,MC, Connell,PM, van der Westhuyzen,DR, van Berkel,TJ. 1999. Scavenger receptor BI mediates the selective uptake of oxidized cholesterol esters by rat liver. *J Biol.Chem.* 274:8893-8899.

Fluiter,K, van der Westhuyzen,DR, van Berkel,TJ. 1998a. In vivo regulation of scavenger receptor BI and the selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J Biol.Chem.* 273:8434-8438.

Fluiter,K, van der Westhuyzen,DR, van Berkel,TJ. 1998b. In vivo regulation of scavenger receptor BI and the selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J Biol.Chem.* 273:8434-8438.

Gangl,A, Ockner,RK. 1975a. Intestinal metabolism of plasma free fatty acids. Intracellular compartmentation and mechanisms of control. *J Clin.Invest* 55:803-813.

Gangl,A, Ockner,RK. 1975b. Intestinal metabolism of plasma free fatty acids. Intracellular compartmentation and mechanisms of control. *J Clin.Invest* 55:803-813.

Gangl,A, Renner,F. 1978. In vivo metabolism of plasma free fatty acids by intestinal mucosa of man. *Gastroenterology* 74:847-850.

Harris,WS. 1989. Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. *J Lipid Res.* 30:785-807.

Harris,WS, Connor,WE, McMurry,MP. 1983. The comparative reductions of the plasma lipids and lipoproteins by dietary polyunsaturated fats: salmon oil versus vegetable oils. *Metabolism* 32:179-184.

Hatahet,W, Cole,L, Kudchodkar,BJ, Fungwe,TV. 2003. Dietary fats differentially modulate the expression of lecithin:cholesterol acyltransferase, apoprotein-A1 and scavenger receptor b1 in rats. *J Nutr* 133:689-694.

Hauser,H, Dyer,JH, Nandy,A, Vega,MA, Werder,M, Bieliauskaite,E, Weber,FE, Compassi,S, Gemperli,A, Boffelli,D, Wehrli,E, Schulthess,G, Phillips,MC. 1998. Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine. *Biochemistry* 37:17843-17850.

Judd,JT, Baer,DJ, Clevidence,BA, Kris-Etherton,P, Muesing,RA, Iwane,M. 2002. Dietary cis and trans monounsaturated and saturated FA and plasma lipids and lipoproteins in men. *Lipids* 37:123-131.

Kagami,A, Fidge,N, Suzuki,N, Nestel,P. 1984. Characteristics of the binding of high-density lipoprotein3 by intact cells and membrane preparations of rat intestinal mucosa. *Biochim.Biophys.Acta* 795:179-190.

Khovidhunkit,W, Moser,AH, Shigenaga,JK, Grunfeld,C, Feingold,KR. 2001. Regulation of scavenger receptor class B type I in hamster liver and Hep3B cells by endotoxin and cytokines. *J Lipid Res* 42:1636-1644.

Knight,BL, Patel,DD, Humphreys,SM, Wiggins,D, Gibbons,GF. 2003. Inhibition of cholesterol absorption associated with a PPAR alpha-dependent increase in ABC binding cassette transporter A1 in mice. *J Lipid Res.* 44:2049-2058.

Kobatake,Y, Kuroda,K, Jinnouchi,H, Nishide,E, Innami,S. 1984. Differential effects of dietary eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acids on lowering of triglyceride and cholesterol levels in the serum of rats on hypercholesterolemic diet. *J Nutr Sci.Vitaminol.(Tokyo)* 30:357-372.

Krieger,M. 2001. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J.Clin.Invest* 108:793-797.

Levy,E, Delvin,E, Peretti,N, Bouchard,G, Seidman,E. 2003. Combined effects of EFA deficiency and tumor necrosis factor-alpha on circulating lipoproteins in rats. *Lipids* 38:595-602.

Levy,E, Loirdighi,N, Thibault,L, Nguyen,TD, Labuda,D, Delvin,E, Menard,D. 1996a. Lipid processing and lipoprotein synthesis by the developing human fetal colon. *Am J Physiol* 270:G813-G820.

Levy,E, Mehran,M, Seidman,E. 1995. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J.* 9:626-635.

Levy,E, Menard,D, Delvin,E, Stan,S, Mitchell,G, Lambert,M, Ziv,E, Feoli-Fonseca,JC, Seidman,E. 2001. The polymorphism at codon 54 of the FABP2 gene increases fat absorption in human intestinal explants. *J.Biol.Chem.* 276:39679-39684.

Levy,E, Menard,D, Suc,I, Delvin,E, Marcil,V, Brissette,L, Thibault,L, Bendayan,M. 2004a. Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. *J.Cell Sci.* 117:327-337.

Levy,E, Menard,D, Suc,I, Delvin,E, Marcil,V, Brissette,L, Thibault,L, Bendayan,M. 2004b. Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. *J.Cell Sci.* 117:327-337.

Levy,E, Menard,D, Suc,I, Delvin,E, Marcil,V, Brissette,L, Thibault,L, Bendayan,M. 2004c. Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. *J.Cell Sci.* 117:327-337.

Levy,E, Menard,D, Suc,I, Delvin,E, Marcil,V, Brissette,L, Thibault,L, Bendayan,M. 2004d. Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. *J.Cell Sci.* 117:327-337.

Levy,E, Sinnett,D, Thibault,L, Nguyen,TD, Delvin,E, Menard,D. 1996b. Insulin modulation of newly synthesized apolipoproteins B-100 and B-48 in human fetal intestine: gene expression and mRNA editing are not involved. *FEBS Lett.* 393:253-258.

Levy,E, Stan,S, Delvin,E, Menard,D, Shoulders,C, Garofalo,C, Slight,I, Seidman,E, Mayer,G, Bendayan,M. 2002. Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. *J.Biol.Chem.* 277:16470-16477.

Levy,E, Thibault,L, Menard,D. 1992. Intestinal lipids and lipoproteins in the human fetus: modulation by epidermal growth factor. *J Lipid Res.* 33:1607-1617.

Lobo,MV, Huerta,L, Ruiz-Velasco,N, Teixeira,E, de la,CP, Celdran,A, Martin-Hidalgo,A, Vega,MA, Bragado,R. 2001. Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids. *J.Histochem.Cytochem.* 49:1253-1260.

Mancini,M, Parillo,M. 1991. Lipid intake and atherosclerosis. *Ann.Nutr.Metab* 35 Suppl 1:103-108.

Mehran,M, Seidman,E, Marchand,R, Gurbindo,C, Levy,E. 1995. Tumor necrosis factor-alpha inhibits lipid and lipoprotein transport by Caco-2 cells. *Am J Physiol* 269:G953-G960.

Mensink,RP, Katan,MB. 1989. Effect of a diet enriched with monounsaturated or polyunsaturated fatty acids on levels of low-density and high-density lipoprotein cholesterol in healthy women and men. *N.Engl.J Med.* 321:436-441.

Murthy,S, Mathur,SN, Field,FJ. 2000. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta inhibit apolipoprotein B secretion in CaCo-2 cells via the epidermal growth factor receptor signaling pathway. *J Biol.Chem.* 275:9222-9229.

Murthy,S, Mathur,SN, Varilek,G, Bishop,W, Field,FJ. 1996. Cytokines regulate apolipoprotein B secretion by Caco-2 cells: differential effects of IL-6 and TGF-beta 1. *Am J Physiol* 270:G94-102.

Phillipson,BE, Rothrock,DW, Connor,WE, Harris,WS, Illingworth,DR. 1985. Reduction of plasma lipids, lipoproteins, and apoproteins by dietary fish oils in patients with hypertriglyceridemia. *N.Engl.J Med.* 312:1210-1216.

Reaven,E, Nomoto,A, Leers-Sucheta,S, Temel,R, Williams,DL, Azhar,S. 1998. Expression and microvillar localization of scavenger receptor, class B, type I (a high density lipoprotein receptor) in luteinized and hormone-desensitized rat ovarian models. *Endocrinology* 139:2847-2856.

Schulthess,G, Compassi,S, Werder,M, Han,CH, Phillips,MC, Hauser,H. 2000. Intestinal sterol absorption mediated by scavenger receptors is competitively inhibited by amphipathic peptides and proteins. *Biochemistry* 39:12623-12631.

Shepherd,J, Packard,CJ, Patsch,JR, Gotto,AM, Jr., Taunton,OD. 1978. Effects of dietary polyunsaturated and saturated fat on the properties of high density lipoproteins and the metabolism of apolipoprotein A-I. *J Clin.Invest* 61:1582-1592.

Soccio,RE, Breslow,JL. 2004. Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24:1150-1160.

Spady,DK, Kearney,DM, Hobbs,HH. 1999. Polyunsaturated fatty acids up-regulate hepatic scavenger receptor B1 (SR-BI) expression and HDL cholesteryl ester uptake in the hamster. *J Lipid Res.* 40:1384-1394.

Suzuki,N, Fidge,N, Nestel,P, Yin,J. 1983. Interaction of serum lipoproteins with the intestine. Evidence for specific high density lipoprotein-binding sites on isolated rat intestinal mucosal cells. *J Lipid Res* 24:253-264.

Sviridov,DD, Safonova,IG, Gusev,VA, Talalaev,AG, Tsibulsky,VP, Ivanov,VO, Preobrazensky,SN, Repin,VS, Smirnov,VN. 1986. Specific high affinity binding and degradation of high density lipoproteins by isolated epithelial cells of human small intestine. *Metabolism* 35:588-595.

Trotter,PJ, Storch,J. 1991. Fatty acid uptake and metabolism in a human intestinal cell line (Caco-2): comparison of apical and basolateral incubation. *J Lipid Res* 32:293-304.

Turley,SD, Dietschy,JM. 2003. Sterol absorption by the small intestine. *Curr.Opin.Lipidol.* 14:233-240.

Umeda,Y, Kako,Y, Mizutani,K, Iikura,Y, Kawamura,M, Seishima,M, Hayashi,H. 2001. Inhibitory action of gemfibrozil on cholesterol absorption in rat intestine. *J Lipid Res.* 42:1214-1219.

Werder,M, Han,CH, Wehrli,E, Bimmler,D, Schulthess,G, Hauser,H. 2001. Role of scavenger receptors SR-BI and CD36 in selective sterol uptake in the small intestine. *Biochemistry* 40:11643-11650.

## **FIGURE LEGENDS**

**Figure 1** Modulation of SR-BI protein expression in Caco-2 cells under proliferation and differentiation conditions. The effect of the maturation process on SR-BI protein was assessed in Caco-2 cells that were grown until 70-90% confluence and transferred to polycarbonate Transwell filter inserts. SR-BI expression was determined in (A) undifferentiated (5-day pre-confluence) and (B) differentiated (21-day post-confluence) Caco-2 cells by fractionation on SDS-PAGE, Western blot analysis and chemiluminescence's detection.

Results in the histogram represent the mean  $\pm$  SEM of 4 separate experiments.

\* $p < 0.0001$  undifferentiated vs differentiated.

**Figure 2** Effects of cholesterol and oxysterols on SR-BI protein expression. Differentiated Caco-2 cells were cultured for 4 h at 37°C in the presence or absence of (A) cholesterol (50  $\mu\text{mol/L}$ ) and (B) 7-ketocholesterol (50  $\mu\text{mol/L}$ ) added to the apical and basolateral sites. At the end of the incubation, cell lysates were generated and 50  $\mu\text{g}$  of protein was resolved by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, immunoblotted with anti-SR-BI antibody and developed by chemiluminescence procedure. The mass of SR-BI was quantitated using an HP ScanJet scanner equipped with a transparency adapter and software. A representative Western blot is shown. Data are mean  $\pm$  SEM for 3 separate experiments.

\* $p < 0.008$ , \*\* $p < 0.001$  vs control.

**Figure 3** Regulation of SR-BI protein expression by methyl  $\beta$ -cyclodextrin. Differentiated Caco-2 cells were treated for 4 h at 37°C with 5 mmol/L methyl  $\beta$ -cyclodextrin added to the apical and basolateral sites. SR-BI expression was examined as described in Methods and in Figure 1 legend. Data represented are mean  $\pm$  SEM for 3 independent experiments.

\* $p < 0.002$ , \*\* $p < 0.001$  vs control.

**Figure 4** Fatty acid regulation of SR-BI in Caco-2 cells. Differentiated Caco-2 cells were incubated for 4 h at 37°C with 0.5 mmol/L arachidonic acid (AA,

20:4n-6), 0.5 mmol/L  $\alpha$ -linolenic acid (ALA, 18:3n-3), 0.5 mmol/L eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) or 0.5 mmol/L docosahexaenoic acid (DHA, 22:5n-3) added to the apical and basolateral sites. After separation in polyacrylamide gel, proteins were transferred electrophoretically onto nitrocellulose membrane for probing with anti-SR-BI antibody as described in Methods.

Data represented are mean  $\pm$  SEM for 3 separate experiments.

\* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.001$  vs control.

**Figure 5** Effect of WY-14643, a specific agonist of PPAR $_{\alpha}$ , on SR-BI protein content. Differentiated Caco-2 cells were exposed to 100  $\mu$ mol/L WY-14643 for 18 h at 37°C. The fibrates were separately added to the apical and basolateral compartments. Following the incubation period, cells were harvested and SR-BI expression was evaluated as described in Methods and in Figure 1 legend.

Data represented are mean  $\pm$  SEM for 3 separate experiments.

\* $p < 0.008$  vs control.

**Figure 6** Effects of LPS and cytokines on SR-BI protein expression. Differentiated Caco-2 cells were treated for 4 h at 37°C with 5 ng/ml LPS, 10 ng/ml TNF- $\alpha$  and 5 IU/ml IFN- $\gamma$  added to the apical and basolateral sites. After incubation, cell lysates were electrophoresed on SDS-PAGE and analyzed by Western blot as described in Methods and Figure 1 legend.

Data represented are mean  $\pm$  SEM for 3 separate experiments.

\* $p < 0.03$ , \*\* $p < 0.02$ , \*\*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.002$  vs control.

**Figure 7** Modulation of SR-BI protein expression by hormonal stimuli. Differentiated Caco-2 cells were treated for 18 h at 37°C with 5 ng/ml GH, 30 mU/ml insulin and 50 ng/ml EGF added to the apical and basolateral sites. Cells were harvested after incubation and their SR-BI content was measured by Western blot as described in Methods and Figure 1 legend.

Data represented are mean  $\pm$  SEM for 3 separate experiments.

\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.003$ , \*\*\* $p < 0.002$  vs control.

**Figure 8** Differential distribution of SR-BI in the apical and basolateral membranes. Caco 2 cells were grown on Transwell filters and submitted to treatments with EPA, EGF and IFN- $\gamma$  stimuli added to the apical (AP) and basolateral (BA) compartments. Thereafter, sulfo-NHS-biotin was employed to selectively label the apical or the basolateral surface. The cells were extracted with lysis buffer and the biotinylated proteins were recovered with streptavidin-agarose beads. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blot. SR-BI mass was quantitated using an HP ScanJet scanner equipped with a transparency adapter and software.

Data are means  $\pm$  SEM for 3 separate experiments.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs controls (100%) without stimuli.

**Figure 9** Influence of apical effectors on cholesterol uptake. Caco 2 cells were grown on Transwell filters and submitted to treatments with EPA, EGF and IFN- $\gamma$  stimuli added to the apical compartment. Thereafter, cholesterol incorporation was evaluated as described in the Methods section.

\* $p < 0.05$

Figure 1

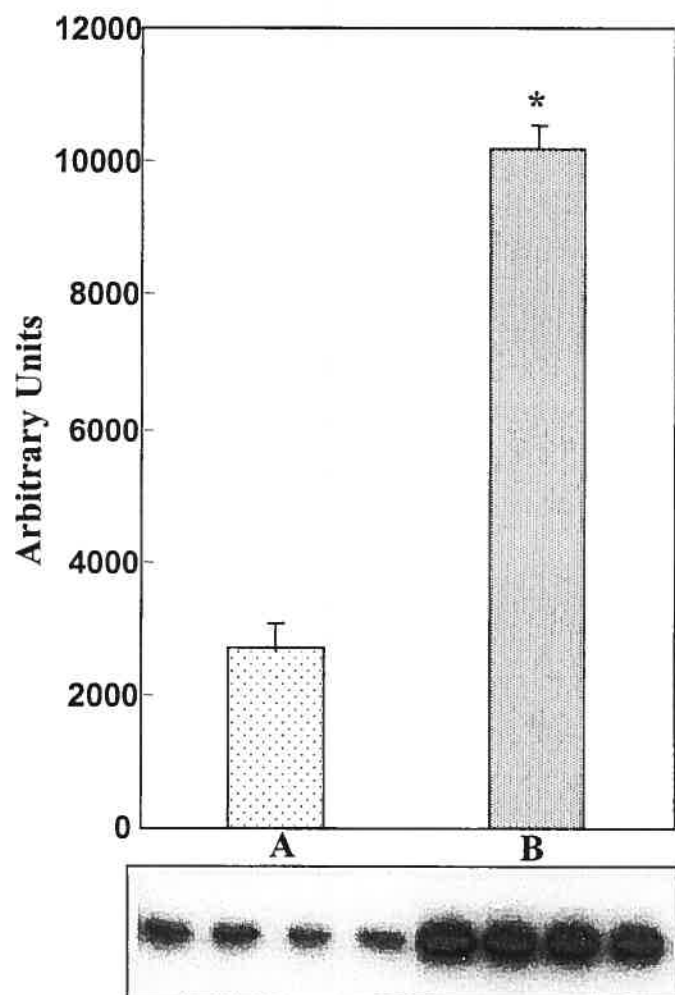




Figure 2

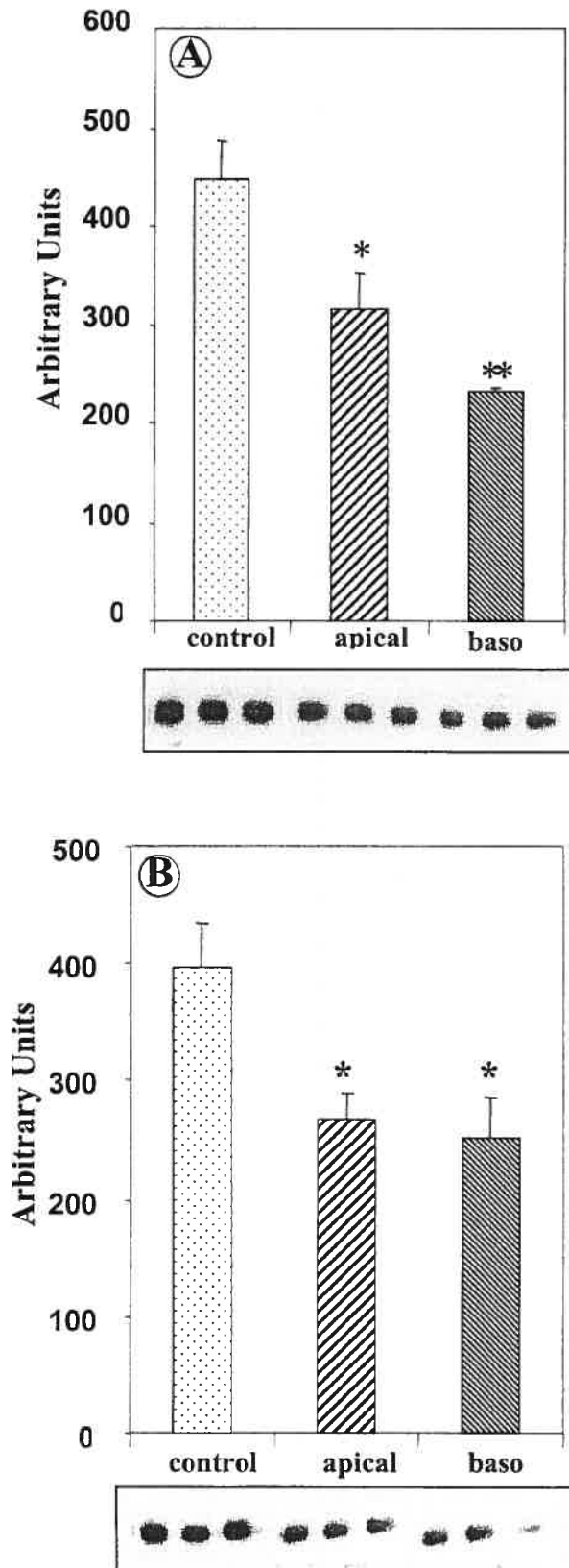


Figure 3

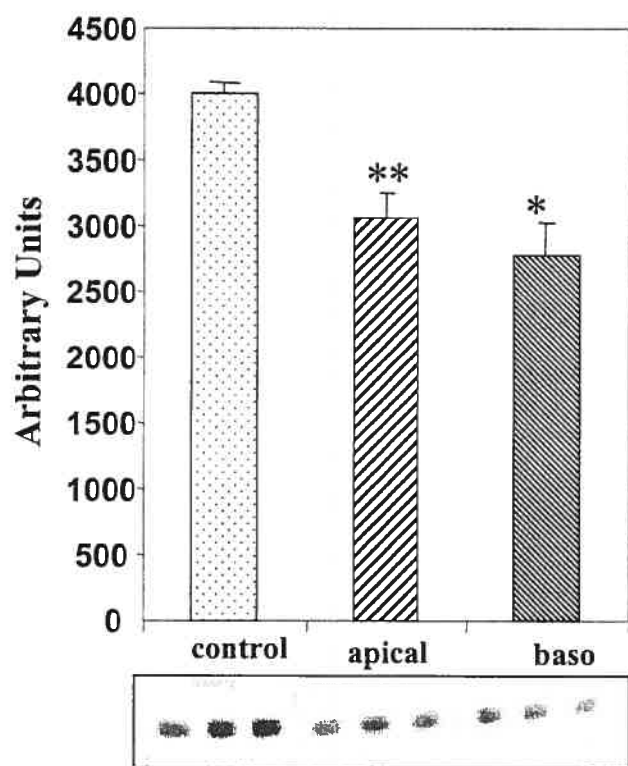


Figure 4

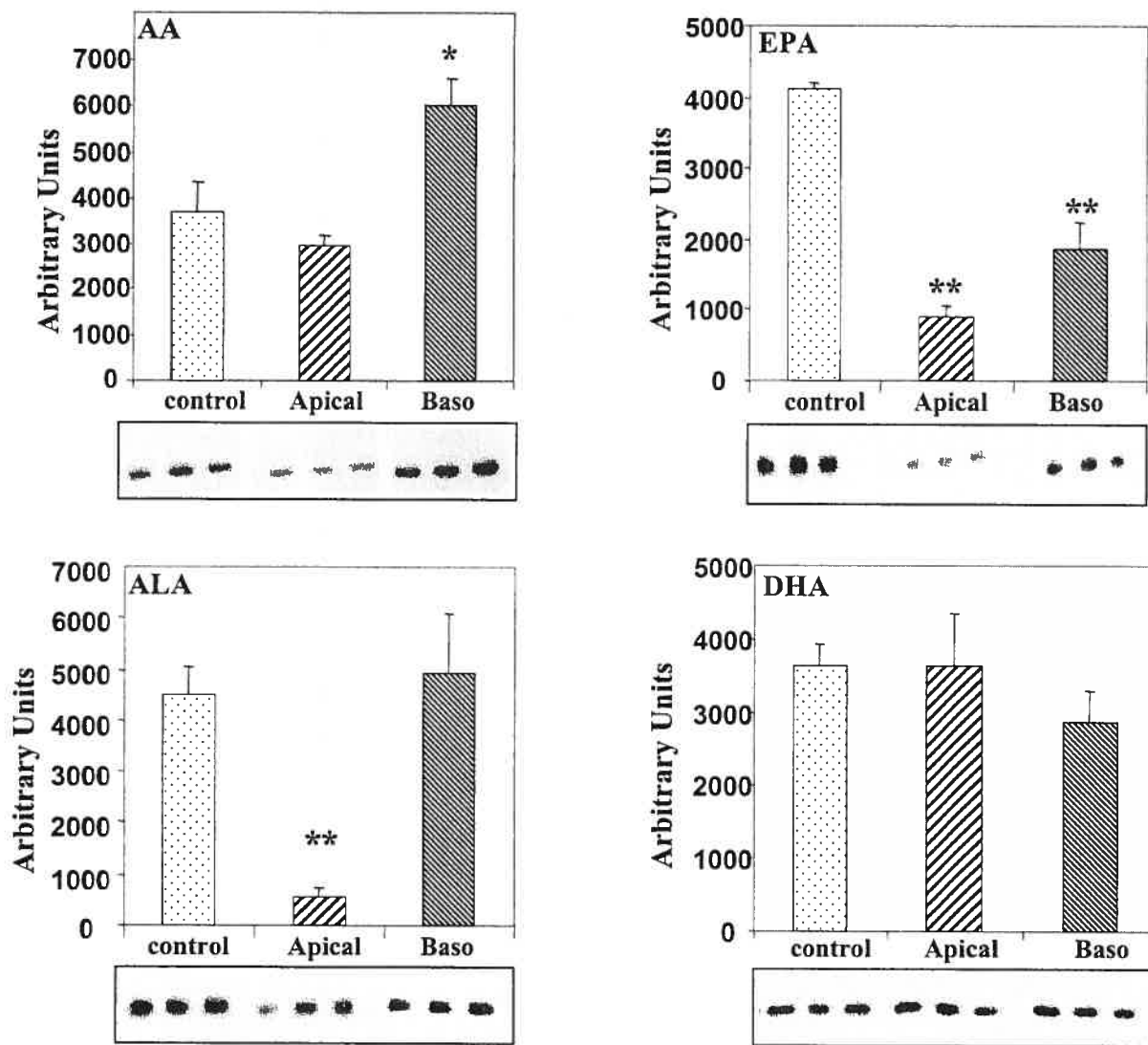


Figure 5

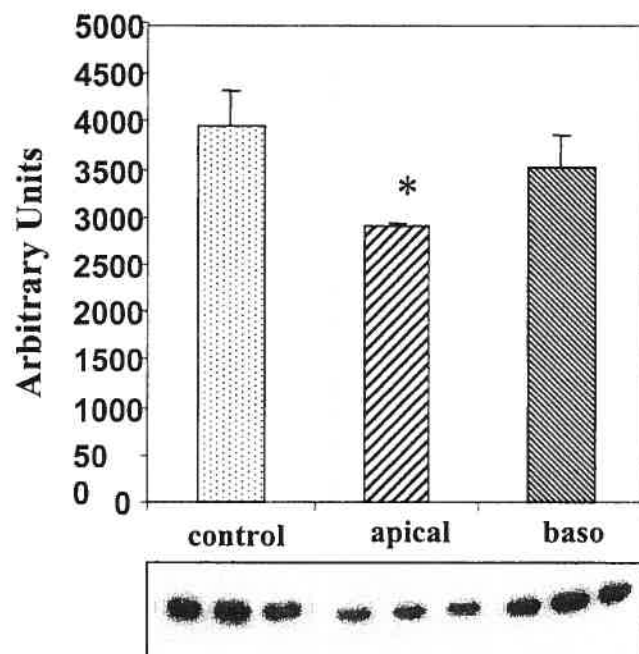


Figure 6

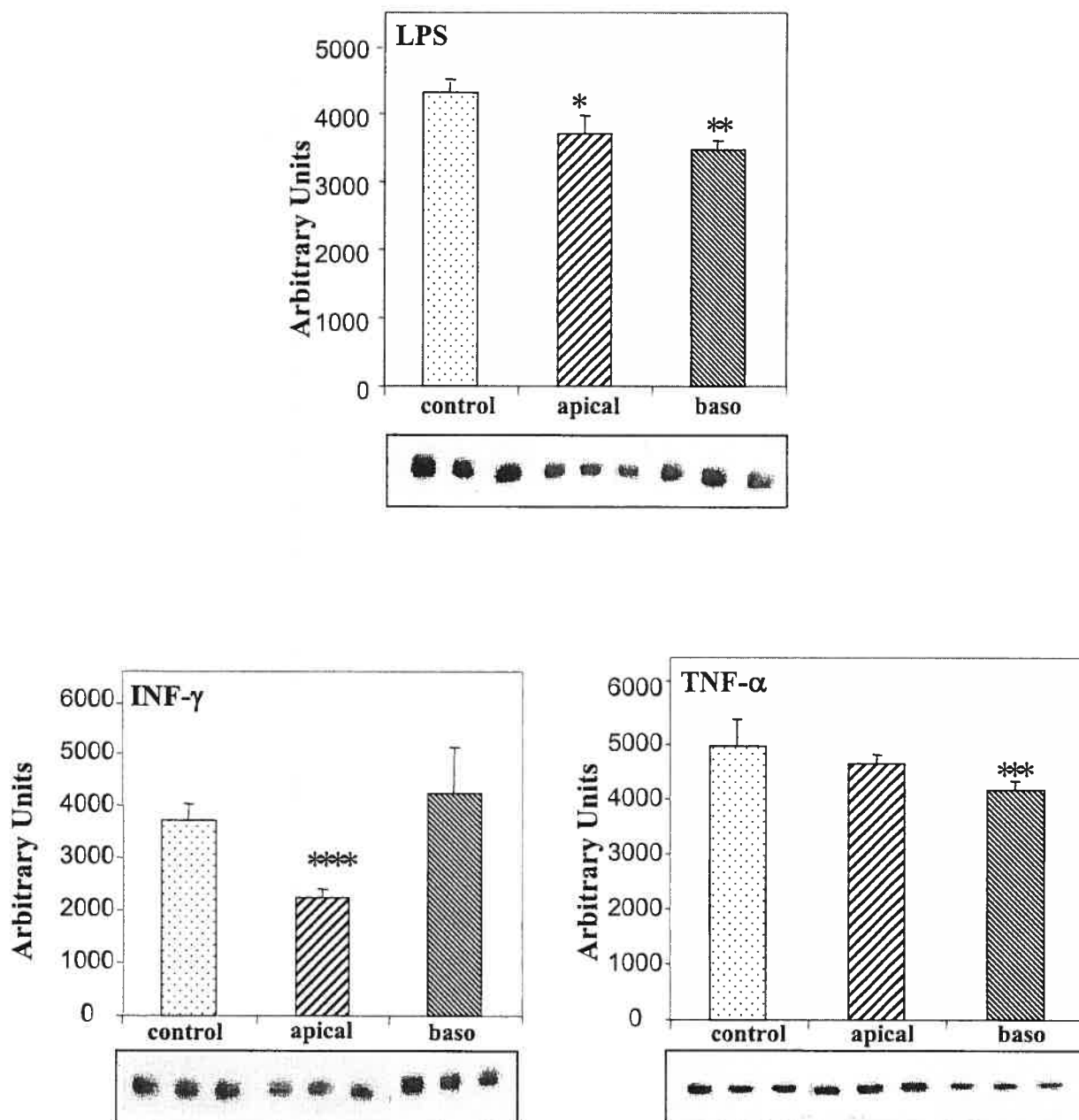


Figure 7

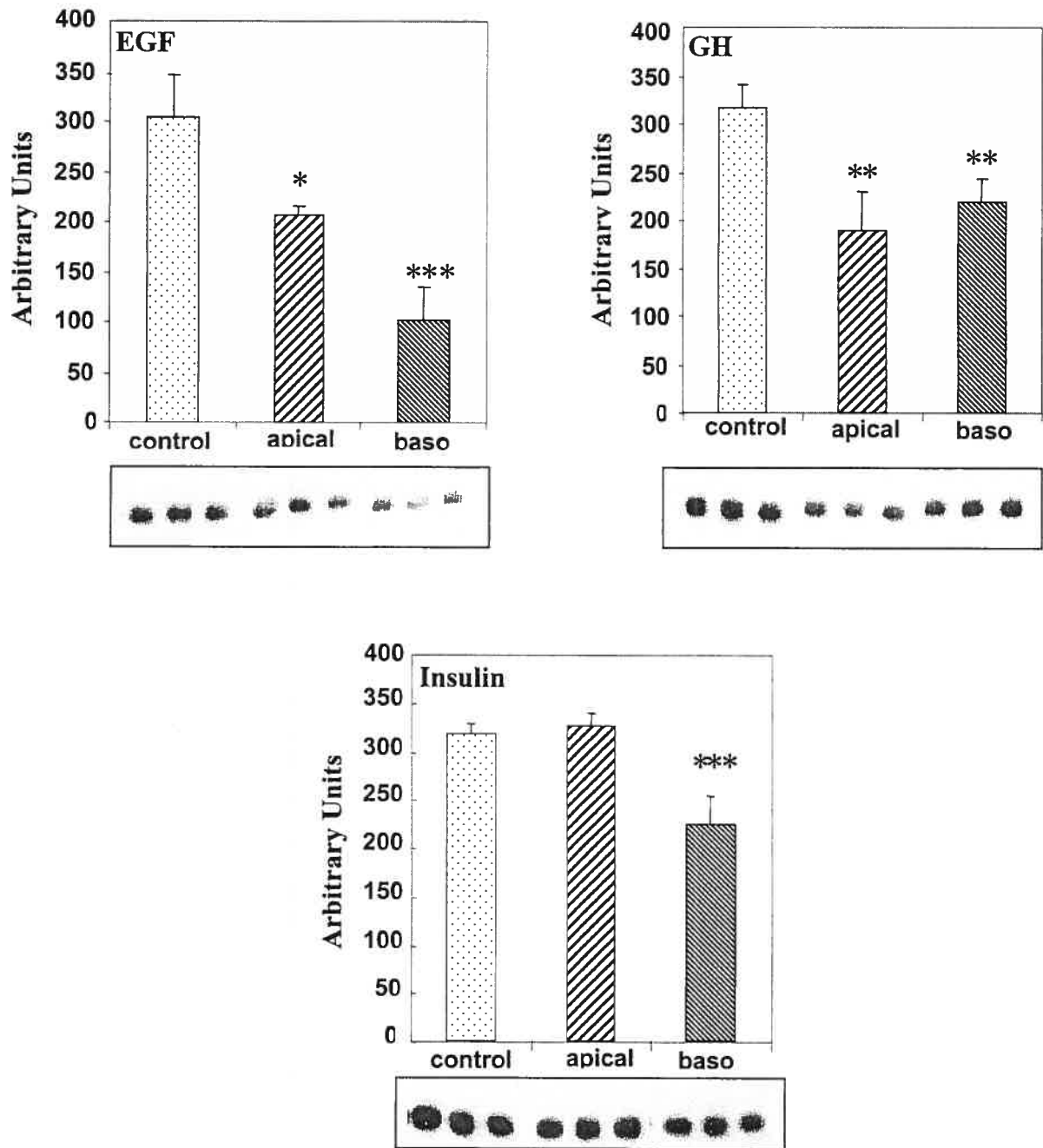
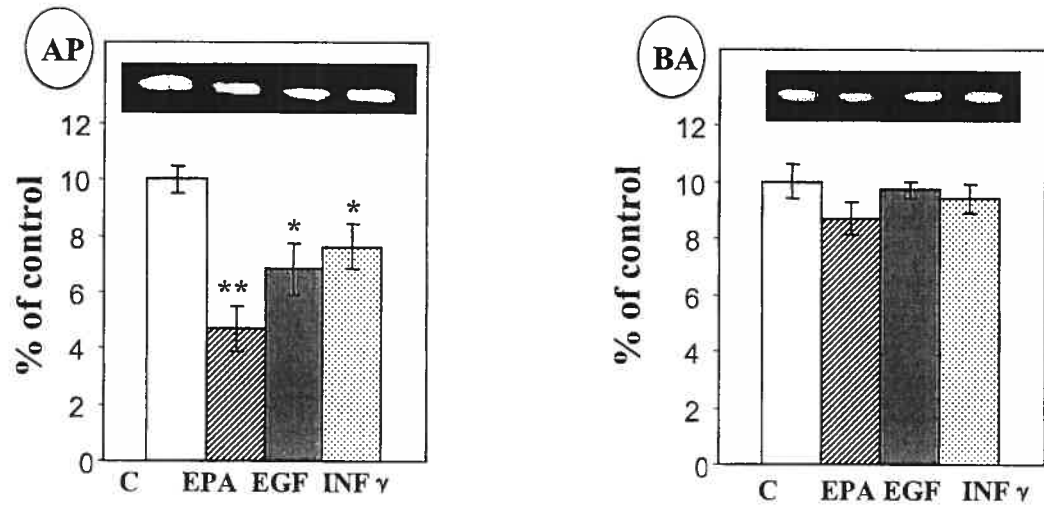


Figure 8

**A. Effect of apical stimuli on apical (AP) and basolateral (BA) SR-BI expression**



**B. Effect of basolateral stimuli on apical (AP) and basolateral (BA) SR-BI expression**

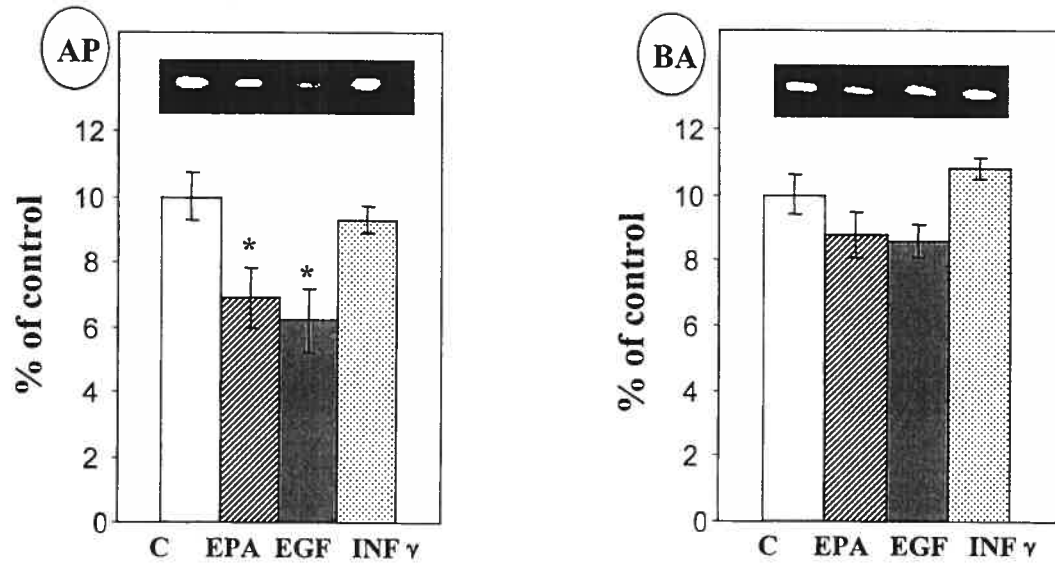
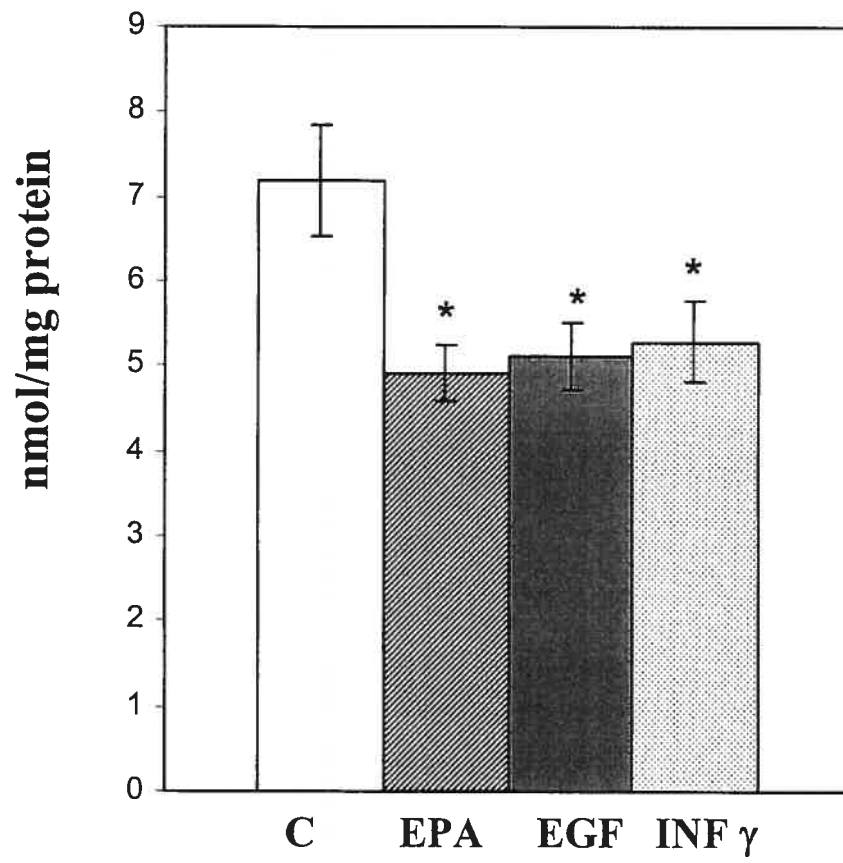


Figure 9





**Article 2 publié dans:**

**American Journal of Physiology -Gastrointestinal and Liver Physiology**

(Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006 Apr;290(4):G609-15.)

**Abnormal Intracellular Lipid Processing Contributes to Fat  
Malabsorption in Cystic Fibrosis Patients**

Noël Peretti<sup>1</sup>, Claude C. Roy<sup>2</sup>, Eric Drouin<sup>2</sup>, Ernest Seidman<sup>2</sup>, Pierre Brochu<sup>3</sup>,  
Georges Casimir<sup>4</sup>, and Emile Levy<sup>1\*</sup>

Departments of <sup>1</sup>Nutrition, <sup>2</sup>Pediatrics and <sup>3</sup>Pathology, CHU Ste-Justine, Université de  
Montréal, 3175, Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5

<sup>4</sup>Hôpital Universitaire des Enfants Reine Fabiola, avenue J.J.-Crocq 15, 1020 Bruxelles

**Running Head:** Intestinal fat transport in cystic fibrosis

**Address for correspondence:**

\* Dr. Emile Levy  
GI-Nutrition Unit  
CHU Sainte-Justine  
3175 Côte Ste-Catherine  
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5  
Tel.: (514) 345-4626  
Fax: (514) 345-4999



## ABSTRACT

A common feature of cystic fibrosis (CF) is the functional derangement of the exocrine pancreas, which affects output of pancreatic lipase. This condition results in severe dietary malabsorption due to the poor hydrolysis of triacylglycerol (TG) in the lumen of the small intestine. Despite the benefits of pancreatic enzyme supplements, persistent intestinal fat malabsorption characterizes patients with CF. The aim of the current investigation was to determine whether defects in the intracellular phase of lipid transport occur in this pathophysiology in addition to the known disturbed digestive processes. Our hypothesis was tested by incubating intestinal biopsies from 6 CF and 6 healthy subjects with radiolabelled lipid and protein precursors. Lipid esterification and secretion were markedly decreased by 22-31% and 38-42%, respectively, in CF as noted by the low incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]-palmitic acid into TGs, phospholipids and cholesteryl esters in patients' duodenal explants and culture media compared with controls (100%). Accordingly, the output of TG-rich lipoproteins was substantially reduced ( $p < 0.05$ ) and a similar trend was observed for high-density lipoproteins. Since intestinal lipoprotein assembly/secretion shows an absolute requirement for apolipoprotein (apo) B-48, radioactive labeling experiments were performed and they demonstrated a significantly ( $p < 0.05$ ) diminished synthesis of apo B-48 (40%) and apo A-I (30%). Given the critical role of microsomal triglyceride transfer protein in the formation of apo B-containing lipoproteins, its activity was determined and not found to be altered in CF intestinal tissue. Taken together, these results suggest that CF malabsorption may also be caused by defects in mucosal mechanisms leading to abnormal lipoprotein delivery into the blood circulation.

**Keywords:** Malabsorption, Lipoproteins, Cystic Fibrosis, Fatty Acids, apo B-48, MTP

## INTRODUCTION

Cystic Fibrosis (CF) is the most common life-threatening recessive genetic disease in the Caucasian population (24). It arises from a reduced density and/or activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in the apical membranes of secretory epithelial cells, such as the airways, exocrine pancreas, salivary glands, intestine and reproductive tissue (1). CF is described as a general exocrine disease, with mortality primarily attributable to the pathology that occurs in the lung and gastrointestinal tract (6). In fact, a major characteristic shared by CF patients is exocrine pancreatic insufficiency, which results in intestinal fat malabsorption and malnutrition as well as essential fatty acid (EFA) and fat-soluble vitamin deficiencies (37). The deficit in salt (chloride) and water transport across duct cells produces a diminution in fluid flow by the gland, which leads to duct blockage and the inspissations and precipitations of proteins in the ducts (9). Over time, cellular damage and atrophy occur and cause a shortage in the secretion of digestive enzymes. Together with conspicuous pancreatic insufficiency, various disorders of the intraluminal digestive phase, including bicarbonate deficiency and bile salt abnormalities, have been purported to be the main causes of fat malabsorption (24, 29, 39). However, despite the beneficial effects of exogenous pancreatic enzyme supplementation, malabsorption cannot be normalized in CF patients as noted by persistent steatorrhea, poor growth and malnutrition (2). Continuing fat malabsorption in CF subjects may also be due to considerations other than defective lipolytic enzyme activity and additional intraluminal factors. The aim of the present study was to investigate whether disturbances in CF lipid transport might also be associated with cause-related changes in the second step of fat absorption, i.e., the intracellular phase leading to lipid esterification, apolipoprotein (apo) biogenesis and lipoprotein assembly.

## MATERIALS AND METHODS

### *Patients*

Six CF patients ( $13.6 \pm 1.4$  years) underwent duodenal endoscopy for diagnostic purposes in view of their digestive symptoms and clinical condition, which did not improve despite pancreatic supplementation. Pancreatic insufficiency in these subjects was defined by the requirement for exogenous pancreatic enzymes for the treatment of clinically diagnosed steatorrhea: 8.4, 11.7, 15.9, 17.2, 20.3, 21.8 g/d (normal range: 3.5-5.0 g/d). In order to further the investigation on malabsorption, biopsies were taken from the duodenum for pathohistological evaluation and for lipid transport assessment presented in detail in the current study. The CF patients were compared with six age-matched healthy subjects who were previously suspected of having gastrointestinal diseases such as disaccharidase deficiency, celiac disease, cow's milk sensitive enteropathy and failure to thrive with chronic nonspecific diarrhea. Informed consent was obtained from the parents and the project was approved by the CHU Sainte-Justine Ethics Committee.

### *Explant Cultures of Duodenal Biopsies*

Fasting intestinal biopsy specimens were obtained from the region of the ligament of Treitz and immediately placed in RPMI-1640 culture medium containing 10% inactivated and dialyzed human lipoprotein-deficient serum (LPDS). This medium was saturated with 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> and cultures were set up by methods described previously within 20 min of taking the biopsies (17). The tissue culture medium (0.8 ml) consisted of leucine-free RPMI-1640 with LPDS including gentamycin (100 µg/ml) and soybean trypsin inhibitor (60 µg/ml). Lipid synthesis and secretion by explants were examined by adding 10 µCi of

[<sup>14</sup>C]-palmitic acid (sp act 40-60 mCi/mmol, New England Nuclear, Montreal, Quebec) to a micellar mixture (8 mM sodium taurocholate, 20 mM palmitic acid, and 10 mM Sn-2 monooleylglycerol) to stimulate intracellular lipid esterification. The final ratio of radioactivity/concentration of palmitic acid in each dish was 1  $\mu$ Ci/ 400  $\mu$ M. The Petri dishes were thereafter placed in anaerobic jars, sealed, gassed with 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>, and incubated for 18 h at 37°C. The pH of the medium was maintained between 7.2-7.4 as indicated by phenol red. After this incubation period, tissue integrity was confirmed by morphological and biochemical studies.

### ***Lipid Synthesis***

Following 18-h incubation, the explants were sonicated and homogenates were lipid-extracted with chloroform-methanol (2:1, v/v). Lipid separation was carried out by thin layer chromatography (TLC) (silica gel, Estman Kodak, Rochester, NY). The developing solvent system was heptane-diethylether-glacial acetic acid (80:20:3, v/v/v). The radioactivity of the separated fractions was measured in a Beckman liquid scintillation spectrometer. Quenching was corrected using computerized curves generated with external standards. An aliquot of the tissue homogenate was used for protein determination.

### ***De Novo Apolipoprotein Synthesis***

Duodenal biopsies were cultured with [<sup>3</sup>H]-leucine (500  $\mu$ Ci/ml) to assess apo biogenesis. At the end of the 45-min incubation at 37°C, explants were washed (3x) for 5 min by the addition of media supplemented with 10 mM leucine and then homogenized in 1 ml of phosphate-buffered saline (20 mM sodium phosphate, 145 mM NaCl, pH 7.4)

containing 1% (wt/v) Triton X-100, leucine (2 mM), phenylmethanesulfonyl fluoride (1 mM) and benzamidine (1 mM). The homogenate was centrifuged (4°C) at 105,000 g for 60 min in a 50-Ti rotor (Beckman, CA) and subsequently reacted with excess polyclonal apo B and apo A-I antibodies (Boehringer Mannheim, Germany) for 18 h at 4°C. Pansorbin (Carbiochem, CA) was then added, and the immunoprecipitate was washed extensively and analyzed by linear 3-20% acrylamide gradient and a 2% stacking gel. Bands corresponding to apo A-I and apo B-48 were sectioned and counted after an overnight incubation at 20°C with 1 ml BTS-450 (Beckman) and 10 ml of liquid scintillation fluid (Ready-Solv. NA, Beckman). Results for each apo studied were expressed as percentage apo/total trichloroacetic acid-precipitable protein.

#### *Isolation of Lipoproteins*

The separation of lipoproteins from the medium was carried out by sequential ultracentrifugation using a TL-100 ultracentrifuge as described previously (10, 15, 22). Briefly, after the removal of TG-rich lipoproteins [chylomicrons and very-low density lipoproteins (1.006 g/ml)] at 100,000 g for 2.26 h at 5°C, the low-density lipoproteins and high-density lipoproteins were obtained together (1.21 g/ml) by centrifuging for 6.30 h at 100,000 g. Each lipoprotein fraction was exhaustively dialyzed against 0.15 M NaCl, 0.0001 M EDTA, pH 7.0 at 4°C for 24 h.

#### *Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP) Activity Assay*

The MTP activity was determined by evaluating the transfer of radiolabeled triacylglycerol (TG) between two populations of unilamellar vesicles, as described previously (18, 19, 32). The donor and acceptor vesicles were prepared by adding the

appropriate amount of lipids to 500  $\mu$ l of chloroform, followed by drying under a stream of nitrogen, rehydration, and probe sonication in 1.25 ml buffer (15 mM Tris HCL, pH 7.4, 35 mM NaCl, 0.05% BSA, 3 mM sodium azide, and 1 mM EDTA). Donor vesicles contained (per assay) 4 nmol of egg yolk phosphatidylcholine, 0.33 nmol of cardiolipin and 0.024 nmol of [ $^3$ H]-triolelylglycerol (Amersham). Acceptor vesicles contained 24 nmol of egg yolk phosphatidylcholine, 0.048 nmol of triolelylglycerol, and  $\sim$ 4.000 cpm [ $^{14}$ C]-dipalmitoyl phosphatidylcholine (Amersham). Both categories of vesicles comprised 0.01% butylated hydroxytoluene. Various amounts of semipurified MTP were incubated with 5  $\mu$ l donor and acceptor vesicles in a final volume of 100  $\mu$ l for 1 h at 37°C. The reaction was quenched by adding 400  $\mu$ l of ice-cold 15:35 buffer (without BSA). The negatively charged donor vesicles were removed from the reaction mixture by adsorption onto DEAE cellulose (Whatman DE-52). The supernatant (containing the acceptor vesicles) was collected after low-speed centrifugation (13,000 rpm x 10 min) and recentrifuged (13,000 rpm x 5 min) to ensure total removal of the DEAE cellulose before scintillation counting. The ratio of [ $^3$ H]-glycerol trioleate to [ $^{14}$ C]-dipalmitoyl phosphatidylcholine was determined and the percentage of lipid transfer was calculated from the increase in this ratio.

### *Analyses*

The hydrolytic activities of sucrase, maltase, lactase and alkaline phosphatase of cultured biopsies was assayed as described by Ménard *et al.* (23). Lactic dehydrogenase, an indicator of tissue deterioration, was determined in the medium by analyzing the conversion of lactic acid to pyruvic acid that reacted to form 2,4-dinitrophenyl-hydrazine. The brownish red colour was read at wavelength 440. Fatty acids (FA) in whole plasma



were assayed by an improved method described by us previously (11, 13, 16). Briefly, each sample to be analyzed was subjected to direct transesterification and then injected into a gas chromatograph (model HP 5880; Hewlett-Packard, Rockville, MD) by using a 60-m fused silica capillary column coated with SP 2331. Cellular protein content was determined according to the method of Lowry et al (20).

#### *Statistical test*

All results are expressed as means  $\pm$  SE. The statistical differences were assessed using the two-tailed Student's *t* test.

## RESULTS

Concomitantly with the evaluation of mucosal fat transport, studies were conducted to assess the integrity of duodenal tissue obtained from CF patients and controls. Figure 1 illustrates the general morphology of intestinal tissue at the light microscopy level. Both patient and control duodenal specimens exhibited well-shaped villi and crypts. The epithelial cells lining the villi were tall and the epithelium of the crypts was well preserved in CF subjects and controls. Furthermore, no damaged cells were noted in the CF epithelium compared with normal mucosa.

Experiments were also carried out to examine the enzymatic activities of duodenal biopsies (Table 1). The levels of lactase, maltase and sucrase were not significantly different between CF patients and controls.

In a subsequent step, we used the model of intestinal organ culture, a reliable and useful technique, to explore the intracellular processes of lipid absorption. The excellent viability of CF and control tissues was reflected by similar levels of alkaline phosphatase activity and thymidine incorporation, as well as by measuring the leakage of lactate dehydrogenase into the culture medium after a 18 h incubation period (Table 2). Overall, these data suggested that no marked undesired gastrointestinal effects occurred as a result of the CF condition or following organ culture of CF patients' intestinal explants.

Lipid synthesis and secretion was assessed by following [ $^{14}\text{C}$ ]-palmitic acid incorporation into different lipid classes. As noted in Figure 2, the formation and release of lipids were decreased in CF duodenal explants in comparison with controls. Importantly, the incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]-palmitic acid into TG, phospholipids (PL) and cholesteryl ester (CE) was moderately reduced in CF duodenal explants (22%, 31% and 30% respectively) and contrasted with the markedly impaired output of these lipids in the culture medium

(40%, 38% and 42%, respectively) when compared with controls. The discrepancy between the synthesis of newly formed lipids and their secretion became particularly evident when expressed as a medium/tissue ratio. Accordingly, the discharge of TG-rich lipoproteins and high-density lipoprotein was much lower ( $p < 0.05$ ) in CF samples than in controls (Figure 3A). In keeping with these biosynthetic lipid abnormalities, the radioactivity incorporated into apo B-48 and apo A-I in CF specimens amounted to 60% and 70%, respectively, of controls ( $p < 0.05$ ) (Figure 3B). However, no significant correlation ( $r = 0.39$ ,  $p < 0.41$ ) was found between faecal fat excretion and the lipoprotein production rates in the CF biopsies.

To determine whether the defect of apo B-48 biogenesis and TG-rich lipoprotein secretion might be related to MTP, we studied protein transfer activity using the transport of [ $^{14}\text{C}$ ]-triolelylglycerol from donor to acceptor small unilamellar vesicles. No significant changes in MTP activity (% transfer) were detected in CF biopsy homogenates ( $16 \pm 5$ ) compared with controls ( $18 \pm 4$ ).

FA composition of CF and control plasma was determined. The CF profile displayed both a significant reduction in the relative content of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and a considerable increase in the proportion of saturated FAs (Figure 4). These alterations in CF patients led to an elevation of the ratio 20:3 (n-9) to 20:4 (n-6), a very sensitive index of essential fatty acid deficiency (EFAD), and to a decrease in the PUFA/saturated FA ratio.

Overall, these findings underline CF patients' limited ability to esterify lipids, elaborate apos and assemble lipoproteins. Thus, our studies show, for the first time, that the intracellular phase of fat absorption is impaired in the enterocytes of CF patients.

## DISCUSSION

In the present study, we used intestinal tissue in culture to further our understanding of the complex biosynthetic molecular events essential for the formation and secretion of lipoproteins relevant to CF patients. This efficient and reliable intestinal model affords the opportunity to investigate lipid transport while minimizing the influence of the many confounding digestive intraluminal factors seen in the *in vivo* situation, thus facilitating the interpretation of data. We can, therefore, conclude that these intraluminal factors are unlikely to be responsible for the diminished capacity of CF patients' biopsies to absorb lipids, since the intraluminal lipolysis of TG by lipases and the solubilization of lipolytic products by bile components are circumvented.

Results from our biochemical analyses provide novel information regarding lipid processing in the intestine of CF patients. First, cultured CF duodenal explants were incapable of the normal biosynthesis of neutral (TG, CE) and polar (PL) lipids. Second, they were inefficient in delivering lipids into the medium, which was confirmed by defective lipoprotein secretion. Third, they displayed less efficiency in elaborating apos (B-48 and A-I) biogenesis.

At present, our findings cannot indicate whether the impaired capacity of the small intestine to produce TG in CF is due to the limited activity of the monoacylglycerol (MG) pathway. As reported previously (14, 35), MG and fatty acyl CoA are covalently joined to form diacylglycerol (DG) in a reaction catalyzed by monoacylglycerol acyltransferase (MGAT). DG and fatty acyltransferase are then used to synthesize TG in a reaction catalyzed by diacylglycerol acyltransferase (DGAT) (14, 35). In our study, the measurement of MGAT and DGAT could not be carried out given the limited tissue availability, nor were we able

to define the status of the enzymes responsible for cholesterol esterification and PL formation.

Importantly, the analysis of free FAs and MG in the mucosa of CF patients did not disclose quantitatively significant changes compared to controls. The absence of FA accumulation in CF mucosa may be suggestive of reduced uptake of exogenous FAs in view of the limited lipid esterification and secretion. However, more evidence is necessary to confirm this mechanism since FAs may have alternative metabolic fates, including mitochondrial beta-oxidation, peroxysomal degradation, elongation and conversion to prostaglandins, protein binding and acylation, intracellular signalling and membrane formation. It is important to mention that biopsies from controls and patients were obtained after fasting, which excludes possible dilution of labelled palmitic acid substrate with residual FAs in the mucosa.

It is generally accepted that the intracellular mechanism of TG-rich lipoprotein assembly requires apo B synthesis and association. An early step in this process is the co-translational lipidation of apo B that is transiently bound to the endoplasmic reticulum (ER) membrane where it is folded. The addition of lipids stabilizes apo B-48 and prevents its proteolytic degradation via the ubiquitin-dependent proteasomal pathway (4, 38). It is, therefore, reasonable to suggest that the defective synthesis of TG, CE and PL in the small intestine of CF patients reduced apo B-48 protection from misfolding and degradation, resulting in the lessened secretion of apo B-48-containing lipoproteins. Additional studies are required to determine the role of COP II machinery (8, 31) and apo B-48 glycosylation (13) in the defective transport of TG-rich lipoproteins in CF patients.

We have also noted that apo A-I biogenesis was diminished in the intestinal tissue of CF patients. Even if the values of apo A-I are normalized and expressed as %TCA-

precipitable protein, they remained lower than controls. These data are consistent with our previous studies that showed decreased concentrations of plasma apo A-I in CF patients (12). It is possible that the decline of apo A-I synthesis by the intestine contributes to diminished apo A-I levels in the blood circulation.

MTP is a resident protein in the lumen of the ER that facilitates the transfer of lipids from their site of synthesis in the ER membrane into the lumen during the assembly of TG-rich lipoproteins (30, 36). However, the MTP requirement for the export of apo B-48 remains controversial. Various studies have stressed that liver-specific MTP knockout mice will still secrete apo B-48, thus excluding the obligatory role of MTP (25, 26). Our findings show that CF intestinal tissue was unable to normally release TG-rich lipoproteins despite adequate MTP activity.

EFAD is another factor capable of contributing to fat malabsorption. Indeed, our previous observations have already emphasized that EFAD in rats impaired both the extracellular and intracellular mechanisms responsible for normal fat absorption (11). Therefore, not only does the elevation of the eicosatrienoic acid (20:3n-9)/arachidonic acid (20:4n-6) ratio, the most sensitive index of EFAD, indicate an abnormal EFA status in CF patients with respect to controls, but it may also account for the lipid enterocyte dysfunction. Evidence has also been reported indicating that EFA status is associated with severe CFTR mutations, which suggests a relationship between the basic protein defect, abnormal EFA metabolism and defective intracellular processing of dietary lipids in CF patients (34). Finally, the alterations in the mucous layer reported by previous investigators (3, 28) may persist in the present intestinal model and may interfere with lipid uptake and processing. In the current investigation, the output of lipids as reflected by the increased ratio of medium/tissue lipid content shows that the secretory mechanism is operational in

CF, which reasonably excludes the role of the mucous layer in intracellular abnormalities in these patients. Moreover, we could not find a correlation between EFAD measured in the plasma and the abnormalities observed in lipids, apos and lipoproteins in the intestine of CF. We, therefore, believe that the differences noted are CF-related. Of particular importance is the abundance of CFTR expression in the apical regions of normal intestinal epithelial cells (27). The presence of defects in CF, CFTR may predispose to disturbed ion transport and to other intestinal manifestations, including intracellular lipid trafficking.

It is difficult to reconcile the failure of appropriate pancreatic enzyme replacement therapy with the persistent malabsorption. It was therefore reasonable to propose that quantitative and qualitative mucosal defects can obviously contribute to aberrations in lipid transport in CF. However, in our studies; no correlation has been established between steatorrhea and the enterocyte phase abnormalities, which suggests that several digestive and cellular factors act in combination to dramatically affect fat absorption process.

Our data have highlighted the defects in the intracellular phase of lipid transport in CF. Conversely, enhanced glucose transport was demonstrated in duodenal biopsies from CF (7), and Frase *et al.*'s experiments revealed glucose absorption in the jejunum of patients with CF (5). Other studies noticed that the inhibition of CFTR did not modify the activity of Na<sup>+</sup>-dependent glucose transporter (SGLT1) (21). Furthermore, ileal bile acid transporter and taurocholate uptake were increased in *cfr<sup>-/-</sup>* mice (33). Overall, these data emphasize that the defect in intestinal lipid absorption in the present study is not specific and that the expression of proteins involved in other metabolic pathways is not modified.

In conclusion, data from the present study indicate that continuing fat malabsorption is not due to pancreatic insufficiency alone. An additional explanation of persistent fat

malabsorption in CF patients may include abnormal intra-enterocyte events leading to aberrant plasma lipid transport. The task ahead, however, is to define the relationship between defective mechanisms governing intracellular lipoprotein assembly and CFTR aberrations.



**ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to Schohraya Spahis for her excellent technical assistance. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MGP 10584).

**Table 1: Activity of Intestinal Brush Border Enzymes in Biopsies from CF Patients and Controls**

Results are expressed as mol.min<sup>-1</sup>/ g tissue protein.

Values represent means  $\pm$  SE for 5 CF patients and 6 controls.

<b>Enzyme</b>	<b>CF Patients</b>	<b>Controls</b>
<b>Sucrase</b>	42.2 $\pm$ 12.6	53.2 $\pm$ 10.9
<b>Maltase</b>	169.0 $\pm$ 17.3	158.1 $\pm$ 12.8
<b>Lactase</b>	13.9 $\pm$ 3.2	14.4 $\pm$ 3.5

**Table 2: Effect of Culture Periods on Intestinal Tissue Integrity.**

Small intestinal specimens obtained from controls were analyzed biochemically before and after culture.

Values represent means  $\pm$  SE of 4 separate duodenal tissues.

<b>Biochemical Parameters</b>	<b>Before Incubation</b>	<b>After Incubation</b>
<b>Alkaline phosphatase (U/g protein)</b>	18.3 $\pm$ 3.7	19.5 $\pm$ 3.9
<b>Lactic dehydrogenase (U/L)</b>	327 $\pm$ 29	376 $\pm$ 44
<b>Thymidine incorporation (dpm/mg protein)</b>	922 $\pm$ 91	778 $\pm$ 132

## REFERENCES

1. **Bertrand CA and Frizzell RA.** The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C1-18, 2003.
2. **Carroccio A, Pardo F, Montalto G, Iapichino L, Soresi M, Averna MR, Iacono G and Notarbartolo A.** Use of famotidine in severe exocrine pancreatic insufficiency with persistent maldigestion on enzymatic replacement therapy. A long-term study in cystic fibrosis. *Dig Dis Sci* 37: 1441-1446, 1992.
3. **Eggermont E and De Boeck K.** Small-intestinal abnormalities in cystic fibrosis patients. *Eur J Pediatr* 150: 824-828, 1991.
4. **Fisher EA, Zhou M, Mitchell DM, Wu X, Omura S, Wang H, Goldberg AL and Ginsberg HN.** The degradation of apolipoprotein B100 is mediated by the ubiquitin-proteasome pathway and involves heat shock protein 70. *J Biol Chem* 272: 20427-20434, 1997.
5. **Frase LL, Strickland AD, Kachel GW and Krejs GJ.** Enhanced glucose absorption in the jejunum of patients with cystic fibrosis. *Gastroenterology* 88: 478-484, 1985.
6. **Grubb BR and Gabriel SE.** Intestinal physiology and pathology in gene-targeted mouse models of cystic fibrosis. *Am J Physiol* 273: G258-G266, 1997.
7. **Hardcastle J, Harwood MD and Taylor CJ.** Small intestinal glucose absorption in cystic fibrosis: a study in human and transgenic DeltaF508 cystic fibrosis mouse tissues. *J Pharm Pharmacol* 56: 329-338, 2004.
8. **Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, Rudling M, Myrdal U, Annesi G, Naik S, Meadows N, Quattrone A, Islam SA, Naoumova RP, Angelin B, Infante R, Levy E, Roy CC, Freemont PS, Scott J and**

- Shoulders CC.** Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet* 34: 29-31, 2003.
9. **Kopelman H, Durie P, Gaskin K, Weizman Z and Forstner G.** Pancreatic fluid secretion and protein hyperconcentration in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 312: 329-334, 1985.
  10. **Levy E, Beaulieu JF, Delvin E, Seidman E, Yotov W, Basque JR and Menard D.** Human crypt intestinal epithelial cells are capable of lipid production, apolipoprotein synthesis, and lipoprotein assembly. *J Lipid Res* 41: 12-22, 2000.
  11. **Levy E, Garofalo C, Thibault L, Dionne S, Daoust L, Lepage G and Roy CC.** Intraluminal and intracellular phases of fat absorption are impaired in essential fatty acid deficiency. *Am J Physiol* 262: G319-G326, 1992.
  12. **Levy E, Lepage G, Bendayan M, Ronco N, Thibault L, Galeano N, Smith L and Roy CC.** Relationship of decreased hepatic lipase activity and lipoprotein abnormalities to essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patients. *J Lipid Res* 30: 1197-1209, 1989.
  13. **Levy E, Marcel Y, Deckelbaum RJ, Milne R, Lepage G, Seidman E, Bendayan M and Roy CC.** Intestinal apoB synthesis, lipids, and lipoproteins in chylomicron retention disease. *J Lipid Res* 28: 1263-1274, 1987.
  14. **Levy E, Mehran M and Seidman E.** Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J* 9: 626-635, 1995.
  15. **Levy E, Menard D, Delvin E, Stan S, Mitchell G, Lambert M, Ziv E, Feoli-Fonseca JC and Seidman E.** The polymorphism at codon 54 of the FABP2 gene increases fat absorption in human intestinal explants. *J Biol Chem* 276: 39679-39684, 2001.

16. **Levy E, Roy C, Lacaille F, Lambert M, Messier M, Gavino V, Lepage G and Thibault L.** Lipoprotein abnormalities associated with cholesteryl ester transfer activity in cystic fibrosis patients: the role of essential fatty acid deficiency. *Am J Clin Nutr* 57: 573-579, 1993.
17. **Levy E, Roy CC, Thibault L, Bonin A, Brochu P and Seidman EG.** Variable expression of familial heterozygous hypobetalipoproteinemia: transient malabsorption during infancy. *J Lipid Res* 35: 2170-2177, 1994.
18. **Levy E, Stan S, Delvin E, Menard D, Shoulders C, Garofalo C, Slight I, Seidman E, Mayer G and Bendayan M.** Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. *J Biol Chem* 277: 16470-16477, 2002.
19. **Levy E, Stan S, Garofalo C, Delvin EE, Seidman EG and Menard D.** Immunolocalization, ontogeny, and regulation of microsomal triglyceride transfer protein in human fetal intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G563-G571, 2001.
20. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
21. **Mailleau C, Capeau J and Brahim-Horn MC.** Interrelationship between the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter and CFTR in Caco-2 cells: relevance to cystic fibrosis. *J Cell Physiol* 176: 472-481, 1998.
22. **Marcil V, Delvin E, Seidman E, Poitras L, Zoltowska M, Garofalo C and Levy E.** Modulation of lipid synthesis, apolipoprotein biogenesis, and lipoprotein assembly by butyrate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G340-G346, 2002.

23. **Menard D, Arsenault P and Pothier P.** Biologic effects of epidermal growth factor in human fetal jejunum. *Gastroenterology* 94: 656-663, 1988.
24. **Pencharz PB and Durie PR.** Nutritional management of cystic fibrosis. *Annu Rev Nutr* 13: 111-136, 1993.
25. **Raabe M, Flynn LM, Zlot CH, Wong JS, Veniant MM, Hamilton RL and Young SG.** Knockout of the abetalipoproteinemia gene in mice: reduced lipoprotein secretion in heterozygotes and embryonic lethality in homozygotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8686-8691, 1998.
26. **Raabe M, Veniant MM, Sullivan MA, Zlot CH, Bjorkegren J, Nielsen LB, Wong JS, Hamilton RL and Young SG.** Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *J Clin Invest* 103: 1287-1298, 1999.
27. **Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL and .** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073, 1989.
28. **Rose MC.** Epithelial mucous glycoproteins and cystic fibrosis. *Horm Metab Res* 20: 601-608, 1988.
29. **Roy CC, Weber AM, Morin CL, Combes JC, Nussle D, Megevand A and Lasalle R.** Abnormal biliary lipid composition in cystic fibrosis. Effect of pancreatic enzymes. *N Engl J Med* 297: 1301-1305, 1977.
30. **Sharp D, Blinderman L, Combs KA, Kienzle B, Ricci B, Wager-Smith K, Gil CM, Turck CW, Bouma ME, Rader DJ and .** Cloning and gene defects in

- microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinaemia. *Nature* 365: 65-69, 1993.
31. **Siddiqi SA, Gorelick FS, Mahan JT and Mansbach CM.** COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci* 116: 415-427, 2003.
  32. **Slight I, Bendayan M, Malo C, Delvin E, Lambert M and Levy E.** Identification of microsomal triglyceride transfer protein in intestinal brush-border membrane. *Exp Cell Res* 300: 11-22, 2004.
  33. **Stelzner M, Somasundaram S, Lee SP and Kuver R.** Ileal mucosal bile acid absorption is increased in Cfr knockout mice. *BMC Gastroenterol* 1: 10, 2001.
  34. **Strandvik B, Gronowitz E, Enlund F, Martinsson T and Wahlstrom J.** Essential fatty acid deficiency in relation to genotype in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 139: 650-655, 2001.
  35. **Tso P.** Intestinal Lipid Absorption. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, edited by John LR. New-York: Raven, 1994, p. 1867-1907.
  36. **Wetterau JR and Zilversmit DB.** A triglyceride and cholesteryl ester transfer protein associated with liver microsomes. *J Biol Chem* 259: 10863-10866, 1984.
  37. **Wilchansky M, Pencharz PB and Durie PR.** Nutritional Management of Cyclic Fibrosis in Pediatric Nutrition. In: *Pediatric Nutrition*, edited by Reifen R, Lerner A, Branski D and Heymans H. *Pediatr Adolesc Med.* Basel, Karger, 1998, p. 182-209.
  38. **Yeung SJ, Chen SH and Chan L.** Ubiquitin-proteasome pathway mediates intracellular degradation of apolipoprotein B. *Biochemistry* 35: 13843-13848, 1996.
  39. **Zemel BS, Kawchak DA, Cnaan A, Zhao H, Scanlin TF and Stallings VA.** Prospective evaluation of resting energy expenditure, nutritional status, pulmonary



function, and genotype in children with cystic fibrosis. *Pediatr Res* 40: 578-586, 1996.

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1:** Morphology of duodenal biopsies obtained from cystic fibrosis patients (A) and controls (B). The light micrograph of these uncultured explants illustrates normal villus and crypt architecture.

**Figure 2:** Incorporation of [<sup>14</sup>C]-palmitate into lipids of explants and their release in the culture medium.

Duodenal biopsies were cultured for 18 h in a medium containing 10 μCi of [<sup>14</sup>C]-palmitic acid. The lipid fractions were extracted and separated by TLC. Results are means ± SD of 6 cystic fibrosis patients and 6 controls which were expressed as nmoles/mg protein. The discrepancy between synthesis of newly formed lipids and their secretion became evident when expressed as a medium/tissue ratio. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01.

TG, triglyceride; PL, phospholipid; CE, cholesteryl ester.

**Figure 3:** Lipoprotein and apolipoprotein (apo) production by duodenal explants.

Following the incubation of intestinal biopsies with [<sup>14</sup>C]-palmitic acid, lipoproteins (A) were isolated by ultracentrifugation according to their specific densities: chylomicron (CM) + very-low density lipoprotein (VLDL) (1.006 g/ml) and high-density lipoprotein (HDL) (1.21 g/ml). Apolipoproteins (apo) were analyzed after the incubation of duodenal explants with [<sup>3</sup>H]-leucine by immunoprecipitation and SDS gel electrophoresis. Radioactivity corresponding to apos (A-I and B) was determined by liquid scintillation spectrometry. Results were expressed as % of control after calculating the data as dpm/mg protein. Control values (X ±

SD) for CM + VLDL=  $23145 \pm 4112$  dpm/mg protein; HDL=  $11715 \pm 2813$  dpm/mg protein; apo A-I=  $0.207 \pm 0.038$  % apo/total trichloroacetic acid-precipitable protein; and apo B-48=  $0.133 \pm 0.020$  % apo/total trichloroacetic acid-precipitable protein

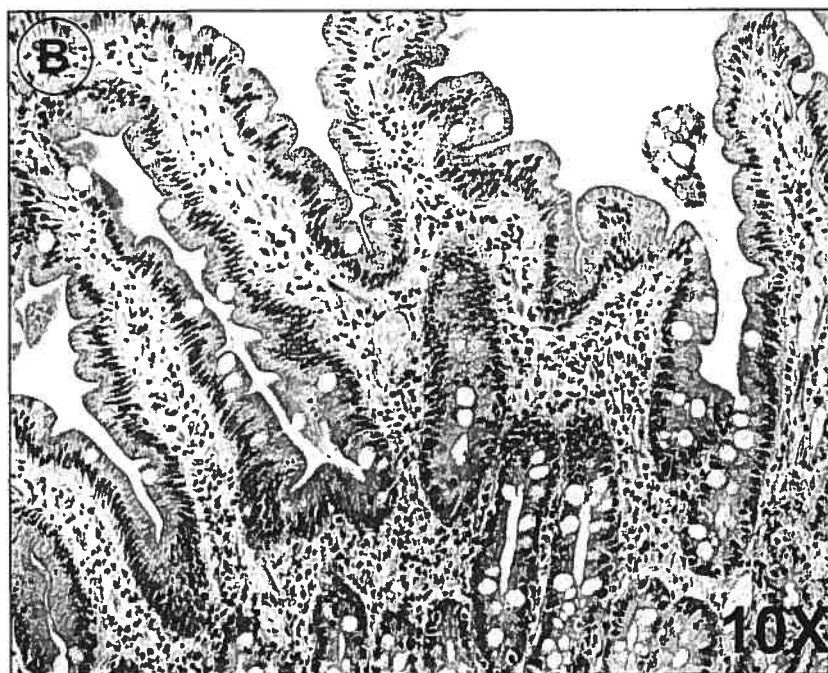
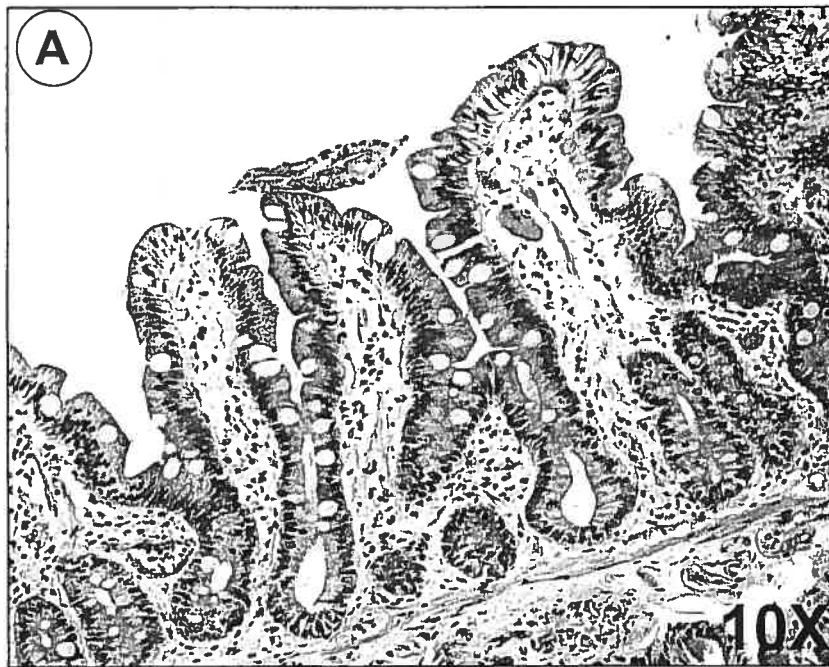
\* $p < 0.05$ .

**Figure 4:** Plasma essential fatty acids in cystic fibrosis and controls.

Blood samples were obtained from the participants and plasma fatty acids (A) were analyzed by capillary gas-liquid chromatography after transmethylating the total lipids with methanolic HCl. The ratios (B) of essential fatty acid deficiency were calculated. Values are means  $\pm$  SD of 6 cystic fibrosis patients and 6 controls.

\* $p < 0.02$ .

Figure 1



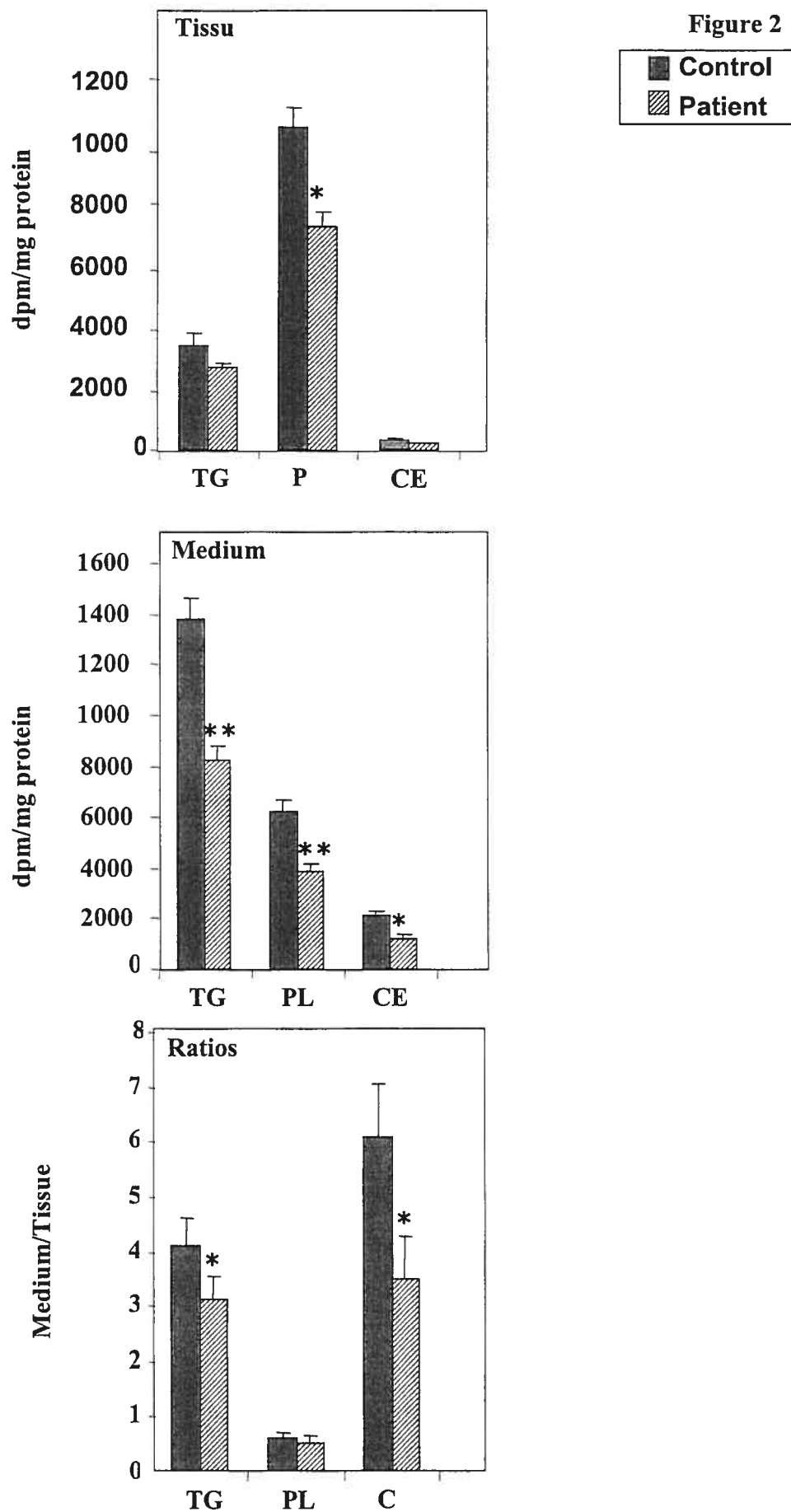


Figure 3

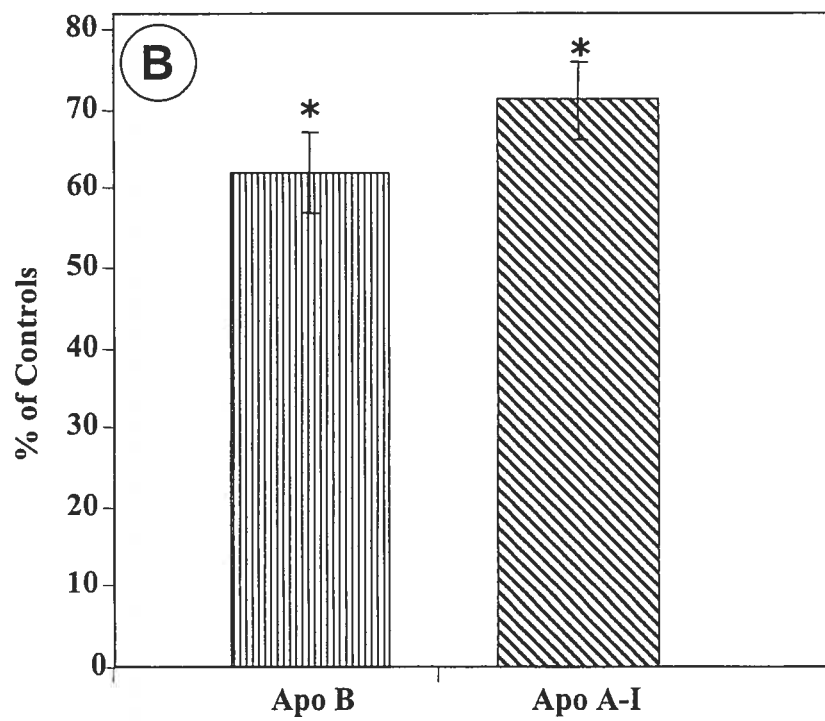
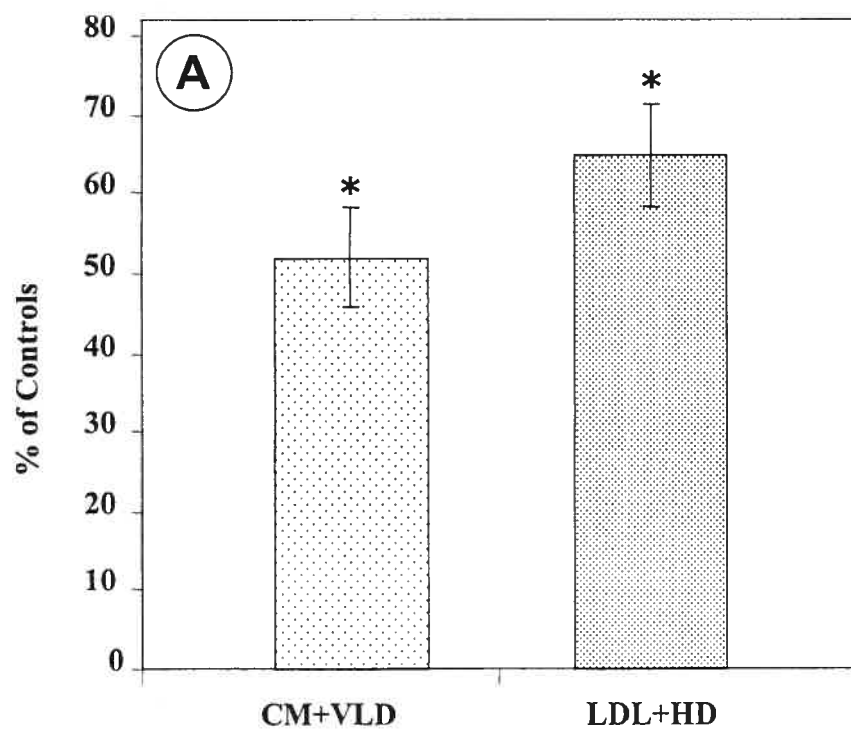
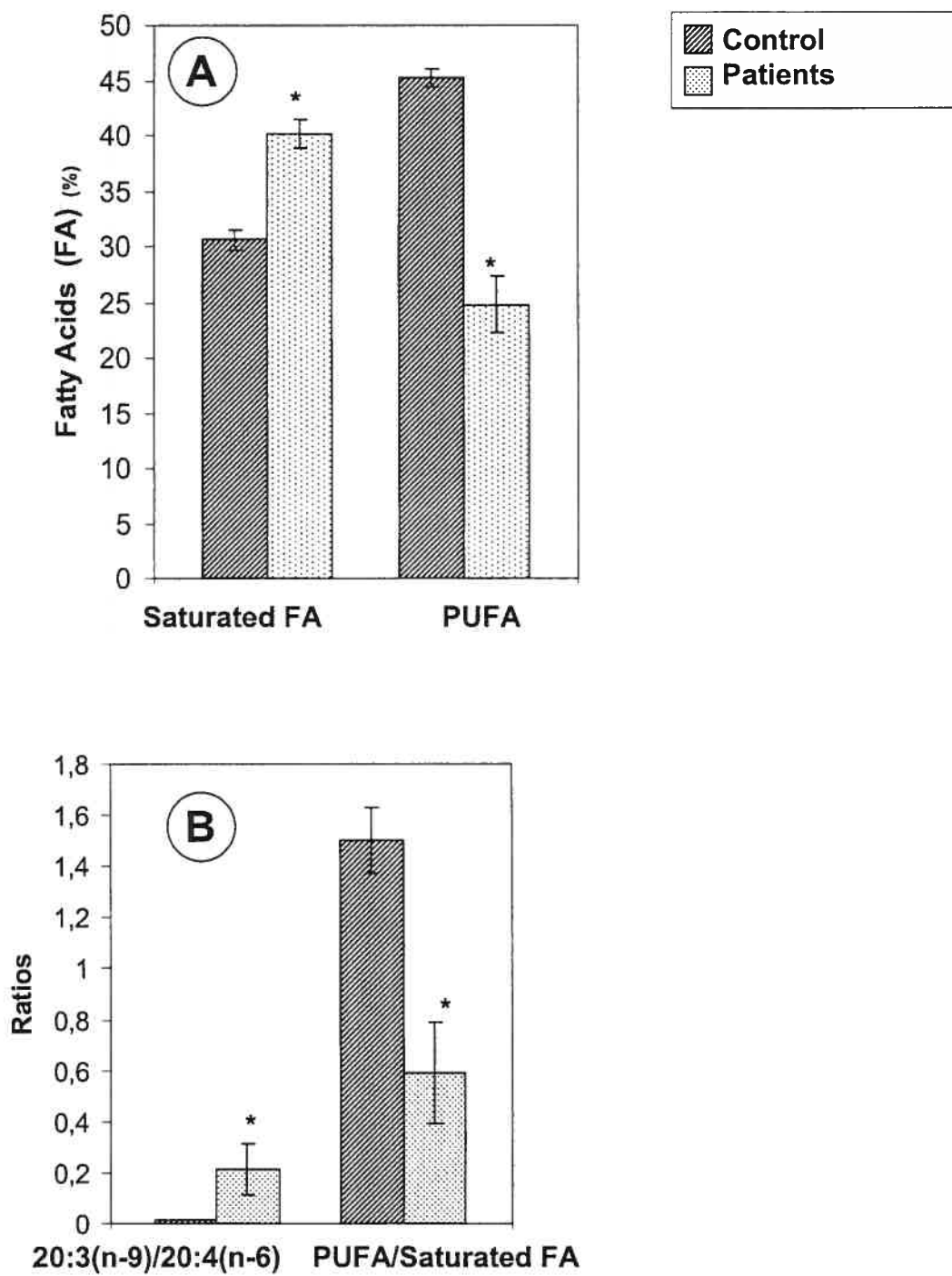


Figure 4



Article 3 publié dans :  
Nutrition and Metabolism  
(Nutr Metab (Lond). 2005 May 3;2(1):11.)



**Mechanisms of lipid malabsorption in Cystic Fibrosis: the impact of essential fatty acids deficiency**

N. Peretti<sup>1</sup>, V. Marcil<sup>1</sup>, E. Drouin<sup>2</sup>, E. Levy<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Department of Nutrition, CHU-Sainte-Justine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, CHU-Sainte-Justine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Address correspondence to:

\*Dr. Emile Levy  
Centre de Recherche  
Hôpital Sainte-Justine  
3175 Côte Ste-Catherine  
Montréal, Québec, Canada H3T 1C5  
Tel.: (514) 345-4626  
Fax: (514) 345-4999



**Abstract**

Transport mechanisms, whereby alimentary lipids are digested and packaged into small emulsion particles that enter intestinal cells to be translocated to the plasma in the form of chylomicrons, are impaired in cystic fibrosis. The purpose of this paper is to focus on defects that are related to intraluminal and intracellular events in this life-limiting genetic disorder. Specific evidence is presented to highlight the relationship between fat malabsorption and essential fatty acid deficiency commonly found in patients with cystic fibrosis that are often related to the genotype. Given the interdependency of pulmonary disease, pancreatic insufficiency and nutritional status, greater attention should be paid to the optimal correction of fat malabsorption and essential fatty acid deficiency in order to improve the quality of life and extend the life span of patients with cystic fibrosis.

## I Introduction

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive genetic disease observed in the Caucasian population, affecting about 1 in 2,500 newborns. It is caused by mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) gene discovered in 1989. The gene was cloned from chromosome 7q21-31, is composed of 27 exons and encodes a protein that functions as a chloride channel [1-4]. CFTR has 1,480 amino acids and the molecular weight varies from 140 kDA to 170 kDA, depending upon the degree of posttranslational glycation in the Golgi complex, which appears to vary somewhat according to cell type and genotype. Defective cAMP-dependent chloride ion conductance leads to an imbalance in fluid flow across epithelia, thickened mucus and blocked exocrine ducts in the affected tissues. In addition to respiratory-tract manifestations that represent the major cause of death in CF, the vast majority of young CF subjects have a wide variability of clinical expression, including gastrointestinal, metabolic and nutritional problems [5,6]. Advances in medical management have led to a continual improvement of life expectancy for CF patients. However, intestinal fat malabsorption remains a persistent feature, given the difficulty of achieving complete correction in clinical practice despite the remarkable benefits resulting from exogenous pancreatic enzyme replacement therapy [7-11]. The purpose of this article is to present a systematic critical review of literature and data sources pertaining to fat malabsorption in CF, emphasizing the role of abnormal, intraluminal and intracellular factors. Furthermore, the relationship between essential fatty acid deficiency (EFAD) and intestinal fat transport is particularly underscored given its implication in gastrointestinal pathophysiology. To facilitate the reader's appreciation of major gastroenterological problems in CF, we first describe the normal digestive and absorptive processes before addressing the issue of various defective mechanisms in CF.

## II Lipids and Essential Fatty Acids (EFAs)

Dietary fat intake represents 35% (100 to 150 g per day) of total calories consumed in the North American diet [12]. Dietary fats are composed mainly of triacylglycerol (TG) with 92–96% long-chain fatty acids [13]. In addition to dietary intake, lipids are derived from bile and desquamated mucosal cells.

Lipids have varied as well as essential functions in organisms. TGs are the principal reserve supply of energy, while phospholipids (PLs) and cholesterol are crucial for the elaboration of cell membranes, and play a functional role in steroid hormone and biliary acid (BA) synthesis. Linoleic (18:2n-6) and linolenic (18:3n-3) acids have recognized functions in growth, the development of the central nervous system, immune and vascular functions, eicosanoid production, membrane fluidity and the control of lipid homeostasis. Adequate EFA levels depend entirely on adequate dietary intake and absorption because mammalian cells cannot synthesize *de novo* EFA efficiently. Once these EFAs are appropriately absorbed, they can be converted into long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as arachidonic acid (AA, 20:4n-6), eicosapentaenoic (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3). Conditions leading to fat malabsorption, as in CF, have been associated with a high incidence of EFAD. However, diet-induced EFAD impairs dietary lipid absorption through various mechanisms, which will be thoroughly discussed in this review.

### II.1. CF Patients and EFAD

A high EFAD incidence (85%) has been frequently reported in CF patients [14-19]. EFAD is most marked at infancy [20] and EFA impairment has been observed most significantly in the cholesteryl ester (CE) fraction [15,21]. The most often reported

abnormalities in plasma are a decrease in linoleic acid and AA, its major metabolites, as well as DHA [22]. This EFA diminution is associated with an elevation in eicosatrienoic acid (20:3n-9), oleic acid (18:1n-9) and palmitoleic acid (16:1n-7) [14,23,24], resulting in a rise in the triene/tetraene ratio. It has been suggested that the (20:3n-9/20:4n-6) ratio is a very sensitive and reliable index of EFAD. A value of the ratio above 0.2 indicates an appropriate cutoff for the diagnosis of EFAD [25]. However, results obtained from CF studies vary, possibly as a consequence of different nutritional status, the degree of malabsorption and the severity of the CFTR mutation.

Abnormal EFA status in CF patients does not seem to be the consequence of intestinal malabsorption only, since reduced EFA values are found as early as in the first weeks of life in infants with CF [22] and they are also present in well-nourished young CF patients who do not receive a low-fat diet and do not present with fat malabsorption [17,24,26-28] even with regular pancreatic enzyme therapy [21]. Among other mechanisms related to EFAD, one can mention the excessive oxidation of EFA as an energy source [29], the exaggerated utilization of eicosanoids as precursors of inflammatory response [30,31], the higher rate of lipid turnover in cell membranes [32], the impaired metabolism of EFA with a defect in plasma membrane incorporation, the decreased activity of desaturases [14,33] and lipid peroxidation [34].

## **II.2. Relationship between CFTR and EFAD**

CFTR primarily functions as a chloride channel in the apical membrane of the respiratory and gastro-intestinal tracts. An elevation of cAMP within the cell results in increased chloride transport through the CFTR. Movement of water is linked osmotically to such ion transport and chloride secretion represents one likely means of hydrating the

mucosal surface of these organs. Other important studies have implicated the CFTR in additional functions, including the regulation of distinct Cl<sup>-</sup> channel proteins, the modulation of intracellular vesicle and Golgi acidification, and the control of vesicle trafficking [35-40]. Furthermore, it has been suggested that the CFTR may regulate membrane PL composition. In human airway epithelial cultured cells, the incorporation of fatty acids (FAs) into membrane PLs is decreased when chloride conductance channels are chemically blocked [41]. A defective CFTR reduces the incorporation of linoleic acid in the PL of CF cells and transfecting these cells with the normal gene increases linoleic acid incorporation [42]. Thus, a relationship is possible between chloride transport conductance and EFA metabolism. To date, these studies are limited and additional investigation is needed to establish the role of the chloride channel function in EFA movement and metabolism.

CFTR knock-out mice demonstrate EFAD. But the EFA composition of the cell membrane varies with different animal models. In *cfr*<sup>-/-</sup> mouse, the pancreas, lungs and ileum were deficient in (n-3) EFA [43], whereas in *cfr*<sup>tm1HGU/tm1HGU</sup> mice, the deficiency was in (n-6) EFA in plasma, lung and pancreatic PL [44]. The PUFA differences between the two mouse models emphasize the importance of determining the exact composition of membrane PL from healthy men and CF patients according to genotype in order to tailor appropriate EFA nutritional intervention.

In CF, AA levels suggest that abnormal EFA status may result from an impaired EFA metabolism. High levels of AA are also reported in the cell membrane of the ileum of CFTR knock-out mice [43]. The same AA imbalance has been reported in the PL fraction deriving from bronchial alveolar lavage fluid, plasma and tissues [31,45-48] of CF patients. The increased AA level in tissues may result from either overproduction or diminished

catabolism. In CF cells (CFPAC-1), the conversion of 18:2n-6 into 20:4n-6 by desaturation and elongation processes is enhanced 1.8-fold compared with CF cells transfected with the normal gene [42]. AA overproduction is compatible with an intrinsic increase in AA release by CFTR-mutated respiratory epithelial cell lines [49]. A decreased metabolism of AA through cyclooxygenase, lipoxygenase or cytochrome P450 pathways could also explain high levels of AA in tissues, but this hypothesis should be thoroughly tested in CF because of a) the high rates of inflammatory species originating from AA that characterize CF patients; and b) the enhanced turnover of endogenous and exogenous AA in polymorph neutrophil granulocytes, which is possibly due to enhanced phospholipase A2 (PLA2) activity [50]. Then, AA catabolism is not obviously diminished, but the ratio between production and degradation may be unbalanced in favor of overproduction. Accordingly, it has been suggested that AA participates in CF physiopathology, since AA has been shown to inhibit CFTR Cl<sup>-</sup> currents when applied to the cytoplasmic face of excised membrane patches [51,52]. Other FAs may also block CFTR pores with various levels of efficiency. For example, cis-unsaturated FAs are more effective than trans-unsaturated FAs and saturated FAs in interfering with CFTR function [52]. Furthermore, in respiratory epithelial cells, CFTR mutation  $\Delta$ F508 is associated with an intrinsic increase in AA release [49] suggesting that the mechanism of chronic inflammation in CF, at least in part, involves this abnormality. Importantly, Chloride ion (Cl<sup>-</sup>) secretion across epithelial cells is induced by AA [53,54]. On the other hand, AA decreases Cl<sup>-</sup> secretion across tracheal epithelium when its metabolism is impaired by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors [54] suggesting that enhanced Cl<sup>-</sup> secretion results from the action of its metabolites [52]. Furthermore, there is a correlation between EFAD and CF genotype in homozygotes for  $\Delta$ F508 and heterozygotes for 394 delTT have display significantly lower concentrations of linoleic and

DHA than the other mutations [55]. Thus, the relationship between AA metabolism abnormalities and specific mutations may explain the discrepancies observed with n-6 EFA supplementation [19,22,56-58]. Evidently, extensive studies are required to clarify the link between the CFTR and FAs, especially in view of the contribution of EFAD to CF pathophysiology.

In animals, EFAD induces symptoms similar to those in CF: defective Na<sup>+</sup> transport, increased bacterial colonization of airways, formation of clusters of lipid-laden macrophages in lungs [59], impaired alveolar macrophage function [60], alteration of surfactants [61], liver steatosis, decreased insulin secretion and increased caloric needs [62]. Interestingly, a membrane lipid imbalance plays a role in the phenotype expression of CF in CFTR knock-out mice and feeding these animals with DHA has normalized disease-related changes that occur in epithelial cells and intestinal mucosa [63].

Of note is the finding that altered PL composition and structure can impair membrane fluidity [64-66], thereby modifying CFTR cell membrane localization and function. Membrane PL composition in CFTR knock-out mice is different from controls [44]. Apparently, lipid membrane composition regulates membrane protein activity through the association between lipid rafts and these proteins [67]. The transient residency of proteins in rafts emerges as a regulatory mechanism responsible for protein biological activity. Recently, it has been reported that lipid raft localization for CFTR is required for signaling in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection, underlying the interaction between the lipid composition of plasma membrane and the CFTR protein [68]. It seems, therefore, that a correction of PL composition may improve CFTR activity *in vivo*, a hypothesis that calls for direct experimental validation in intestinal cells.



### II.3. Nutritional Status and Prognosis in CF

Various studies emphasize a correlation between a low nutritional status and an unfavorable prognosis in patients with CF [69]. Chronic under nutrition is associated with weight and height retardation in CF children. Early studies showed a correlation between the degree of malnutrition and the severity of pulmonary disease [69-71] and a slower rate of deterioration of pulmonary function was found in CF children without steatorrhea [72]. However, low values of EFA (linoleic acid and DHA) are not always correlated with anthropometric data or lung function [55]. CF survival and well-being are also correlated with malnutrition in CF [73]. This positive correlation between good nutritional status and long-term survival underscores the optimization of energy balance, nutrient intake, as well as intestinal absorption for CF patients.

Since EFA levels are abnormal in CF patients and EFAD may contribute to CF pathophysiology in animal models, it has been suggested that EFA supplementation has a beneficial effect in this disease. Nutritional studies demonstrate that oral and intravenous supplementations with n-3 FAs are efficient in increasing EPA and DHA incorporation in plasma, erythrocyte and platelet membrane [56-58]. Oral supplementation with n-6 FAs increases plasma and erythrocyte membrane AA levels [22,74-76]. The clinical effects of EFA supplementation vary among studies: linoleic acid increases weight for height in CF children [19,22] and an improvement in pulmonary function is also observed with n-3 FA intake. Nevertheless, this valuable effect is not reported in all studies [56-58] and the differences may be explained by the limited number of patients (under 20) and the short duration (between 4 and 6 weeks) that prevent the proper evaluation of any clinical benefit. Undoubtedly, further studies should focus on the relationship between dose recommendations, the degree of correction of plasma EFAs and clinical outcome. In

particular, long-term lipid dosage adjustments are necessary to define the optimal n-3/n-6 ratio required in CF patients to prevent clinical manifestations.

In contrast to carbohydrates and proteins, lipids are poorly soluble in water. Their lipolysis into the aqueous phase of the intestinal lumen, as well as their transport into plasma, requires the formation of soluble complexes such as BAs and lipoproteins (LPs). Any deficiency or variation in these processes may impact on fat digestion and transport. Fat malabsorption in CF may result from the inefficiency of sequential events: the lipolysis of alimentary lipids, the effect of BAs on micellar solubilization, the integrity of intestinal mucus and enterocytes, multiple intracellular processes and LP secretion. These lipid digestive and absorptive steps will be discussed chronologically.

#### Intraluminal Abnormalities

##### **III.1.1. Lipolytic Phase**

TGs cannot be transported into the cell because of their size and their hydrophobic characteristics. The lipolysis process is required to produce smaller and more hydrophilic molecules, which can thus be absorbed. TGs can be hydrolyzed by two lipolytic enzymes in humans: gastric lipase and pancreatic lipase [77,78]. The enzyme postulated to be the main participant in gastrointestinal lipid digestion is pancreatic lipase. However, intra-gastric lipolysis accounts for about 20-30% of total gastrointestinal lipolysis *in vivo* and it has been suggested that it is increased in CF pancreatic insufficiency.

##### **Gastric Lipase**

Human gastric lipase is the key acid enzyme that is secreted by the chief cells located in the fundic region of the stomach. Human gastric lipase is stable in gastric juice at pH values ranging from 2.0 to 7.0 and is the most stable acid lipase [79].

In the past, it was suggested that gastric lipase played only a minor role in the digestion of dietary fat, because of its specificity for medium-chain FAs, which are less common than long-chain FAs in dietary fat [80]. In fact, human gastric lipase also exerts an important activity on long-chain TGs in an acidic pH. When pH levels are between 5 and 6, it hydrolyzes medium-chain TGs more efficiently than longer ones [81]. This lipase is quantitatively important, contributing 20-30% of TG acyl chain hydrolysis [82-84]. Moreover, initial digestion of dietary fat in the stomach was found to be an essential step for optimal intestinal lipolysis for three reasons: releasing long-chain PUFA in the stomach induces cholecystokinin output, which stimulates pancreatic lipase secretion [85]; the efficiency of pancreatic lipase is increased with partially hydrolyzed TGs [86]; and free fatty acids (FFAs) enhance lipase binding to colipase [85].

Acid lipase activity exists in CF children [87,88], but its level, compared with normal controls, varies among studies [89,90]. Basal lipase activity in the stomach and in the duodenum is similar in CF patients and normal controls [91], but its lipolytic activity is almost three times higher in CF patients after a test meal [90]. There are two main explanations for the maintained high activity of acid lipase in CF patients. First, contrary to pancreatic lipase, the low postprandial pH in the upper small intestine, due to bicarbonate deficiency, does not inactivate gastric lipase activity [92,93] and the latter is preserved for a longer period than in normal subjects. Second, the inactivation of gastric lipase is less effective, because of the low concentration of BAs and pancreatic proteolytic enzymes [94,95]. Compensatory lipolytic activity by gastric lipase may account for 40-70% of dietary fat digestion [87,96]. In CF patients, preduodenal activity amounts to 90% of the total lipase activity at the ligament of Treitz in the postprandial state [96]. However, acid-

resistant enzyme supplements, such as fungal lipase, fail to prove efficacy in CF [97]. No correlation between gastric lipase and EFA status is reported in the literature.

### **III.1.2. Pancreatic Lipase and Colipase.**

Amphipathic molecules, monoacylglycerols (MG) and FA, produced during TG hydrolysis, stabilize dietary fat emulsion. Most of the fat digestion occurs in the upper small intestine following the action of pancreatic lipase and BAs. The hydrolysis of long-chain TGs is achieved by pancreatic lipase. Its optimum pH is 8 and the enzyme becomes inactive at a pH under 6 and is irreversibly inactivated at a pH less than 4.5. Colipase is required for pancreatic lipase stabilization on lipid droplets and for optimal lipolytic activity. At least, two other hydrolytic enzymes are needed to release FAs: PLA2 and cholesterol esterase (CET).

Fat malabsorption is present only when pancreatic enzyme secretion is under 10% of normal [98]. On diagnosis, only 15% of CF patients have sufficient pancreatic function for normal fat digestion [72]. The pancreatic function decreases with time, since 37% of CF newborns show a substantial preservation of pancreatic function [99] and more than 90% of CF infants and younger children display pancreatic insufficiency. The physiopathology of pancreatic insufficiency results from several abnormalities. In fact, pancreatic changes are caused by the obstruction of small ducts by thick, sticky secretions and cellular debris. A primary defect of fluid secretion (water and bicarbonate) leads to high protein concentration in pancreatic juice [100]. Then, protein precipitation blocks small pancreatic ducts and promotes pancreatic acinar atrophy and fibrosis. The ratio of acinar cells to connective tissue decreases progressively in the pancreas of CF children until the normal structure of the pancreas is lost. The role of the CFTR for normal proliferation and differentiation of secretory cell populations has been demonstrated in the lung and intestine

of transgenic mice [101,102] and, interestingly, the CFTR appears as a valuable marker of human pancreatic duct cell development and differentiation [103]. CFTR mutation may, therefore, affect the proliferation of pancreatic secretory cells, thereby favoring pancreatic insufficiency and physiopathology.

Not only quantitative but also qualitative abnormalities characterize pancreatic lipase activity. Pancreatic lipase supplements are inactivated by acidic pH levels in the small bowel: only 8% of active enzyme reaches the ligament of Treitz [92,93]. The severity of pancreatic involvement appears to increase with age and, even with maximum pancreatic enzyme replacement therapy, a substantial proportion of ingested energy is probably malabsorbed.

There is little information about colipase in CF. Although, colipase has been reported to be deficient in this disease [104], its secretion is extremely variable in CF patients [105]. More investigations are necessary to clarify this aspect.

End products of gastric lipases are mainly one FFA and one 1-3-diacylglycerol, while the lipolytic products of pancreatic lipase are two FFAs (n-1 and n-3) and one 2-monoacylglycerol [106]. Furthermore, in contrast to pancreatic lipase, gastric lipase has been shown to cleave not only the external ester bonds (n-1 and n-3 position), but also the ester bond in the Sn-2 position [107]. This difference is important for nutritional intervention with enteral defined structured TGs, which provide medium-chain FA as a source of immediate energy. In Caco-2 cell cultures, the addition of structured TGs containing only octanoic acid, a non-EFA, in the Sn-1 and Sn-3 position, but linoleic acid in the Sn-2 position in the presence of gastric lipase, enhances the cellular uptake of TGs, improves cellular EFAD and exhibits a beneficial effect on lipid incorporation and LP production [108]. In the rat, EFAs at the Sn-2 position appear faster in lymph than EFAs at

the terminal positions of TGs [109] and are more readily recovered in lymph [110]. Defined TG with EFA linoleic acid at the Sn-2 position increases the absorption of EFA in rats with fat malabsorption induced by biliary and pancreatic diversion [111]. These results suggest that structured TG, in the presence of gastric lipase, could improve EFAD, despite the absence of pancreatic lipase activity. In patients who are not supplemented with pancreatic enzymes, an organized lipid matrix containing lysophosphatidylcholine (Lyso-PC), MG and FFA could be effective in increasing TG and retinyl-palmitate absorption and in improving clinical outcome [112].

In animal models, EFAD does not affect the lipolytic phase: there is no difference between EFAD and control rodents in the lipolytic step [113,114]. Furthermore, animal models suggest that EFAD is likely to be of minor importance in exocrine pancreas function in CF [113,115]. Furthermore, EFAD does not seem to induce any significant changes in the structure and composition of pancreas [116]. Overall, these studies show that structured TG can effectively supply functional FAs distributed throughout the glycerol skeleton. In particular, structured TG with EFAs at the Sn-2 position and medium chain FAs at the Sn-1 and Sn-2 positions of the glycerol molecule can be used for distinct nutritional and clinical purposes in CF. Although, it is obvious that structured TG are far superior to conventional oils, it is quite difficult to appreciate their influence on lipolysis in CF patients with EFAD in view of the paucity of information available in the literature. Probably, the difficulty originates from the enormous cost of producing highly purified structured TG.

### **III.1.3. Phospholipase A2 (PLA2) and Cholesterol Esterase (CET)**

The phospholipid-hydrolyzing enzymes include phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>), PLA<sub>2</sub> and CET [117]. PLA<sub>1</sub> and PLA<sub>2</sub> are secreted in their zymogen form and activated by trypsin on

entering the duodenum [118]. PLA<sub>2</sub> preferentially hydrolyzes FA in phosphatidylcholine (PC), the most abundant dietary PL, at position 2 to produce more hydrosoluble components (FA and 2-lyso-PC). CET hydrolyzes CE, retinyl ester and lyso-PC in the small bowel [117], but it is 100 times less effective than pancreatic lipase in the TG digestion process.

In CF patients, PLA<sub>1</sub> and PLA<sub>2</sub> activity is correlated with the pancreatic function [119]. It is of particular interest to note that, despite the total absence of PLA<sub>2</sub>, around 30% of PLs are hydrolyzed [120]. The decreased activity of PL hydrolyzing enzymes may interact with lipid absorption in several ways. First, since PLs are amphipathic molecules, they adsorb to the surface of lipid droplets, preventing contact between the lipase-colipase complex and the TG substrate [118]. PC hydrolysis will allow desorption of lyso-PL from lipid droplets, which are relatively hydrosoluble molecules, and will thus facilitate the interaction between TG and pancreatic lipase. Secondly, unhydrolyzed PLs impair the absorption of cholesterol and FAs [121,122]. Finally, they impair bile acid absorption through their receptors in the terminal ileum, which increases bile acid losses in the stool.

In CF children, CET activity is dramatically decreased [123] and parallels pancreatic lipase activity. The reduction in BAs, which are essential cofactors for optimal esterase activity, results in a failure to solubilize and thus absorb cholesterol and their esters.

In the enterocyte, lyso-PC is an essential source of PLs for LP formation [124], the transport of TGs from the enterocyte into the blood [125] and the PL turnover induced by exocytosis [126]. These phenomena may be impaired by phospholipase or CET defects.

No data are provided about the impact of EFAD on PLA<sub>1</sub>, PLA<sub>2</sub> and CET activity. However, AA and DHA decrease the secretion of bile-salt dependent lipase, but without directly impairing the biosynthesis of this enzyme. AA alters the transport of the enzyme

toward the cytosol, leading to the retention of bile-salt dependent lipase in microsomes [127]. It is likely that much attention must be paid to phospholipases and CET in CF in view of their role in fat absorption. Future studies should be designed to test whether their supplementation may increase lipolysis efficiency and alleviate EFAD in CF.

#### III.1.4. Intraluminal pH

Duodenum pH results from an interaction among food buffering, gastric acid production and pancreatic bicarbonate secretion. In humans, physiological pH is 2-4 in the stomach and it varies from 6-7 in the upper duodenum, but rarely dips below 5.

In CF patients, pancreatic, intestinal and biliary  $\text{HCO}_3^-$  secretion is decreased to below 10% of the normal values [128]. Consequently, a low pH is observed in the intestinal lumen of the duodenum and even during postprandial time. Besides, basal and postprandial pH levels in the stomach are similar in CF patients and normal subjects [91,96]. In CFTR<sup>(-/-)</sup> mouse intestine,  $\text{HCO}_3^-$  secretion is impaired too [129,130]. The acidic upper small intestine in CF may contribute to fat malabsorption given: 1) the inactivation of trypsin, which induces an impairment of active enzyme molecules from their zymogen form (pancreatic lipase, PLA2); 2) the inactivation of pancreatic lipase [131]; 3) BA precipitation, decreasing the BA pool and diminishing its availability to form micelles; and 4) early protonation, which impairs the micellar dispersion of lipolytic products [132]. The ability of acid suppressant therapy (cimetidine, ranitidine or proton pump inhibitors) to improve fat absorption is controversial. Recently, a metanalysis of randomized trials involving agents that reduce gastric acidity has been carried out and it showed that treatment failed to improve nutritional status and had little impact on fat absorption [133]. Differences between studies could be due to the small number of subjects, differences in dietary intake and the degree of pancreatic insufficiency, the important physiologic range in



fat intestinal absorption and variability in intestinal drug absorption or inter individual variation in medication bioavailability, pH measurement and fat absorption evaluation.

### **III.2. Micellar Phase and Biliary Abnormalities**

BAs are amphipathic molecules synthesized by the liver. They enhance the solubility of lipolytic products in the aqueous intestinal phase [134,135]. In fact, micellar solubilization increases the aqueous concentration of MG and FA 100 to 1000 times. The importance of this phase is underscored by a 30% reduction in dietary lipid absorption in patients with biliary atresia [136]. Similarly, rats with biliary drainage displayed reduced linoleic acid absorption [137].

#### **III.2.1. BA Excretion**

Outside the critical micellar concentration range, the amount of lipid solubilized is significantly reduced. Consequently, steatorrhea appears [138] and FA absorption decreases [139]. This situation is found in CF patients where total bile salt secretion is impaired [140]. About 36% of CF children showed reduced BA secretion into the duodenum [141]. Despite this low BA secretion, impaired water secretion leads to high concentrations of bile salts in hepatobiliary secretions [142], which may contribute to the cholelithiasis reported in CF patients [94,143].

EFA regulate BA excretion: PUFAs are reported to induce the excretion of BA in rats [144] and humans [145], but this effect depends on the EFA family, since n-3 FA increases bile flow more than n-6 FA [146]. The EFAD effect on bile flow and BA secretion varies among animal species: decreasing in rats [147,148], having no effect in mice [114] and increasing in hamsters [114]. In humans, the impact of EFAD on BA secretion and composition remains unclear. However, prostaglandins, which are AA

metabolites, alter hepatic bile flow [149] indicating that disturbances of AA status may affect choleric response in CF patients.

### III.2.2. BA Composition

The nature of BAs influences their ability to solubilize lipids. Cholesterol absorption by enterocytes is greater with cholyl-aurine than with chenodeoxycholyl-aurine [150-152] and BAs with conjugated taurine are more effective than glycine-conjugated BAs at solubilizing lipids. The effect of EFA on BA composition variation and fat absorption remains enigmatic in humans, since there are no available data.

In CF, oral taurine load appears to be normal, but excessive fecal loss [153] increases the ratio of glycine/taurine-conjugated BA [94,140,141]. Oral taurine supplementation in CF children is effective in decreasing the glycine/taurine ratio in duodenal fluid [153], but its ability to improve fat malabsorption is controversial [154-157]. Apparently, taurine supplementation improves BA malabsorption, mainly in patients with a high degree of steatorrhea [158-160].

Studies on animals show that EFAD leads to impaired biliary excretion of taurocholate [161] and to reduced EFA content (linoleic and arachidonic acid) in biliary PC that is essential for micelle formation [162]. However, BA and bile lipid composition vary across species. In rats and hamsters with EFAD, bile composition is markedly impaired [147,161]. On the other hand, BA composition appears to be similar in EFA-deficient and EFA-sufficient mice [114].

The relationship between BA and EFA was investigated in CF-EFAD children and it showed that ursodeoxycholic acid supplementation improves the hepatic metabolism of EFA. After 1 year, ursodeoxycholic acid supplementation led to an improvement of EFA status (reduction of triene/tetraene FA ratio) [163].

### III.2.3. BA Malabsorption

BAs are recycled through the enterohepatic cycle with remarkable efficiency (95% reabsorbed) [164,165]. The enterohepatic cycle is often interrupted in CF because of excessive fecal losses of BA, [95,166-170], which diminish the BA pool [171,172]. Excessive BA losses may be attributed to: 1) BA irreversibly bound to unhydrolyzed TG and PL within the intestinal lumen [173] ; 2) BA precipitation due to acidic pH in the duodenum [174]; and 3) intestinal bacterial overgrowth, which is present in 40% of CF patients and results in BA deconjugation and dehydration [175]. BA loss may also result from a primary cell defect in the active absorption of BA in the ileum. *In vitro* studies using brush border membrane vesicles from CF patients have shown that total ileal BA uptake is diminished [176,177]. Surprisingly, a study of Ileal Biliary Acid Transporter (IBAT) in CFTR knock-out mice shows a BA uptake rate four-fold that of wild-type mice [178]. The increase in IBAT protein and BA uptake can be interpreted as an up-regulation in response to a low BA rate. This result should lead to a renewed interest in intraluminal events, especially for the implication of the thick mucus barrier in CF pathophysiology.

### III.3. Gastric and Intestinal Transit Time

Fat digestion begins in the stomach with the action of acid lipase. Following hydrolysis by gastric lipase, medium-chain FAs are partly absorbed by the stomach [179]. Thus, the stomach plays an essential role in fat digestion, especially in pancreatic insufficiency [147].

In CF patients with pancreatic insufficiency, altered motility with an increase in gastric emptying [180] and small bowel transit time has been described [181-184]. It has been reported that slow gastric emptying reduces the success of pancreatic enzyme replacement therapy in improving TG hydrolysis, which could explain in part the variation

in pancreatic enzyme replacement therapy efficiency [180,185]. However, other studies have shown that gastric emptying time is similar in both CF patients and healthy controls [90,182].

In EFAD rats, AA and linoleic acid are emptied from the stomach at similar rates and these rates do not differ from controls [186]. However, EFA-deficient mice show that the motility of epithelial cells is increased in the jejunum [187].

### **III.4. Intestinal Mucosa Trophicity**

#### **III.4.1. Quantitative and Qualitative Mucosal Abnormalities.**

In the majority of CF patients, histological brush border studies reveal normal morphology [188]. However, in some cases, abnormalities are reported, such as ileal hypertrophy [189] or partial villous atrophy in the small intestine [190,191]. This atrophic mucosa, which also occurs in knock-out mice [189], may result from acidic aggression by unbuffered stomach chyme, chronic inflammation or denutrition. Furthermore, a thick mucinous layer covering the brush border and large areas of the microvilli is revealed by electron microscopic examination of biopsies from CF patients [188], which may contribute to malabsorption in CF patients. The viscosity of the intact CF glycoprotein is almost two-fold that of normal glycoprotein [192]. Elevated viscosity may be caused by defective chloride transport, mucin hyperglycosylation or a high level of disulfide-linked peptides [193,194]. Obviously, the highly acidic properties of surface components related to oversulfatation could modify the micro acidic climate on the intestinal epithelium surface and influence interaction between micelles and enterocytes, impairing the protonation of FAs.

In EFAD, histological and biochemical alterations of the intestinal mucosa are described [195]. In rats and mice with EFAD, the height of villi is decreased leading to a

diminished absorption area. Cellular differentiation was also found to be impaired [196], highlighting the role of EFA in the formation of new tissues, such as the maintenance of tissue and cell structure [197]. Furthermore, the abnormal structure of mitochondria and microvilli is correlated to decreased fat absorption [196]. It seems difficult to reconcile jejunal hypertrophy in CF patients and microvilli in EFAD animals. However, EFAD seems to induce histological abnormalities in the CFTR function. In CFTR knock-out mice, jejunal hypertrophy is corrected with an oral administration of high doses of DHA [198], which are associated with an inhibitory proliferative cell effect [199]. Then, more than in typical EFAD, an abnormal EFA imbalance could lead to hypertrophic villosities in CF patients. Hypertrophy is only localized in the jejunal portion. Accordingly, the FA composition of jejunum mucosa, the main segment for optimal lipid absorption, is markedly different from ileal and colonic mucosa [195]. Furthermore, it is interesting to note that dietary influences are tissue specific, since serum or red blood cell membranes do not reflect local changes in any of the different intestinal segments [195]. At present, no studies have correlated intestinal morphology in CF patients with their EFAD status.

#### **III.4.2. Intestinal Permeability**

Recently, studies have suggested that pathological modifications in EFAD may be the consequence of cell adhesion disorders [200].

In CF patients, the dual sugar permeability test [201] demonstrates that the paracellular pathway is more permeable to large molecules, while the passive transcellular uptake of small molecules is normal [182]. Intestinal permeability in CF is related to patient genotype: patients homozygous or heterozygous for  $\Delta F508$  mutation exhibit significantly increased intestinal permeability compared with patients with unidentified

genotypes or controls [202]. Moreover, abnormalities in the tight junction, an essential structure for the control of intestinal permeability, have been reported in the intestinal epithelium of fetuses with CF [203].

EFAAs are able to modify cells ultrastructurally and to alter intestinal permeability. In the culture of enterocytes from EFA-deficient CF, the lateral surfaces between cells are fairly straight, a consequence of the absence of complex interdigitations that play an essential intercellular cohesive role [196]. Moreover, a reduction in the number of desmosomes has been reported in the intestinal tract of EFAD rats [59,204]. Studies in endothelial cells suggest a possible mechanism of EFA-modulating cell adhesion. However, this EFA function has to be demonstrated in intestinal cells. In endothelial cells, some PUFA such as  $\gamma$ -linolenic acid or EPA increase transepithelial electrical resistance and reduce paracellular permeability. Studies involving CF patients are definitely needed to assay intestinal cell adhesion molecules and their relation to FA status.

#### Enterocyte Phase Abnormalities

##### **IV.1. Enterocyte Lipid Uptake**

##### **IV.1.1. Physiology**

EFAAs may be absorbed by enterocytes, mostly in the form of EFA and MG. Until recently, it was assumed that these lipids diffused passively through the enterocyte brush border membrane [205]. Indeed, earlier studies reported that the uptake of FAs occurred at 0°C, implying that the process is strictly passive. In particular, the intestinal absorption mechanism of linoleate was noted to depend on its intraluminal concentration, showing a passive diffusion at high concentrations. However, a transporter was required at weaker concentrations [206]. Accordingly, the absorption of FFA was found to be a saturable phenomenon that can be inhibited through competition with long-chain PUFA [207]. These

observations suggest that FA uptake is a concentration-dependent dual transport mechanism involving both passive diffusion and a carrier-dependent process. Recently, several membrane transport systems have been identified and they seem to be involved in the enterocyte absorption of lipids: membrane FA binding protein (FABPm), capable of facilitating transmembrane passage mainly of FAs, but other lipids as well [208-210]; FA translocase/cluster determinant 36 (FAT/CD36) implicated in long-chain FA transport [211-213]; scavenger Receptor class B type I (SR-BI) that plays a role especially in cholesterol movement (absorption and/or efflux) at the enterocyte level [214]; ATP Binding Cassette transporter family that provides several cholesterol carriers: ABCG5 and ABCG8 cooperate to limit sterol intestinal absorption, rather facilitating cholesterol efflux toward the intestinal lumen and their mutations predispose to sitostolemia [215,216]; and ABCA1 expressed in the enterocyte, which could partially control cholesterol efflux toward the intestinal lumen [217], although its exact role in the brush border membrane remains controversial [218,219]. Recently, a new protein called Nieman Pick C1-Like1 was identified in the small intestine. It seems closely involved in intestinal cholesterol absorption, a pathway sensitive to sterol absorption inhibitors such as ezetimibe [220,221].

#### **IV.1.2. CFTR and Lipid Transporters**

No study to our knowledge has investigated the interaction that may exist between the CFTR and these lipid transporters. Yet, the CFTR is known to modulate the activity of other carriers as well as certain ionic channels, for instance [37,222]. The CFTR regulation of other intestinal ionic transporters is effectively diminished in CF patients [223]. Furthermore, a microarray study on pulmonary tissue from knock-out CFTR mice shows that membrane transporters specific for ligands as different as glutamate, hormones or neurotransmitters have their expression influenced by CFTR [224]. The completion of the

same type of study on intestinal tissue would likely offer interesting tracks to target lipid transport proteins capable of being influenced by the CFTR. The large diversity of transporters interacting with the CFTR could lead to impairment in enterocyte lipid uptake and trafficking in CF, which would represent another cause for nutrient malabsorption.

The existence of anomalies in the enterocyte uptake to EFA is controversial. In effect, EFA intestinal absorption in patients does not always appear to be impaired. Some studies report that the rate of linoleic acid absorption is normal when pancreatic enzyme supplementation is given at sufficient doses [225]. Apparently, even the presence of steatorrhea was not accompanied by diminished EFA absorption [186] and no correlation has been established between steatorrhea and EFAD in preadolescents with CF [226]. On the other hand, a recent study has shown that patients undergoing pancreatic enzyme treatment display a reduction in the intestinal uptake of long-chain FAs [9]. The differences between these studies may indicate either that the intestinal malabsorption does not in itself explain the EFA deficit or that the severity of CFTR mutation could influence the enterocyte absorption of lipids. Unfortunately, genotyping analysis has not been carried out in most of these investigations. Future developments will get to the bottom of these major unsolved questions by tracing the defects in enterocyte lipid uptake, the status of lipid transporters, the relationship with CFTR in CF patients and fat malabsorption.

#### **IV.1.3. EFAD and Lipid Transporters**

Early studies on EFAD did not notice an anomaly in the enterocyte transport of EFA [186,196,227]. However, these data have not been confirmed. The studies are somewhat outdated and the sensitivity of the techniques used may be called into question. Furthermore, several elements suggest that EFAD may be implicated, at least to some extent, in lipid intestinal malabsorption. Indeed, EFAD can affect the lipid composition of



the enterocyte membrane and modify its fluidity, which may directly disturb the functioning of the transporters that can be found there. Moreover, some transporters like the SR-BI or CD36 could act as transporters, not directly, but by creating a special micro-environment in the neighbouring membrane lipids. This local change favors the transfer of their ligands [228]. In this model, it appears very likely that a modification of the physiochemical properties of the membrane, as is the case in EFAD, may impact on the transporter lipid transfer abilities. EFAD could also influence these lipid transporters more directly. In effect, most of these transporters are regulated by long-chain FAs: the expression of the FABP and CD36 genes is increased by long-chain FAs [229]; the SR-BI protein is also regulated according to the type of long-chain FAs (unpublished personal data); and finally, the polyunsaturated FAs trigger a decrease in the ABCA1 protein, thereby reducing the basolateral efflux of cholesterol in human Caco-2 cells [230]. This regulation could be drilled through a reduction in ABCA1 expression [231] or an increase in the degradation of the protein [232].

FAs can also act directly on the level of expression of the CFTR protein. In this way, a short-chain FA, the butyrate, increases CFTR expression significantly in animal epithelium cell cultures [233]. It is interesting to note that this same FA modulates lipid synthesis, the biogenesis of apolipoproteins (apos) and the assembly of LP in the enterocyte [234]. To our knowledge, there are no similar studies with long-chain FAs or EFAs. The potential role for the CFTR in all the enterocyte lipid synthesis steps underlines the need for new investigations, which may lead to new therapeutic strategies.

## **IV.2. Enterocyte Lipid Trafficking**

### **IV.2.1. Physiology**

After crossing the brush border membrane, the lipids must be processed by cytosolic proteins for their intracellular trafficking toward various compartments, including the endoplasmic reticulum (ER), where their reesterification may take place. However, the precise mechanisms behind this transport remain unclear. Certain transport proteins have been identified, but their roles often remain hypothetical: the Sterol Carrier Protein (SCP-2) and two cytosolic FABP capable of linking FA in particular, but also PL. According to our unpublished and preliminary data, intestinal-FABP (I-FABP), which is restricted to the intestine, could direct the FAs to membranes for lipid cycling or to a degradation pathway (peroxisome or mitochondria), whereas the liver-FABP (L-FABP), also found in the liver, could guide them to the ER to be assembled into LP. I-FABP and L-FABP bind differently according to lipid class, but both with a greater affinity for unsaturated FAs than saturated FAs.

### **IV.2.2. CFTR and Enterocyte Lipid Trafficking**

No study has examined the interactions that can exist between the various proteins of the cytoplasmic transport of lipids and the CFTR. However, it has been clearly demonstrated that anomalies in CF exist in the intracellular movement of the CFTR itself. Various physiochemical conditions, such as low temperatures [233] or chemical agents [235], are able to increase the stability of the mutated CFTR protein and avoid its abnormal retention in the ER [236,237]. The latter would, in part, be attributable to a defective interaction between the CFTR and certain PLs that play the role of lipid chaperones. Obviously, the mutation of  $\Delta F508$  causes the CFTR protein to lose its ability to bind preferentially with phosphatidylserine rather than with PC. The replacement of PC with

non charged analogues in mutated cell cultures increases CFTR expression and the quantity of its mature form. Therefore, certain PLs through their lipid chaperone function seem important for the intracellular trafficking of the CFTR [238]. Moreover, the invalidation of the CFTR initiates changes in gene expression as well as protein degradation via ubiquitin-dependent proteasome, which may modify several transport proteins [224]. Overall, these studies support the concept that CFTR is modulated by PLs and indicate potential relationships between CFTR and other local transporters. Unfortunately, it remains unknown how EFAs contained in PLs directly alter the activity of CFTR and whether a “partnership” exists between CFTR and intracellular lipid transporters in the enterocyte. Forthcoming investigations will highlight new links between the CFTR, EFAs and cellular processes, which may identify important factors that play a role in networks of lipid signalling and transport.

#### **IV.2.3. EFA and Enterocyte Lipid Trafficking**

The assembly of microtubules is critical for intracellular trafficking and chylomicron transport [239,240]. Early reports had indicated that the administration of microtubule inhibitors led to a decrease in the conveyance of radioactive lipids in rat enterocytes [241]. Certain EFAs, such as  $\gamma$ -linoleic acid or AA, regulate the microtubule polymerization [242,243]. Thus, EFAD could hinder intraenterocyte trafficking through an alteration of microtubule polymerization, synthesis or function.

### **IV.3. Lipid Esterification and Lipoprotein Synthesis**

#### **IV.3.1. Physiology**

The products of lipolysis once absorbed and transported to the ER are reesterified to form TG, PL and CE through specific enzymatic pathways. This reesterification involves several enzymes monoacylglycerol acyltransferase (MGAT), diacylglycerol acyltransferase

(DGAT), glycerophosphate acyltransferase, phosphatidate phosphodiesterase, lyso-PC acyltransferase, CE and acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT). After their synthesis, hydrophobic lipids must be associated with proteins or apolipoproteins, in order to allow their solubilization in the blood circulation, thereby forming complexes known as LP. The intestine is capable of secreting most lipoprotein classes (chylomicrons, VLDL, HDL), but chylomicrons represent the specific and most abundant class in the enterocyte.

Note that apo B is a component that is essential for LP assembly and secretion by the intestine. It exists in two forms: apo B-100, present particularly in the liver, but to a limited extent in the intestine, and apo B-48, which is specific to the enterocyte that results from the posttranscriptional modification of the apo B-100 mRNA, or editing, involving an enzymatic complex called APOBEC-I (apo B mRNA-editing catalytic subunit-1) [244]. Other apos are produced in the enterocyte, mainly apo A-I and apo A-IV that is exclusively of intestinal origin in humans [245]. During its synthesis in the ER, apo B must undergo lipidation that protects it from degradation by the proteasome [246]. Lipid transfer from the endoplasmic reticulum to apo B requires microsomal triglyceride transfer protein (MTP) intervention. This step is crucial for chylomicron assembly as noted in abetalipoproteinemia, an illness brought on by the mutation of the MTP gene, where there is defective lipoprotein secretion [247].

Pre-chylomicrons are exported to the Golgi apparatus where they undergo their final maturation (glycosylation of the apos, modification of certain PLs, etc.) before being secreted through the basolateral membrane into the lymphatic milieu. It is important to note the role of cargo proteins in the secretion step, which has been highlighted in chylomicron retention disease: the mutation of the Sar-1 GTPase protein prevents the secretion of chylomicrons through the dependent COPII vesicles [248]. TG transfer from the ER to the

Golgi apparatus seems to be a limiting step in fat absorption [249]. After being secreted into the lymphatic capillaries, intestinal LPs are discharged into the systemic blood circulation through the thoracic canal.

#### **IV.3.2. Role of the CFTR in the Intracellular Phase**

In CF patients, lipid composition, concentration and size are irregular [250]. At present, the role played by CFTR anomalies is unknown. To our knowledge, no study has focused on the possible interactions of the CFTR with the implicated enzymes in lipid reesterification, apo B biosynthesis, MTP activity or the relationship with Sar-1 GTPase protein expression.

It is during this LP secretion step that interactions with the CFTR may be the most likely. In fact, CFTR mutations alter the secretion not only of electrolytes, but also of substances as different as BAs by the hepatocyte [172],  $\gamma$ -light chain antibodies by lymphocytes [251], INF $\gamma$  by monocytes [252] or neurotransmitters by pulmonary neuroendocrine cells [253]. Since the enterocyte represents a key cell in the pathophysiology of CF and given the numerous lipid aberrations observed in this disease, it appears essential to study the secretion abilities of lipids by epithelial cells instead of focusing only on the digestive mechanism in CF as is presently the case. For example, the recent analysis of RNA, influenced by CFTR knock-out, identified a number of proteins involved in LP metabolism, including proteasome 26S [224]. The latter subunit is the major proteolytic component of the ubiquitin-dependent proteasome. As mentioned before, the ER-localized ubiquitin-proteasome pathway is primarily involved in the intracellular degradation of apo B. Its alteration in the absence of CFTR [224] indicates potential relationships between CFTR and the apo B recovery/degradation pathway, thereby

determining LP assembly and secretion. Furthermore, there is increasing evidence that CFTR regulates endosomal fusion and vesicular trafficking [254], indicating potential relationships between the CFTR and ADP-ribosylation factor [254], which has a central role in VLDL assembly [255]. Finally, the Sar-1/COPII complex is necessary when apo B-100 exits the hepatic ER [256] and apo B-48 containing chylomicrons are exported from the enterocyte [248]. However, the Sar-1/COPII complex is also implicated in the exiting of CFTR from the ER [257] for its entry into the proteasome degradation pathway [258]. Overall, these observations demonstrate the existence of possible interactions among apo B elaboration, chylomicron packaging and CFTR function. Hence, CFTR mutations may significantly affect lipid transport and obviously studies are needed to clarify this relationship.

#### **IV.3.3. Possible Implications of EFAs in Intracellular Lipid Transport**

It is important to underline that the anomalies in the reported LP during CF are most marked in patients with EFAD [250]. These defects may either be the direct consequence of EFAD on LP synthesis or may only reflect an association between the type of CFTR mutation and lipid metabolism. A phenotypic classification of LP profiles according to genotype would allow us to elucidate this question. In fact, EFAD could cause interference at several levels within the process of LP synthesis and secretion.

TG reesterification rates are diminished in rats during EFAD [259,260]. Lipid membrane modifications, notably long-chain FAs, are known to change the functioning of reesterification key enzymes such as MGAT [261]. Similarly, intake rich in (n-3) FA lowers the ratio (n-6)/(n-3) and leads to an activation of DGAT and ACAT [262]. Therefore, an unbalancing of the EFA status could affect the lipid reesterification step.

Biosynthesis through the enterocytes of several apoproteins, such as apo B or apo A-IV, is regulated in a specific way by certain EFAs [263-265]. Experimental studies confirm investigations carried out on humans [266]. Thus, EFAD is possibly deleterious for the synthesis of the main intestinal LP. Accordingly, enterocyte secretion of synthesized lipids is impaired during EFAD in mice and rats, which translates into an accumulation of large lipid droplets in the intercellular space [196]. Notably, in EFAD, the balance between the various EFAs rather than directly the absence of EFAs could impair the exocytosis mechanism. In effect, in enterocyte cultures, certain EFAs, such as EPA, decrease TG esterification and PL transfer from the ER to the Golgi and the mechanisms responsible for these processes have not yet been specified [267]. Similarly, EFAD may affect microtubules [242,268], as we previously mentioned, which could impact on the assembly and secretion of chylomicrons [239,240,242,268].

### Conclusions

It is well established that defective digestive processes in CF patients are secondary to pancreatic insufficiency. However, it is difficult to reconcile the failure of appropriate pancreatic enzyme replacement therapy with the persistent fat malabsorption. Since mutations in CFTR result in impaired intracellular pH organelle, glycosylation and sialylation in mammalian cells, it is possible that disturbances in intestinal CF lipid transport may also be associated with cause-related changes in the second step of fat absorption, i.e. the intracellular phase leading to lipolytic product uptake and esterification, apolipoprotein synthesis and processing, and nascent lipoprotein assembly and secretion following the fusion of Golgi vesicles with the basolateral plasma membrane. This hypothesis is reinforced by the findings that CFTR dysfunction alters further intracellular pathways, crucial for lipoprotein packaging and delivery, such as ubiquitin-proteasome

complexes, endosomal fusion and vesicular trafficking, as well as Sar1/COP II and ADP-ribosylation factor 1/COP I systems. Additionally, in keeping with substantial growing evidence from the available literature, it is reasonable to put forward that EFAD contributes to CF malabsorption by interfering with intra-enterocyte lipid transport. If previous studies had entirely attributed EFAD to diminished EFA intake and malabsorption, it is likely today that a mutated CFTR may also decrease the incorporation of EFAs in PL [42], increases the release of AA [49], lowers the concentrations of linoleic acid and DHA, and disrupts EFA metabolism [42,50]. An interrelation between CFTR and EFAs is demonstrated when the chloride channels are blocked chemically [41]. Nevertheless, the exact relationship between CFTR and EFAs remains unclear and studies in this fundamental direction would shed considerable light on our understanding of the mechanisms responsible for EFAD in CF. This aspect is particularly important given the suggestions that EFAD is related to a basic defect in FA metabolism. It seems imperative that rigorous and long-term studies be conducted on EFA supplementation to normalize EFA status in CF patients, otherwise EFAD would continue to affect intestinal lipid transport and to simultaneously exacerbate the poor clinical course of the CF patients.



**Abbreviations**

AA (20:4n-6):	Arachidonic Acid
ABCA1:	ATP Binding Cassette transporter A1
ACAT:	Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase
Apo:	Apolipoprotein
BA:	Biliary Acid
CD36:	Cluster Determinant 36
CE:	Cholesterol-Ester
CET:	Cholesterol esterase
CF:	Cystic Fibrosis
CFTR:	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
DGAT:	Diacylglycerol acyltransferase
DHA (22:6n-3):	Docosahexaenoic Acid
EFA:	Essential Fatty Acid
EFAD:	Essential Fatty Acid Deficiency
EPA (20:5n-3):	Eicosapentaenoic acid
ER:	Endoplasmic Reticulum
FA:	Fatty Acid
FABP:	Fatty Acid Binding Protein
FFA:	Free Fatty Acids
IBAT:	Ileal Biliary Acid Transporter
LP:	Lipoprotein
Lyso-PC:	Lyso-Phosphatidylcholine
MG:	Monoacylglycerol

MGAT:	Monoacylglycerol Acyltransferase
MTP:	Microsomal Triglyceride Transfer Protein
PC:	Phosphatidylcholine (lecithin)
PL:	Phospholipid
PLA <sub>2</sub> :	Phospholipase A <sub>2</sub>
PUFA:	Polyunsaturated Fatty Acid
SR-BI:	Scavenger Receptor class B type I
TG:	Triacylglycerol

### **Competing Interests**

The authors declare that there are non-financial competing interests regarding this manuscript.

### **Acknowledgements**

All the authors have contributed to the preparation of this review. The authors thank Schohraya Spahis for her expert technical assistance. This paper was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MT 10584 and MOP 49433)

## REFERENCES

1. Smith AE: **Treatment of cystic fibrosis based on understanding CFTR.** *J Inherit Metab Dis* 1995, **18**: 508-516.
2. Anderson MP, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ: **Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR.** *Science* 1991, **251**: 679-682.
3. Bear CE, Li CH, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M *et al.*: **Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR).** *Cell* 1992, **68**: 809-818.
4. Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui LC *et al.*: **Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer.** *Cell* 1990, **62**: 1227-1233.
5. Roy CC, Weber AM, Lepage G, Smith L, Levy E: **Digestive and absorptive phase anomalies associated with the exocrine pancreatic insufficiency of cystic fibrosis.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988, **7 Suppl 1**: S1-S7.
6. Welsh MJ, Fick RB: **Cystic fibrosis.** *J Clin Invest* 1987, **80**: 1523-1526.
7. Carroccio A, Pardo F, Montalto G, Iapichino L, Soresi M, Averna MR *et al.*: **Use of famotidine in severe exocrine pancreatic insufficiency with persistent maldigestion on enzymatic replacement therapy. A long-term study in cystic fibrosis.** *Dig Dis Sci* 1992, **37**: 1441-1446.
8. Couper RT, Corey M, Durie PR, Forstner GG, Moore DJ: **Longitudinal evaluation of serum trypsinogen measurement in pancreatic- insufficient and pancreatic-sufficient patients with cystic fibrosis.** *J Pediatr* 1995, **127**: 408-413.
9. Kalivianakis M, Minich DM, Bijleveld CM, van Aalderen WM, Stellaard F, Laseur M *et al.*: **Fat malabsorption in cystic fibrosis patients receiving enzyme replacement therapy is due to impaired intestinal uptake of long-chain fatty acids.** *Am J Clin Nutr* 1999, **69**: 127-134.
10. Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, Tsui LC *et al.*: **Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis.** *Am J Hum Genet* 1992, **50**: 1178-1184.
11. Zentler-Munro PL, Fine DR, Batten JC, Northfield TC: **Effect of cimetidine on enzyme inactivation, bile acid precipitation, and lipid solubilisation in pancreatic steatorrhoea due to cystic fibrosis.** *Gut* 1985, **26**: 892-901.
12. Posner BM, Cupples LA, Franz MM, Gagnon DR: **Diet and heart disease risk factors in adult American men and women: the Framingham Offspring-Spouse nutrition studies.** *Int J Epidemiol* 1993, **22**: 1014-1025.
13. Carey MC, Hernell O. **Digestion and absorption of fat.** *Semin Gastrointest Dis* 3, 189-208. 1992.
14. Farrell PM, Mischler EH, Engle MJ, Brown DJ, Lau SM: **Fatty acid abnormalities in cystic fibrosis.** *Pediatr Res* 1985, **19**: 104-109.
15. Hubbard VS, Dunn GD, di Sant'Agnese PA: **Abnormal fatty-acid composition of plasma-lipids in cystic fibrosis. A primary or a secondary defect?** *Lancet* 1977, **2**: 1302-1304.
16. Lepage G, Levy E, Ronco N, Smith L, Galeano N, Roy CC: **Direct transesterification of plasma fatty acids for the diagnosis of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis.** *J Lipid Res* 1989, **30**: 1483-1490.

17. Parsons HG, O'Loughlin EV, Forbes D, Cooper D, Gall DG: **Supplemental calories improve essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patients.** *Pediatr Res* 1988, **24**: 353-356.
18. Rosenlund ML, Kim HK, Kritchevsky D: **Essential fatty acids in cystic fibrosis.** *Nature* 1974, **251**: 719.
19. van Egmond AW, Kosorok MR, Kosciak R, Laxova A, Farrell PM: **Effect of linoleic acid intake on growth of infants with cystic fibrosis.** *Am J Clin Nutr* 1996, **63**: 746-752.
20. Lloyd-Still JD, Bibus DM, Powers CA, Johnson SB, Holman RT: **Essential fatty acid deficiency and predisposition to lung disease in cystic fibrosis.** *Acta Paediatr* 1996, **85**: 1426-1432.
21. Benabdeslam H, Garcia I, Bellon G, Gilly R, Revol A: **Biochemical assessment of the nutritional status of cystic fibrosis patients treated with pancreatic enzyme extracts.** *Am J Clin Nutr* 1998, **67**: 912-918.
22. Steinkamp G, Demmelmair H, Ruhl-Bagheri I, von der HH, Koletzko B: **Energy supplements rich in linoleic acid improve body weight and essential fatty acid status of cystic fibrosis patients.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000, **31**: 418-423.
23. Chase HP, Dupont J: **Abnormal levels of prostaglandins and fatty acids in blood of children with cystic fibrosis.** *Lancet* 1978, **2**: 236-238.
24. Roulet M, Frascarolo P, Rappaz I, Pilet M: **Essential fatty acid deficiency in well nourished young cystic fibrosis patients.** *Eur J Pediatr* 1997, **156**: 952-956.
25. Holman RT: **The ratio of trienoic: tetraenoic acids in tissue lipids as a measure of essential fatty acid requirement.** *J Nutr* 1960, **70**: 405-410.
26. Chan GM: **Performance of dual-energy x-ray absorptiometry in evaluating bone, lean body mass, and fat in pediatric subjects.** *J Bone Miner Res* 1992, **7**: 369-374.
27. Clandinin MT, Zuberbuhler P, Brown NE, Kielo ES, Goh YK: **Fatty acid pool size in plasma lipoprotein fractions of cystic fibrosis patients.** *Am J Clin Nutr* 1995, **62**: 1268-1275.
28. Lloyd-Still JD, Johnson SB, Holman RT: **Essential fatty acid status in cystic fibrosis and the effects of safflower oil supplementation.** *Am J Clin Nutr* 1981, **34**: 1-7.
29. Landon C, Kerner JA, Castillo R, Adams L, Whalen R, Lewiston NJ: **Oral correction of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis.** *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1981, **5**: 501-504.
30. Strandvik B, Bronnegard M, Gilljam H, Carlstedt-Duke J: **Relation between defective regulation of arachidonic acid release and symptoms in cystic fibrosis.** *Scand J Gastroenterol Suppl* 1988, **143**: 1-4.
31. Strandvik B, Svensson E, Seyberth HW: **Prostanoid biosynthesis in patients with cystic fibrosis.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996, **55**: 419-425.
32. Rogiers V, Dab I, Michotte Y, Vercruyse A, Crockaert R, Vis HL: **Abnormal fatty acid turnover in the phospholipids of the red blood cell membranes of cystic fibrosis patients (in vitro study).** *Pediatr Res* 1984, **18**: 704-709.
33. Levy E, Roy C, Lacaille F, Lambert M, Messier M, Gavino V *et al.*: **Lipoprotein abnormalities associated with cholesteryl ester transfer activity in cystic fibrosis patients: the role of essential fatty acid deficiency.** *Am J Clin Nutr* 1993, **57**: 573-579.

34. Lepage G, Kneepkens CM, Roy C. **Dysfonction peroxysomiale associée à la déficience en acides gras essentiels.** *Médecine/Sciences* 9, 571-576. 1993.
35. Egan M, Flotte T, Afione S, Solow R, Zeitlin PL, Carter BJ *et al.*: **Defective regulation of outwardly rectifying Cl<sup>-</sup> channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR.** *Nature* 1992, **358**: 581-584.
36. Guggino WB: **Outwardly rectifying chloride channels and CF: a divorce and remarriage.** *J Bioenerg Biomembr* 1993, **25**: 27-35.
37. Gabriel SE, Clarke LL, Boucher RC, Stutts MJ: **CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship.** *Nature* 1993, **363**: 263-268.
38. Barasch J, Kiss B, Prince A, Saiman L, Gruenert D, al Awqati Q: **Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis.** *Nature* 1991, **352**: 70-73.
39. Bradbury NA, Jilling T, Berta G, Sorscher EJ, Bridges RJ, Kirk KL: **Regulation of plasma membrane recycling by CFTR.** *Science* 1992, **256**: 530-532.
40. Jilling T, Cunningham S, Barker PE, Green MW, Frizzell RA, Kirk KL: **Genetic complementation in cystic fibrosis pancreatic cells by somatic cell fusion.** *Am J Physiol* 1990, **259**: C1010-C1015.
41. Kang JX, Man SF, Brown NE, Labrecque PA, Clandinin MT: **The chloride channel blocker anthracene 9-carboxylate inhibits fatty acid incorporation into phospholipid in cultured human airway epithelial cells.** *Biochem J* 1992, **285** ( Pt 3): 725-729.
42. Bhura-Bandali FN, Suh M, Man SF, Clandinin MT: **The deltaF508 mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator alters control of essential fatty acid utilization in epithelial cells.** *J Nutr* 2000, **130**: 2870-2875.
43. Freedman SD, Katz MH, Parker EM, Laposata M, Urman MY, Alvarez JG: **A membrane lipid imbalance plays a role in the phenotypic expression of cystic fibrosis in cftr(-/-) mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**: 13995-14000.
44. Dombrowsky H, Clark GT, Rau GA, Bernhard W, Postle AD: **Molecular species compositions of lung and pancreas phospholipids in the cftr(tm1HGU/tm1HGU) cystic fibrosis mouse.** *Pediatr Res* 2003, **53**: 447-454.
45. Carlstedt-Duke J, Bronnegard M, Strandvik B: **Pathological regulation of arachidonic acid release in cystic fibrosis: the putative basic defect.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**: 9202-9206.
46. Freedman SD, Blanco PG, Zaman MM, Shea JC, Ollero M, Hopper IK *et al.*: **Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism.** *N Engl J Med* 2004, **350**: 560-569.
47. Gilljam H, Strandvik B, Ellin A, Wiman LG: **Increased mole fraction of arachidonic acid in bronchial phospholipids in patients with cystic fibrosis.** *Scand J Clin Lab Invest* 1986, **46**: 511-518.
48. Stead RJ, Muller DP, Matthews S, Hodson ME, Batten JC: **Effect of abnormal liver function on vitamin E status and supplementation in adults with cystic fibrosis.** *Gut* 1986, **27**: 714-718.
49. Miele L, Cordella-Miele E, Xing M, Frizzell R, Mukherjee AB: **Cystic fibrosis gene mutation (deltaF508) is associated with an intrinsic abnormality in Ca<sup>2+</sup>-induced arachidonic acid release by epithelial cells.** *DNA Cell Biol* 1997, **16**: 749-759.

50. Keicher U, Koletzko B, Reinhardt D: **Omega-3 fatty acids suppress the enhanced production of 5-lipoxygenase products from polymorph neutrophil granulocytes in cystic fibrosis.** *Eur J Clin Invest* 1995, **25**: 915-919.
51. Anderson MP, Welsh MJ: **Fatty acids inhibit apical membrane chloride channels in airway epithelia.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**: 7334-7338.
52. Linsdell P: **Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel currents by arachidonic acid.** *Can J Physiol Pharmacol* 2000, **78**: 490-499.
53. Barrett KE, Bigby TD: **Involvement of arachidonic acid in the chloride secretory response of intestinal epithelial cells.** *Am J Physiol* 1993, **264**: C446-C452.
54. Shiota M, Kurano Y, Mochizuki Y, Kimura K, Ohta M, Sugano T: **Effects of nerve stimulation and zymosan on glycogenolysis in perfused livers from cold-exposed rats.** *Am J Physiol* 1992, **263**: G353-G359.
55. Strandvik B, Gronowitz E, Enlund F, Martinsson T, Wahlstrom J: **Essential fatty acid deficiency in relation to genotype in patients with cystic fibrosis.** *J Pediatr* 2001, **139**: 650-655.
56. Henderson WR, Jr., Astley SJ, McCready MM, Kushmerick P, Casey S, Becker JW *et al.*: **Oral absorption of omega-3 fatty acids in patients with cystic fibrosis who have pancreatic insufficiency and in healthy control subjects.** *J Pediatr* 1994, **124**: 400-408.
57. Katz DP, Manner T, Furst P, Askanazi J: **The use of an intravenous fish oil emulsion enriched with omega-3 fatty acids in patients with cystic fibrosis.** *Nutrition* 1996, **12**: 334-339.
58. Kurlandsky LE, Bennink MR, Webb PM, Ulrich PJ, Baer LJ: **The absorption and effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids on serum leukotriene B4 in patients with cystic fibrosis.** *Pediatr Pulmonol* 1994, **18**: 211-217.
59. Eynard AR, Cejas V, Silva R, Quiroga P, Munoz S: **Histopathology of essential fatty acid-deficient mice.** *Nutrition* 1992, **8**: 37-40.
60. Harper TB, Chase HP, Henson J, Henson PM: **Essential fatty acid deficiency in the rabbit as a model of nutritional impairment in cystic fibrosis. In vitro and in vivo effects on lung defense mechanisms.** *Am Rev Respir Dis* 1982, **126**: 540-547.
61. Galabert C, Filliat M, Chazallete JP: **Fatty-acid composition of serum-lecithins in cystic-fibrosis patients without steatorrhea.** *Lancet* 1978, **2**: 903.
62. Akpan JO, Hurley MC, Lands WE: **Insulin and glucagon secretion in essential fatty acid deficient rats.** *Acta Diabetol Lat* 1981, **18**: 147-156.
63. Freedman SD, Katz MH, Parker EM, Laposata M, Urman MY, Alvarez JG: **A membrane lipid imbalance plays a role in the phenotypic expression of cystic fibrosis in *cftr(-/-)* mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**: 13995-14000.
64. Daveloose D, Linard A, Arfi T, Viret J, Christon R: **Simultaneous changes in lipid composition, fluidity and enzyme activity in piglet intestinal brush border membrane as affected by dietary polyunsaturated fatty acid deficiency.** *Biochim Biophys Acta* 1993, **1166**: 229-237.
65. Gaggiotti G, Taus M, Spazzafumo L, Tesei M, La Rocca R, Mazzanti L: **Modifications of functional and physico-chemical properties of rat ileal plasma membranes.** *Biochem Mol Biol Int* 1995, **35**: 851-854.

66. Kaur M, Kaur J, Ojha S, Mahmood A: **Dietary fat effects on brush border membrane composition and enzyme activities in rat intestine.** *Ann Nutr Metab* 1996, **40**: 269-276.
67. Lucero HA, Robbins PW: **Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity.** *Arch Biochem Biophys* 2004, **426**: 208-224.
68. Kowalski MP, Pier GB: **Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for Pseudomonas aeruginosa-induced cellular activation.** *J Immunol* 2004, **172**: 418-425.
69. Ramsey BW, Farrell PM, Pencharz P: **Nutritional assessment and management in cystic fibrosis: a consensus report. The Consensus Committee.** *Am J Clin Nutr* 1992, **55**: 108-116.
70. Kraemer R, Rudeberg A, Hadorn B, Rossi E: **Relative underweight in cystic fibrosis and its prognostic value.** *Acta Paediatr Scand* 1978, **67**: 33-37.
71. Sproul A, Huang N: **Growth Patterns In Children With Cystic Fibrosis.** *J Pediatr* 1964, **65**: 664-676.
72. Gaskin K, Gurwitz D, Durie P, Corey M, Levison H, Forstner G: **Improved respiratory prognosis in patients with cystic fibrosis with normal fat absorption.** *J Pediatr* 1982, **100**: 857-862.
73. Corey M, McLaughlin FJ, Williams M, Levison H: **A comparison of survival, growth, and pulmonary function in patients with cystic fibrosis in Boston and Toronto.** *J Clin Epidemiol* 1988, **41**: 583-591.
74. Dodge JA, Custance JM, Goodchild MC, Laing SC, Vaughan M: **Paradoxical effects of essential fatty acid supplementation on lipid profiles and sweat electrolytes in cystic fibrosis.** *Br J Nutr* 1990, **63**: 259-271.
75. Hubbard VS, McKenna MC: **Absorption of safflower oil and structured lipid preparations in patients with cystic fibrosis.** *Lipids* 1987, **22**: 424-428.
76. Christophe A, Robberecht E, Franckx H, De Baets F, van de PM: **Effect of administration of gamma-linolenic acid on the fatty acid composition of serum phospholipids and cholesteryl esters in patients with cystic fibrosis.** *Ann Nutr Metab* 1994, **38**: 40-47.
77. Hamosh M, Scanlon JW, Ganot D, Likel M, Scanlon KB, Hamosh P: **Fat digestion in the newborn. Characterization of lipase in gastric aspirates of premature and term infants.** *J Clin Invest* 1981, **67**: 838-846.
78. Roberts IM, Montgomery RK, Carey MC: **Rat lingual lipase: partial purification, hydrolytic properties, and comparison with pancreatic lipase.** *Am J Physiol* 1984, **247**: G385-G393.
79. Ville E, Carriere F, Renou C, Laugier R: **Physiological study of pH stability and sensitivity to pepsin of human gastric lipase.** *Digestion* 2002, **65**: 73-81.
80. Cohen M, Morgan RG, Hofmann AF: **Lipolytic activity of human gastric and duodenal juice against medium and long chain triglycerides.** *Gastroenterology* 1971, **60**: 1-15.
81. Liao TH, Hamosh P, Hamosh M: **Fat digestion by lingual lipase: mechanism of lipolysis in the stomach and upper small intestine.** *Pediatr Res* 1984, **18**: 402-409.



82. Carriere F, Barrowman JA, Verger R, Laugier R: **Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans.** *Gastroenterology* 1993, **105**: 876-888.
83. Armand M, Pasquier B, Andre M, Borel P, Senft M, Peyrot J *et al.*: **Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract.** *Am J Clin Nutr* 1999, **70**: 1096-1106.
84. Armand M, Borel P, Dubois C, Senft M, Peyrot J, Salducci J *et al.*: **Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach.** *Am J Physiol* 1994, **266**: G372-G381.
85. Carey MC, Small DM, Bliss CM: **Lipid digestion and absorption.** *Annu Rev Physiol* 1983, **45**: 651-677.
86. Patton JS: **Gastrointestinal lipid digestion.** In *Physiology of the gastrointestinal tract*. Edited by Johnson LR. New York: Raven Press; 1981:1123.
87. Fredrikzon B, Blackberg L: **Lingual lipase: an important lipase in the digestion of dietary lipids in cystic fibrosis?** *Pediatr Res* 1980, **14**: 1387-1390.
88. Moreau H, Saunier JF, Gargouri Y, Pieroni G, Verger R, Sarles H: **Human gastric lipase: variations induced by gastrointestinal hormones and by pathology.** *Scand J Gastroenterol* 1988, **23**: 1044-1048.
89. Hamosh M: **A review. Fat digestion in the newborn: role of lingual lipase and preduodenal digestion.** *Pediatr Res* 1979, **13**: 615-622.
90. Roulet M, Weber AM, Paradis Y, Roy CC, Chartrand L, Lasalle R *et al.*: **Gastric emptying and lingual lipase activity in cystic fibrosis.** *Pediatr Res* 1980, **14**: 1360-1362.
91. Abrams CK, Hamosh M, Hubbard VS, Dutta SK, Hamosh P: **Lingual lipase in cystic fibrosis. Quantitation of enzyme activity in the upper small intestine of patients with exocrine pancreatic insufficiency.** *J Clin Invest* 1984, **73**: 374-382.
92. DiMagno EP, Malagelada JR, Go VL, Moertel CG: **Fate of orally ingested enzymes in pancreatic insufficiency. Comparison of two dosage schedules.** *N Engl J Med* 1977, **296**: 1318-1322.
93. Meyer JH: **The ins and outs of oral pancreatic enzymes.** *N Engl J Med* 1977, **296**: 1347-1348.
94. Roy CC, Weber AM, Morin CL, Combes JC, Nussle D, Megevand A *et al.*: **Abnormal biliary lipid composition in cystic fibrosis. Effect of pancreatic enzymes.** *N Engl J Med* 1977, **297**: 1301-1305.
95. Weber AM, Roy CC, Morin CL, Lasalle R: **Malabsorption of bile acids in children with cystic fibrosis.** *N Engl J Med* 1973, **289**: 1001-1005.
96. Hamosh M: **Lingual and gastric lipases.** *Nutrition* 1990, **6**: 421-428.
97. Zentler-Munro PL, Assoufi BA, Balasubramanian K, Cornell S, Benoliel D, Northfield TC *et al.*: **Therapeutic potential and clinical efficacy of acid-resistant fungal lipase in the treatment of pancreatic steatorrhoea due to cystic fibrosis.** *Pancreas* 1992, **7**: 311-319.
98. DiMagno EP, Go VL, Summerskill WH: **Relations between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency.** *N Engl J Med* 1973, **288**: 813-815.
99. Waters DL, Dorney SF, Gaskin KJ, Gruca MA, O'Halloran M, Wilcken B: **Pancreatic function in infants identified as having cystic fibrosis in a neonatal screening program.** *N Engl J Med* 1990, **322**: 303-308.

100. Durie PR: **The pathophysiology of the pancreatic defect in cystic fibrosis.** *Acta Paediatr Scand Suppl* 1989, **363**: 41-44.
101. Cohen JC, Morrow SL, Cork RJ, Delcarpio JB, Larson JE: **Molecular pathophysiology of cystic fibrosis based on the rescued knockout mouse model.** *Mol Genet Metab* 1998, **64**: 108-118.
102. Larson JE, Delcarpio JB, Farberman MM, Morrow SL, Cohen JC: **CFTR modulates lung secretory cell proliferation and differentiation.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, **279**: L333-L341.
103. Hyde K, Reid CJ, Tebbutt SJ, Weide L, Hollingsworth MA, Harris A: **The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator as a marker of human pancreatic duct development.** *Gastroenterology* 1997, **113**: 914-919.
104. Gaskin KJ, Durie PR, Lee L, Hill R, Forstner GG: **Colipase and lipase secretion in childhood-onset pancreatic insufficiency. Delineation of patients with steatorrhea secondary to relative colipase deficiency.** *Gastroenterology* 1984, **86**: 1-7.
105. Blackberg L, Hernell O, Bengtsson G, Olivecrona T: **Colipase enhances hydrolysis of dietary triglycerides in the absence of bile salts.** *J Clin Invest* 1979, **64**: 1303-1308.
106. Borgstrom B: **On the interactions between pancreatic lipase and colipase and the substrate, and the importance of bile salts.** *J Lipid Res* 1975, **16**: 411-417.
107. Levy E, Goldstein R, Freier S, Shafrir E: **Characterization of gastric lipolytic activity.** *Biochim Biophys Acta* 1981, **664**: 316-326.
108. Spalinger JH, Seidman EG, Lepage G, Menard D, Gavino V, Levy E: **Uptake and metabolism of structured triglyceride by Caco-2 cells: reversal of essential fatty acid deficiency.** *Am J Physiol* 1998, **275**: G652-G659.
109. Ikeda I, Tomari Y, Sugano M, Watanabe S, Nagata J: **Lymphatic absorption of structured glycerolipids containing medium-chain fatty acids and linoleic acid, and their effect on cholesterol absorption in rats.** *Lipids* 1991, **26**: 369-373.
110. Brink EJ, Haddeman E, de Fouw NJ, Weststrate JA: **Positional distribution of stearic acid and oleic acid in a triacylglycerol and dietary calcium concentration determines the apparent absorption of these fatty acids in rats.** *J Nutr* 1995, **125**: 2379-2387.
111. Christensen MS, Mullertz A, Hoy CE: **Absorption of triglycerides with defined or random structure by rats with biliary and pancreatic diversion.** *Lipids* 1995, **30**: 521-526.
112. Lepage G, Yesair DW, Ronco N, Champagne J, Bureau N, Chemtob S *et al.*: **Effect of an organized lipid matrix on lipid absorption and clinical outcomes in patients with cystic fibrosis.** *J Pediatr* 2002, **141**: 178-185.
113. Levy E, Garofalo C, Thibault L, Dionne S, Daoust L, Lepage G *et al.*: **Intraluminal and intracellular phases of fat absorption are impaired in essential fatty acid deficiency.** *Am J Physiol* 1992, **262**: G319-G326.
114. Werner A, Minich DM, Havinga R, Bloks V, Van Goor H, Kuipers F *et al.*: **Fat malabsorption in essential fatty acid-deficient mice is not due to impaired bile formation.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002, **283**: G900-G908.
115. Hjelte L, Ahren B, Andren-Sandberg A, Bottcher G, Strandvik B: **Pancreatic function in the essential fatty acid deficient rat.** *Metabolism* 1990, **39**: 871-875.

116. Hjelte L, Strandvik B, Muller RM, Sagstrom S, Roomans GM: **Essential fatty acid deficient rats in the study of cystic fibrosis: an X-ray microanalytical and ultrastructural study in chronically reserpinized rats.** *J Submicrosc Cytol Pathol* 1990, **22**: 409-414.
117. Duan RD, Borgstrom B: **Is there a specific lysophospholipase in human pancreatic juice?** *Biochim Biophys Acta* 1993, **1167**: 326-330.
118. Borgstrom B: **Importance of phospholipids, pancreatic phospholipase A2, and fatty acid for the digestion of dietary fat: in vitro experiments with the porcine enzymes.** *Gastroenterology* 1980, **78**: 954-962.
119. Nouri-Sorkhabi MH, Chapman BE, Kuchel PW, Gruca MA, Gaskin KJ: **Parallel secretion of pancreatic phospholipase A(2), phospholipase A(1), lipase, and colipase in children with exocrine pancreatic dysfunction.** *Pediatr Res* 2000, **48**: 735-740.
120. Weber AM, Roy CC: **Intraduodenal events in cystic fibrosis.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984, **3 Suppl 1**: S113-S119.
121. O'Connor PJ, Loiudice TA, Bochenek W, Rodgers JB: **Effect of diester and diether phosphatidylcholine on intestinal absorption of neutral and acidic sterols.** *Am J Dig Dis* 1978, **23**: 316-320.
122. Saunders DR, Sillery J: **Lecithin inhibits fatty acid and bile salt absorption from rat small intestine in vivo.** *Lipids* 1976, **11**: 830-832.
123. Mathias PM, Harries JT, Muller DP: **Optimization and validation of assays to estimate pancreatic esterase activity using well-characterized micellar solutions of cholesteryl oleate and tocopheryl acetate.** *J Lipid Res* 1981, **22**: 177-184.
124. Clark SB: **Chylomicron composition during duodenal triglyceride and lecithin infusion.** *Am J Physiol* 1978, **235**: E183-E190.
125. Nilsson A, Borgstrom B: **Absorption and metabolism of lecithin and lysolecithin by intestinal slices.** *Biochim Biophys Acta* 1967, **137**: 240-254.
126. Tso P, Lam J, Simmonds WJ: **The importance of the lysophosphatidylcholine and choline moiety of bile phosphatidylcholine in lymphatic transport of fat.** *Biochim Biophys Acta* 1978, **528**: 364-372.
127. Petit-Thevenin J, Bruneau N, Nganga A, Lombardo D, Verine A: **Effects of arachidonic and docosahexaenoic acids on secretion and degradation of bile salt-dependent lipase in AR4-2J cells.** *J Lipid Res* 2001, **42**: 1220-1230.
128. Sinaasappel M, Bouquet J, Neijens HJ: **Problems in the treatment of malabsorption in CF.** *Acta Paediatr Scand Suppl* 1985, **317**: 22-27.
129. Clarke LL, Harline MC, Gawenis LR, Walker NM, Turner JT, Weisman GA: **Extracellular UTP stimulates electrogenic bicarbonate secretion across CFTR knockout gallbladder epithelium.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000, **279**: G132-G138.
130. Seidler U, Blumenstein I, Kretz A, Viellard-Baron D, Rossmann H, Colledge WH *et al.*: **A functional CFTR protein is required for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca(2+)-dependent.** *J Physiol* 1997, **505 ( Pt 2)**: 411-423.
131. Robinson PJ, Smith AL, Sly PD: **Duodenal pH in cystic fibrosis and its relationship to fat malabsorption.** *Dig Dis Sci* 1990, **35**: 1299-1304.

132. Regan PT, Malagelada JR, DiMagno EP, Go VL: **Reduced intraluminal bile acid concentrations and fat maldigestion in pancreatic insufficiency: correction by treatment.** *Gastroenterology* 1979, **77**: 285-289.
133. Ng SM, Jones AP. **Drug Therapies for Reducing Gastric Acidity in People with Cystic Fibrosis.** Wiley, J and Sons. The Cochrane Library. 1-21. 2004. Chichester, UK.
134. Westergaard H, Dietschy JM: **The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell.** *J Clin Invest* 1976, **58**: 97-108.
135. Wilson FA, Sallee VL, Dietschy JM: **Unstirred water layers in intestine: rate determinant of fatty acid absorption from micellar solutions.** *Science* 1971, **174**: 1031-1033.
136. Kobayashi A, Ohbe Y, Yonekubo A: **Fat absorption in patients with surgically repaired biliary atresia.** *Helv Paediatr Acta* 1983, **38**: 307-314.
137. Minich DM, Kalivianakis M, Havinga R, Van Goor H, Stellaard F, Vonk RJ *et al.*: **Bile diversion in rats leads to a decreased plasma concentration of linoleic acid which is not due to decreased net intestinal absorption of dietary linoleic acid.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1438**: 111-119.
138. Ros E, Garcia-Puges A, Reixach M, Cuso E, Rodes J: **Fat digestion and exocrine pancreatic function in primary biliary cirrhosis.** *Gastroenterology* 1984, **87**: 180-187.
139. Narayanan VS, Storch J: **Fatty acid transfer in taurodeoxycholate mixed micelles.** *Biochemistry* 1996, **35**: 7466-7473.
140. Harries JT, Muller DP, McCollum JP, Lipson A, Roma E, Norman AP: **Intestinal bile salts in cystic fibrosis: studies in the patient and experimental animal.** *Arch Dis Child* 1979, **54**: 19-24.
141. Robb TA, Davidson GP, Kirubakaran C: **Conjugated bile acids in serum and secretions in response to cholecystokinin/secretin stimulation in children with cystic fibrosis.** *Gut* 1985, **26**: 1246-1256.
142. Weizman Z, Durie PR, Kopelman HR, Vesely SM, Forstner GG: **Bile acid secretion in cystic fibrosis: evidence for a defect unrelated to fat malabsorption.** *Gut* 1986, **27**: 1043-1048.
143. Roy CC, Weber AM, Morin CL, Lepage G, Brisson G, Yousef I *et al.*: **Hepatobiliary disease in cystic fibrosis: a survey of current issues and concepts.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1982, **1**: 469-478.
144. Knox R, Stein I, Levinson D, Tso P, Mansbach CM: **Effect of fat pre-feeding on bile flow and composition in the rat.** *Biochim Biophys Acta* 1991, **1083**: 65-70.
145. Connor WE, Witiak DT, Stone DB, Armstrong ML: **Cholesterol balance and fecal neutral steroid and bile acid excretion in normal men fed dietary fats of different fatty acid composition.** *J Clin Invest* 1969, **48**: 1363-1375.
146. Smit MJ, Temmerman AM, Wolters H, Kuipers F, Beynen AC, Vonk RJ: **Dietary fish oil-induced changes in intrahepatic cholesterol transport and bile acid synthesis in rats.** *J Clin Invest* 1991, **88**: 943-951.
147. Levy E: **The 1991 Borden Award Lecture. Selected aspects of intraluminal and intracellular phases of intestinal fat absorption.** *Can J Physiol Pharmacol* 1992, **70**: 413-419.

148. Levy E, Garofalo C, Rouleau T, Gavino V, Bendayan M: **Impact of essential fatty acid deficiency on hepatic sterol metabolism in rats.** *Hepatology* 1996, **23**: 848-857.
149. Ekelund K, Johansson C, Nylander B: **Effects of 16,16 dimethyl prostaglandin E2 on food-stimulated pancreatic secretion and output of bile in man.** *Scand J Gastroenterol* 1977, **12**: 457-460.
150. Cohen BI, Raicht RF, Mosbach EH: **Sterol metabolism studies in the rat. Effects of primary bile acids (sodium taurochenodeoxycholate and sodium taurocholate) on sterol metabolism.** *J Lipid Res* 1977, **18**: 223-231.
151. Gallo-Torres HE, Miller ON, Hamilton JG: **Further studies on the role of bile salts in cholesterol esterification and absorption from the gut.** *Arch Biochem Biophys* 1971, **143**: 22-36.
152. Reynier MO, Montet JC, Gerolami A, Marteau C, Crotte C, Montet AM *et al.*: **Comparative effects of cholic, chenodeoxycholic, and ursodeoxycholic acids on micellar solubilization and intestinal absorption of cholesterol.** *J Lipid Res* 1981, **22**: 467-473.
153. Thompson GN: **Excessive fecal taurine loss predisposes to taurine deficiency in cystic fibrosis.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988, **7**: 214-219.
154. De Curtis M, Santamaria F, Ercolini P, Vittoria L, De Ritis G, Garofalo V *et al.*: **Effect of taurine supplementation on fat and energy absorption in cystic fibrosis.** *Arch Dis Child* 1992, **67**: 1082-1085.
155. Merli M, Bertasi S, Servi R, Diamanti S, Martino F, De Santis A *et al.*: **Effect of a medium dose of ursodeoxycholic acid with or without taurine supplementation on the nutritional status of patients with cystic fibrosis: a randomized, placebo-controlled, crossover trial.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994, **19**: 198-203.
156. Smith LJ, Lacaille F, Lepage G, Ronco N, Lamarre A, Roy CC: **Taurine decreases fecal fatty acid and sterol excretion in cystic fibrosis. A randomized double-blind trial.** *Am J Dis Child* 1991, **145**: 1401-1404.
157. Thompson GN: **Failure of taurine to improve fat absorption in cystic fibrosis.** *J Inherit Metab Dis* 1988, **11 Suppl 2**: 158-160.
158. Belli DC, Levy E, Darling P, Leroy C, Lepage G, Giguere R *et al.*: **Taurine improves the absorption of a fat meal in patients with cystic fibrosis.** *Pediatrics* 1987, **80**: 517-523.
159. Carrasco S, Codoceo R, Prieto G, Lama R, Polanco I: **Effect of taurine supplements on growth, fat absorption and bile acid on cystic fibrosis.** *Acta Univ Carol [Med ] (Praha)* 1990, **36**: 152-156.
160. Colombo C, Setchell KD, Podda M, Crosignani A, Roda A, Curcio L *et al.*: **Effects of ursodeoxycholic acid therapy for liver disease associated with cystic fibrosis.** *J Pediatr* 1990, **117**: 482-489.
161. Sarfeh IJ, Beeler DA, Treble DH, Balint JA: **Studies of the hepatic excretory defects in essential fatty acid deficiency. Their possible relationship to the genesis of cholesterol gallstones.** *J Clin Invest* 1974, **53**: 423-430.
162. Trehwella MA, Collins FD: **A comparison of the relative turnover of individual molecular species of phospholipids in normal rats and in rats deficient in essential fatty acids.** *Biochim Biophys Acta* 1973, **296**: 34-50.

163. Lepage G, Paradis K, Lacaille F, Senechal L, Ronco N, Champagne J *et al.*: **Ursodeoxycholic acid improves the hepatic metabolism of essential fatty acids and retinol in children with cystic fibrosis.** *J Pediatr* 1997, **130**: 52-58.
164. Hofmann AF: **The enterohepatic circulation of bile acids in man.** *Adv Intern Med* 1976, **21**: 501-534.
165. Schreiber AJ, Simon FR: **Overview of clinical aspects of bile salt physiology.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1983, **2**: 337-345.
166. Goodchild MC, Murphy GM, Howell AM, Nutter SA, Anderson CM: **Aspects of bile acid metabolism in cystic fibrosis.** *Arch Dis Child* 1975, **50**: 769-778.
167. O'Brien S, Mulcahy H, Fenlon H, O'Broin A, Casey M, Burke A *et al.*: **Intestinal bile acid malabsorption in cystic fibrosis.** *Gut* 1993, **34**: 1137-1141.
168. Smalley CA, Brown GA, Parkes ME, Tease H, Brookes V, Anderson CM: **Reduction of bile acid loss in cystic fibrosis by dietary means.** *Arch Dis Child* 1978, **53**: 477-482.
169. Walters MP, Littlewood JM: **Faecal bile acid and dietary residue excretion in cystic fibrosis: age group variations.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998, **27**: 296-300.
170. Watkins JB, Tercyak AM, Szczepanik P, Klein PD: **Bile salt kinetics in cystic fibrosis: influence of pancreatic enzyme replacement.** *Gastroenterology* 1977, **73**: 1023-1028.
171. Vlahcevic ZR, Miller JR, Farrar JT, Swell L: **Kinetics and pool size of primary bile acids in man.** *Gastroenterology* 1971, **61**: 85-90.
172. Weber AM, Roy C, Lepage G, Chartrand L, Lasalle R: **Interruption of the enterohepatic circulation of bile acids in cystic fibrosis.** *Gastroenterology* 68, 1066. 1975.
173. Jonas A, Diver-Haber A: **Bile acid sequestration by the solid phase of stools in cystic fibrosis patients. Role of pancreatic enzymes.** *Dig Dis Sci* 1988, **33**: 724-731.
174. Isenberg JN, Hendrix PY, Cox KL: **Effect of short-term cimetidine administration on fecal bile acid losses in cystic fibrosis.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1983, **2**: 447-451.
175. Lefebvre D, Ratelle S, Chartrand L, Roy CC: **Reduced microbial transformation of bile acids in cystic fibrosis.** *Experientia* 1977, **33**: 616-618.
176. de Rooij FW, van den Berg JW, Sinaasappel M, Bosman-Jacobs EP, Touw-Blommesteijn AC: **Bile acid malabsorption in cystic fibrosis; membrane vesicles, a tool for revealing the role of the ileal brush border membrane.** *Acta Paediatr Scand Suppl* 1985, **317**: 28-30.
177. Fondacaro JD, Heubi JE, Kellogg FW: **Intestinal bile acid malabsorption in cystic fibrosis: a primary mucosal cell defect.** *Pediatr Res* 1982, **16**: 494-498.
178. Stelzner M, Somasundaram S, Lee SP, Kuver R: **Ileal mucosal bile acid absorption is increased in Cfr knockout mice.** *BMC Gastroenterol* 2001, **1**: 10.
179. Levy E, Goldstein R, Stankiewicz H, Hager E, Freier S: **Gastric handling of medium-chain triglycerides and subsequent metabolism in the suckling rat.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984, **3**: 784-789.
180. Symonds EL, Omari TI, Webster JM, Davidson GP, Butler RN: **Relation between pancreatic lipase activity and gastric emptying rate in children with cystic fibrosis.** *J Pediatr* 2003, **143**: 772-775.

181. Bali A, Stableforth DE, Asquith P: **Prolonged small-intestinal transit time in cystic fibrosis.** *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983, **287**: 1011-1013.
182. Dalzell AM, Freestone NS, Billington D, Heaf DP: **Small intestinal permeability and oro-caecal transit time in cystic fibrosis.** *Arch Dis Child* 1990, **65**: 585-588.
183. Mack DR, Flick JA, Durie PR, Rosenstein BJ, Ellis LE, Perman JA: **Correlation of intestinal lactulose permeability with exocrine pancreatic dysfunction.** *J Pediatr* 1992, **120**: 696-701.
184. Seal S, McClean P, Walters M, Wolfe SP, Harding M, Coward W *et al.*: **Stable isotope studies of pancreatic enzyme release in vivo.** *Postgrad Med J* 1996, **72 Suppl 2**: S37-S38.
185. Taylor CJ, Hillel PG, Ghosal S, Frier M, Senior S, Tindale WB *et al.*: **Gastric emptying and intestinal transit of pancreatic enzyme supplements in cystic fibrosis.** *Arch Dis Child* 1999, **80**: 149-152.
186. Hjelte L, Melin T, Nilsson A, Strandvik B: **Absorption and metabolism of [3H]arachidonic and [14C]linoleic acid in essential fatty acid-deficient rats.** *Am J Physiol* 1990, **259**: G116-G124.
187. Snipes RL: **Cellular dynamics in the jejunum of essential fatty acid deficient mice.** *Anat Rec* 1967, **159**: 421-429.
188. Freye Hb, Kurtz Sm, Spock A, Capp Mp: **Light And Electron Microscopic Examination Of The Small Bowel Of Children With Cystic Fibrosis.** *J Pediatr* 1964, **64**: 575-579.
189. Kent G, Oliver M, Foskett JK, Frndova H, Durie P, Forstner J *et al.*: **Phenotypic abnormalities in long-term surviving cystic fibrosis mice.** *Pediatr Res* 1996, **40**: 233-241.
190. Cox KL, Isenberg JN, Ament ME: **Gastric acid hypersecretion in cystic fibrosis.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1982, **1**: 559-565.
191. Van Biervliet S, Eggermont E, Marien P, Hoffman I, Veereman G: **Combined impact of mucosal damage and of cystic fibrosis on the small intestinal brush border enzyme activities.** *Acta Clin Belg* 2003, **58**: 220-224.
192. Slomiany A, Liau YH, Carter SR, Newman LJ, Slomiany BL: **Mucus glycoprotein fatty acyltransferase in patients with cystic fibrosis: effect on the glycoprotein viscosity.** *Biochem Biophys Res Commun* 1985, **132**: 299-306.
193. Schutt WH, Isles TE: **Protein in meconium from meconium ileus.** *Arch Dis Child* 1968, **43**: 178-181.
194. Wesley A, Forstner J, Qureshi R, Mantle M, Forstner G: **Human intestinal mucin in cystic fibrosis.** *Pediatr Res* 1983, **17**: 65-69.
195. Korotkova M, Strandvik B: **Essential fatty acid deficiency affects the fatty acid composition of the rat small intestinal and colonic mucosa differently.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1487**: 319-325.
196. Snipes RL: **The effects of essential fatty acid deficiency on the ultrastructure and functional capacity of the jejunal epithelium.** *Lab Invest* 1968, **18**: 179-189.
197. AAES-JORGENSEN E: **Essential fatty acids.** *Physiol Rev* 1961, **41**: 1-51.
198. Freedman SD, Katz MH, Parker EM, Laposata M, Urman MY, Alvarez JG: **A membrane lipid imbalance plays a role in the phenotypic expression of cystic fibrosis in cftr(-/-) mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**: 13995-14000.

199. Pandalai PK, Pilat MJ, Yamazaki K, Naik H, Pienta KJ: **The effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on in vitro prostate cancer growth.** *Anticancer Res* 1996, **16**: 815-820.
200. Jiang WG, Eynard AR, Mansel RE: **The pathology of essential fatty acid deficiency: is it cell adhesion mediated?** *Med Hypotheses* 2000, **55**: 257-262.
201. Juby LD, Rothwell J, Axon AT: **Cellobiose/mannitol sugar test--a sensitive tubeless test for coeliac disease: results on 1010 unselected patients.** *Gut* 1989, **30**: 476-480.
202. Hallberg K, Grzegorzczak A, Larson G, Strandvik B: **Intestinal permeability in cystic fibrosis in relation to genotype.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997, **25**: 290-295.
203. Gosden CM, Gosden JR: **Fetal abnormalities in cystic fibrosis suggest a deficiency in proteolysis of cholecystinin.** *Lancet* 1984, **2**: 541-546.
204. Eynard AR, Monis B, Kalinec F, Leguizamon RO: **Increased proliferation of the epithelium of the proximal alimentary tract of EFA-deficient rats: a light and electron microscopy study.** *Exp Mol Pathol* 1982, **36**: 135-143.
205. Thomson AB, Keelan M, Garg ML, Clandinin MT: **Intestinal aspects of lipid absorption: in review.** *Can J Physiol Pharmacol* 1989, **67**: 179-191.
206. Chow SL, Hollander D: **A dual, concentration-dependent absorption mechanism of linoleic acid by rat jejunum in vitro.** *J Lipid Res* 1979, **20**: 349-356.
207. Trotter PJ, Ho SY, Storch J: **Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells.** *J Lipid Res* 1996, **37**: 336-346.
208. Baier LJ, Bogardus C, Sacchettini JC: **A polymorphism in the human intestinal fatty acid binding protein alters fatty acid transport across Caco-2 cells.** *J Biol Chem* 1996, **271**: 10892-10896.
209. Clarke SD, Armstrong MK: **Cellular lipid binding proteins: expression, function, and nutritional regulation.** *FASEB J* 1989, **3**: 2480-2487.
210. Ockner RK, Manning JA: **Fatty acid-binding protein in small intestine. Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport.** *J Clin Invest* 1974, **54**: 326-338.
211. Sfeir Z, Ibrahim A, Amri E, Grimaldi P, Abumrad N: **Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997, **57**: 17-21.
212. Stahl A, Hirsch DJ, Gimeno RE, Punreddy S, Ge P, Watson N *et al.*: **Identification of the major intestinal fatty acid transport protein.** *Mol Cell* 1999, **4**: 299-308.
213. Lobo MV, Huerta L, Ruiz-Velasco N, Teixeira E, de la CP, Celdran A *et al.*: **Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids.** *J Histochem Cytochem* 2001, **49**: 1253-1260.
214. Levy E, Menard D, Suc I, Delvin E, Marcil V, Brissette L *et al.*: **Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine.** *J Cell Sci* 2004, **117**: 327-337.
215. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J *et al.*: **Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters.** *Science* 2000, **290**: 1771-1775.



216. Lee MH, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H *et al.*: **Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption.** *Nat Genet* 2001, **27**: 79-83.
217. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K *et al.*: **Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers.** *Science* 2000, **289**: 1524-1529.
218. Mulligan JD, Flowers MT, Tebon A, Bitgood JJ, Wellington C, Hayden MR *et al.*: **ABCA1 is essential for efficient basolateral cholesterol efflux during the absorption of dietary cholesterol in chickens.** *J Biol Chem* 2003, **278**: 13356-13366.
219. Murthy S, Born E, Mathur SN, Field FJ: **LXR/RXR activation enhances basolateral efflux of cholesterol in CaCo-2 cells.** *J Lipid Res* 2002, **43**: 1054-1064.
220. Iyer SP, Yao X, Crona JH, Hoos LM, Tetzloff G, Davis HR, Jr. *et al.*: **Characterization of the putative native and recombinant rat sterol transporter Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) protein.** *Biochim Biophys Acta* 2005.
221. Klett EL, Patel SB: **Biomedicine. Will the real cholesterol transporter please stand up.** *Science* 2004, **303**: 1149-1150.
222. Briel M, Greger R, Kunzelmann K: **Cl<sup>-</sup> transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to the inhibition of epithelial Na<sup>+</sup> channels (ENaCs) in Xenopus oocytes co-expressing CFTR and ENaC.** *J Physiol* 1998, **508 ( Pt 3)**: 825-836.
223. Mall M, Bleich M, Kuehr J, Brandis M, Greger R, Kunzelmann K: **CFTR-mediated inhibition of epithelial Na<sup>+</sup> conductance in human colon is defective in cystic fibrosis.** *Am J Physiol* 1999, **277**: G709-G716.
224. Xu Y, Clark JC, Aronow BJ, Dey CR, Liu C, Wooldridge JL *et al.*: **Transcriptional adaptation to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficiency.** *J Biol Chem* 2003, **278**: 7674-7682.
225. McKenna MC, Hubbard VS, Bieri JG: **Linoleic acid absorption from lipid supplements in patients with cystic fibrosis with pancreatic insufficiency and in control subjects.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985, **4**: 45-51.
226. Thompson GN: **Relationships between essential fatty acid levels, pulmonary function and fat absorption in pre-adolescent cystic fibrosis children with good clinical scores.** *Eur J Pediatr* 1989, **148**: 327-329.
227. Clark SB, Ekkers TE, Singh A, Balint JA, Holt PR, Rodgers JB, Jr.: **Fat absorption in essential fatty acid deficiency: a model experimental approach to studies of the mechanism of fat malabsorption of unknown etiology.** *J Lipid Res* 1973, **14**: 581-588.
228. Kellner-Weibel G, Llera-Moya M, Connelly MA, Stoudt G, Christian AE, Haynes MP *et al.*: **Expression of scavenger receptor BI in COS-7 cells alters cholesterol content and distribution.** *Biochemistry* 2000, **39**: 221-229.
229. Amri EZ, Bonino F, Ailhaud G, Abumrad NA, Grimaldi PA: **Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors.** *J Biol Chem* 1995, **270**: 2367-2371.
230. Murthy S, Born E, Mathur SN, Field FJ: **Liver-X-receptor-mediated increase in ATP-binding cassette transporter A1 expression is attenuated by fatty acids in**

- CaCo-2 cells: effect on cholesterol efflux to high-density lipoprotein.** *Biochem J* 2004, **377**: 545-552.
231. Uehara Y, Engel T, Li Z, Goepfert C, Rust S, Zhou X *et al.*: **Polyunsaturated fatty acids and acetoacetate downregulate the expression of the ATP-binding cassette transporter A1.** *Diabetes* 2002, **51**: 2922-2928.
232. Wang Y, Oram JF: **Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1.** *J Biol Chem* 2002, **277**: 5692-5697.
233. Heda GD, Marino CR: **Surface expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutant DeltaF508 is markedly upregulated by combination treatment with sodium butyrate and low temperature.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **271**: 659-664.
234. Marcil V, Delvin E, Seidman E, Poitras L, Zoltowska M, Garofalo C *et al.*: **Modulation of lipid synthesis, apolipoprotein biogenesis, and lipoprotein assembly by butyrate.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002, **283**: G340-G346.
235. Brown CR, Hong-Brown LQ, Biwersi J, Verkman AS, Welch WJ: **Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein.** *Cell Stress Chaperones* 1996, **1**: 117-125.
236. Venglarik CJ, Bridges RJ, Frizzell RA: **A simple assay for agonist-regulated Cl and K conductances in salt-secreting epithelial cells.** *Am J Physiol* 1990, **259**: C358-C364.
237. Zhang XM, Wang XT, Yue H, Leung SW, Thibodeau PH, Thomas PJ *et al.*: **Organic solutes rescue the functional defect in delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.** *J Biol Chem* 2003, **278**: 51232-51242.
238. Eidelman O, BarNoy S, Razin M, Zhang J, McPhie P, Lee G *et al.*: **Role for phospholipid interactions in the trafficking defect of Delta F508-CFTR.** *Biochemistry* 2002, **41**: 11161-11170.
239. Arreaza-Plaza CA, Bosch V, Otayek MA: **Lipid transport across the intestinal epithelial cell. Effect of colchicine.** *Biochim Biophys Acta* 1976, **431**: 297-302.
240. Glickman RM, Perrotto JL, Kirsch K: **Intestinal lipoprotein formation: effect of cholchicine.** *Gastroenterology* 1976, **70**: 347-352.
241. Pavelka M, Gangl A: **Effects of colchicine on the intestinal transport of endogenous lipid. Ultrastructural, biochemical, and radiochemical studies in fasting rats.** *Gastroenterology* 1983, **84**: 544-555.
242. Chun J, Auer KA, Jacobson BS: **Arachidonate initiated protein kinase C activation regulates HeLa cell spreading on a gelatin substrate by inducing F-actin formation and exocytotic upregulation of beta 1 integrin.** *J Cell Physiol* 1997, **173**: 361-370.
243. Jiang WG, Bryce RP, Horrobin DF, Mansel RE: **Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **244**: 414-420.
244. Anant S, Davidson NO: **Molecular mechanisms of apolipoprotein B mRNA editing.** *Curr Opin Lipidol* 2001, **12**: 159-165.
245. Le Beyec J, Chaffeton V, Kan HY, Janvier PL, Cywiner-Golenzer C, Chatelet FP *et al.*: **The -700/-310 fragment of the apolipoprotein A-IV gene combined with**

- the -890/-500 apolipoprotein C-III enhancer is sufficient to direct a pattern of gene expression similar to that for the endogenous apolipoprotein A-IV gene. *J Biol Chem* 1999, **274**: 4954-4961.
246. Hussain MM, Kancha RK, Zhou Z, Luchoomun J, Zu H, Bakillah A: **Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors.** *Biochim Biophys Acta* 1996, **1300**: 151-170.
  247. Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M *et al.*: **Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia.** *Science* 1992, **258**: 999-1001.
  248. Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S *et al.*: **Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders.** *Nat Genet* 2003, **34**: 29-31.
  249. Mansbach CM, Nevin P: **Intracellular movement of triacylglycerols in the intestine.** *J Lipid Res* 1998, **39**: 963-968.
  250. Levy E, Thibault L, Garofalo C, Messier M, Lepage G, Ronco N *et al.*: **Combined (n-3 and n-6) essential fatty deficiency is a potent modulator of plasma lipids, lipoprotein composition, and lipolytic enzymes.** *J Lipid Res* 1990, **31**: 2009-2017.
  251. Bubien JK: **CFTR may play a role in regulated secretion by lymphocytes: a new hypothesis for the pathophysiology of cystic fibrosis.** *Pflugers Arch* 2001, **443 Suppl 1**: S36-S39.
  252. Moss RB, Hsu YP, Olds L: **Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocytes.** *Clin Exp Immunol* 2000, **120**: 518-525.
  253. Pan J, Bear C, Farragher S, Cutz E, Yeger H: **Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulates neurosecretory function in pulmonary neuroendocrine cell-related tumor cell line models.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, **27**: 553-560.
  254. Biwersi J, Emans N, Verkman AS: **Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activation stimulates endosome fusion in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**: 12484-12489.
  255. Asp L, Claesson C, Boren J, Olofsson SO: **ADP-ribosylation factor 1 and its activation of phospholipase D are important for the assembly of very low density lipoproteins.** *J Biol Chem* 2000, **275**: 26285-26292.
  256. Gusarova V, Brodsky JL, Fisher EA: **Apolipoprotein B100 exit from the endoplasmic reticulum (ER) is COPII-dependent, and its lipidation to very low density lipoprotein occurs post-ER.** *J Biol Chem* 2003, **278**: 48051-48058.
  257. Yoo JS, Moyer BD, Bannykh S, Yoo HM, Riordan JR, Balch WE: **Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway.** *J Biol Chem* 2002, **277**: 11401-11409.
  258. Fu L, Sztul E: **Traffic-independent function of the Sar1p/COPII machinery in proteasomal sorting of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.** *J Cell Biol* 2003, **160**: 157-163.
  259. Becker W, Mansson JE: **Incorporation of 14C into tissue lipids after oral administration of [1-14C]linoleic acid in rats fed different levels of essential fatty acids.** *J Nutr* 1985, **115**: 1248-1258.

260. Williams MA, Tinoco J, Yang YT, Bird MI, Hincenbergs I: **Feeding pure docosahexaenoate or arachidonate decreases plasma triacylglycerol secretion in rats.** *Lipids* 1989, **24**: 753-758.
261. Coleman RA, Wang P, Bhat BG: **Diradylglycerols alter fatty acid inhibition of monoacylglycerol acyltransferase activity in Triton X-100 mixed micelles.** *Biochemistry* 1998, **37**: 5916-5922.
262. Chautan M, Charbonnier M, Leonardi J, Andre M, Lafont H, Nalbone G: **Modulation of lipid chylomicron-synthesizing enzymes in rats by the dietary (n-6):(n-3) fatty acid ratio.** *J Nutr* 1991, **121**: 1305-1310.
263. Stan S, Delvin EE, Seidman E, Rouleau T, Steinmetz A, Bendayan M *et al.*: **Modulation of apo A-IV transcript levels and synthesis by n-3, n-6, and n-9 fatty acids in CACO-2 cells.** *J Cell Biochem* 1999, **75**: 73-81.
264. Wang H, Lu S, Du J, Yao Y, Berschneider HM, Black DD: **Regulation of apolipoprotein secretion by long-chain polyunsaturated fatty acids in newborn swine enterocytes.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001, **280**: G1137-G1144.
265. Murthy S, Albright E, Mathur SN, Davidson NO, Field FJ: **Apolipoprotein B mRNA abundance is decreased by eicosapentaenoic acid in CaCo-2 cells. Effect on the synthesis and secretion of apolipoprotein B.** *Arterioscler Thromb* 1992, **12**: 691-700.
266. Kratz M, Wahrburg U, von Eckardstein A, Ezeh B, Assmann G, Kronenberg F: **Dietary mono- and polyunsaturated fatty acids similarly increase plasma apolipoprotein A-IV concentrations in healthy men and women.** *J Nutr* 2003, **133**: 1821-1825.
267. Yao Y, Eshun JK, Lu S, Berschneider HM, Black DD: **Regulation of triacylglycerol and phospholipid trafficking by fatty acids in newborn swine enterocytes.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002, **282**: G817-G824.
268. Jiang WG, Bryce RP, Horrobin DF, Mansel RE: **gamma-Linolenic acid blocks cell cycle progression by regulating phosphorylation of p27kip1 and p57kip2 and their interactions with other cycle regulators in cancer cells.** *Int J Oncol* 1998, **13**: 611-617.

**Article 4 soumis à :**

**Gastroenterology**

**SARA2 mutations in chylomicron retention disease: a genotype-phenotype analysis in Canadian and French patients.**

**Noel Peretti<sup>\*</sup>, Agnès Sassolas<sup>†</sup>, Claude C Roy<sup>§</sup>, Colette Deslandre<sup>§</sup>, Eric Drouin<sup>§</sup>, André Rasquin<sup>§</sup>, Pierre Brochu<sup>&</sup>, Alain Montoudis<sup>\*</sup>, Sylvie Labarge<sup>††</sup>, Raymonde Bouvier<sup>‡</sup>, Mathilde Charcosset<sup>†</sup>, Marie-Claude Vohl<sup>\*\*</sup>, Alain Lachaux<sup>††</sup>, Emile Levy<sup>\*</sup>**

Departments of <sup>\*</sup>Nutrition, <sup>§</sup>Pediatrics and <sup>&</sup>Pathology, CHU Sainte-Justine, Université de Montréal, Québec, Canada; <sup>\*\*</sup>Lipid Research Center, CHUL Research Center, Quebec City, Quebec, Canada; <sup>†</sup>UF lipides, Laboratoire de biochimie, Hopital neurologique, Lyon, France ; Departments of <sup>††</sup>Nutrition-Gastroenterology and <sup>‡</sup>Pathology, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

**Running Title:** Chylomicron retention disease

**Address for correspondence:**

\*Dr. Emile Levy  
GI-Nutrition Unit  
Hôpital Sainte-Justine  
3175 Côte Ste-Catherine  
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5  
Tel. :(514) 345-462 Fax:(514) 345-4999

**ABSTRACT (342)**

**Background & Aims:** Lipoprotein assembly is critical for intestinal absorption of dietary lipids and fat-soluble vitamins. Mutations in SARA2 gene coding for Sar1 GTPase prevents chylomicron secretion and leads to chylomicron retention disease (CRD). The aim of this study was to expand the molecular delineation of CRD, to provide a complete clinical and biological description of the largest cohort so far described and to compare the long-term evolution of two sub-cohorts from France and Canada. **Patients & Methods:** The investigation was carried out on clinically diagnosed 7 patients from France and 9 from Canada. Peripheral blood samples were obtained for genomic DNA isolation. Exon-specific intronic primers were used to amplify DNA samples from individuals. PCR products were subsequently sequenced to detect mutations. **Results:** Compared with age- and sex-matched controls, CRD patients presented early in their lives with fat malabsorption, deficiency of vitamins A, E and essential fatty acids, as well as severe hypocholesterolemia coupled with decreased levels of LDL- and HDL-cholesterol, and apolipoproteins A-I and B. The mutation spectrum of SARA2 gene in our French and Canadian groups includes 4 missenses, 1 deletion and 1 splice, which spanned 4 distinct exons. Our analysis has identified 3 novel mutations (364G-T, exon2del and 554G-T) in addition to the mutations reported previously (409G-A, 537T-A, 83-84delTG). Carrier screening of our samples also revealed two different compound heterozygotes harbouring the combined mutant alleles L28fsX34-D137N and S179R-D137N. The new mutations are expected to impact on the affinity of Sar1 GTPase to both GDP/GTP and sec23 component of the coat protein COPII. French patients with the new mutations displayed later debut and milder lipid disorders

than the Canadians subjects. **Conclusions:** The cohorts of French and Canadian CRD patients are characterized by different mutations and the degree of plasma lipid abnormalities. However, our long-term follow-up disclosed persistent defective lipid profile in all the patients along with clinical particularities in some patients whatever the molecular aberrations.



## **INTRODUCTION**

The small intestine produces chylomicrons (CM) in the postprandial state. The assembly of these large lipoprotein particles is critical for the transport of fat and lipid-soluble vitamins. Although significant strides have been achieved over the three last decades in the understanding of the formation of intestinal lipoproteins (1-3), additional efforts are obviously necessary to delineate the intracellular mechanisms of CM elaboration. Studies of genetic disorders have afforded tremendous insights into the mechanisms involved in intestinal lipid handling and lipoprotein metabolism. Such congenital pathophysiological conditions have undeniably highlighted the crucial role of apolipoprotein (apo) B-48 (4-6), microsomal triglyceride transfer protein (MTP) (7; 8) and Sar1 GTPase (9). Currently, it is considered that the packaging process starts with the biosynthesis and entrance of apo B-48 into the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) where lipids are added through the interaction with pivotal MTP allowing correct folding of apo B-48. The latter protein is then sorted into exit sites, to leave the ER by vesicles formed under the influence of Sar1 GTPase and COPII (coatamer proteins). Mutations in the genes of apo B-48, MTP and Sar1 GTPase result in hypobetalipoproteinemia, abetalipoproteinemia and chylomicron retention disease (CRD), respectively, all characterized by chronic fat malabsorption leading to steatorrhea and fat-soluble vitamin deficiency, failure to thrive and variable neurological manifestations.

The assembly and secretion of apo B-containing lipoproteins requires the transport of proteins between the ER and the Golgi. Newly synthesized proteins, such as apo B-48 destined for secretion, are sorted into COPII-coated vesicles, which bud from specialized regions of the ER and then deliver their content by fusing with recipient Golgi membrane

sites. The efficient operation of COPII pathway necessitates two multimeric complexes (Sec23/24p and Sec13/31p), and Sar1, a GTPase of the Ras superfamily (10). The GTP-binding protein Sar1 is particularly essential for the budding reaction and is also important for correct vesicle targeting and fusion (11). The requirement of Sar1 for the intracellular CM transport has only recently been established in view of mutations identified in the SARA2 gene that encodes Sar1b (12) which is consistent with previous data demonstrating that GTP binding and hydrolysis are required for the transport of cargo from the ER to the Golgi apparatus (13). To our knowledge, no systematic investigation has reported long-term data about CRD and no studies have been able to examine how genetic and phenotypic variations correlate. The main objective of the current work was to determine whether different mutations of SARA2 influence lipid parameters, apo profile, clinical features and the response to nutritional treatment. The identification of mutations in the SARA2 gene may shed new light on genetic variations responsible for autosomal dominantly inherited CRD. In this analysis, the most comprehensive published so far, we screened a large series comprising 16 for mutations in the SARA2 gene by direct sequencing to evaluate the clinical phenotype to establish a genotype/phenotype relation.

## **SUBJECTS AND METHODS**

### **Subjects**

Sixteen patients, 8 girls and 8 boys, with a mean age of 12 years (4 to 23 y) were recruited from two pediatric gastroenterology units: Edouard Herriot Hospital, Lyon, France (7 patients, families 1 to 3) and Sainte Justine Hospital, Montreal, Canada (9 patients, families 4 to 9). These patients were seen for a malabsorption syndrome diagnosed as CRD. Initial data at the diagnosis, follow-up information and fresh observations were obtained from medical records. The patients underwent clinical appraisal, such as neurological exam with electromyography, electroretinograph and visual evoked potentials, as well as hepatic and cardiac ultrasonography and bone density assessment. Patients' plasma tests were compared to determinations of age and sex-matched healthy controls. Informed consent was obtained from the patients or their parents and permission to conduct the study was obtained from the Ethics Committees of Edouard Herriot and Sainte Justine hospitals.

### **Anthropometry**

Height and weight, expressed in percentile, were determined by employing the American curves established by the Center for Disease Control ([http://www.cdc.gov/growth charts](http://www.cdc.gov/growth_charts)). After measuring height by a standard clinical apparatus, target height (TH) was calculated for boys  $[(\text{mother height} + \text{father height} + 12) / 2] + 3$  and for girls  $[(\text{mother height} + \text{father height} - 12) / 2] + 3$ .

**Intestinal biopsies specimens**

Fasting intestinal biopsy specimens were obtained from the proximal duodenum by gastroscopy, except for two oldest patients (4-1 and 8-1) who provided a biopsy with Carey capsule at the ligament of Treitz. Frozen sections were treated with oil red-O to stain neutral fat. Another biopsy was fixed in formalin for routine histology and another was processed for electron microscopy.

**Steatorrhea**

Steatorrhea was determined by collecting stools between two carmine red markers consisting of 200 mg of powder dissolved in water given 72 h apart. The data ( $X \pm SD$ ) showed no differences between the French group ( $7.5 \pm 1$  g/day) and the Canadian group ( $11 \pm 2.5$  g/day).

**Bone density**

Bone mineral density of lumbar spine was measured by dual energy X-ray absorptiometry (DXA; Lunar Prodigy, Madison, WI, YSA). The results were compared to healthy age- and sex-matched controls and expressed as Age-Egal Z-Score for L2-L4. Osteopenia in children is defined as bone mineral density below 2 SDS (14).

**Blood samples**

Blood samples were collected in tubes containing 1 g EDTA/L after subjects had fasted for 12 h overnight. Plasma was separated immediately by low-speed centrifugation ( $700 \times g$  for 20 min) at 4°C.

### **Molecular diagnosis**

DNA from 5 ml EDTA-anticoagulated blood was extracted by resin-chloroform (Nucleon BACC3, Amersham, Baie d'Urfé, Canada). Mutations in SARA2 were determined by sequencing exons 2 to 7. The primer sequences were obtained from PRIMER3 web site ([www.genome.wi.mit.edu](http://www.genome.wi.mit.edu)) and from SARA2 gene sequence (Genbank, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). The sizes of amplicon included the exon-intron boundaries to detect potential splice site mutations. In exon 4, the amplicon comprised an intronic 40 bp polyT sequence. The PCR amplifications were carried out with polymerase Optimase Taq (Transgenomic) for exons 3, 5, 6, 7, with EurobioTaq (Eurobio) for exon 2 and with Hotstar Taq (Quiagen) for exon 4. The exon number1 was not amplified because of its uncoded region (first ATG codon in exon 2: Gene, ncbi web site). PCR amplicons were sequenced with ABI PRISM BigDye ready reaction reagent set (Applied Biosystems) on an ABI PRISM 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems).

### **Fatty acid analysis**

Fatty acids (FA) in whole plasma were assayed by an improved method described by us previously (15). Briefly, each sample to be analyzed was subjected to direct transesterification and then injected into a gas chromatograph (model HP 5880; Hewlett-Packard, Rockville, MD) by using a 60-m fused silica capillary column coated with SP 2331.

### **Vitamin measurements**

Plasma vitamins were measured as described previously (16) using HPLC system equipped with a spherical 5- $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub> octadesilsilane Hypersil column (20 cm x 2.1 mm internal diameter; Hewlett-Packard).

### **Lipid and lipoprotein analysis**

Plasma concentrations of total cholesterol, free cholesterol, and triacylglycerols were measured enzymatically with a commercial kit (Boehringer Mannheim, Montreal) as reported previously (17; 18). Cholesteryl esters were calculated as 1.7 times the difference between total and unesterified cholesterol. Phospholipids were measured by the Bartlett method (19). High-density lipoprotein (HDL) cholesterol was measured after precipitation of very low-density lipoprotein and low-density lipoprotein (LDL) with phosphotungstic acid (20; 21). Apo A-I and apo B were measured by nephelometry (Array Protein System; Beckman).

### **Statistical analysis**

All values are expressed as means  $\pm$  SEMs. Statistical differences were assessed by Student's two-tailed *t* test. *P* values  $<0.05$  were considered significant.

## **RESULTS**

The baseline characteristics of the Canadian and French patients are provided in Table 1. The two groups of subjects were comparable for age, gender, weight and height percentiles, as well as the onset and type of symptoms. Nevertheless, French patients were characterized by a high rate of parental consanguinity, delayed diagnosis with a shorter follow-up and decreased weight and height percentiles during the current investigation.

Table 2 exhibits the individual clinical findings at diagnosis. Most of the patients presented with failure to thrive, diarrhea and vomiting. The majority of them displayed elevated values of alanine aminotransferase (1.5 to 17-fold normal levels) and aspartate aminotransferase (1.5 to 12-fold normal levels). Hepatomegalia was noted only in 3 patients. Incorrect diagnoses such as ricketsia, celiac and metabolic diseases, hepatitis and hypobetalipoproteinemia were first formulated before CRD was pertinently discriminated. However, the commonest misdiagnosis was protein bovine allergy.

Histologically, in routine optical microscopy, the mucosa of biopsies taken from the duodenal region at fasting was of normal thickness with villi of typical height. Very often, the enterocytes were swollen up as a result of the presence of numerous lipid droplets. In electronic microscopy, these lipid droplets were of variable size in the case of the Canadian patients (Fig.1) and of homogeneous dimension in the case of the French patients (Fig.2). The lipid structures in the French patients' epithelium accumulated in membrane-bound vesicles throughout the cytoplasm, and ultrastructural analysis of the Canadian subjects displayed huge membrane-bound compartments even close to the basolateral membrane (Fig. 1 and 2).

The persistent, clinical complications after evolution are listed in Table 3. Few patients maintained high values of transaminases and three developed steatosis. Elevated activity of creatine kinase was detected in the plasma of 11 patients while myopathic changes were noted by electromyography in 4 individuals. Abnormal visual evoked potential testing was recorded in 3 patients and atypical electroretinogram was demonstrated in one subject, consistent with irregular neurological and ophthalmologic system functions. Furthermore, bone density was below normal values in most young patients.

Mutation spectrum of SARA2 gene in the patients with CRD in France and Canada is described in Table 4. By using PCR/SSCP and DNA sequencing, all exons of SARA2 gene in the 16 patients with CRD were studied. A total of 6 different mutations, including 4 missenses, 1 deletion and 1 splice were detected. In addition to known mutations (409G-A, 537T-A, 83-84delTG), 3 novel mutations were identified in the current investigation: 364G-T, exon2del and 554G-T, leading to E122X, deletion of the first 43 amino acids, and G185V, respectively, in the Sar1 GTPase protein. The mutations 364G-T and 409G-A were the prevalent molecular aberrations with relative frequencies of 23.5 and 17.6%, respectively. The other relative frequencies of Exon2del, 554G-T, 537T-A and 83-84delTG were 5.9, 5.9, 11.8 and 5.9%. Evidently, the mutation spectrum of SARA2 in France is different from that of the Canadian population.

Plasma lipids, lipoprotein cholesterol and apos in all study subjects (~12-year-old) are given in Table 5. The CRD patients were characterized by marked hypocholesterolemia



coupled with a decrease in both free cholesterol and esterified cholesterol as well as in phospholipids, when compared to healthy age- and sex-matched controls recruited from Canada and France. The low plasma cholesterol was largely accounted for by the limited cholesterol content of both LDL and HDL lipoprotein. Accordingly, the protein moieties of LDL and HDL, apos B and A-I, respectively, were decreased. Importantly, the Canadian cohort was more affected in its levels of total cholesterol, esterified cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol in comparison with the French cohort.

The plasma FA composition of the CRD patients (~12-year-old) displayed several significant differences compared with those of the age- and sex-matched control subjects (Tables 6A and 6B). For example, the proportion of palmitic, stearic and oleic acids was significantly higher in CRD patients whereas the percentage of their essential fatty acids (EFA), linoleic and alpha-linolenic acids, was lower. The overall percentages of the various FA species and the ratios of FAs relevant for the assessment of EFA deficiency were also altered in CRD patients. Proportions of both n-3 ( $\alpha$ -linolenic acid) and n-6 (linoleic acid) EFA precursors were lower in CRD patients than in control subjects, whereas proportions of saturated and monounsaturated (n-7 and n-9) FAs were higher. The ratios of eicosatrienoic (20:3n-9) to arachidonic acid (20:4n-6) and of palmitoleic acid (16:1n-7) to linoleic acid (18:2n-6), established indexes of EFA status, were higher in CRD patients than in control subjects, confirming EFA reduction in CRD patients (Table 7).

Long-term evolution of lipids, lipoproteins, apos, liposoluble vitamins and plasma transaminases and muscular enzymes was assessed by comparing the data early at age of diagnosis and afterwards at ~12 years. Figure 3 depicts the different parameter patterns in

the Canadian and French subjects. A slight improvement, although not significant, was noticed in the levels of total cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol (Fig.3) as well as apo A-I (Fig.4) of French patients, whereas a worsening was observed in similar determinations of Canadian patients. On the other hand, both cohorts exhibit amelioration in the plasma levels of vitamins A, E and D even though normal concentrations of vitamins A and E were not attained (Fig. 5).

The next step in our study was to clarify whether the SARA2 mutations influence the clinical and biochemical phenotypes of the CRD patients. The clinical outcome of French patients with the 364G>T, 554 G>T and the deletion of exon 2 was worse than that of the Canadian patients with 409G>A and 537T>A as well as the heterozygote compound 409G>A regarding growth (height and weight), AST transaminase, neuromuscular evaluation, ophthalmologic findings, bone density and plasmatic vitamins (Table 8). On the other hand, the plasma lipids were more affected in the Canadian subjects. Interestingly, in relation with CK values, minimal abnormalities were noted in a muscle biopsy obtained from a Canadian patient. We could observe disorganization in focal Z line, which apparently affected a few sarcomers. Additionally, a loss of Z lines was apparent as illustrated in Figure 6.

## DISCUSSION

Intestinal cells synthesize and secrete CM in the postprandial state. Our previous work showed that the production of these particles is faulty in CRD (22; 23), a disorder caused by defective SARA2 gene. Using the largest cohort so far described, we substantiated the involvement of SARA2 abnormalities in alimentary fat absorption, identified new mutations potentially affecting the affinity of the encoded Sar1 GTPase protein to COPII sec23 component, compared the distribution of SARA2 mutations in two subgroups originating from Canada and France, provided the longitudinal clinical course and response to treatments and attempted to assess the genotype-phenotype associations.

Molecular analysis of the SARA2 gene from patients with CRD has allowed the characterization and distribution of different types of mutations in this gene. One new missense mutation in exon 6, 364G>T (E122X), is exclusively and most commonly expressed in French patients. Its frequency among the cohort of 16 subjects is 25%. Deletion of exon 2 and 554G>T in exon 7 represent the additional novel mutations detected in the French cohort only, with the respective frequency of 12,5% and 6.25%. All these novel mutations are predicted to diminish the affinity either for Sec23 or for GDP/GTP, which may affect the trafficking of secretory proteins (necessary for CM exocytosis) between the ER and the Golgi apparatus. The other obvious mutations have been already reported by Jones *et al.* (24) and were noticeable in the Canadian cohort with the relative distribution of 18.75% for 409 G>A in exon 6, 12.5% for 537 T>A in exon 7, and 6.25% for 83-84delTG in exon 3. These known mutations would reduce or totally eliminate the affinity for GDP/GTP, thereby inhibiting Sar1 GTP hydrolysis and stabilization of Sar1 membrane binding.

The sex ratio female/male in our study is equivalent to 1. Although previous studies reported less females than males suffering of CRD (25; 26), the autosomal transmission of CRD is now well established and our results using a large cohort confirm that males and females have the same risk of developing the disease with comparable phenotypes. Interestingly, the two subgroups in our cohort have different ethnic origins. The Canadian patients are all French Canadian, but the French subjects are from three different origins: Turkey, Algeria and Portugal. The majority of previous cases mentioned in the scientific literature were in fact from North Africa (27-29). Therefore, our cohort is largely representative of the patients all over the world and probably includes most of the CRD mutations that have distinctly been split into the two subgroups. Additionally, the rate of consanguinity is elevated in the French subgroup where 6 out of 7 parents are cousins, while only one case of consanguinity has been spotted among the Canadian patients. However, the Canadian cohort is characterized by only 3 mutations, which concurs with the homogeneous genetic background of French Canadians.

To our knowledge, this is the largest described cohort with genetically confirmed CRD and it provides a unique opportunity to define the relationship between molecular defects and disease severity. The French group carrying the mutations 364G>T, 554 G>T and exon 2 deletion exhibited more severe clinical manifestations than the Canadian group harboring the mutations 409G>A, 537T>A and the combined mutant alleles L28fsX34-D137N. The French patients exhibited more: (i) delayed diagnosis with potential repercussions on growth and neurological system function; (ii) growth retardation without catching up evidence; (iii) bone demineralization; (iv) marked and frequent neurological and

ophthalmological abnormalities such as areflexia, elevated CK values and pathological electromyography; and (v) deficiency in vitamins A, D and E at diagnosis as well as decreased levels of vitamins A and E with advancing age. On the other hand, the Canadian patients visibly had lower concentrations of EFAs, lipids and lipoprotein-cholesterol in comparison with the French individuals. Presently, it may be hazardous to ascribe this segregation of clinical and biochemical parameters to the distinct mutations discriminating between Canadian and French patients. In fact, the genotype-phenotype correlations remain difficult owing to the large variations of mutations and complex protein structure as well as the function and heterogeneity of phenotypes. In particular, one cannot count on the "gold standard" 72-h fecal test to uncover the precise degree of malabsorption as a function of a specific molecular aberration since this technique suffers from important limitations. The fecal test relies on the quantitative relationship between dietary intake of fat and its stool excretion. However, it is complicated to discern whether patients consumed an adequate and known intake of fat for at least 72 hours and collect all stools corresponding to this period of intake. The issues regarding patient compliance and quantitative collection of stools together with the levels of steatorrhea in our patients, which were irrespective of the diverse molecular defects, do not allow us to establish the genotype-phenotype relationship.

The institution of a low-fat diet supplemented with lipid soluble vitamins and EFA has lessened gastrointestinal symptoms. According to our data, there was however obvious deficiency signs of EFA and lipid soluble vitamins, which persisted with age progression. Modification of the FA and vitamin profiles may be due to reduced dietary intake and fat malabsorption, which may explain growth faltering in several patients since growth failure and ocular and neurological complications have been found correlated with defects in EFA

and vitamin status (30; 31). Importantly, these abnormalities may be preventable by replacing vitamins A and E as well as EFA from an early stage and by maintaining a close follow-up.

In the present investigation and previous studies, histological analysis pointed out the normal presence of brush-border membrane along with excessive fat droplets in the enterocytes of fasted patients with CRD (32). The comparison of the French and Canadian patients revealed that intestinal biopsies are heterogeneous in appearance. Lipid-laden enterocytes were characterized by smaller lipid droplets scattered throughout the cytoplasm in the former subjects. Examination of the Canadian biopsies at higher magnification showed the heterogeneous nature of the lipid particles that frequently skewed toward larger sizes, but no lipid particles were evident in the interstitium between adjacent enterocytes. Many of the lipid droplets were situated in membrane-bound vesicles in the French and Canadian patients. The identity of the membrane-bound compartment is not clear. Since COPII-coated vesicles cannot bud from the ER and export newly synthesised proteins and CM towards the Golgi in view of the Sar1 GTPase mutations, we propose that the cytoplasmic membrane-bound vesicles derive from the breakdown of the ER compartments. Additional studies are obviously necessary to delineate the intracellular defective mechanisms in CRD since previous studies suggested that the lipoprotein-sized particles were present in the ER and the Golgi apparatus (33; 34). In order to establish whether Sar1 ATPase deficiency affects the morphology of muscle, we analyse the ultra structural aspect of the muscular tissue of a Canadian patients. Our findings denoted a focal disorganization of the Z line with the loss of a few Z lines in specific regions of the muscle specimen. Of interest was the absence of lipid droplets or lipofuscin inclusions despite Sar1

GTPase deficiency. Obviously, these data are novel since no information related to muscle morphology is available in CRD patients despite the evidence reported in abetalipoproteinemia (35).

In conclusion, our study's strengths lie in the following: (1) it is the most important cohort to be published to date, since among the forty odd cases previously described, only two cohorts were present, made up of 7 and 8 subjects each; (2) the description of the subjects' phenotype is especially exhaustive, both clinically and biologically, thereby providing new data on the clinical expression of this disease; (3) the subjects benefited from very long-term follow-up (an average of 5 y for the French cohort and 10 y for the Canadian, with some subjects receiving follow-up over more than 20 y); and finally (4) this is the first work to compare phenotype with genotype in CRD. The scientific contribution of this work includes the discovery of new mutations, a description of new phenotype data (myolysis, absence of myocardial impairment) or the precise measurement of previously known but unquantified clinical symptoms (e.g., bone demineralization).

**Acknowledgments**

This study was supported by the Research grant (MT 10583) from the Canadian Institutes of health Research and Quebec Nutraceuticals and Functional foods Institute (INAF). We thank N Allos, C Jacobs, J Castagnetti, Sonia Gingras and L Bouthillier for their valuable contribution. We acknowledge the expert secretarial assistance of Schohraya Spahis



**Table 1: Baseline Characteristics of the Canadian and the French Cohorts**

	<b>Canadian</b>	<b>French</b>	<i>P</i>
<b>Characteristics</b>	(n=9)	(n=7)	
Age (years)	12 ± 2.5	11.3 ± 1.7	<i>NS</i>
Sex (female/male)	4/5	4/3	
Consanguinity	1/9	6/7	
<b>Percentile at birth</b>			
Weight	50 ± 10	40 ± 10	<i>NS</i>
height	55 ± 10	50 ± 5	<i>NS</i>
<b>Percentile at diagnosis</b>			
Weight	30 ± 10	25 ± 5	<i>NS</i>
Height	20 ± 5	20 ± 5	<i>NS</i>
<b>Percentile within the study</b>			
Weight	50 ± 10	25 ± 5	<i>0.04</i>
Height	40 ± 10	15 ± 5	<i>0.02</i>
Onset of symptoms (month)	2.3 ± 0.7	1.4 ± 0.3	<i>NS</i>
Type of first symptoms	FTT, diarrhea, vomiting, abdominal distension,		
Age at diagnosis (year)	1.5 ± 1	6.4 ± 1.3	<i>0.01</i>
Follow-up (year)	10.6 ± 2	4.9 ± 0.8	<i>0.03</i>

FTT, Failure to thrive

**Table 2 : Individual Findings at Diagnosis**

Patients	FTT	Digestive Symptoms		Hepatic Evaluation			Previous Diagnosis
		Diarrhea	Vomiting	ALT	AST	US	
<b>French</b>							
1-1	+	+	+	N	3N	N	Metabolic Disorder
1-2	+	+	+	N	1.5N	HM	Ricketsia
1-3	-	+	+	2.5N	3N	N	Bovin Protein Allergy
1-4	-	+	+	1.5N	2N	N	Bovin Protein Allergy
2-1	+	+	-	1.5N	3N	HM	Bovin Protein Allergy
2-2	+	+	-	2N	2N	N	Bovin Protein Allergy
3-1	+	+	-	N	1.5N	N	Celiac Disease
<b>Canadian</b>							
4-1	+	+	+	1.5N	N	N	Bovin Protein Allergy
5-1	+	+	+	2N	2N	N	Celiac Disease
6-1	+	+	+	17N	12N	N	Hepatitis
7-1	-	+	+	2N	N	HM	Hypocholesterolemia
7-2	+	+	+	2N	N	N	Bovin Protein Allergy
8-1	+	+	+	3N	N	N	Bovin Protein Allergy
8-2	+	+	+	7N	4N	N	Bovin Protein Allergy
9-1	+	+	-	3N	4N	N	Bovin Protein Allergy
9-2	-	+	-	1.5N	N	N	Hypobetalipoproteinemia
ALT, Alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CK, creatine kinase; HM, hepatomagalia; EMG, electromyogram; VEP, visual evoked potential; ERG, electroretinogram; N, normal; FTT, Failure to thrive							

Table 3 : Individual Clinical Findings after long-term follow-up

Patient	Growth (percentil)		Hepatic Evaluation			Muscular Evaluation			Ophtalmologic			Bone density (L2-L4 Z-score)
	Height	Weight	ALT	AST	US	CK	EMG	VEP	ERG	ERG		
<b>French</b>												
1-1	5th	10th	N	2N	N	2N	N	N	+	N	N	-3
1-2	5th	25th	N	N	N	1.7N	+	+	+	N	N	-2.4
1-3	25th	25th	2N	3N	steatosis	4N	+	+	N	N	N	-2.2
1-4	50th	50th	N	1.5N	N	6N	+	+	+	N	N	-3.6
2-1	10th	30th	1.5N	1.5N	N	5N	N	N	N	N	N	-1.6
2-2	10th	10th	N	N	N	1.5N	N	N	N	N	N	-1.2
3-1	10th	25th	N	N	N	N	NA	NA	NA	NA	NA	-3.2
<b>Canadian</b>												
4-1	75th	95th	2N	N	N	1.5	N	N	N	N	N	+3.1
5-1	50th	50th	1.5N	N	N	N	N	N	N	N	N	+0.7
6-1	10th	50th	3N	N	steatosis	N	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7-1	25th	25th	1.5N	N	N	N	N	N	N	N	N	-2.3
7-2	25th	50th	1.2N	N	N	N	N	N	N	N	N	-0.5
8-1	50th	50th	N	N	steatosis	2N	N	N	N	+	+	-1.1
8-2	40th	40th	N	N	N	1.5N	+	+	N	N	N	-1.5
9-1	25th	10th	N	N	N	1.5N	N	N	N	N	N	-0.5
9-2	50th	50th	2N	N	N	2N	N	N	N	N	N	+0.1

ALT, Alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CK, creatine kinase; HM, hepatomagalia; EMG, electromyogram; VEP, visual evoked potential; ERG, electroretinogram; N, normal; NA, not available.

Table 4: SARA2 Mutations and Potential Impact on Sar1GTPase Functioning

Patients	Origin	Status	SARA2 Mutations	Amino-Acid Change	Functional Site Affected	Predicted Effect on Function
1-1, 1-2, 1-3, 1-4	Turkey	Hom	Exon 6, 364G>T	E122X	Sec23 Binding Motif ( $\alpha$ -helix 6)	No Affinity for Sec23
2-1, 2-2	Algeria	Hom	Exon2 Del	43 first AA lost	Guanine Binding Motif Sec23 Binding Motif ( $\alpha$ -helix 2)	$\downarrow$ Affinity for GDP/GTP $\downarrow$ Affinity for Sec23
3-1	Portugal	Hom	Exon 7, 554G>T	G185V	Guanine Binding Motif	No Affinity for GDP/GTP
5-1, 9-1, 9-2	Canada	Hom	Exon 6, 409G>A	D137N	Guanine Binding Motif	$\downarrow$ Affinity for GDP/GTP
4-1	Canada	Het	Exon 6, 409G>A Exon 3, 83-84delITG	D137N L28fsX34	Guanine Binding Motif Sec12 binding Motif	$\downarrow$ Affinity for GDP/GTP No Affinity for GDP/GTP
7-1, 7-2	Canada	Het	Exon 6, 409G>A Exon 7, 537T>A	D137N S179R	Guanine Binding Motif Guanine Binding Motif	No Affinity for GDP/GTP No Affinity for GDP/GTP
6-1, 8-1, 8-2	Canada	Hom	Exon 7, 537T>A	S179R	Guanine Binding Motif	No Affinity for GDP/GTP

**Table 5: Lipids and Apolipoproteins between Controls and Patients Following Evolution**

Lipids	Total Subjects		Canadian Group		French Group	
	Controls (n=16)	Patients (n=16)	Controls (n=9)	Patients (n=9)	Controls (n=7)	Patients (n=7)
TG (mmol/L)	0.81 ± 0.36	0.75 ± 0.29	0.73 ± 0.21	0.76 ± 0.35	0.90 ± 0.50	0.73 ± 0.21
TC (mmol/L)	3.69 ± 0.63	1.77 ± 0.58 ***	3.73 ± 0.80	1.49 ± 0.56 ***	3.64 ± 0.37	2.13 ± 0.40 *** ††
EC (mmol/L)	2.74 ± 0.51	0.69 ± 0.24 ***	2.79 ± 0.65	0.58 ± 0.15 ***	2.68 ± 0.27	0.83 ± 0.28 *** †
EC (% of TC)	74.18 ± 1.79	40.43 ± 11.68 ***	74.44 ± 2.24	41.00 ± 10.09 ***	73.85 ± 1.06	39.71 ± 14.33 ***
PL (mmol/L)	3.5 ± 0.28	1.22 ± 0.14 ***	3.55 ± 0.19	1.21 ± 0.13 ***	3.44 ± 0.36	1.24 ± 0.15 ***
HDL-C (mmol/L)	1.08 ± 0.22	0.51 ± 0.10 ***	1.07 ± 0.22	0.46 ± 0.08 ***	1.11 ± 0.24	0.57 ± 0.09 *** ††
LDL-C (mmol/L)	2.23 ± 0.51	0.95 ± 0.49 ***	2.33 ± 0.64	0.69 ± 0.38 ***	2.11 ± 0.25	1.28 ± 0.42 *** †††
ApoA-I (g/L)	1.07 ± 0.17	0.56 ± 0.09 ***	1.05 ± 0.19	0.56 ± 0.11 ***	1.09 ± 0.15	0.55 ± 0.05 ***
ApoB (g/L)	0.64 ± 0.13	0.42 ± 0.13 ***	0.66 ± 0.18	0.40 ± 0.15 *	0.62 ± 0.06	0.45 ± 0.10 **

TG, triglycerides; TC, Total Cholesterol; CE, Cholesteryl Ester; PL, Phospholipid; LDL-C, LDL-Cholesterol; HDL-C, LDL-Cholesterol  
 \* p=0.004 patient versus control, † p=0.04 French patients versus Canadian patients, \*\* p=0.002 patient versus control, †† p=0.02 French patients versus Canadian patients, \*\*\* p=0.001 patients versus controls, ††† p=0.01 French patients versus Canadian patients

**Table 6-A Plasma fatty profile in CRD patients and age-matched and sex-matched control subjects**

Fatty acids		Total Subjects		
		Controls (n=16)	Patients (n=16)	<i>P</i>
		<i>mol%</i>		
Myristique	C14:0	1.34 ± 0.59	1.6 ± 0.46	<i>NS</i>
Pentadecanoique	C15:0	0.31 ± 0.13	0.22 ± 0.05	<i>0.03</i>
Palmitique	C16:0	25.70 ± 1.59	28.05 ± 4.15	<i>0.05</i>
Heptadecanoique	C17:0	0.33 ± 0.05	0.34 ± 0.11	<i>NS</i>
Stearique	C18:0	6.42 ± 1.19	7.76 ± 1.28	<i>0.005</i>
Arachidique	C20:0	0.19 ± 0.03	0.25 ± 0.12	<i>NS</i>
Behenique	C22:0	0.44 ± 0.08	0.21 ± 0.89	<i>0.001</i>
Lignocerique	C24:0	0.59 ± 0.61	0.29 ± 0.22	<i>NS</i>
Oleique	C18:1(n-9)	10.31 ± 2.59	24.27 ± 4.51	<i>0.001</i>
Eicosaenoique	C20:1(n-9)	0.20 ± 0.11	0.23 ± 0.09	<i>NS</i>
Eicosatrienoique-cis5,8,11	C20:3(n-9)	0.08 ± 0.3	0.19 ± 0.13	<i>0.005</i>
Nervonique	C24:1(n-9)	0.62 ± 0.11	0.93 ± 0.47	<i>0.02</i>
Palmitelaidique	C16:1(n-9) Trans	0.06 ± 0.12	0.32 ± 0.35	<i>0.01</i>
Elaidique	C18:1(n-9) Trans	0.28 ± 0.10	0.13 ± 0.08	<i>0.001</i>
Palmitoleique	C16:1(n-7)	1.96 ± 0.64	4.3 ± 1.24	<i>0.001</i>
Vaccenique	C18:1(n-7)	1.44 ± 0.16	2.70 ± 0.87	<i>0.001</i>
Linoleique	C18:2(n-6)	31.7 ± 3.19	13.02 ± 3.44	<i>0.001</i>
γ-Linolenique	C18:3(n-6)	0.37 ± 0.15	0.48 ± 0.17	<i>NS</i>
Homo-γ-Linolenique	C20:3(n-6)	1.17 ± 0.36	1.75 ± 0.44	<i>0.001</i>
Arachidonique	C20:4(n-6)	5.20 ± 1.28	6.49 ± 1.71	<i>0.02</i>
Eicosadienoique	C20:2(n-6)	0.13 ± 0.02	0.18 ± 0.05	<i>0.006</i>
α-Linolenique	C18:3(n-3)	0.77 ± 0.37	0.44 ± 0.19	<i>0.004</i>
EPA	C20:5(n-3)	0.30 ± 0.12	0.46 ± 0.30	<i>NS</i>
DPA	C22:5(n-3)	0.26 ± 0.06	0.51 ± 0.24	<i>0.001</i>
DHA	C22:6(n-3)	0.94 ± 0.36	2.64 ± 1.52	<i>0.001</i>

Table 6-B Plasma fatty profile in CRD patients and age-matched and sex-matched control subjects

Fatty acids	Canadian Subjects		French Subjects		P
	Controls (n=9)	Patients (n=9)	Controls (n=7)	Patients (n=7)	
Myristique	1.17 ± 0.39	1.78 ± 0.43	1.55 ± 0.75	1.37 ± 0.41	NS
Pentadecanoique	0.31 ± 0.82	0.20 ± 0.05	0.31 ± 0.19	0.25 ± 0.02	NS
Palmitique	26.05 ± 1.64	30.95 ± 2.64	25.25 ± 1.53	24.31 ± 2.23	NS
Heptadecanoique	0.33 ± 0.25	0.29 ± 0.09	0.34 ± 0.08	0.41 ± 0.11	NS
Stearique	6.25 ± 0.74	7.59 ± 1.32	6.63 ± 1.65	7.97 ± 1.31	NS
Arachidique	0.20 ± 0.03	0.25 ± 0.13	0.18 ± 0.24	0.26 ± 0.12	NS
Behenique	0.45 ± 0.08	0.25 ± 0.067	0.42 ± 0.08	1.57 ± 0.08	0.001
Lignocerique	0.05 ± 0.58	0.14 ± 0.05	0.60 ± 0.71	0.48 ± 0.21	NS
Oleique	19.14 ± 2.18	22.9 ± 3.38	19.54 ± 3.21	26.03 ± 5.41	0.02
Eicosanoique	0.22 ± 0.14	0.23 ± 0.06	0.17 ± 0.06	0.23 ± 0.12	NS
Eicosatrienoique-cis5,8,11	0.09 ± 0.01	0.29 ± 0.08	0.08 ± 0.05	0.07 ± 0.02	NS
Nervonique	0.64 ± 0.10	1.26 ± 0.31	0.59 ± 0.13	0.51 ± 0.25	NS
Palmitelaidique	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.067 ± 0.01	0.70 ± 1.35	0.001
Elaidique	0.04 ± 0.13	0.83 ± 0.29	0.26 ± 0.06	0.19 ± 0.07	NS
Palmitoleique	2.02 ± 0.69	4.94 ± 1.12	1.88 ± 0.62	3.49 ± 0.92	0.002
Vaccenique	1.46 ± 0.15	2.84 ± 1.07	1.42 ± 0.19	2.5 ± 0.53	0.001
Linoleique	30.16 ± 2.59	11.23 ± 2.19	33.71 ± 2.87	15.32 ± 3.5	0.001
γ-Linolenique	0.39 ± 0.14	0.48 ± 0.19	0.35 ± 0.17	0.48 ± 0.14	NS
Homo-γ-Linolenique	1.18 ± 0.23	1.61 ± 0.36	1.15 ± 0.51	1.92 ± 0.49	0.01
Arachidonique	5.2 ± 0.84	6.65 ± 1.58	5.14 ± 1.77	6.28 ± 1.97	NS
Eicosadienoique	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.21 ± 0.05	0.005
α-Linolenique	0.68 ± 0.24	0.38 ± 0.15	0.89 ± 0.48	0.51 ± 0.23	NS
EPA	0.32 ± 0.13	0.31 ± 0.10	0.27 ± 0.12	0.65 ± 0.38	0.04
DPA	0.25 ± 0.04	0.45 ± 0.17	0.28 ± 0.07	0.59 ± 0.31	0.04
DHA	0.93 ± 0.33	1.82 ± 0.73	0.96 ± 0.42	3.69 ± 1.67	0.004

Table 7 Fatty acid ratios and index of fatty acid deficiency

Fatty acids	Total Subjects		Canadian Group		French Group		P
	Controls (n=16)	Patients (n=16)	Controls (n=9)	Patients (n=9)	Controls (n=7)	Patients (n=7)	
PUFA/saturés	1.28 ± 0.57	0.57 ± 0.09	1.11 ± 0.10	0.56 ± 0.11	1.5 ± 0.84	0.57 ± 0.08	0.01
20:3(n-9)/20:4(n-6)	0.01 ± 0.005	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.005	0.04 ± 0.02	0.01 ± 0.004	0.01 ± 0.004	NS
n-6/n-3	17.04 ± 2.96	7.18 ± 6.06	17.05 ± 2.92	8.9 ± 7.5	17.07 ± 3.24	4.92 ± 2.33	0.001
EPA/DHA	0.33 ± 0.10	0.21 ± 0.13	0.36 ± 0.12	0.22 ± 0.15	0.29 ± 0.63	0.20 ± 0.10	NS
DHA/AA	0.18 ± 0.04	0.43 ± 0.31	0.17 ± 0.05	0.26 ± 0.10	0.18 ± 0.04	0.64 ± 0.37	0.02
ALA/EPA	3.01 ± 1.92	1.31 ± 1.07	2.50 ± 1.51	1.31 ± 0.44	3.67 ± 2.33	1.31 ± 1.61	0.04
ALA/LA	0.24 ± 0.11	0.035 ± 0.12	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.34 ± 0.01	NS
LA/ALA	46.91 ± 14.62	33.90 ± 14.64	48.10 ± 12.23	32.72 ± 14.01	45.38 ± 18.17	35.4 ± 16.43	NS



Table 8 Association between genotype and phenotype at advancing age

SARA2 mutation	exon 6 364 G>T E122>X homozyg	del exon 2 homozyg	exon 7 554 G>T G185>V homozyg	exon 6 409 G>A D137N homozyg	exon 6 409G>A exon3 83-84 del TG	exon 6 409 G>A exon 7 537 T>A	exon 7 537 T>A S179R homozyg
<b>Patients</b>	n=4	n=2	n=1	n=3	n=1	n=2	n=3
Ethnic origin	1-1, 1-2, 1-3, 1-4 French	2-1, 2-2 French	3-1 French	5-1, 9-1, 9-2 Canadian	4-1 Canadian	7-1, 7-2 Canadian	6-1, 8-1, 8-2 Canadian
Age at screening (years)	12,7 ± 2y	12 ± 1y	4y	9,5 ± 1y	22y	8,7 ± 3,2y	13,5 ± 6,6y
<b>Growth</b>							
Height (percentile)	21 ± 20th	10th	10th	41 ± 14th	75th	25th	33 ± 20th
Weight (percentile)	27 ± 16th	20 ± 14th	25th	36 ± 23th	95th	37 ± 17th	46 ± 5th
<b>Hepatic Evaluation</b>							
ALT (x Normal Value)	1.2 ± 0.5 N	1.2 ± 0.3 N	N	1.5 ± 0.5 N	2 N	1.3 ± 0.2 N	1.6 ± 1.1 N
AST (x Normal Value)	1.8 ± 0.8 N	1.2 ± 0.3 N	N	N	N	N	N
Steatosis (n=)	1	N	N	N	N	N	2
<b>Neuromuscular Evaluation</b>							
CK (x Normal Value)	3.4 ± 2 N	3.2 ± 2.4 N	N	1.5 ± 0.5	1.5	N	N
EMG (n=)	3	N	?	N	N	N	1
<b>Ophthalmologic Evaluation</b>							
VEP (n=)	3	N	?	N	N	N	N
ERG (n=)	N	N	?	N	N	N	1
<b>Bone</b>							
<b>Lipid Screening (mmol/L)</b>							
Triglycerides	0,73 ± 0,14	0,72 ± 0,13	0,76	0,54 ± 0,13	0,41	0,72 ± 0,18	1,12 ± 0,17
Total Cholesterol	1,89 ± 0,1	2,6 ± 0,24	2,09	1,13 ± 0,13	1,45	1,25 ± 0,14	2,04 ± 0,39
Esterified cholesterol (% of TC)	0,72 ± 0,02	0,73 ± 0,01	1,47	0,48 ± 0,07	0,66	0,63 ± 0,04	0,62 ± 0,13
Phospholipids	1,18 ± 0,07	1,26 ± 0,1	1,42	1,2 ± 0,04	1,28	1,15 ± 0,03	1,24 ± 0,14
LDL-Cholesterol	0,99 ± 0,07	1,83 ± 0,19	1,36	0,46 ± 0,08	0,73	0,51 ± 0,1	1,02 ± 0,3
HDL-Cholesterol	0,62 ± 0,04	0,52 ± 0,01	0,45	0,42 ± 0,03	0,53	0,4 ± 0,04	0,51 ± 0,06
<b>Plasmatic Vitamins (% N)</b>							
Vitamin E	47 ± 12	65 ± 7		60 ± 22	75	67 ± 24	75 ± 5
Vitamin A	82 ± 17	90 ± 14		100	100	100	100

**FIGURE LEGENDS**

**FIGURE 1:** Ultrastructural examination of Canadian CRD patients' biopsies. The intestinal tissue specimens were obtained after a 12-h fast and examined by electronic microscopy. The micrograph of the upper panel (A) shows the apical pole of the enterocytes exhibiting well preserved microvilli and complete juxtaposition of intercellular membranes where lipid particles are absent. The absorptive cells also display fat droplets (of varying sizes) gorging the cytoplasm. X 7,000. The micrograph of the lower panel (B) illustrates the basolateral region of the enterocytes revealing lipoprotein-like particles clustered in membrane-bound compartments. Once again, there are not lipoprotein-like particles in the intercellular space. Fewer lipid droplets are noted. X 14,000.

**FIGURE 2:** Ultrastructural examination of French CRD patients' biopsies. The intestinal tissue specimens were obtained after a 12-h fast and examined by electronic microscopy. The micrograph of the upper panel (A) shows enterocytes swollen up with lipid droplets of more homogeneous size than those observed in the Canadian biopsies (Fig.1A). The intercellular is empty. The lower panel (B) depicts lipoprotein-like particles surrounded by membranes at the basolateral region.

**FIGURE 3:** Plasma lipids and lipoproteins at the time of diagnosis and after the follow-up in Canadian (n=9) and French (n=7) CRD patients. Dotted lines indicate the lowest limit of control range values.

\*p<0.05 vs. French counterpart; F p<0.005 follow-up vs. diagnosis.

TG, triglyceride; TC, total cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol.

**FIGURE 4:** Plasma apolipoproteins at the time of diagnosis and after the follow-up in Canadian (n=9) and French (n=7) CRD patients. Dotted lines indicate the lowest limit of control range values.

\*p<0.02 vs. French counterpart

Apo A-I, apolipoprotein A-I; Apo B, apolipoprotein B.

**FIGURE 5:** Plasma vitamins at the time of diagnosis and after the follow-up in Canadian (n=9) and French (n=7) CRD patients. 100% indicate the lowest limit of control range values. Values under 100% correspond to a deficiency. Absolute normal values are for vitamin E: 12 to 28 micromol/L, vitamin A: 1.05 to 2.8 micromol/L, vitamin D: 30 to 70 nanomol/l.

p<0.03 vs. French counterpart; F p<0.008 follow-up vs diagnosis;

F F p<0.001 follow-up vs diagnosis. Vit, vitamin.

**FIGURE 6:** Electron microscopy of a Canadian muscle biopsy. The black arrow indicates an abnormality in focal Z line of sarcomers, whereas the white arrow underlines a Z line loss X 8,900.

Figure 1:

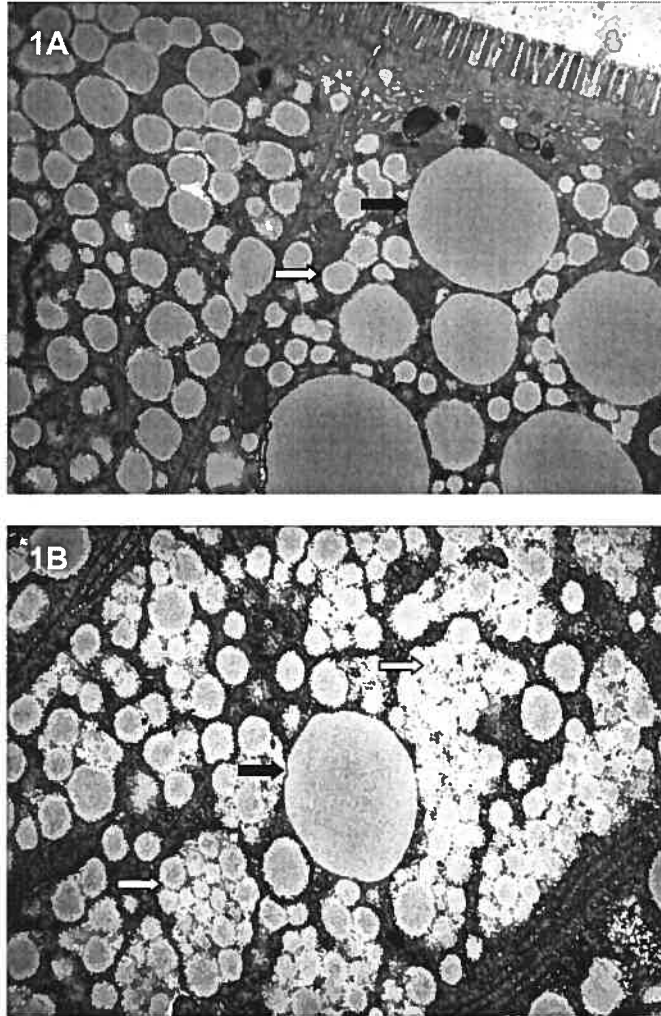


Figure 2:

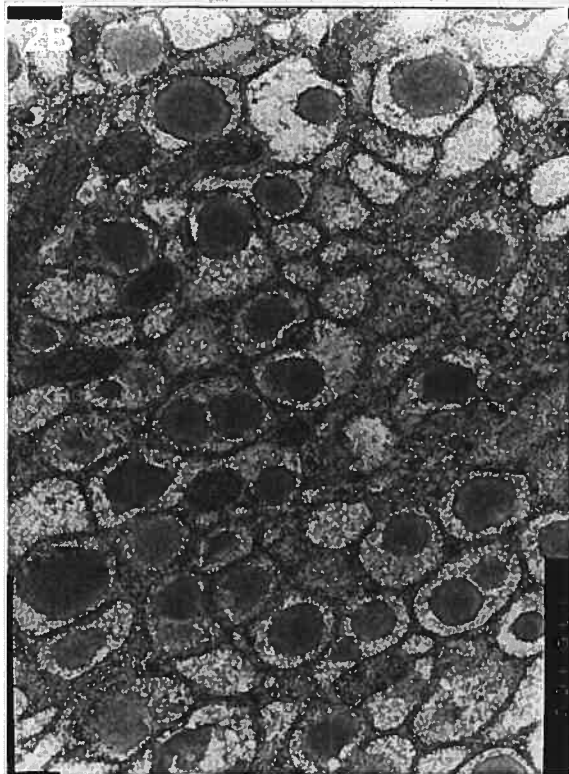
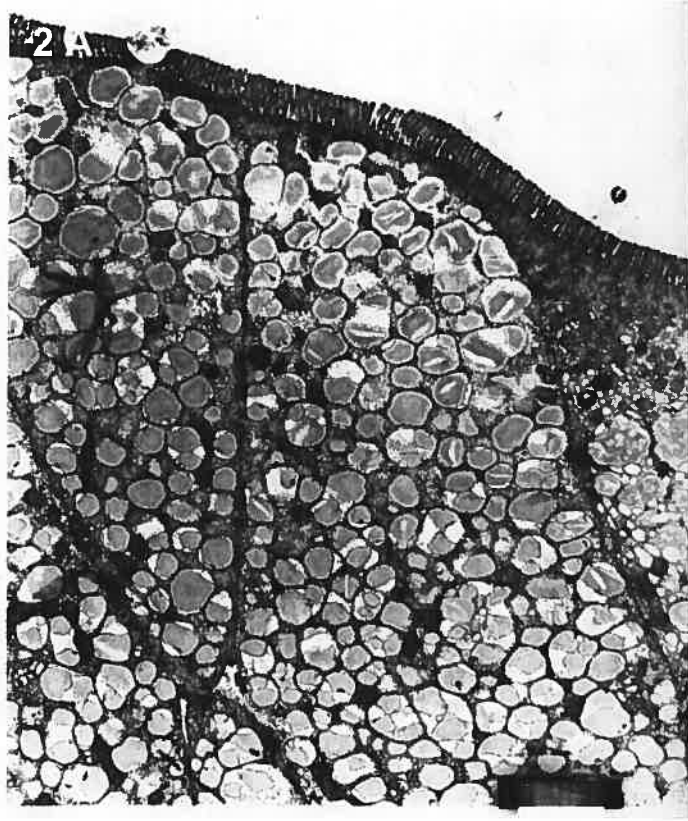


Figure 3

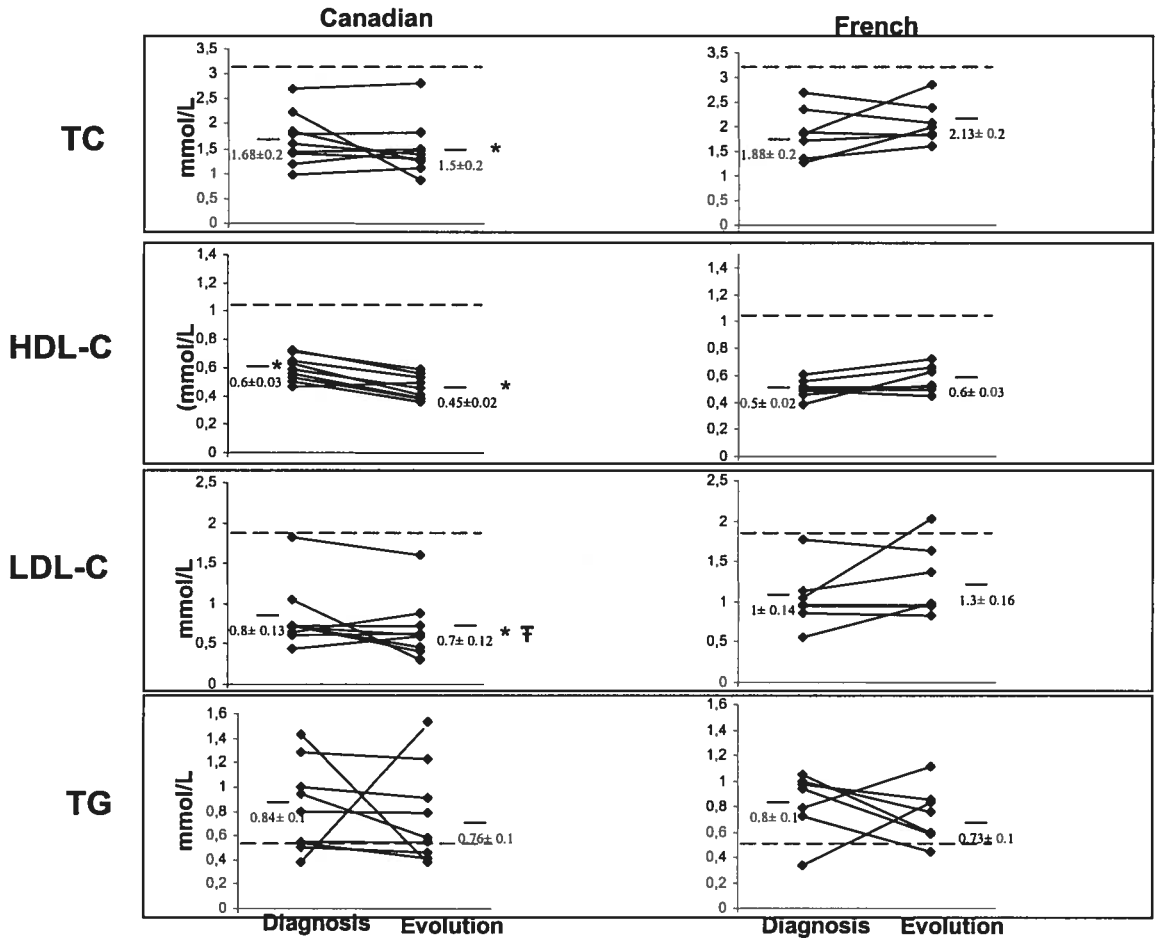


Figure 4

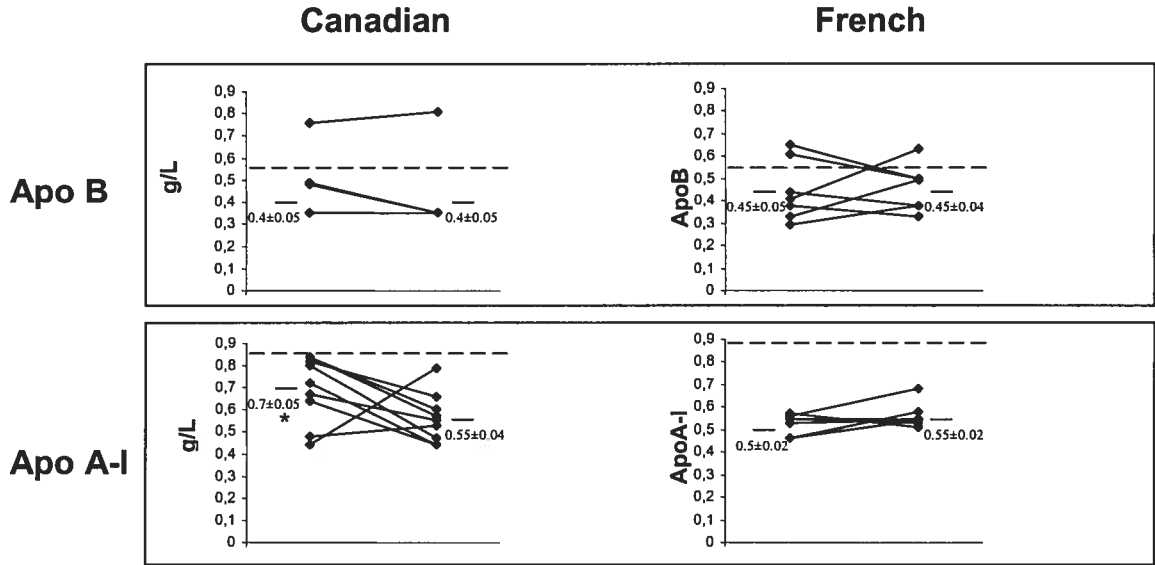


Figure 5

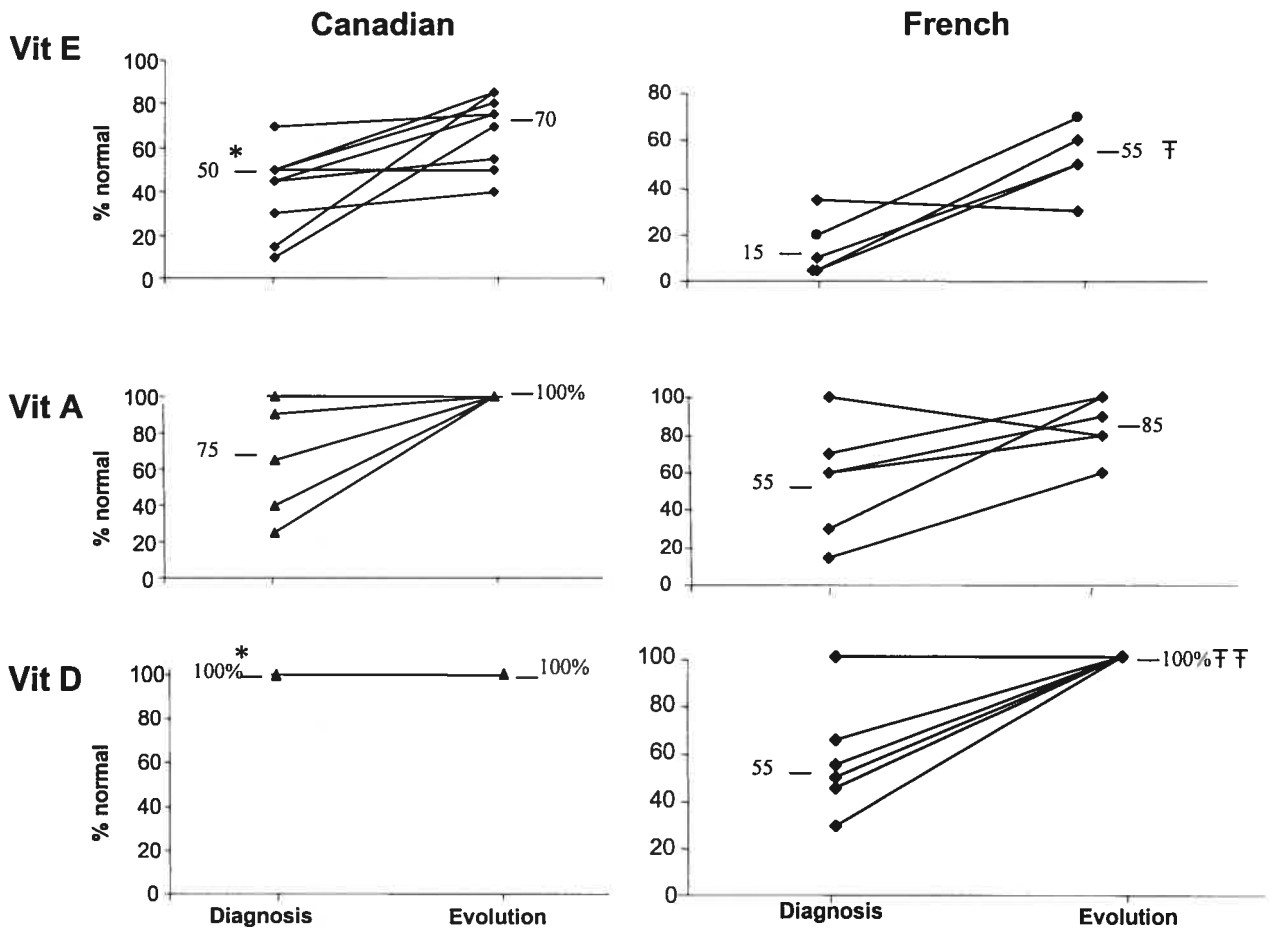
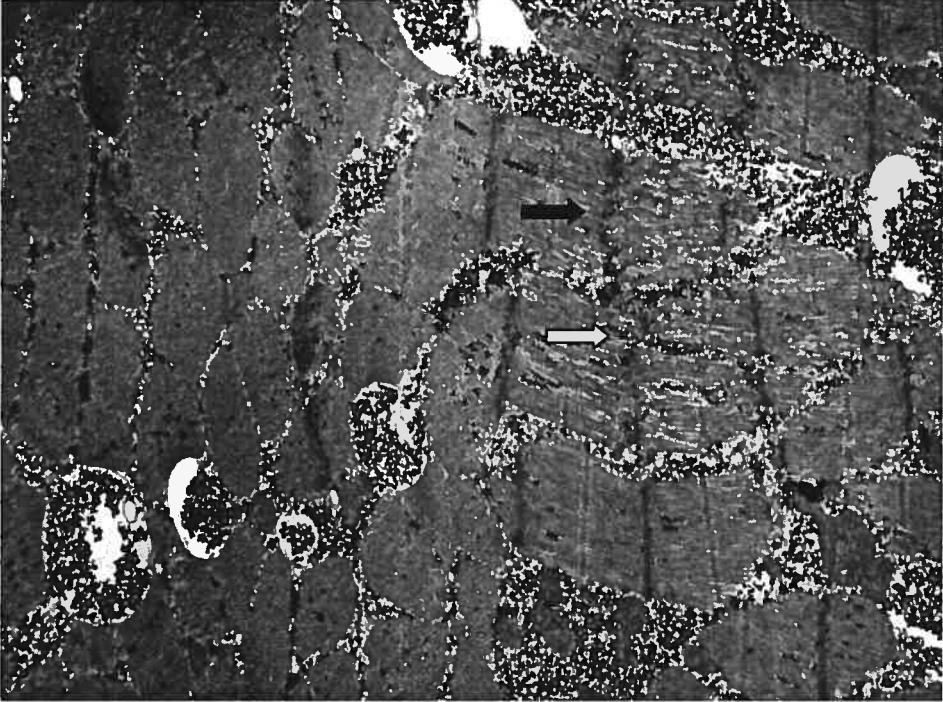




Figure 6



## REFERENCES

1. Hussain MM, Fatma S, Pan X, Iqbal J. Intestinal lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol* 2005;16:281-285.
2. Levy E, Bendayan M. Use of immunoelectron microscopy and intestinal models to explore the elaboration of apolipoproteins required for intraenterocyte lipid transport. *Microsc Res Tech* 2000;49:374-382.
3. Peretti N, Marcil V, Drouin E, Levy E. Mechanisms of lipid malabsorption in Cystic Fibrosis: the impact of essential fatty acids deficiency. *Nutr Metab (Lond)* 2005;2:11.
4. Young SG, Hubl ST, Chappell DA, Smith RS, Claiborne F, Snyder SM, Terdiman JF. Familial hypobetalipoproteinemia associated with a mutant species of apolipoprotein B (B-46). *N Engl J Med* 1989;320:1604-1610.
5. Schonfeld G, Lin X, Yue P. Familial hypobetalipoproteinemia: genetics and metabolism. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1372-1378.
6. Levy E, Roy CC, Thibault L, Bonin A, Brochu P, Seidman EG. Variable expression of familial heterozygous hypobetalipoproteinemia: transient malabsorption during infancy. *J Lipid Res* 1994;35:2170-2177.
7. Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader DJ, Gregg RE. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 1992;258:999-1001.
8. Sharp D, Blinderman L, Combs KA, Kienzle B, Ricci B, Wager-Smith K, Gil CM, Turk CW, Bouma ME, Rader DJ, . Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinaemia. *Nature* 1993;365:65-69.
9. Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, Rudling M, Myrdal U, Annesi G, Naik S, Meadows N, Quattrone A, Islam SA, Naoumova RP, Angelin B, Infante R, Levy E, Roy CC, Freemont PS, Scott J, Shoulders CC. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet* 2003;34:29-31.
10. Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 1994;77:895-907.
11. Barlowe C, Schekman R. SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* 1993;365:347-349.
12. Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, Rudling M, Myrdal U, Annesi G, Naik S, Meadows N, Quattrone A, Islam SA, Naoumova RP, Angelin B, Infante R, Levy E, Roy CC, Freemont PS, Scott J, Shoulders CC. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet* 2003;34:29-31.
13. Siddiqi SA, Gorelick FS, Mahan JT, Mansbach CM. COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci* 2003;116:415-427.

14. van dS, I, de Ridder MA, Boot AM, Krenning EP, de Muinck Keizer-Schrama SM. Reference data for bone density and body composition measured with dual energy x ray absorptiometry in white children and young adults. *Arch Dis Child* 2002;87:341-347.
15. Lepage G, Levy E, Ronco N, Smith L, Galeano N, Roy CC. Direct transesterification of plasma fatty acids for the diagnosis of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis. *J Lipid Res* 1989;30:1483-1490.
16. Levy E, Rizwan Y, Thibault L, Lepage G, Brunet S, Bouthillier L, Seidman E. Altered lipid profile, lipoprotein composition, and oxidant and antioxidant status in pediatric Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 2000;71:807-815.
17. Levy E, Thibault L, Garofalo C, Messier M, Lepage G, Ronco N, Roy CC. Combined (n-3 and n-6) essential fatty deficiency is a potent modulator of plasma lipids, lipoprotein composition, and lipolytic enzymes. *J Lipid Res* 1990;31:2009-2017.
18. Levy E, Thibault LA, Roy CC, Bendayan M, Lepage G, Letarte J. Circulating lipids and lipoproteins in glycogen storage disease type I with nocturnal intragastric feeding. *J Lipid Res* 1988;29:215-226.
19. Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 1959;234:466-468.
20. Levy E, Thibault L, Garofalo C, Messier M, Lepage G, Ronco N, Roy CC. Combined (n-3 and n-6) essential fatty deficiency is a potent modulator of plasma lipids, lipoprotein composition, and lipolytic enzymes. *J Lipid Res* 1990;31:2009-2017.
21. Levy E, Thibault LA, Roy CC, Bendayan M, Lepage G, Letarte J. Circulating lipids and lipoproteins in glycogen storage disease type I with nocturnal intragastric feeding. *J Lipid Res* 1988;29:215-226.
22. Levy E, Marcel Y, Deckelbaum RJ, Milne R, Lepage G, Seidman E, Bendayan M, Roy CC. Intestinal apoB synthesis, lipids, and lipoproteins in chylomicron retention disease. *J Lipid Res* 1987;28:1263-1274.
23. Roy CC, Levy E, Green PH, Sniderman A, Letarte J, Buts JP, Orquin J, Brochu P, Weber AM, Morin CL, . Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology* 1987;92:390-399.
24. Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, Rudling M, Myrdal U, Annesi G, Naik S, Meadows N, Quattrone A, Islam SA, Naoumova RP, Angelin B, Infante R, Levy E, Roy CC, Freemont PS, Scott J, Shoulders CC. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet* 2003;34:29-31.
25. Roy CC, Levy E, Green PH, Sniderman A, Letarte J, Buts JP, Orquin J, Brochu P, Weber AM, Morin CL, . Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology* 1987;92:390-399.
26. Lacaille F, Bratos M, Bouma ME, Jos J, Schmitz J, Rey J. [Anderson's disease. Clinical and morphologic study of 7 cases]. *Arch Fr Pediatr* 1989;46:491-498.

27. Lacaille F, Bratos M, Bouma ME, Jos J, Schmitz J, Rey J. [Anderson's disease. Clinical and morphologic study of 7 cases]. *Arch Fr Pediatr* 1989;46:491-498.
28. Bouma ME, Beucler I, Aggerbeck LP, Infante R, Schmitz J. Hypobetalipoproteinemia with accumulation of an apoprotein B-like protein in intestinal cells. Immunoenzymatic and biochemical characterization of seven cases of Anderson's disease. *J Clin Invest* 1986;78:398-410.
29. Pessah M, Benlian P, Beucler I, Loux N, Schmitz J, Junien C, Infante R. Anderson's disease: genetic exclusion of the apolipoprotein-B gene in two families. *J Clin Invest* 1991;87:367-370.
30. Fleith M, Clandinin MT. Dietary PUFA for preterm and term infants: review of clinical studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005;45:205-229.
31. Sen CK, Khanna S, Roy S. Tocotrienol: the natural vitamin E to defend the nervous system? *Ann N Y Acad Sci* 2004;1031:127-142.
32. Dannoura AH, Berriot-Varoqueaux N, Amati P, Abadie V, Verthier N, Schmitz J, Wetterau JR, Samson-Bouma ME, Aggerbeck LP. Anderson's disease: exclusion of apolipoprotein and intracellular lipid transport genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2494-2508.
33. Polonovski C, Navarro J, Fontaine JL, de GF, Saudubray JM, Cathelineau L. [Anderson's disease]. *Ann Pediatr (Paris)* 1970;17:342-354.
34. Nemeth A, Myrdal U, Veress B, Rudling M, Berglund L, Angelin B. Studies on lipoprotein metabolism in a family with jejunal chylomicron retention. *Eur J Clin Invest* 1995;25:271-280.
35. Lazaro RP, Dentinger MP, Rodichok LD, Barron KD, Satya-Murti S. Muscle pathology in Bassen-Kornzweig syndrome and vitamin E deficiency. *Am J Clin Pathol* 1986;86:378-387.

**Article 5 soumis à :**

**Pediatrics**

**Recommendations for diagnosis, follow-up and treatment of chylomicron retention disease based on recent insights**

**N Peretti<sup>\*</sup>, A Sassolas<sup>†</sup>, C Deslandres<sup>§</sup>, M Charcosset<sup>†</sup>, Laurence Pugnet<sup>†</sup>, P Moulin<sup>††</sup>,  
E Grenier<sup>\*</sup>, L Bouthillier<sup>§</sup>, C Roy<sup>§</sup>, A Lachaux<sup>††</sup>, E Levy<sup>\*</sup>.**

Departments of <sup>\*</sup>Nutrition and <sup>§</sup>Pediatrics, CHU Sainte-Justine, Université de Montréal, Québec; <sup>††</sup> Department of lipidology and endocrinology and <sup>†</sup>UF lipids, Hôpital neurologique, Lyon, France ; Departments of <sup>††</sup>Nutrition-Gastroenterology and <sup>†</sup>Pathology, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

**Running Title:** Chylomicron retention disease

**Abbreviations:** Å : angström, AB: abetalipoproteinemia, Apo: apolipoprotein, FTT : failure-to-thrive, HB: hypobetalipoproteinemia, LDL: low-density lipoprotein, COPII : coating protein complex type II, CRD: chylomicron retention disease, MTP: microsomal triglyceride transfer protein, PDI: Protein Disulfide Isomerase, TG: triglycerides, VLDL: very-low density lipoprotein,

**Address for correspondence:**

\*Dr. Emile Levy  
GI-Nutrition Unit  
Hôpital Sainte-Justine  
3175 Côte Ste-Catherine  
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5  
Tel. :(514) 345-462 Fax:(514) 345-4999

## **Introduction**

Chylomicron is a lipoprotein secreted exclusively by the enterocyte. Even if the enterocyte is able to secrete all classes of lipoproteins, chylomicrons are the main carrier of dietary lipids. This large lipoprotein (700 to 6000 Å) is mainly composed of triglycerides (TG). Apolipoprotein B (ApoB) is essential to the cohesion of the chylomicron structure. ApoB is also found in very-low density lipoproteins (VLDL) and low-density lipoproteins (LDL) secreted by the liver.

Many genetic diseases are responsible for ApoB synthesis, metabolism or secretion abnormalities, causing intestinal malabsorption of lipids with growth retardation and neuro-ophthalmological complications. During the last 20 years, genetic abnormalities have been identified for three main disorders that constitute familial hypocholesterolemia: hypobetalipoproteinemia (HB), abetalipoproteinemia (AB) and chylomicron retention disease (CRD). The tables on lipid screening and oral fat load summarize biological lipid differences among these diseases (table 1 and 2).

HypoBetaHB was first characterized [Leppert 1988]. The autosomal dominant transmission seems specific to this group compared to the other familial hypocholesterolemias. Therefore, lipid screening of parents can help with diagnosis: one of them, or both, has decreased plasma cholesterol (table 1). But HB is a heterogeneous group of ApoB abnormalities. Therefore, a clinical classification is used for this disease: homozygotes for HB, who have the most severe form; symptomatic heterozygotes with digestive and/or neurological symptoms; and asymptomatic heterozygotes who are the most common (1/400 to 1/2500 of the general population). Mutation of the ApoB gene, on chromosome 2, is found in only half of cases, leading to a shorter ApoB molecule, also called truncated ApoB. The other abnormalities are responsible for the other half of cases but yet are undetermined. The characterization of HB has led to a better understanding of the structural function of ApoB in chylomicrons.

A genetic abnormality in AB was identified in 1992 [Wetterau 1992]. ApoB is synthesized by a continuous process. When lipid transfer does not occur in the enterocyte, ApoB is degraded. The microsomal triglyceride transfer protein (MTP) is a protein located

in the endoplasmic reticulum membrane; this heterodimeric complex is composed with two sub units: the small unit of 58kD, also called Protein Disulfide Isomerase (PDI), and a large subunit of 97kD [Wetterau 1990] [Wetterau 1991]. MTP protects the nascent ApoB by lipidation in the reticulum plasma membrane. This lipid transfert activity depends only on the large subunit. Mutation of the MTP gene on chromosome 4 affects the large subunit wich is absent in the AB [Sharp 1993] [Shoulders 1993]. Then, this mutation affects the MTP gene and protein, blocking the lipid transfer, thereby inducing degradation of ApoB and preventing chylomicron synthesis. Research on AB highlighted the pivotal role of MTP for ApoB synthesis and triglyceride-rich lipoprotein assembly.

Recently, the gene implicated in CRD, or Anderson's disease, was identified [Jones 1992]. It consists of mutations of the SARA2 gene, which encodes for the Sar1b protein. The protein Sar1b interacts with intracellular proteins to mediate chylomicron transport from the endothelial reticulum (ER) to the Golgi apparatus [Barlowe 1994] [Matsuoka 1998]. Briefly, Sar1b is a small GTP-binding protein that forms with two heterodimers, Sec 23/24 and Sec 13/31, the coating protein complex type II (COPII). COPII initiates budding and captures cargo to eject vesicles from the ER towards the Golgi apparatus [Kirchhausen 2000]. The interactions between Sar1 and Sec23 form a concave complex that initiates the coat complex assembly [Bi 2002]. Sec 24 interacts with Golgi proteins by means of potential binding sites [Bi 2002]. In humans, there are two Sar1 isoforms, designated Sar1a and Sar1b, differing by 20 amino acid residues. To date, only Sar1b have been found mutated in Anderson's, CRD and CRD-Marinesco Sjögren syndrome with associated neurologic impairments. Until now, only 8 mutations have been described. For CRD, this had increased our knowledge about intracellular transport of chylomicrons.

Clinicians may have many difficulties with CRD patients. First, the diagnosis of CRD is often delayed because symptoms are non specific (diarrhea, abdominal distension, vomiting, and failure to thrive...) and hypocholesterolemia may be attributed to malnutrition secondary to malabsorptive diarrhea. Secondly, follow-up and treatment are poorly defined for many reasons. The similarity between different familial hypocholesterolemias may lead to the wrong diagnosis if a molecular test is missing. On the other hand, CRD is a rare and often unknown disease. Indeed, only about 40 cases and two small cohorts (7 and 8 patients, respectively) have been previously described



[Anderson 1961] [Polonovski 1970] [Rey 1973] [Scott 1979] [Gauthier 1983] [Roy 1987] [Pessah 1991] [Strich 1993] [Patel 1994] [Nemeth 1995] [Dannoura 1999] [Bouma 1986] [Lacaille 1989]. Very long-term follow-up is not known although some adult case reports indicate that neurological impairment may be serious, even if it occurs later and is less severe than in patients with AB or with HB [Gauthier 1983] [Scott 1979] [Lacaille 1989] [Strich 1993] [Roy 1987]. Finally, to our knowledge, there are no specific recommendations for CRD follow-up or treatment. For the most part, therapeutic suggestions have been elaborated from the recommendations for patients with AB or symptomatic HB patients. However, these diseases have different pathophysiologies.

The objectives of this study are to review literature and to analyse data from a new and larger cohort to provide recommendations for diagnosis, follow-up and treatment of patients with CRD. We compared 16 patients with CRD from two different groups: 9 Canadian patients from Ste Justine Hospital in Montreal, and 7 French patients from Edouard Herriot Hospital in France (tables 3 and 4). It is the first cohort in which all patients had a molecular diagnosis and a long-term follow-up (median from 5 and 10 years for the French and Canadian cohorts respectively with some patients followed for more than 20 years). Our results are expressed as mean. Differences between means were assessed utilizing the two-tailed Student's t-test; paired t-test to compare the progression in the same population.

### **Diagnosis of CRD.**

An early diagnosis is needed to decrease the risk and severity of complications. Low plasma cholesterol may be a result of different causes of intestinal malabsorption (celiac disease, cystic fibrosis...). Furthermore, there can be confusion with other genetic hypocholesterolemias with decreased LDL-C (abetalipoproteinemia or hypobetalipoproteinemia), or those with low HDL-C. However, the latter usually does not have gastrointestinal or neuro-ophthalmologic symptoms during infancy. For the differences between secondary or HDL-related hypocholesterolemia, the reader is referred to the excellent review of Deckelbaum's group [Granot 1989]. The Figure 1 summarizes the differences between familial hypocholesterolemia with low LDL-C. The steps to diagnose CRD are presented in the table 5. When a patient has low plasma cholesterol and

a malabsorption syndrome, a standard lipid screening should be done to confirm that LDL-cholesterol is decreased and triglycerides are normal. A plasma LDL apoprotein B level within normal limits or just mildly decreased excludes abetalipoproteinemia or homozygous hypobetalipoproteinemia. Parents should also undergo lipid screening to eliminate an autosomal dominant hypobetalipoproteinemia.

The second step is to perform an oral fat-loading test (50g / 1.73m<sup>2</sup>, lipid dosages at t0 and each hour until t5h) to demonstrate the absence of an increase of chylomicrons and triglycerides. Steatorrhea can be measured at the beginning to evaluate the lipid malabsorption, but results are not always correlated with the severity of the decrease in plasma cholesterol.

The third step is to conduct upper gastroscopy to visualize a white duodenal mucosa and to collect biopsies. Histology shows multivacuolated enterocytes in intestinal villi of normal architecture. However some patients demonstrate mild atrophic villi (4 / 7 patients of Lacaille [Lacaille 1989], which may be confused with celiac disease if the lipid vacuoles are not identified. Furthermore, in the same patient, villi are affected to a variable extent and between patients the percent of lipid-laden villi and the region of affected villi vary [Dannoura 1999]. In most cases, the vacuolization is seen only in the upper one-third of the villi. Furthermore, biopsies require electron microscopy examination in order to distinguish the type of lipid vacuolization: small membrane-bound vesicles versus larger vesicles without membrane and then to classify the different aspect of histological abnormalities depending on the mutation.

Finally, the third step is the identification of SARA2 mutation, to identify the different mutations and to classify, if possible, phenotype in accordance to genotype.

### **Follow up of CRD.**

The kind and frequency of complications guide the follow-up. Neurological and ophthalmologic complications in CRD are less severe than in abetalipoproteinemia, but the lack of data about very long-term progression in treated patients with CRD means that rigorous follow-up is required. The follow-up has to be oriented toward growth, bone density, intestinal, hepatic, and neuro-ophthalmologic parameters. Table 6 summarizes the follow-up suggested for patients with CRD.

Growth is a pediatric-specific goal in patients with malabsorption syndromes. In CRD, there is no intrauterine growth retardation. But, failure-to-thrive (FTT) is one of the most common initial symptoms in this disease. After diagnosis and treatment, catch up is the most common progression observed in the literature. However, some of our patients stayed under their genetic potential: weight and height remained around the 20<sup>th</sup> percentile (p) for a genetic size of 40<sup>th</sup> p. These patients had a delayed diagnosis. However, the mutation also may influence the growth, such as illustrated by patient 8-1. She is homozygous for 537T>A on exon 7; she had a delayed diagnosis (10y) and was short at diagnosis (15<sup>th</sup> p) but the catch-up was excellent, with a normal final height (50<sup>th</sup> p for a genetic potential of the 25<sup>th</sup> p) compared to other patients with the same delayed diagnosis but a different mutation (patients 1-2, 1-3, 1-4, 2-1 and 2-2). Furthermore, she did not receive any treatment, and catch-up was spontaneously corrected during puberty. Tracking the growth curve is a basic but essential way to follow children with CRD. Annual evaluation is appropriate.

Poor mineralization and delayed bone maturation has been observed previously in CRD [Lacaille 1989]. However, to our knowledge, no specific measurements of bone density were available. We provide bone mineral density at the lumbar spine by dual X-ray absorptiometry only after evolution; this exam was not performed at diagnosis (table 3 and 4). After evolution, two groups in our cohort are distinguished: French patients had a significant decreased bone density compared to the Canadian group, who were in the normal range ( $-2.46 \pm 0.3$  versus  $-0.25 \pm 0.6$  L2-L4 Z Score,  $p=0.007$ ). Plasma vitamin D levels were normal for the Canadian group but decreased to half of normal levels in the French group (100% versus  $56 \pm 8\%$  of inferior limit value,  $p=0.03$ ), which reflects the delayed diagnosis for this latter population. During follow-up, the vitamin D reached normal values in the French population. Therefore, a delayed diagnosis may permanently impair bone density. Vitamin D supplementation is able to normalize plasma vitamin D levels but do not induce necessary bone density normalization, even after 7y of treatment. Therefore, bone density should be examined every 2 to 3 years, and measurement at diagnosis is appropriate to evaluate the impact of vitamin D treatment in CRD during follow-up.

The gastrointestinal tract is the first system to be evaluated in order to determine the malabsorption, compliance with the diet and the quality of life of the patients. In CRD, the most common symptoms are vomiting, diarrhea and abdominal distension. They diminish and/or disappear with a low-fat diet. Furthermore, in some previously reported patients, the intensity of symptoms seemed to decrease with time independently of the level of fat in the diet [Nemeth 1995]. However, our data do not support the hypothesis of an intestinal adaptation during CRD. Even if our patients improved their digestive symptoms with a low-fat diet, diarrhea began again when fat was reintroduced, even in adult patients. Furthermore, there was no improvement of steatorrhea after an average of 5 years of follow-up (from  $6.6 \pm 1$  to  $6.9 \pm 1.7$  g/d).

Hepatic cytolysis was moderate (between 1.5 and 3N), and frequent (all patients in our cohort at diagnosis). However, ultrasonography detected few morphological abnormalities (among 16 patients, 3 were found to have hepatomegaly and 3 had steatosis during the entire duration of follow-up, tables 3 and 4). A moderate degree of macrolobular steatosis was previously reported [Nemeth 1995] [Roy 1987], but no case of cirrhosis has been reported in CRD, in contrast to abetalipoproteinemia. However, the lack of very long-term data means that patients should be carefully followed. Interestingly, during follow-up, we did not find any correlation between the level of hepatic enzymes (AST and/or ALT) and steatosis or hepatomegaly. Serological testing alone was insufficient to detect hepatic morphological problems. Therefore, hepatic transaminase levels and ultrasonography should both be obtained yearly.

The delayed diagnosis and prolonged progression are two classic risk factors for neurological and ophthalmic complications in hypobetalipoproteinemia and abetalipoproteinemia [Lacaille 1989] [Strich 1993] [Roy 1987] [Gauthier 1983] [Scott 1979]. In our cohort, 4/16 patients had electromyographic abnormalities. The youngest was 6.5 years old, and one had areflexia as early as 11 years of age. In the literature, children with CRD and neurological impairment had a delayed diagnosis: areflexia at 10y and 13y in a French publication and 13y and 18y in Strich's publication; areflexia combined with proprioceptive abnormalities at 10y and 7y in a Canadian study [Lacaille 1989] [Strich 1993] [Roy 1987]. Furthermore, more severe neurological degeneration, such as ataxia, myopathy and sensitive neuropathy have been reported in adults 21y and 55y old with CRD

[Gauthier 1983] [Scott 1979]. The mean age in the literature of children with clinical neurological manifestations is 12y, which is significantly older than asymptomatic patients (4y old). Vitamin E status plays a pivotal role in neurological degenerative complications [Kayden-a 1993] [Sokol 1990]. In our study, it is relevant to note that the three patients with the more pronounced abnormalities had the lowest vitamin E level at diagnosis (0.88, 0.61 and 1.42 mmol/L versus a mean of 3.8 mmol/L in the other patients). To our knowledge, no data about muscular cytolysis in CRD have previously been published.

In our cohort, CK levels were elevated in all patients who had CK measured at diagnosis (7/16 patients), except one. This elevation appeared as early as 7 months of age, and was relatively high, with a mean of almost 5N. The higher level (10N) was found in the patient who had the most severe neurological impairment (areflexia and abnormal electromyography). However, the CK level was not always correlated with the severity of the neurological impairment: electromyographic abnormalities may exist with CK levels at around only 1.5 to 2.5N, and, conversely, some patients with elevated CK levels around 4 to 5N had normal electromyography. During progression, CK doesn't normalize and the decrease is not significant (from  $4.6 \pm 1N$  to  $3 \pm 0.7N$ ,  $p=0.06$ ) despite a dramatic increase of plasma vitamin E (from  $15 \pm 5\%$  to  $53 \pm 6\%$ ,  $p=0.008$ ). This may be because the number of patients was too small to show a significant statistical result. However, in abetalipoproteinemia, some data suggest that the myopathy in vitamin E deficiency may be due to some other mechanism and not to vitamin E deficiency per se: myopathic abnormalities in biopsy worsened, despite one year of vitamin E therapy and apparent preservation of strength [Lazaro 1985]. Our results also support this hypothesis in CRD. Interestingly, Sar1GTPase is expressed not only in the intestine but also in the liver, muscle and brain. Musculoskeletal and neurological abnormalities could be related to impaired Sar1b in these different specific cells [Shoulders 2004].

With regards to ophthalmic complications, minimal visual abnormalities have previously reported: micronystagmus, mild deficit in perception of the blue-yellow axis, delayed dark adaptation [Roy 1987]. In our populations, the ophthalmic complications were mild and only electrical.

Therefore, neurological and ophthalmic impairments are mild but may occur early during infancy requiring a rigorous follow-up and compliance with vitamin treatment. CK

level may indicate more severe neurological impairment when the level is extremely high but is inadequate to evaluate neuromuscular progression. Annual neurological and ophthalmologic examinations are necessary to detect complications such as developmental retardation, areflexia, ataxia, dysarthria, loss of deep proprioception, muscular weakness and decreased night vision. Furthermore, it seems reasonable to schedule a specialised neurology and ophthalmology consultation every 2 to 3 years to measure electromyography, visual evoked potentials, and electroretinography, because electrical abnormalities occur before clinical symptoms.

Cardiomyopathy with cardiomegaly, murmurs and abnormal electromyograms have been described in some hypocholesterolemic syndromes such as abetalipoproteinemia, but its prevalence is not known [Caballero 1980]. To our knowledge, no data have been published about myocardial function in CRD. In our cohort, all patients had normal echocardiography, and no signs of cardiomyopathy were found before 23.5 years of age. Therefore, we do not recommend echocardiography in pediatric patients if there are no clinical symptoms.

In summary, a standard clinical exam should be performed annually, focusing on growth and hepatogastrointestinal and neurological symptoms. In addition, neurology and ophthalmology consultations are recommended every 2 to 3 years, depending on clinical symptoms and compliance with treatment.

### **Treatment of CRD:**

Among fat-soluble vitamins, vitamins E and A are the most decreased during the progression of CRD, and are implicated in neurological, muscular and ophthalmic complications. Vitamin E is the most affected among the liposoluble vitamins in CRD because its transport is highly dependent on apoB-containing lipoprotein [Berriot-Varoqueaux 2000]. High dosages of vitamin E (100 UI/kg/d) have been demonstrated to prevent, slow or improve neurological complications in different hypocholesterolemias such as abetalipoproteinemia [Sokol 1990] [Triantafillidis 1998] [Alex 2000] [Azizi 1978] [Miller 1980] [Malloy 1981]. Furthermore, these high intakes are safe; relatively few side effects have been reported in double-blind studies of vitamin E at doses as high as 2000 or 3200 IU/d [Anderson 1974]. Alpha-tocopherol seems to be the most suitable vitamin E

form to prevent neurological degeneration. Indeed, the nervous tissue is characterized by slow exchange and high selectivity for RRR- $\alpha$ -tocopherol [Vatassery 1998]. However, it has been documented that in abetalipoproteinemia, the ability of patients to absorb and transport the oral hydrosoluble form of vitamin E ( $\alpha$ -tocopheryl acetate) is not only markedly impaired but also variable [Kayden 1993-b]. Our CRD patients received an average of  $51 \pm 32$  IU/kg/d of vitamin E (table 7), with a dosage as high as 100 IU/kg/d in some of them. Despite higher dosages of vitamin E and A, and assured compliance by intravenous administration, only some French patients had clinical signs of neurological improvement. This may be due to the delayed diagnosis or the influence of the mutation. However, the majority of patients with a medium dose of around 50 UI/kg/d, and sometimes as low as 20 UI/kg/d, did not develop clinical, nor electrical neuro-ophthalmologic complications when the treatment was given during the first years of life. Therefore, it seems reasonable to prescribe only 50 UI/kg/d of vitamin E to patients with CRD.

To prevent complications, our data does not represent an advantage relative to intravenous treatment. The oral route is sufficient, as illustrated by the Canadian cohort, which was early treated orally and did not develop neurological impairment until 22 years of age in 2 patients. However, patients with clinical neurological abnormalities in the French patients that were treated intravenously display abnormalities that did not progress. Furthermore electromyography and electroretinographic abnormalities in two patients improved after this intravenous treatment. In abetalipoproteinemia, a high intake of vitamin E given orally has been effective in treating neurological complications in some patients. However, neurological impairment continues to progress, such as reduced visual action potential in a 23y old after 14y of treatment for example [Muller 1985].

Determination of the appropriate dose of vitamin E can be problematic. Measurement of plasma concentration is too imprecise to guide us. Plasma levels after supplementation reached only to half to two-thirds of normal levels ( $68 \pm 6\%$  versus  $53 \pm 6\%$ ,  $p=ns$  for Canadian and French respectively), independent of the vitamin E dose, as illustrated in the figure 2 on plasma variation: patients with 20, 40 or 100 UI/kg/d may have the same plasma vitamin E levels of around 60% of the minimal normal range (patients 4-1, 5-1, and 9-2 respectively). Poor treatment compliance seems improbable because of the

young age of these children and good parental cooperation. This level is comparable to that obtained in abetalipoproteinemia after oral supplementation with high doses (45% of normal range for 100 UI/kg/d of vitamin E) [Muller 1985]. Furthermore, plasma levels of vitamin E did not necessarily correlate with vitamin E doses as illustrated in the figure on plasma vitamin E variation (figure 2). Finally, the steatorrhea was also not correlated with vitamin E and A deficiency in our patients. Therefore, vitamin treatment cannot be adjusted to the severity of steatorrhea. An interesting alternative is to measure vitamin E levels in subcutaneous adipose tissue. It was previously demonstrated that after supplementation, the adipose tissue concentrations reach normal levels, even if plasma levels remain low [Kayden 1983]. Finally, electromyographic exploration is able not only to detect neurological impairment early, but also to follow the neurological progression with treatment.

Our patients demonstrated that the lowest vitamin A dose (15,000 IU/d) was effective, in combination with vitamin E, to prevent and cure ophthalmologic complications in CRD. Vitamin A plasma levels were less decreased than vitamin E levels at diagnosis. After treatment, levels increased to normal values.

When vitamin D treatment was started early, double to triple doses (800 to 1200 IU/d) prevented osteopenia, as illustrated by the Canadian cohort. However, when osteopenia was present, higher vitamin D intake (1300 to 3000 IU/d) did not normalize bone density after 5y of treatment. Unfortunately, we do not have initial bone density measurements to evaluate progression with vitamin D treatment.

Vitamin K was administrated in similar doses in the two groups. The plasma values were not measured, but INR was normal and no hemorrhages were detected in any patient during the entire follow-up.

In summary, we first suggest oral treatment with 50 UI/kg/d of vitamin E in an aqueous form, if possible; 15,000 IU/d of vitamin A; 800 to 1200 UI/d of vitamin D; and 15 mg/week of vitamin K. Secondly, we should consider intravenous treatment only when patients have neurological impairments. Vitamin E measurements in adipose tissue and electromyography are the best ways to evaluate the adequacy of vitamin E doses.

Patients with lipid malabsorption have increased risk of essential fatty acid deficiency (EFAD). Furthermore, a low-fat diet is necessary to improve digestive



symptoms (diarrhea, abdominal distension, vomiting...), but may also contribute to increasing the EFAD. Therefore, dietary counseling is needed to decrease fat intake but to maintain sufficient caloric and essential fatty acid intake. It was recommended to the Canadian cohort to add 1 to 3 teaspoons per day of soy bean oil to meals and to increase fish consumption to 2 to 3 times per week. The objective was to reach 3 to 5% of total calories with omega 6, and 0.5 to 1% with omega 3. The French cohort had the same diet recommendations but each month 4 of them also received an infusion of 80g of lipid emulsion containing 8g of EFA (linoleic, olive oil 80% and soy bean oil 20% purified). The three other patients drank 25g per day of oral supplements containing medium-chain triglycerides (Liprocil, 80% MCT, Nestle, France).

At diagnosis, our patients with CRD had an abnormal plasma FA profile when expressed as percentage of cholesterol ester fraction with excess of some saturated and monosaturated FAs (palmitic (C16:0), oleic (C18:1(n-9)) (figure 3). They also presented with omega-6 deficiency (linoleic acid (C18:2(n-6)) but, surprisingly, omega-3 levels were in the normal range for this lipid fraction, i.e. cholesterol ester. Despite oral and intravenous supplementation, these abnormalities worsened significantly during evolution as illustrated on figure EFA evolution (figure 3). Arachidonic acid (C20:4(n-6)) decreased significantly with time but stayed in the normal range.

After progression, the Canadian cohort had the worse EFA profile when expressed as percentage of total plasma FA, with higher saturated FA (myristic acid C14:0:  $2 \pm 0.4$  versus  $1.3 \pm 0.2$  % FA,  $p < 0.01$ ; palmitic acid C16:0:  $31 \pm 3.4$  versus  $24 \pm 1.8$  % FA,  $p < 0.001$  for Canadian versus French group respectively); and lower omega-6 levels (linoleic acid C18:2(n-6):  $11 \pm 2$  versus  $15 \pm 3$  % FA,  $p < 0.05$ ). For omega 3, even if levels of all FAs were in a normal range, Canadian children had a lower level. Furthermore, the Canadian patients had reduced polyunsaturated FA (PUFA) and essential FAs, as demonstrated by a decrease of the PUFA/saturated FA ratio and an elevation of the triene/tetraene ratio over 0.02 ( $0.04 \pm 0.01$  versus  $0.01 \pm 0.005$ ), this ratio being the most sensitive index of essential FA deficiency.

The discrepancy between omega 6 levels after evolution when expressed as percentage of cholesterol ester (28%) or as percentage of total FA (15.3%) underlight the

differences of origin and metabolism of FA in each lipid fraction (% of phospholipids, cholesterol ester or total FA).

In conclusion, the plasma EFA profile was abnormal in CRD, with omega-6 deficiency and excess of saturated FAs. Intravenous and oral supplementations were unable to normalise the serologic levels. Furthermore, the clinical impact of this supplementation is not obvious, since the Canadian cohort had less supplementation and worse plasma levels but fewer complications. This discrepancy may be explained by a difference between plasma FA levels and the FA concentration in tissues, since dietary FAs are mainly carried by chylomicrons, which are dramatically decreased in CRD. Adipose tissue biopsy may provide some answers to this question. Simple counselling to increase oral EFAs with vegetable oils and fish seem appropriate in CRD, as illustrated by the excellent clinical progression of the Canadian cohort despite the low plasma omega-6 levels. However, prospective clinical interventions with FA supplementation are needed to evaluate the optimal dose, route of administration, and long-term impact of EFA treatment. Similarly, the role of medium-chain triglycerides to supplement CRD patients remains to be defined.

### **Conclusion**

Our study is the first to extensively describe phenotype in relation to genotype for CRD. Moreover, it is the largest cohort of this rare autosomal recessive disease, and the first to compare two genetically different populations. Previously, two cohorts were described: one of 7 patients from a French population [Bouma 1986] [Lacaille 1989] and another one of 8 patients from a Canadian population [Roy 1987] [Levy 1987]. Our article is also the first to report the progression of CRD after a long follow-up (mean of 10 years and 5 years for each population respectively, with some patients followed more than 20y). Finally, we report new insights about the phenotype of this disease. Thanks to these new data, we propose guidelines for the management of patients with CRD and direction for future clinical research.

The familial hypocholesterolemias have led to a better understanding of physiology of intestinal lipid absorption: hypobetalipoproteinemia highlighted the essential function of ApoB, abetalipoproteinemia revealed the pivotal function of MTP, and recently CRD implicated the coat vesicle protein cargo type II (COP II) in chylomicron transport.

However, the CRD model does not provide all the answers to many unsolved questions. For example, fasting plasma triglyceride levels are normal but do not increase after a fat load in CRD. However, COP II transport is also implicated in the hepatic secretion of VLDL [Gusarova 2003], suggesting at least another pathway for hepatic triglyceride secretion which is independent of SARA2 and Sar1 GTPase.

**Acknowledgments**

This study was supported by the Research grant (MT 10583) from the Canadian Institutes of health Research and Quebec Nutraceuticals and Functional foods Institute (INAF). We thank Sonia Gingras and Raymonde Bouvier for their valuable contribution. We acknowledge the expert secretarial assistance of Schohraya Spahis.

**Bibliography:**

Alex 2000 Ataxia with isolated vitamin E deficiency: a clinical, biochemical and genetic diagnosis. *J Paediatr Child Health*. 2000 Oct;36(5):515-6.

Anderson 1961 Unusual causes of steatorrhea in infancy and childhood. *Med J Aust*. 1961 Oct 14;48(2):617-22.

Anderson 1974 A double-blind trial of vitamin E in angina pectoris. *Am J Clin Nutr*. 1974 Oct;27(10):1174-8.

Azizi 1978 Abetalipoproteinemia treated with parenteral and oral vitamins A and E, and with medium chain triglycerides. *Acta Paediatr Scand*. 1978 Nov;67(6):796-801.

Barlowe 1994 COPPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*, 1994, 77, 895-907.

Berriot-Varoqueaux 2000 The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *Annu Rev Nutr*. 2000;20:663-97.

Bi 2002. Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of COPII vesicle coat. *Nature*, 2002, 419, 271-277.

Bouma 1986 Hypobetalipoproteinemia with accumulation of an apoprotein B-like protein in intestinal cells. Immunoenzymatic and biochemical characterization of seven cases of Anderson's disease. *J Clin Invest*. 1986 Aug;78(2):398-410.

Caballero 1980 Abetalipoproteinemia presenting as severe vitamin K deficiency. *Pediatrics*. 1980 Jan;65(1):161-3.

Dannoura 1999 Anderson's disease: exclusion of apolipoprotein and intracellular lipid transport genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Oct;19(10):2494-508.

Gauthier 1983 Action tremor as a manifestation of chylomicron retention disease. *Ann Neurol*. 1983 Nov;14(5):591.

Granot 1989 Hypocholesterolemia in childhood. *J Pediatr*. 1989 Aug;115(2):171-85.

Gusarova 2003 Apolipoprotein B100 exit from the endoplasmic reticulum (ER) is COPII-dependent, and its lipidation to very low density lipoprotein occurs post-ER. *J Biol Chem.* 2003 Nov 28;278(48):48051-8.

Jones 2003. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nature Genetics* online 14 April 2003 ; doi :10.1038/ng1145.

Kirchhausen 2000. Three ways to make a vesicle. *Nature Rev Mol Cell Biol.*, 2000, 1, 187-198.

Kayden 1993-a The neurologic syndrome of vitamin E deficiency: a significant cause of ataxia. *Neurology.* 1993 Nov;43(11):2167-9.

Kayden-b 1993 Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res.* 1993 Mar;34(3):343-58.

Lacaille 1989 Anderson's disease. Clinical and morphologic study of 7 cases. *Arch Fr Pediatr.* 1989 Aug-Sep;46(7):491-8.

Lazaro 1986 Muscle pathology in Bassen-Kornzweig syndrome and vitamin E deficiency. *Am J Clin Pathol.* 1986 Sep;86(3):378-87.

Leppert 1988 Inference of a molecular defect of apolipoprotein B in hypobetalipoproteinemia by linkage analysis in a large kindred. *J Clin Invest.* 1988 Sep;82(3):847-51.

Levy 1987 Intestinal apoB synthesis, lipids, and lipoproteins in chylomicron retention disease. *J Lipid Res.* 1987 Nov;28(11):1263-74.

Malloy 1981 Normotriglyceridemic abetalipoproteinemia. absence of the B-100 apolipoprotein. *J Clin Invest.* 1981 May;67(5):1441-50.

Matsuoka 1998 COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemical defined liposomes. *Cell,* 1998, 93, 263-275.

Miller 1980 The neuropathy of abetalipoproteinemia. *Neurology.* 1980 Dec;30(12):1286-91.

- Muller 1985 The role of vitamin E in the treatment of the neurological features of abetalipoproteinaemia and other disorders of fat absorption. *J Inherit Metab Dis.* 1985;8 Suppl 1:88-92. Review.
- Nemeth 1995 Studies on lipoprotein metabolism in a family with jejunal chylomicrons retention. *Eur J Clin Invest.* 1995 Apr;25(4):271-80.
- Patel 1994 Chylomicron retention disease: exclusion of apolipoprotein B gene defects and detection of mRNA editing in an affected family. *Atherosclerosis.* 1994 Aug;108(2):201-7.
- Pessah 1991 Anderson's disease: genetic exclusion of the apolipoprotein-B gene in two families. *J Clin Invest.* 1991 Jan;87(1):367-70.
- Polonvsky 1970 Anderson's disease. *Ann Pediatr (Paris).* 1970 May 2;17(5):342-54.
- Rey 1973 Idiopathic disorder of intestinal fat transport (Anderson's disease). A further case. *Arch Fr Pediatr.* 1973 May;30(5):564-5.
- Roy 1987 Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology.* 1987 Feb;92(2):390-9.
- Scott 1979 Hypobetalipoproteinaemia-a variant of the Bassen-Kornzweig syndrome. *Gut.* 1979 Feb;20(2):163-8.
- Sharp 1993 Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinaemia. *Nature.* 1993 Sep 2;365(6441):65-9.
- Shoulders 1993 Microsomal triglyceride transfer protein, the abetalipoproteinemia gene product, mediates the secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from heterologous cells. *J Biol Chem.* 1994 Sep 2;269(35):21951-4.
- Shoulders 2004 The intracellular transport of chylomicrons requires the small GTPase, Sar1b. *Curr Opin Lipidol* 2004, 15, 191-197.
- Sokol 1990 Vitamin E and neurologic deficits. *Adv Pediatr.* 1990;37:119-48.
- Strich 1993 Anderson's disease: no linkage to the apo B locus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1993 Apr;16(3):257-64.
- Sokol 1990 Vitamin E and neurologic deficits. *Adv Pediatr.* 1990;37:119-48.

Triantafyllidis 1998 A-beta-lipoproteinemia: clinical and laboratory features, therapeutic manipulations, and follow-up study of three members of a Greek family. *J Clin Gastroenterol.* 1998 Apr;26(3):207-11.

Vatassery 1998 Alpha tocopherol in CSF of subjects taking high-dose vitamin E in the DATATOP. *Neurology.* 1998 Jun;50(6):1900-2. study. Parkinson Study Group.

Wetterau 1990 Protein disulfide isomerase is a component of the microsomal triglyceride transfer protein complex. *J Biol Chem.* 1990 Jun 15;265(17):9801-7.

Wetterau 1991 Protein disulfide isomerase appears necessary to maintain the catalytically active structure of the microsomal triglyceride transfer protein. *Biochemistry.* 1991 Oct 8;30(40):9728-35.

Wetterau 1992 Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science.* 1992 Nov 6;258(5084):999-1001.



Table 1: Lipid Screening

Pathology	TC [3.1-5 mM]	HDL-C [1.05-1.8 mM]	LDL-C [2-3.8 mM]	TG [0.5-2 mM]	PL [1.8-3.2 mM]	ApoB [0.45-1.1 g/L]	ApoA1 [0.9-1.78 g/L]
<b>Abeta</b>							
Patient	0.93	0.96	0.04	0.02	0.81	0	?
Mother	6.68	1.59	4.84	0.69	2.89	1.18	?
Father	5.72	0.79	4.46	1.28	2.5	1.2	?
<b>CMRD</b>							
Patient	1.77	0.46	0.83	1.06	1.22	0.35	0.55
Mother	3.81	1.16	2.03	0.8	2.1	0.4	1.4
Father	4.17	0.96	2.8	1.2	2.8	0.8	1.14
<b>Hypobeta</b>							
Patient	2.43	1.31	0.79	0.72	?	0.38	1.38
Mother	2.66	1.42	1.08	0.35	?	0.25	1.49
Father	4.46	1.21	3.04	0.46	?	0.77	1.03

## Legend:

Abeta: Male, 3y, homozygote, MTP gene, 59del17, >stop.  
 RCMD: Male, 2y, homozygote, SARA2 gene, Exon6, 409G>A, D137N.  
 Hypobeta: Male, 5y, heterozygote, ApoB gene, 11712delC, ApoB-86 truncated.  
 ApoA-I: apolipoprotein A-I, ApoB: apolipoprotein B, HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol,  
 LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol, PL: phospholipid, TC: total cholesterol, TG: triglyceride.

Table 2: Oral Fat Load

Pathology	TC [3.1-5 mM]	HDL-C [1.05-1.8 mM]	LDL-C [2-3.8 mM]	TG [0.5-2 mM]	PL [1.8-3.2 mM]	ApoB [0.45-1.1 g/L]
<b>Abeta</b>						
t0	0.93	0.96	0.04	0.02	0.81	0
t1.5h	0.87	0.90	0.03	0.01	0.74	0
t3h	0.83	0.91	0.07	0.03	0.77	0
<b>RCMD</b>						
t0	1.77	0.46	0.83	1.06	1.22	0.35
t1.5h	1.81	0.47	0.84	1.26	1.23	0.35
t3h	1.9	0.50	0.89	1.02	1.22	0.35

Legend: ApoB: apolipoprotein B, HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol, LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol, PL: phospholipid, TC: total cholesterol, TG: triglyceride

table 3: Canadian patients

patient / sex	age	growth height weight	bone density L2-L4 Z score	gastrointestinal	neurologic	ophthalmic	Mutation SARA2
5-1/Audrey GD / F 1° symptom diagnosis evolution	Birth	10th P					
	1m	50th P		diarr, vom, stagnation			homozyg exon 6
	3m	<5th P		diarr, vom, AST=2N ALT=2N	N	N	409 G>A
4-1/Marc SD / M 1° symptom diagnosis evolution	10y	50th P	0.7	asympt, ALT=1.5N	N, EMG ?	N	D137N
	Birth	50th P					exon 6
	2m	50th P		diarr, vom, stagnation			409G>A
7-1/Roseline Ta / F 1° symptom diagnosis evolution	1.5y	<5th P		diarr, stagnation, ALT=1.5	N	N	exon3
	22y	75th P	+3.1	asympt, ALT=2N	CK=1.5N	N	83-84 del TG
	Birth	50th P					exon 6
7-2/Laurent Ta / M 1° symptom diagnosis evolution	1w	50th P		diarr, vom			409 G>A
	2w	50th P		steatorrhea, vom, HM, stagnation, ALT=2N	N	N	exon 7
	5.5y	25th P	-2.3	asympt, ALT=1.5N	N	N	537 T>A
7-2/Laurent Ta / M 1° symptom diagnosis evolution	Birth	90th P					exon 6
	1m	90th P		vom, stagnation			409 G>A
	3.5m	5th P		vom, stagnation, ALT=2N	N	N	exon 7
6-1/Léa Tr / F 1° symptom diagnosis evolution	12y	25th P	-0.5	asympt, ALT=1.2N	N	N	537 T>A
	Birth	25th P					homozyg exon 7
	1m	25th P		diarr, vom			537 T>A
8-1/Manon So / F 1° symptom diagnosis evolution	5m	<5th P		vom, stagnation, AST=12N, ALT=17N	N	ND	537 T>A
	1y	10th P	ND	vom, ALT=3N, focal steatosis	N	ND	S179R
	Birth	50th P					homozyg exon 7
8-2/Simon So / M 1° symptom diagnosis evolution	3m	50th P					537 T>A
	10y	15th P		diarr, vom, stagnation	N	N	S179R
	23.5y	50th P	-1.1	asympt, ALT=3N	CK=2N	ERG	homozyg exon 7
9-1/Vincent Co / M 1° symptom diagnosis evolution	Birth	50th P					537 T>A
	1w	50th P		diarr, vom			S179R
	2m	<5th P		diarr, vom, stagnation, AST=4N, ALT=7N	N	N	homozyg exon 7
9-2/Louis Co / M 1° symptom diagnosis evolution	16y	40th P	-1.5	asympt	CK=1.5N, EMG	N	537 T>A
	Birth	75th P					S179R
	2m	10th P		diarr			homozyg exon 6
9-2/Louis Co / M 1° symptom diagnosis evolution	3m	10th P		diarr, stagnation, AST=4N, ALT=3N	N	N	409 G>A
	11y	25th P	-0.5	asympt	CK=1.5N	N	D137N
	Birth	90thp					homozyg exon 6
9-2/Louis Co / M 1° symptom diagnosis evolution	2m	50th P		diarr, stagnation			409 G>A
	2m	50th P		diarr, stagnation, ALT=1.5N	N	N	409 G>A
	7.5y	50th P	0.1	asympt, ALT=2N	CK=2N	N	D137N

Legend: areflex: areflexia, asymp: asymptomatic, CK: creatinine kinase, diarr: diarrhea, EMG: electromyography, ERG: electroretinography, GH: Genetic height, HM: hepatomegalia, HP+: helicobacter pylori positif, IV: intra-venous, m: month, ND: not done  
N: normal, VP: visual potentials, PO: per os, SD: standard deviation, vom: vomiting, y: year,

table 3: Canadian patients

patient / sex	age	growth height weight	bone density L2-L4 Z score	gastrointestinal	neurologic	ophthalmic	Mutation SARA2
5-1/Audrey GD / F 1° symptom diagnosis evolution	Birth	10th P					
	1m	50th P		diarr, vom, stagnation			homozyg exon 6
	3m	<5th P		diarr, vom, AST=2N ALT=2N	N	N	409 G>A
4-1/Marc SD / M 1° symptom diagnosis evolution	10y	50th P	0.7	asympt, ALT=1.5N	N, EMG ?	N	D137N
	Birth	50th P					exon 6
	2m	50th P		diarr, vom, stagnation			409G>A
7-1/Roseline Ta / F 1° symptom diagnosis evolution	1.5y	<5th P	+3.1	diarr, stagnation, ALT=1.5	N	N	exon3
	22y	75th P		asympt, ALT=2N	CK=1.5N	N	83-84 del TG
	Birth	50th P					exon 6
7-2/Laurent Ta / M 1° symptom diagnosis evolution	1w	50th P		diarr, vom			409 G>A
	2w	50th P		steatorrhea, vom, HM, stagnation, ALT=2N	N	N	exon 7
	5.5y	25th P	-2.3	asympt, ALT=1.5N	N	N	537 T>A
6-1/Léa Tr / F 1° symptom diagnosis evolution	Birth	90th P					exon 6
	1m	90th P		vom, stagnation			409 G>A
	3.5m	90th P		vom, stagnation, ALT=2N	N	N	exon 7
8-1/Manon So / F 1° symptom diagnosis evolution	12y	25th P	-0.5	asympt, ALT=1.2N	N	N	537 T>A
	Birth	25th P					homozyg exon 7
	1m	25th P		diarr, vom			537 T>A
8-2/Simon So / M 1° symptom diagnosis evolution	5m	<5th P	ND	vom, stagnation, AST=12N, ALT=17N	N	ND	537 T>A
	1y	10th P		vom, ALT=3N, focal steatosis	N	ND	S179R
	Birth	50th P					homozyg exon 7
9-1/Vincent Co / M 1° symptom diagnosis evolution	3m	50th P					537 T>A
	10y	15th P		diarr, vom, stagnation	N	N	S179R
	23.5y	50th P	-1.1	asympt, ALT=3N	CK=2N	ERG	homozyg exon 7
9-2/Louis Co / M 1° symptom diagnosis evolution	Birth	50th P					537 T>A
	1w	50th P		diarr, vom			S179R
	2m	<5th P		diarr, vom, stagnation, AST=4N, ALT=7N	N	N	homozyg exon 7
9-1/Vincent Co / M 1° symptom diagnosis evolution	16y	40th P	-1.5	asympt	CK=1.5N, EMG	N	537 T>A
	Birth	75th P					S179R
	2m	10th P		diarr			homozyg exon 6
9-2/Louis Co / M 1° symptom diagnosis evolution	3m	10th P		diarr, stagnation, AST=4N, ALT=3N	N	N	409 G>A
	11y	25th P	-0.5	asympt	CK=1.5N	N	D137N
	Birth	90thp					homozyg exon 6
9-2/Louis Co / M 1° symptom diagnosis evolution	2m	50th P		diarr, stagnation			409 G>A
	2m	50th P		diarr, stagnation, ALT=1.5N	N	N	exon 6
	7.5y	50th P	0.1	asympt, ALT=2N	CK=2N	N	409 G>A

Legend: areflex: areflexia, asymp: asymptomatic, CK: creatinine kinase, diarr: diarrhea, EMG: electromyography, ERG: electroretinography, GH: Genetic height, HM: hepatomegalia, HP+: helicobacter pylori positif, IV: intra-venous, m: month, ND: not done  
N: normal, VP: visual potentials, PO: per os, SD: standard deviation, vom: vomiting, y: year,

Table 5: Diagnosis

---

**Diagnosis:**


---

Clinical:

-anthropometry (failure-to-thrive), digestive (diarrhea, vomiting, abdominal distension), hepatomegaly, neurological abnormalities (areflexia, ↓ deep proprioception)

Serological (fasting state)

- Blood Cell Count (no acanthocytosis, ± anemia)
- Hepatic: ↑ (1.5-3N) AST and ALT, but normal GGT, bilirubin and alkaline phosphatase
- Fasting lipids in patient : ↓↓ total cholesterol, N<sup>al</sup> triglycerides, ↓ HDL and ↓↓ LDL
  - ↑ (1.5-4N) creatine kinase
  - abnormal plasma fatty acid profile
- plasma vitamin ↓↓↓ E, ↓↓ A, ↓ - N<sup>al</sup> D, ↓ - N<sup>al</sup> K
- coagulation: ↓ - N<sup>al</sup> INR
- Fasting lipids in parents: N<sup>al</sup> (± ↓ ApoAI and HDL)

Oral fat load:

-No increase (NB: TG are normal at t0 but doesn't increase thereafter)

Upper Endoscopy with biopsies (fasting state)

- White duodenal mucosa
- Light microscopy: Nal architecture, lipid droplets
- Electron microscopy: membrane bound?

Genotyping:

Mutation in SARA 2, Chr 5.

---

Table 6: Follow-Up

---

**Follow-Up:**

---

Clinical:

- anthropometry (weight and height), digestive (abdominal distension, diarrhea, appetite, vomiting), hepatic size, neurological (developmental retardation, areflexia, ataxia, dysarthria, deep proprioception loss, muscular weakness)
- dietary counselling

Serological

- Blood cell count
- Hepatic: AST, ALT, GGT, total bilirubin, alkaline phosphatase
- Lipids: total cholesterol, triglycerides, HDL and LDL cholesterol
- Essential Fatty Acids
- Vitamins: plasma levels of vitamin A, D, E and K
- coagulation: INR

Specialized consultations:

- Total body composition (bone mineral density, every 2 to 3 years)
  - Hepatic ultrasonography (steatosis, portal hypertension, yearly)
  - Ophthalmologic exam (fundus, color vision, visual evoked potentials, electroretinography, every 2 to 3 years)
  - Neurological exam (clinical, creatine kinase, electromyography, every 2 to 3 years)
-

Table 7: treatment with liposoluble vitamins:

Patients	Canadian cohort	French cohort	Statistics
Administration	PO	PO ± IV	
Vitamin E (IU/kg/d)	39±32	65±27	NS
Vitamin A (IU/d)	4000±1000	135,000±40,000	0.003
Vitamin D (IU/d)	1000±300	3000±500	0.006
Vitamin K	12.2±5.7	14.3±7.3	NS

Legend: NS: nonstatistically significant, PO: per oral, IV: intravenous.

Table 8: Treatment

Treatment:	
Early diagnosis without neurological complications: PO	Delayed diagnosis and neurological complications: PO + IV
<u>Diet:</u> -low fat diet (...) -Enriched in essential fatty acids (vegetable oils, fish...) - ± Enriched in medium-chain triglycerides	
<u>Liposoluble Vitamins PO:</u> -Vitamin E (hydrosoluble form): 50 IU/kg/d -Vitamin A: 15,000 IU/d (adjust according to plasma levels) -Vitamin D: 800-1200 IU/kg/d or 100,000 IU/ 2 month if < 5y old, and 600,000 IU/ 2 month if > 5y old -Vitamin K: 15 mg/week (adjust according to INR and plasma levels)	
<u>One perfusion / month:</u> -Fatty acids: intralipid 20% 2g/kg/month -Vitamin E: 4 to 6 mg/kg/month -Vitamin A: 500 IU/kg/month	

## **FIGURE LEGENDS**

### **FIGURE 1:**

Differences between various types of genetic hypocholesterolemia. The focus is placed on hypocholesterolemia syndromes with low LDL-cholesterol since HDL-related hypocholesterolemia remains asymptomatic during childhood. The upper part of the figure describes the clinical symptoms, whereas intermediary part defines the lipid abnormalities (lipid profile and fat oral meal), and the lower part mentions the genetic transmission.

Abeta, abetalipoproteinemia; asympt, asymptomatic; chr, chromosome; CRD, chylomicron retention disease; HDL, high density lipoprotein cholesterol; hetero, heterozygote; homo, homozygote; hyperTG, hypertriglyceridemia; hypobeta, hypobetalipoproteinemia; LCAT, lecithin cholesterol acyl transferase; LDL, low density lipoprotein cholesterol; Tangier D, Tangier disease; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; ApoAI, apolipoprotéine AI; ApoB, apolipoprotéine B; ↑, increase; ?, data unknown;

### **FIGURE 2:**

Evolution of plasma vitamin E levels (dotted lines) as a function of vitamins supplementation amount (full lines). The plasma variations are not correlated to vitamin E supplementations doses. Patients with high (100 mg/kg/d) or low (20 mg/kg/d) doses have the same average plasma vitamin E levels,  $\approx 60\%$  of the minimal normal value [12 micromol/L].

### **FIGURE 3:**

Plasma fatty acid distribution in the cholesterol ester of the French cohort at time of diagnosis (streaked columns) and after evolution (black columns). Results are expressed as % distribution.

N, normal range.



Figure 1

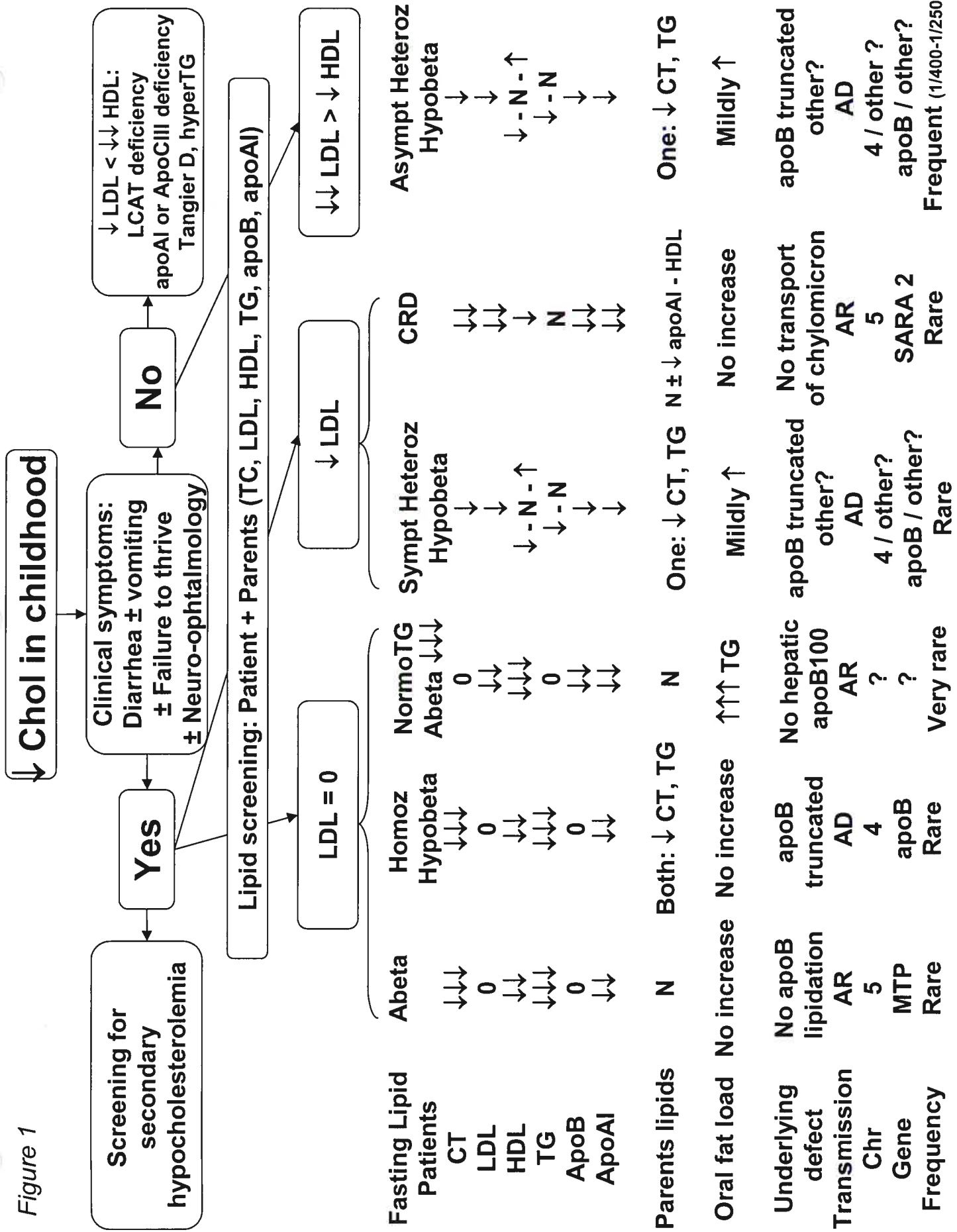


Figure 2 plasmatic vit E variation:

—●— VitE treatment U/kg/d    □ Vit E plasmatic % normal value

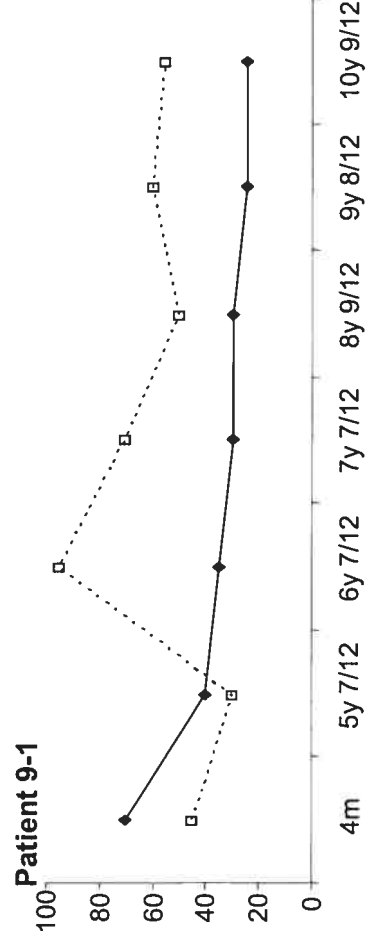
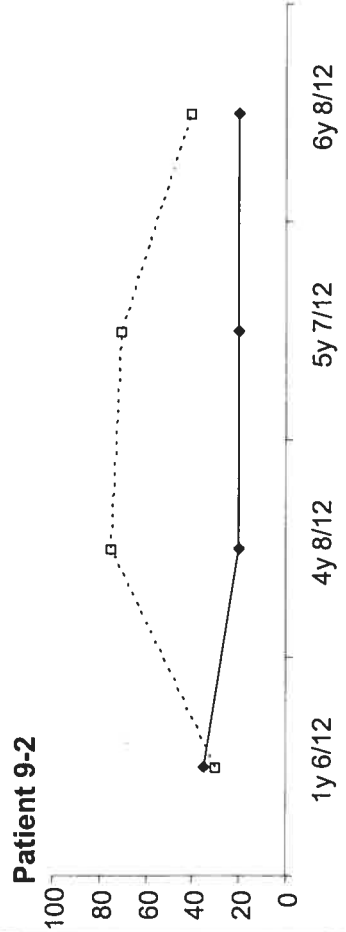
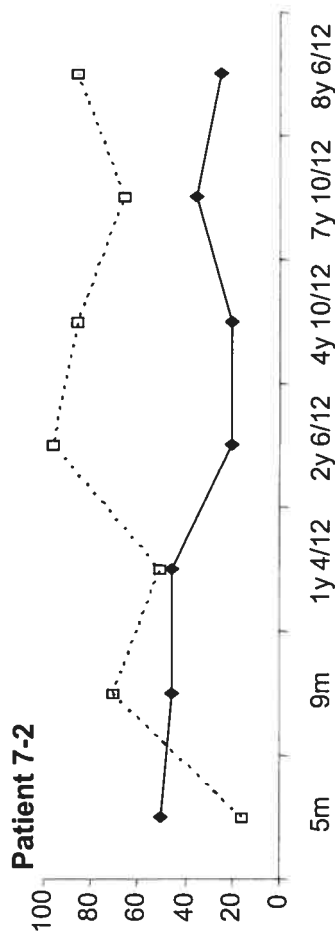
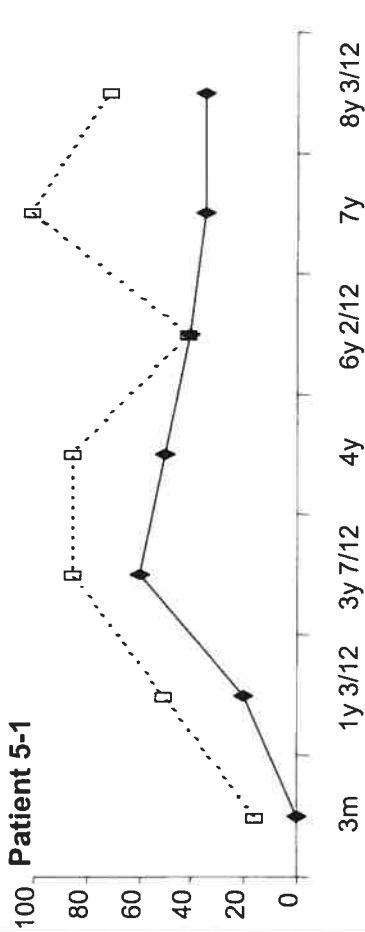
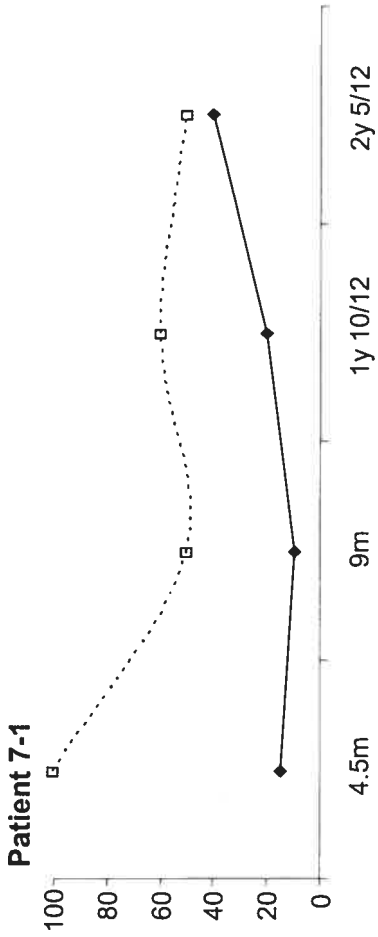
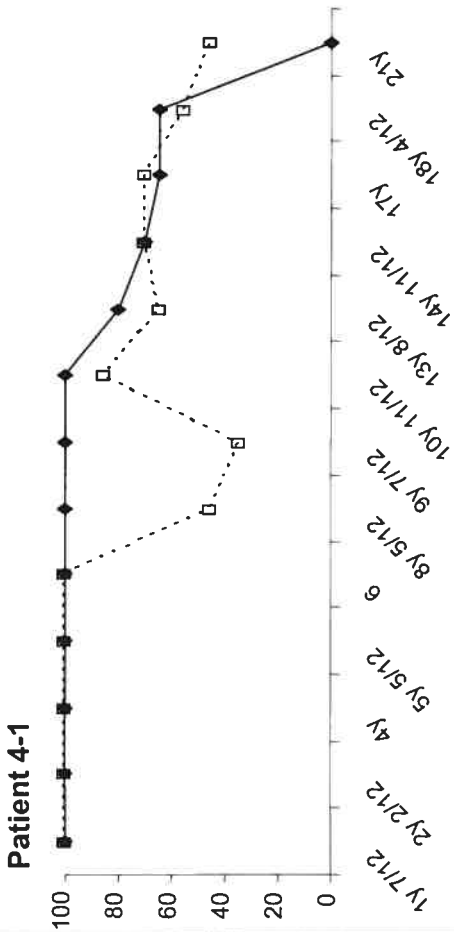
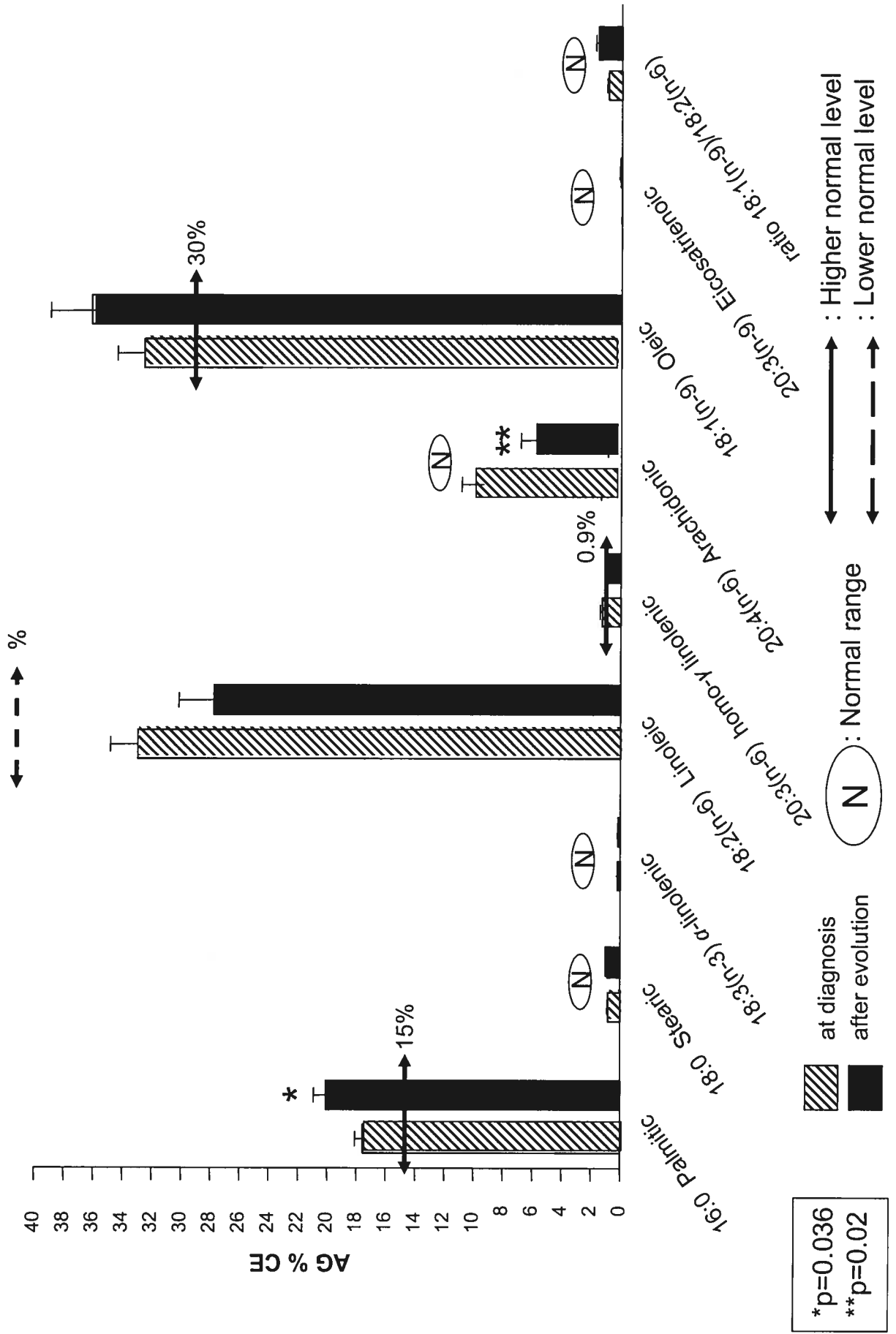


Figure 3

# AG (%CE) French cohort at diagnosis and after evolution



## **Partie C : Discussion générale**

### **I) INTRODUCTION**

Les connaissances sur le métabolisme, l'importance physiologique et l'implication en pathologie des lipides ont connu un essor important au cours des dernières décennies. Si les étapes intraluminales comme la misellisation ou l'hydrolyse ont été largement étudiées, par contre la phase intraentérocytaire n'a été l'objet d'investigation que plus récemment, possiblement à cause des difficultés techniques, probablement aussi à cause du concept ancien que l'intestin ne jouait qu'un rôle de "filtre" pour les nutriments. Bien que l'identification récente de transporteurs soit un progrès essentiel dans la caractérisation de ces étapes cellulaires, il reste encore de nombreuses lacunes avant d'obtenir une vue d'ensemble cohérente du processus entérocytaire de l'absorption des lipides. Actuellement, peu de données sont disponibles sur la régulation nutritionnelle ou hormonale des transporteurs, sur leur importance respective dans l'absorption lipidique, sur leur rôle au cours de diverses pathologies, ou même sur les voies de régulation qui permettent leur coordination. C'est pour ces raisons que nous avons choisi d'aborder chacune des 3 étapes de la phase entérocytaire que sont l'absorption des lipides au pôle apical, leur transport intraentérocytaire et leur sécrétion au pôle basolatéral. Avant de discuter de nos travaux et de leur interprétation, nous pouvons résumer les principaux résultats obtenus.

La première étape a été d'aborder le transport via le pôle apical et nous avons pu éclairer plusieurs éléments importants de la physiologie de l'absorption intestinale du cholestérol. Tout d'abord, le transporteur SR-BI est effectivement régulé par plusieurs effecteurs qui sont capables de modifier l'absorption intestinale des lipides, qu'il s'agisse d'effecteurs nutritionnels comme le cholestérol, les oxystérols et certains acides gras, ou bien d'hormones, de médiateurs de l'inflammation, ou encore de médicaments.

D'autre part, nous avons pu mettre en évidence qu'il existe une polarisation dans la régulation de ce transporteur au niveau entérocytaire. Ainsi, le même effecteur peut induire une modulation différente de l'expression de la protéine SR-BI selon le pôle par lequel il entre en contact avec la cellule, le pôle apical qui correspond au site l'alimentation versus le pôle basolatéral qui reflète le contact avec la voie sanguine. Nous avons ensuite précisé

le site cellulaire sur lequel a lieu la régulation du transporteur. En effet, cette régulation polarisée induit des changements de l'expression du transporteur SR-BI, principalement au pôle apical de la cellule, comme démontré par la technique de biotinylation. Enfin, nous avons pu mettre en évidence que la régulation de SR-BI est suivie d'une variation significative de la captation du cholestérol par les cellules Caco2. Lorsque l'expression de SR-BI est abaissée par différents effecteurs, il survient aussi une diminution de la captation entérocytaire du cholestérol. Ce résultat vient s'ajouter aux études précédentes de notre laboratoire et d'autres équipes qui démontrent que SR-BI serait un acteur important dans l'absorption intestinale du cholestérol [Levy 2003] [Hauser 1998] [Werder 2001].

Deuxièmement, pour l'étape de transport intraentérocytaire, nous avons mis en évidence pour la première fois l'existence d'anomalies susceptibles d'altérer la phase intraentérocytaire de l'absorption des lipides dans la FK, alliant à la fois la recherche clinique et fondamentale. En effet, jusqu'alors les travaux sur la malabsorption lipidique au cours de cette maladie s'étaient surtout intéressés aux anomalies de la phase intraluminaire (anomalies pancréatiques et biliaires). Nous avons ainsi démontré que plusieurs processus entérocytaires importants pour l'absorption des lipides étaient altérés chez la FK. D'une part, la biosynthèse des lipides est profondément perturbée pour les TG, PL et le cholestérol ester. D'autre part, il y a une efficacité diminuée de la biogénèse des apolipoprotéines, clairement démontrée pour l'ApoB48 et l'ApoAI. Enfin la sécrétion par le pôle basolatéral des lipoprotéines et des lipides est significativement abaissée. L'ensemble de ces troubles est accompagné par une baisse de la captation apicale des lipides.

Troisièmement, pour la phase de sécrétion au pôle basolatéral, nous avons caractérisé une cohorte de 16 sujets, puis comparé leurs mutations, l'expression de leur maladie, et leur prise en charge dans deux centres de référence pour les hypocholestérolémies (Hôpitaux Ste Justine-Montréal et Edouard Herriot-Lyon). Grâce à ce travail, nous avons identifié 3 nouvelles mutations ; décrit la cohorte la plus importante jusqu'ici et fourni de nouvelles données sur le phénotype de la maladie comme les mesures de densité osseuses mises en relation avec les taux de vitamine D circulants, la mesure précise de la cytolysse musculaire, ou l'absence d'atteinte myocardique. De plus, nos données suggèrent l'existence d'une corrélation génotype-phénotype puisque d'une part les facteurs de risques classiques (retard au diagnostic, évolution prolongée, déficit

vitaminique...) n'expliquent qu'en partie les différences d'expression de la maladie entre nos deux populations ; et que d'autre part il existe des différences histologiques aux biopsies intestinales selon les deux groupes de patients. Enfin, à partir de ces nouvelles données phénotypiques et en comparant les prises en charge différentes dans les deux centres participants, nous avons pu proposer des recommandations non seulement pour le suivi, mais aussi pour le traitement de ces enfants.

## **II) PHASE APICALE**

### **2-1) INTRODUCTION**

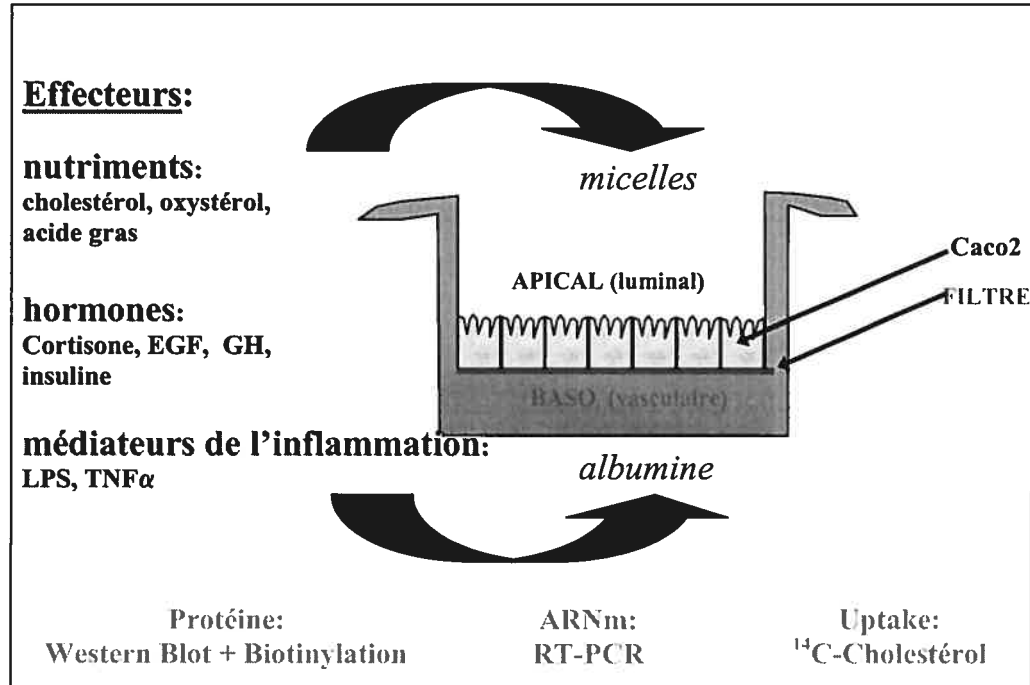
Les descriptions initiales de la régulation de SR-BI concernaient principalement les organes stéroïdiens et le foie où l'expression de cette protéine est particulièrement abondante. SR-BI permet l'entrée du cholestérol dans ces cellules à partir des HDL circulantes. Le niveau d'expression de SR-BI semble participer à la régulation de la synthèse des hormones stéroïdiennes via la captation de cholestérol. Ainsi, au niveau surrénalien chez le rongeur l'ACTH provoque une augmentation de l'expression de SR-BI [Rigotti 1996]. Au niveau testiculaire, l'HCG stimule les niveaux d'ARNm et d'expression de SR-BI parallèlement à l'augmentation de la captation de HDL-cholestérol [Reaven 1998]. De même dans l'ovaire, SR-BI augmente sous l'action de la FSH [Azhar 1998]. La captation de cholestérol à partir des HDL pourrait s'appliquer au pôle basolatéral de l'entérocyte qui est au contact des capillaires sanguins et lymphatiques, cependant le contexte est très différent au pôle apical qui est orienté vers la lumière intestinale et les nutriments. Nous avons donc choisi d'étudier plus spécifiquement la régulation de SR-BI dans l'entérocyte, de préciser à quel pôle avaient lieu les variations de son expression, et de mesurer les éventuelles modifications d'absorption induites.

### **2-2) MATÉRIEL ET MÉTHODE**

Très brièvement, la technique choisie est celle de culture des cellules humaines Caco2 sur filtre afin de pouvoir incuber un même effecteur à un pôle précis uniquement (apical versus basolatéral).

La figure ci-dessous résume les techniques utilisées, on pourra se reporter à l'article pour plus de détail.

**Figure 12 Technique de culture sur filtre et d'incubation sélective**



Légende : un même effecteur peut être incubé sélectivement en apical (pôle intestinal) ou en basolatéral (pôle vasculaire). Les variations des protéines sont dosées par Western Blot ; la localisation cellulaire de cette variation par biotinylation; les variations d'ARNm par RT-PCR ; et enfin la captation de cholestérol grâce au cholestérol radioactif.

### 2-3) RÉSULTATS ACTUELS

Nos expérimentations sur les cultures cellulaires d'entérocytes humains (Caco2/15) démontrent d'une part l'existence de plusieurs facteurs régulant l'expression de la protéine SR-BI, et d'autre part que cette régulation est polarisée. Nous aborderons les différents effecteurs étudiés : nutriments, hormones, facteurs inflammatoires et médicaments. Nous aborderons chaque classe d'effecteurs en faisant d'abord un très bref rappel des résultats sur la variation de la protéine et de l'ARNm, puis nous rapporterons les données de la littérature connues sur cette régulation, afin de les comparer à nos résultats dans une courte discussion.

### 2-3-1) Nutriments

L'incubation de **cholestérol** au pôle apical comme au pôle basolatéral des entérocytes diminue significativement la quantité de protéine SR-BI présente. Il n'existe pas d'effet dose-réponse, seulement une réponse de type on-off pour les concentrations utilisées (0.1, 0.5, 50, 100, 500, 1000  $\mu\text{mol/l}$  – données non montrées). Cet abaissement se fait par régulation génique avec une diminution de l'ARNm. La littérature rapporte que la modulation de SR-BI par le cholestérol peut être spécifique de l'espèce animale et du type cellulaire étudiés. La spécificité d'espèce est démontrée au niveau hépatique puisqu'un régime enrichi modérément en cholestérol ne modifie pas le niveaux de SR-BI chez le hamster alors qu'il l'augmente chez le rat [Woollett 1997] [Fluiter 1997]. La spécificité cellulaire est illustrée par l'impact d'une diète riche en cholestérol qui entraîne dans le foie de rat une diminution de la protéine SR-BI au niveau du parenchyme mais une augmentation dans les cellules de kupffer [Fluiter 1997]. Donc, SR-BI pourrait jouer des rôles différents au niveau du flux de cholestérol selon les types cellulaires : contrôle de l'entrée sélective du cholestérol dans les hépatocytes à partir des HDL, mais sortie de cholestérol des cellules de Kupffer vers les HDL par exemple. Ces résultats soulignent l'importance d'étudier spécifiquement SR-BI dans des entérocytes humains si l'on veut évaluer son rôle dans l'absorption intestinale. Nos résultats suggèrent un contrôle négatif exercé par le cholestérol sur SR-BI. Ainsi, après absorption du cholestérol, la quantité de transporteur diminue pour ralentir l'influx de ce substrat dans la cellule intestinale.

Les **oxystérols** (7 cétocholestérol et 25 hydroxycholestérol), incubés au pôle apical comme au pôle basolatéral des Caco2, diminuent la quantité d'ARNm et de protéine SR-BI comme le fait le cholestérol. Cette régulation pourrait impliquer le facteur de transcription LXR. En effet, il existe un élément de réponse LXR sur le promoteur du SR-BI humain et les oxystérols sont de puissants activateurs de LXR [Malerod 2002]. Cet élément de réponse est activé par exemple par le 22 hydroxycholestérol qui augmente l'expression de SR-BI dans les cellules hépatiques (HepG2, Hepa 1c1c) ou les préadipocytes (3T3-L1) [Malerod 2002]. La différence de régulation entre les hépatocytes et les entérocytes peut provenir d'une régulation qui serait spécifique au type d'oxystérol et/ou au type cellulaire [Schroepfer 2000]. Par ailleurs, les oxystérols sont capables de modifier les propriétés des



membranes cellulaires en affectant la fluidité et la perméabilité membranaire. Cette désorganisation de la structure membranaire pourrait perturber le fonctionnement des récepteurs membranaires en affectant leur leur turn-over par exemple [Luu 1991] [Richert1984] [Theunissen 1986].

En diminuant la quantité de SR-BI, les oxystérols pourraient diminuer l'absorption du cholestérol diététique selon notre modèle proposé. Effectivement, il est rapporté que les oxystérols diminuent l'absorption intestinale du cholestérol et augmentent son excrétion fécale [Brabson 1988] [Schroepfer 1987]. D'autres mécanismes pourraient également intervenir comme la diminution importante d'activité de l'ACAT (-77%) qui permet le stockage du cholestérol sous sa forme estérifiée. Les inhibiteurs de l'ACAT sont connus pour diminuer l'absorption intestinale du cholestérol [Needleman 1987], [Raal 2003].

L'effet des **acides gras** sur les niveaux de SR-BI varie selon le type d'acide gras et le pôle d'incubation. Ainsi, l'acide oléique monoinsaturé n'entraîne aucune modification des taux de la protéine SR-BI. Par contre, certains acides gras polyinsaturés de la famille n-3 (acide linoléique et EPA) sont les seuls capables de réguler à la baisse la protéine SR-BI. Enfin, seul un acide gras de la famille n-6 (l'AA) a augmenté les taux de protéine SR-BI. Quelque soit la régulation sur SR-BI, il s'agit d'un mécanisme post-translationnel, aucune variation d'ARNm n'ayant été enregistrée par RT-PCR. Des études antérieures rapportent ce même type de régulation spécifique selon le type d'AG au niveau hépatique. En effet, chez le hamster, les acides gras polyinsaturés augmentent la protéine SR-BI, alors que certains acides gras saturés comme l'acide myristique entraînent une régulation transcriptionnelle négative avec baisse de l'ARNm et de la protéine SR-BI de façon dose dépendante [Loison 2002]. Il est important de noter que la régulation provoquée par un AG précis dépend du pôle cellulaire par lequel il interagit avec l'entérocyte, comme cela est résumé dans le tableau ci dessous. En effet : i) L'acide arachidonique n'entraîne aucune modulation de SR-BI lorsqu'il est incubé en apical, alors que par le pôle basolatéral il provoque une augmentation de la protéine ; ii) L'acide linoléique diminue le SR-BI lorsqu'il pénètre par la face luminale des cellules, mais n'a aucun effet par la face vasculaire. iii) L'EPA diminue la quantité de SR-BI quelque soit le pôle par lequel il entre en contact avec la cellule. SR-BI est diminué lors de l'incubation des Caco-2 avec les acides gras n-3 (linoléique et EPA) présents à la face luminale des entérocytes alors que

l'acide oléique n'a aucune action. Ce résultat est à rapprocher de ceux obtenus in vivo : une diète enrichie en acide linoléique diminue l'absorption intestinale du cholestérol [Thomson 1989]. Il est intéressant de souligner que chez le rongeur, ces mêmes acides gras de la famille n-3, lorsqu'ils sont donnés au cours d'une diète enrichie, régulent aussi l'expression de SR-BI au niveau hépatique mais à la hausse [Morise 2004] [Spady 1999] [Le Morvan 2002]. Bien que la régulation de SR-BI dans cet organe soit l'opposée de celle observée dans l'entérocyte, elle aboutit au même effet cardioprotecteur puisque la baisse de SR-BI dans l'entérocyte pourrait diminuer l'apport de cholestérol à la circulation sanguine alors que sa hausse dans l'hépatocyte favoriserait la clairance plasmatique du cholestérol.

**Tableau IX Modulation de la quantité totale de SR-BI par différents AG dans les Caco2**

Acide Gras	Pôle d'incubation	Variation de SR-BI
Acide Arachidonique	Apical	→
	Basolatéral	↑
Acide $\alpha$ -Linoléique	Apical	↓
	Basolatéral	→
EPA	Apical	↓
	Basolatéral	↓
Acide Oléique	Apical	→
	Basolatéral	→

Légende : ↑, augmentation ; →, sans effet

### 2-3-2) Hormones

Les facteurs trophiques que sont l'épidermal growth factor (EGF) et l'hormone de croissance (GH) diminuent la quantité de SR-BI lorsqu'ils sont incubés en apical aussi bien qu'en basolatéral, sans modification des niveaux d'ARNm.

Le récepteur EGF a été localisé à la face apicale de culture de cellules coliques cancéreuses (HT29-D4), cellules proches des Caco2 par leur propriété à se différencier en

cellules entérocytaires. Seulement 15% du récepteur EGF se retrouve au pôle apical. Le récepteur est fonctionnel comme le prouve sa capacité d'internalisation après liaison à l'EGF [Lehmann 1994]. Une polarité de régulation par l'EGF a déjà été rapportée dans l'entérocyte : les cellules Caco2 présentent une régulation positive plus importante du cotransport sodium-glucose lorsque l'EGF est incubé en basolatéral comparativement au pôle apical [Mehta 1997], étayant ainsi nos résultats pour le SR-BI dans une autre voie métabolique.

Le récepteur de la **GH** est exprimé sur les cellules intestinales humaines dès la 20<sup>e</sup> semaine de gestation [Simard 1996] [Nagano 1995]. Les patients déficitaires en GH présentent des taux élevés de cholestérol plasmatique alors que l'administration de GH abaisse les taux d'hypercholestérolémie [De Boer 1994] [Cuneo 1993] [Russell-Jones 1994]. Cependant, les mesures d'absorption intestinale du cholestérol in vivo sont contradictoires selon les études : chez l'homme la GH ne modifierait pas l'absorption intestinale, alors que chez le cochon avec transplantation intestinale, la GH augmenterait le transport intestinal du cholestérol [Leonsson 1999] [Pakarinen 2004]. Ces résultats discordants réclament d'autres investigations pour pouvoir éclaircir cet aspect important compte tenu du retentissement pour les patients sous hormonothérapie substitutive de GH.

**L'insuline** n'abaisse le SR-BI que lorsqu'elle agit au pôle basolatéral ; elle n'a pas d'action en apical. Cette régulation est post-transcriptionnelle. L'insuline possède des récepteurs au niveau de l'entérocyte qui sont distincts de ceux des autres facteurs de croissance, comme l'EGF par exemple [Zimmerman 1985]. De plus, cette hormone est capable d'être véhiculée dans les deux sens d'un pôle à l'autre de l'entérocyte par un mécanisme de transcytose [Bendayan 1994] [Shah 1996]. L'absence de régulation de SR-BI par l'insuline au pôle apical n'est guère étonnante puisque physiologiquement, la quantité d'insuline présente au pôle intestinal est très faible comparativement au pôle basolatéral. La diminution de SR-BI en présence d'insuline en basolatéral pourrait participer à la baisse de l'absorption du cholestérol lors d'un traitement par insuline chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine comme nous l'avons détaillé au chapitre A-2-2).

### 2-3-3) Fibrates

L'incubation de cellules Caco2 avec le fibrate WY14643, qui est un PPAR $\alpha$  agoniste, entraîne une diminution importante de la quantité de SR-BI du pôle apical mais pas de variation par le pôle basolatéral de l'entérocyte. Cette régulation ne passe pas par une modification des taux d'ARNm. Antérieurement, des résultats similaires ont été décrits dans les cellules hépatiques : des souris traitées aux fibrates ont une diminution des niveaux de la protéine SR-BI dans leurs hépatocytes. La diminution de SR-BI s'accompagnait d'une baisse des taux de TG et de HDL-C ainsi que d'une augmentation de la taille des HDL [Mardones 2003]. La régulation de SR-BI au niveau hépatique est bien médiée par la voie PPAR $\alpha$  comme le démontre l'absence de régulation de SR-BI chez les souris déficientes pour PPAR $\alpha$ . Cependant, cette régulation négative est tissu dépendante puisque les activateurs de PPAR $\alpha$  entraînent une augmentation du SR-BI dans les macrophages et monocytes humains [Chinetti 2000]. Il a déjà été démontré que l'activation de la voie des PPAR peut entraîner une régulation négative de différentes protéines, dont certaines apolipoprotéines [Corton 2000] [Braissant 1996] [Mansen 1996] [Torra 2001]. La baisse de la protéine SR-BI dans l'hépatocyte sous l'action des fibrates ne s'accompagnait pas non plus d'une modification des taux d'ARNm, à l'instar de notre modèle cellulaire entérocytaire [Mardones 2003]. Une telle régulation post-transcriptionnelle de SR-BI a déjà été rapportée à plusieurs reprises, non seulement dans le foie de souris [Arai 1999] [Witt 2000], mais aussi au niveau intestinal avec une diminution de la protéine SR-BI sans altération des taux d'ARNm lorsque la circulation entérohépatique est perturbée (dérivation biliaire, souris déficientes pour les gènes *Mdr2* ou de la cholestérol 7 $\alpha$ -hydroxylase) [Voshol 2001].

Une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol sous l'influence de ligands des PPAR a déjà été suggérée par plusieurs études. Le gemfibrozil, ligand PPAR $\alpha$ , inhibe l'absorption intestinale du cholestérol depuis la lumière intestinale vers la lymphe chez le rat [Umeda 2001]. D'autre part, l'excrétion fécale de cholestérol est triplée chez des souris traitées par agonistes fibrates PPAR $\alpha$  [Post 2001]. Donc, la diminution des quantités de SR-BI au niveau apical que nous mesurons dans les cellules Caco2 sous l'action des fibrates est compatible avec un rôle absorbant du SR-BI au niveau entérocytaire.

#### 2-3-4) Facteurs pro-inflammatoires

Dans notre étude, les incubations avec le Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) diminuent les taux de SR-BI sans affecter les niveaux d'ARNm. Il est actuellement bien établi que le TNF $\alpha$  perturbe de manière importante le métabolisme lipidique dans l'entérocyte. Dans les cellules Caco2, il diminue la synthèse de novo de CE, PL et TG, des apolipoprotéines (ApoAI, B48, B100) ou de certaines lipoprotéines (VLDL et HDL), sans que cette inhibition ne soit due à un effet cytotoxique [Mehran 1995]. Ces perturbations de synthèse et de sécrétion des apolipoprotéines et des lipoprotéines sont en accord avec la diminution d'absorption intestinale des lipides retrouvée dans plusieurs pathologies inflammatoires intestinales comme la maladie de Crohn par exemple. La régulation négative de SR-BI par le TNF $\alpha$  que nous décrivons dans notre étude est donc cohérente avec les données précédemment citées, soutenant l'hypothèse d'un rôle de SR-BI dans le trafic entérocytaire du cholestérol.

Le lipopolysaccharide (LPS) diminue significativement la concentration de protéine SR-BI mais sans affecter les niveaux d'ARNm. Le LPS est un constituant essentiel de la paroi de certaines bactéries gram négatives retrouvées dans la flore digestive. Il peut donc se retrouver au contact de la bordure en brosse des entérocytes avec la flore commensale ou pathogène, mais également au pôle vasculaire de la cellule intestinale lors de bactériémie ou de septicémie à bacilles gram négatifs avec libération d'endotoxines dont le LPS [Periti 1999]. Ce dernier joue alors un rôle important dans la physiopathologie du choc septique. Le LPS, délétère pour l'organisme, est neutralisé par les HDL qui peuvent le lier pour permettre son acheminement vers le foie où il sera éliminé [Parker 1995]. Or, les HDL sont aussi l'un des ligands privilégiés de SR-BI, ce qui indique une voie possible d'interaction entre LPS et SR-BI au pôle basolatéral des entérocytes. D'autre part, une liaison plus directe entre le LPS et SR-BI est également possible : le LPS est capable de se lier au CLA-1 (dans des cellules HeLa avec transfection stable de cla-1 humain) qui est un orthologue humain de SR-BI, avant d'être capté et de s'accumuler initialement dans les membranes plasmatiques puis secondairement dans le Golgi [Vishnyakova 2003]. Le LPS est connu pour diminuer la synthèse de SR-BI dans d'autres lignées cellulaires comme les hépatocytes ou les macrophages, bien que les mécanismes de régulation soient différents

puisque dans les Caco2 nous ne détectons aucune modification d'ARNm, alors que dans les deux autres lignées citées, la quantité d'ARNm est abaissée [Baranova 2002] [Buechler 1999] [Khovidhunkit 2001].

L'interféron- $\gamma$  (INF $\gamma$ ) abaisse la quantité de SR-BI lorsqu'il pénètre par la face apicale, alors qu'en basolatéral il n'a pas d'influence sur les taux de la protéine. Aucune variation des taux d'ARNm n'est enregistrée par RT-PCR. L'INF $\gamma$  a déjà été décrit comme régulant à la baisse le SR-BI dans les monocytes et macrophages humains [Buechler 1999]. Très peu de données sont disponibles sur cet effecteur au niveau entérocytaire.

#### 2-4) PERSPECTIVES

L'implication de SR-BI dans le transport du cholestérol est maintenant clairement établie, même si l'importance exacte de son rôle en physiologie reste à déterminer. Nous avons souligné au chapitre A-2) que l'invalidation des protéines candidates n'entraînait que rarement une malabsorption du cholestérol (hormis pour NPCILI), malgré des données probantes en modèles cellulaires. Ceci peut s'expliquer par l'existence de stratégies de régulation compensant la baisse du transporteur en question. Nous souhaitons étudier plus précisément les mécanismes de coopération entre les principaux transporteurs, en particulier SR-BI, NPCILI et CD13. La technique d'invalidation génique multiple dans le modèle Caco2 nous permettra d'avancer dans la compréhension de ces interactions.

La vitamine E est l'un des anti oxydants naturels le plus puissant. Or, le stress oxydatif joue un rôle bien établi dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Or, récemment, l'implication de SR-BI dans le transport de cette vitamine au niveau entérocytaire a été démontrée [Reboul 2006]. Par contre, aucun article de la littérature ne s'est penché sur le rôle de NPCILI dans l'absorption de la vitamine E, alors que le rôle de ce transporteur a été décrit pour d'autres vitamines liposolubles comme la vitamine A [During 2005]. D'autres part, nous avons pu démontrer dans notre laboratoire que l'invalidation du gène de NPCILI altère l'expression du gène de SR-BI. Nous souhaitons étudier si le transport de cet antioxydant puissant qu'est la vitamine E est affecté lorsque NPCIL est inhibé, que ce soit par invalidation ou par son inhibiteur chimique, l'Ezétimibe.

### **III) TRANSPORT INTRAENTÉROCYTAIRE**

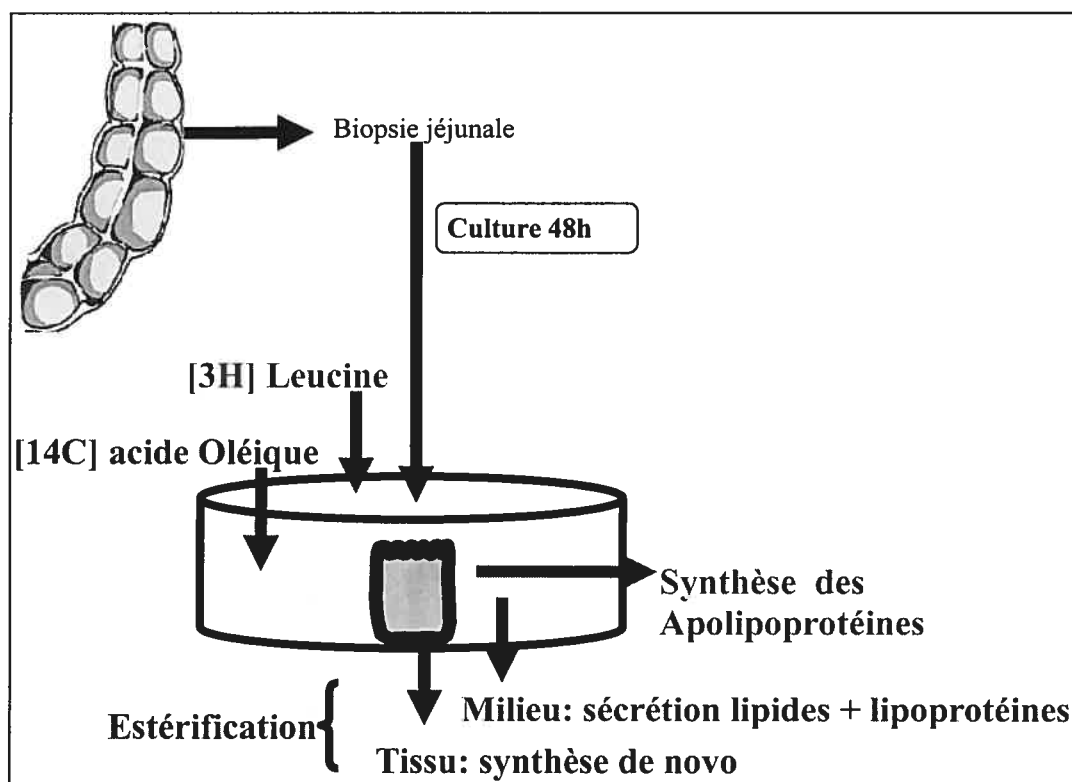
#### **3-1) INTRODUCTION**

Dans la Fibrose Kystique (FK), le traitement substitutif par des enzymes pancréatiques améliore de manière drastique la malabsorption intestinale des graisses. Cependant, la stéatorrhée ne se normalise pas chez certains patients malgré de fortes doses d'enzymes. Cette constatation nous a poussés à étudier la phase entérocytaire de l'absorption des graisses à la recherche d'anomalies susceptibles d'expliquer cette résistance au traitement. Il s'agit là d'un nouveau champ d'exploration dans l'étude de la physiopathologie de la FK. En effet, la vaste majorité des études publiées ne considérait que les troubles de la phase luminale.

#### **3-2) MATÉRIEL ET MÉTHODE**

Nous avons choisi la technique de culture d'explants intestinaux qui permet de limiter l'influence des facteurs intraluminaux pour se concentrer sur la cellule intestinale. De plus, il s'agit de tissus humains et non de modèles animaux ou cellulaires avec invalidation génique chez lesquels la physiopathologie peut parfois être différente de celle rencontrée chez l'homme. Nous allons donc aborder les résultats obtenus et les nouvelles questions qu'ils soulèvent.

**Figure 13 Technique d'incubation d'explants intestinaux**



Légende : L'incubation avec la leucine tritiée permet de mesurer la synthèse protéique (Apolipoprotéines). L'incubation avec l'acide oléique marqué au C14 permet de mesurer la synthèse lipidique (TG, CE, PL).

### 3-3) RÉSULTATS ACTUELS

Nous avons donc décrit grâce aux explants intestinaux l'existence d'anomalies intraentérocytaires participant à la malabsorption intestinale des graisses dans la FK. En effet, on note une diminution de la reestérification des lipides d'un tiers, de la synthèse des apolipoprotéines d'un tiers également et de la sécrétion des lipides de moitié environ. Cependant, les mécanismes responsables de ces dysfonctionnements intraentérocytaires demeurent inconnus, bien que nous ayons exclu l'implication de la MTP. Afin de proposer une prise en charge thérapeutique efficace de cette composante entérocytaire participant à la malnutrition des patients, il est crucial d'élucider les mécanismes responsables. Deux hypothèses peuvent être formulées.



Premièrement, le déficit en AGE, par lui-même, pourrait participer activement à la physiopathologie de la FK, notamment à la malabsorption des graisses. En effet, la carence en AGE induit chez l'animal des symptômes proches de ceux de la FK : défaut dans le transport cellulaire du sodium, tendance accrue à la colonisation des voies aériennes supérieures par les bactéries [Eynard 1992] et anomalies des fonctions macrophagiques dans les alvéoles pulmonaires et altération du surfactant [Harper 1982] [Galabert 1978]. De plus, les changements au niveau des cellules épithéliales et de la muqueuse intestinale provoqués par l'inactivation du gène CFTR chez l'animal sont améliorés par la supplémentation en DHA (20:4n-3) qui est métabolisé à partir de l'AGE précurseur [Freedman 1999]. Par ailleurs, un déficit en AGE est déjà connu pour altérer l'absorption intestinale des graisses en affectant plusieurs éléments essentiels comme la quantité et la composition des acides biliaires [Sraffeh 1974], [Levy 1992], l'histologie de la muqueuse intestinale [Freedman 1999] et la fluidité des membranes où se localisent les protéines clés responsables de l'assemblage des lipoprotéines. Puisque les anomalies intraluminales ne suffisent pas à expliquer entièrement la malabsorption intestinale des graisses dans la FK et que la carence en AGE est susceptible d'altérer par elle-même l'absorption lipidique, il est logique de proposer que la carence en AGE pourrait être à l'origine des anomalies intraentérocytaires décrites dans notre article.

Deuxièmement, la mutation du CFTR, indépendamment de la carence en AGE, pourrait altérer les étapes entérocytaires de l'absorption des graisses. Le CFTR est une protéine connue surtout pour son activité de transporter le chlore. Cependant, le CFTR est concerné aussi par de nombreuses autres fonctions de transport qui pourraient être impliquées dans l'absorption entérocytaire des lipides, à savoir : la régulation de transporteurs apicaux, les altérations du pH intracellulaire, le transport intracellulaire et la sécrétion au pôle basolatéral. Tout d'abord, le CFTR influence l'expression de transporteurs membranaires pour des ligands aussi différents que des ions, le glutamate, certaines hormones ou des neurotransmetteurs [Briel 1998] [Mall 1999] [Xu 2003]. De plus, il est suggéré que la protéine CFTR est impliquée dans la régulation du trafic intracellulaire des membranes [Jilling 1997], et qu'elle pourrait réguler la composition des membranes en PL, tout comme l'incorporation d'AGE dans ces phospholipides, ce qui a un impact direct sur la fluidité membranaire et les fonctions des protéines membranaires

[Kang 1992]. Le CFTR influence aussi le transport intracellulaire par sa capacité à réguler la fusion des endosomes, le trafic vésiculaire et à interagir avec certains PL qui jouent le rôle de lipides "chaperones" [Biwersi 1996] [Eidelman 2002]. Par ailleurs, l'invalidation du CFTR altère plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides comme le protéasome S26 indispensable au métabolisme de l'ApoB [Xu 2003]. Enfin, le CFTR est également impliqué dans plusieurs processus de sécrétion comme les acides biliaires par les hépatocytes, les anticorps par les lymphocytes, l'INF $\gamma$  par les monocytes et les neurotransmetteurs par les cellules neuroendocrines pulmonaires [Vlahcevic 1971] [Bubien 2001] [Moss 2000] [Pan 2002]. Inversement, les vésicules COPII qui ne sont pas fonctionnelles au cours de la maladie de Rétention des Chylomicrons (chapitre IV) transportent également le CFTR depuis le réticulum vers l'appareil de Golgi, soulignant ainsi que les interactions entre CFTR et transport des lipides sont multiples [Yoo 2002]. A la lumière de ces données de la littérature et de nos premiers résultats, il apparaît donc crucial d'étudier les interactions entre le CFTR et les étapes intraentérocytaires d'absorption, de transport et de sécrétion des lipides.

### 3-4) PERSPECTIVES

Pour essayer de vérifier ces deux hypothèses, nous pourrions élaborer un protocole qui s'appuyerait sur la même technique des explants intestinaux. La comparaison de deux groupes de sujets ayant tous la même mutation mais des statuts différents en AGE permettrait de déterminer la part respective qui revient à la déficience en AGE ou à la mutation du CFTR directement. En effet, si le groupe sans déficit en AGE présente également les anomalies intraentérocytaires que nous venons de décrire, alors nous pourrions conclure que la mutation du CFTR participe activement à la physiopathologie de ces anomalies. La mutation à choisir devrait être la delta F508, car c'est la plus fréquente et elle est associée au déficit le plus sévère en AGE. De plus, dans cette population, il existe bien une variabilité des statuts en AGE comme nous l'avons vérifié au sein des deux cohortes de patients avec FK suivis dans les services de pneumologie de Ste Justine et d'Edouard Herriot.

Une autre perspective complémentaire serait d'élaborer des études de supplémentation en AGE chez ces enfants atteints de FK, en tenant compte des mécanismes éventuellement mis en évidence par le projet que nous venons juste de décrire. En effet, la compréhension des anomalies du métabolisme des AGE en lien avec le CFTR modifierait considérablement l'approche thérapeutique pour tenter de corriger le déficit en AGE : si une anomalie fonctionnelle se trouve en amont des premières enzymes (delta-6 desaturase) qui métabolisent les AGE (acides linoléique et linoléique), alors l'apport de ces précurseurs ne suffirait pas à améliorer le statut en AGE des sujets. Mais comme les niveaux plasmatiques sont différents des taux tissulaires, il est essentiel de pouvoir déterminer les classes anormales d'AGE ainsi que les niveaux d'activités des enzymes impliquées dans leur métabolisme directement dans les tissus.

Enfin, développer un réseau international d'experts travaillant sur les anomalies intraentérocytaires de la FK est un objectif à plus long terme également. Les échanges favorisés par un tel réseau devrait nous permettre d'augmenter nos connaissances fondamentales sur cette étape trop peu documentée jusqu'à présent, ainsi que d'élaborer des protocoles de recherche cliniques multicentriques avec des cohortes suffisamment importantes afin d'améliorer la prise en charge nutritionnelle de ces patients. Des contacts ont déjà été pris entre le Canada, la France et la Belgique.

#### **IV) SÉCRÉTION AU PÔLE BASO-LATÉRAL**

##### **4-1) INTRODUCTION**

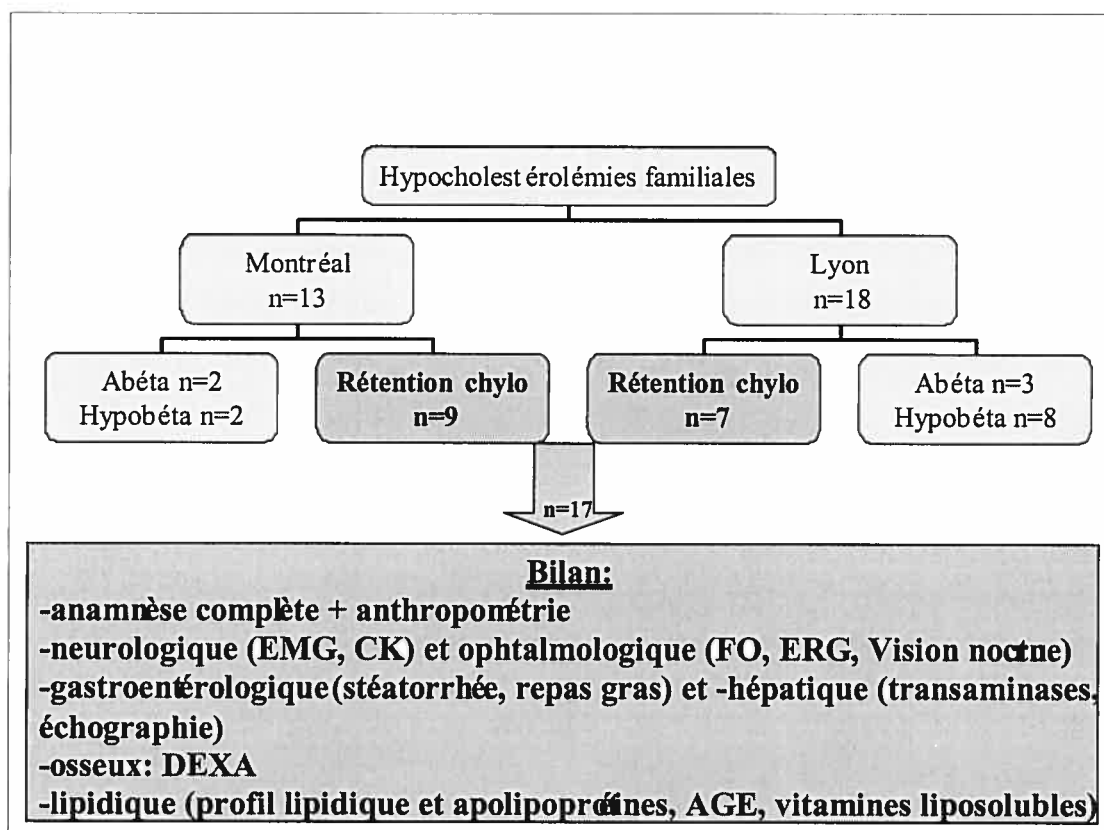
L'étude des maladies génétiques rares qui sont responsables d'une hypocholestérolémie a permis des avancées majeures dans la compréhension de la physiologie de l'absorption intestinale des lipides. Ainsi, les travaux sur l'HB ont démontré le rôle essentiel de l'ApoB dans la cohésion de la structure du chylomicron [Collins 1988] [Young 1988] [Leppert 1988]. Les études sur l'AB sont venues éclairer l'importance de la MTP dans la synthèse de l'ApoB [Wetterau 1992] [Sharp 1993] [Shoulders 1993]. Enfin, l'identification récente du gène muté SARA2 et ses conséquences sur la formation des vésicules de transport COPII a permis d'identifier cette voie importante de sécrétion des

chylomicrons [Jones 2002]. Cependant, plusieurs problèmes se posent au clinicien qui suit des patients atteints de MRC. Tout d'abord une difficulté diagnostique, puisque les ressemblances entre les différentes hypocholestérolémies familiales, ainsi que l'hétérogénéité phénotypique au sein d'une même pathologie rendent souvent le diagnostic final imprécis si l'on ne pratique pas de diagnostic moléculaire. D'autre part, une difficulté pour le suivi et le traitement liée au manque de connaissance sur l'expression clinique, l'évolution à long terme et l'absence de recommandations spécifiques. En effet, la MRC est une maladie génétique rare, seulement une quarantaine de patients a été publiée jusqu'à présent. C'est pour ces raisons que dans le volet de recherche sur la phase de sécrétion basolatérale nous avons choisi de travailler sur la maladie de MRC.

#### **4-2) MATÉRIEL ET MÉTHODE**

Pour cette étude nous avons étudié le génotype de 2 cohortes de patients avec hypocholestérolémie suivis dans les Centres Hospitaliers Universitaires de Ste-Justine (Montréal, Canada) et Edouard Herriot (Lyon, France). La méthodologie est résumée dans la figure ci-dessous.

**Figure 14 Recrutement et inclusion des patients avec rétention de chylomicron**



#### 4-3) RÉSULTATS ACTUELS

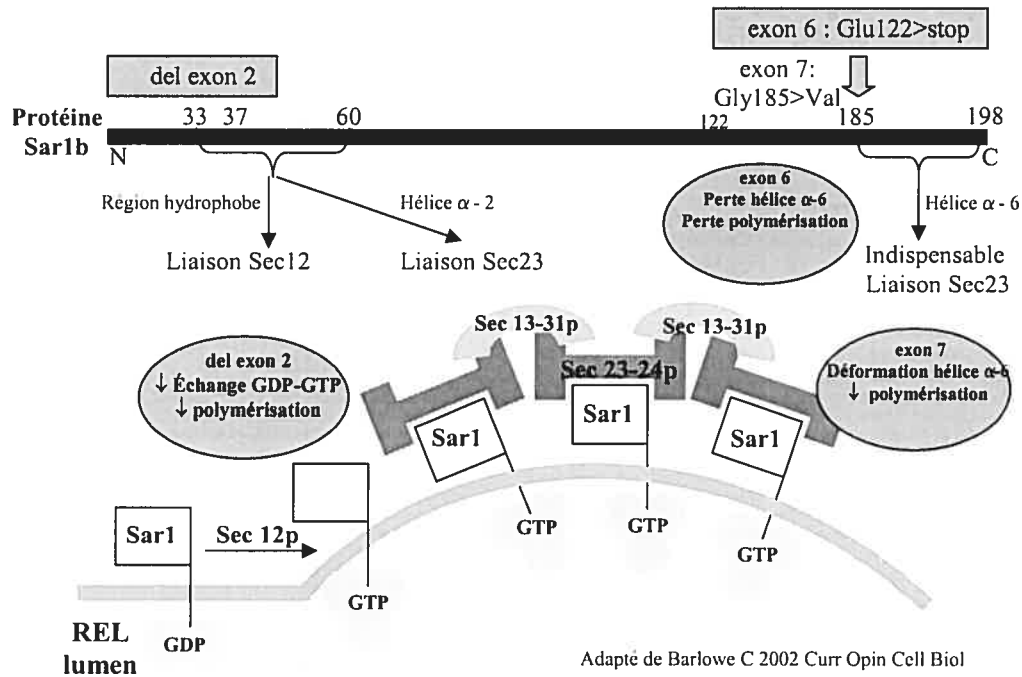
Les points forts de notre études peuvent se résumer ainsi : premièrement il s'agit de la plus importante cohorte publiée jusqu'à présent puisque parmi la quarantaine de cas décrits précédemment seulement 2 cohortes étaient présentes, qui comprenaient 7 et 8 sujets chacune [Bouma 1986] [Lacaille 1989] [Roy 1987] [Levy 1987] ; deuxièmement, la description du phénotype des sujets est particulièrement exhaustive tant cliniquement que biologiquement, apportant ainsi des données nouvelles sur l'expression clinique de cette maladie ; troisièmement, les sujets ont bénéficié d'un suivi particulièrement long (5 ans en moyenne pour les français et 10 ans pour les canadiens, certains ayant un suivi de plus de 20 ans) ; quatrièmement, il s'agit du premier travail comparant le phénotype au génotype au cours de la MRC ; enfin cinquièmement, c'est également la première étude à comparer et analyser les prises en charge de patients avec MRC dans deux centres spécialisés. La contribution scientifique de ce travail comprend la découverte de nouvelles mutations, la

description de nouvelles données phénotypiques (myolyse, absence d'atteinte myocardique) ou la mesure précise de symptômes cliniques connus antérieurement mais non quantifiés (déméralisation osseuse par exemple), et l'élaboration de recommandations pour le diagnostic, le suivi et le traitement des patients atteints de MRC.

Les résultats principaux méritant une discussion sont les suivants : notre hypothèse principale (cf chapitre A-4-2) était que l'hétérogénéité de l'expression clinique de la MRC pourrait s'expliquer par l'existence d'une corrélation génotype/phénotype, autrement dit que le type de mutation pourrait déterminer en partie la nature ou l'intensité des symptômes cliniques.

Premièrement, nous avons découvert trois nouvelles mutations, dont deux types non encore décrits dans cette maladie (une délétion de tout un exon et un codon stop). Les conséquences possibles de ces mutations sur la fonction protéique sont résumées dans la figure ci-dessous. On aurait attendu un phénotype plus sévère pour la mutation la plus importante, or les patients les plus gravement atteints ont "seulement" un codon stop (patients 1-1 à 1-4, exon 6, 364G>T Glu122>stop homozygotes); alors que ceux ayant une délétion de tout un exon sont moins sévèrement atteints (patients 2-1 et 2-2, del exon2 homozygote). Une explication possible est que le codon stop de l'exon 6 entraîne la perte des 76 derniers acides aminés de la protéine, ce qui provoque la perte de l'hélice alpha numéro 6 qui joue un rôle crucial dans la liaison du GTP à Sar1 [Jones 2003] [Shoulders 2004]. Par contre la mutation de l'exon 2, même si elle est plus importante en taille n'entraîne que la perte des 43 premiers acides aminés de la protéine et n'affecte pas cette région très importante autour du résidu 185 comme cela est illustré dans le schéma ci-dessous, par contre la délétion entraîne une diminution d'efficacité de l'étape d'initialisation (échange sur Sar1 du GDP pour du GTP) ainsi que de la première polymérisation (Sar1 avec Sec23-24). Enfin, la troisième mutation est de type faux sens (patient 3-1, exon 7, 554 G>T, Gly 185>Val homozygote), elle affecte le premier acide aminé de l'hélice alpha numéro 6, pouvant ainsi favoriser une déformation de sa structure ce qui diminuerait simplement l'affinité pour le substrat.

**Figure 15 Conséquences hypothétiques des mutations**



Légende : Dans les rectangles à la partie supérieure de la figure sont indiquées les zones de la protéine affectées par chacune des mutations. Dans les ovales sont indiquées les conséquences des 3 mutations sur la fonctionnalité de la protéine.

Deuxièmement, l'expression phénotypique met en évidence plusieurs différences entre les deux groupes de patients. Les français sont cliniquement plus atteints puisque i) leur croissance est ralentie et qu'ils ne rattrapent pas leur taille cible génétique; ii) leur déminéralisation osseuse est significativement plus marquée; iii) leurs anomalies neurologiques et ophtalmiques sont plus fréquentes et plus sévères (aréflexie, CK plus hautes, enregistrements électriques pathologiques); iiiii) enfin, leurs taux plasmatiques de vitamines liposolubles sont plus basses : vitamines A, D et E au diagnostic; ainsi que vitamine E et A après évolution, malgré une supplémentation. Il est important de souligner qu'il n'existe pas de différence dans le degré de stéatorrhée entre les deux cohortes. Par contre, les canadiens sont biologiquement plus atteints avec des taux plasmatiques de lipides et d'AG significativement plus bas. Cette discordance apparente entre des taux particulièrement abaissés en cholestérol ou en AGE et un meilleur état clinique suggère

plusieurs hypothèses. Tout d'abord, ces anomalies biologiques pourraient ne participer que de manière minime aux troubles décrits chez nos patients. Par contre, les carences en AGE pourraient entraîner d'autres problèmes soit plus subtils à détecter, soit survenant à plus long terme, comme par exemple des troubles du comportement ou des facultés d'apprentissage [Burgess 2000] [Voigt 2001]. Cette hypothèse nécessiterait pour être validée un suivi neuro-psychologique attentif à long terme et d'autres études cliniques spécifiques à cette problématique. Ensuite, cette discordance souligne l'importance de la vitamine E dans la genèse des troubles neurologiques présentés par ces patients. En effet, on retrouve chez nos patients français des taux plasmatiques de vitamine E très abaissés et un diagnostic plus tardif ( $6.4 \pm 1.3$  vs  $1.5 \pm 1$  ans) qui sont des facteurs de risques de dégénérescence neurologiquement classiquement décrits dans l'AB et l'HB homozygote [Kayden 1993] [Sokol 1990] [Nelson 1981]. Bien que le diagnostic soit significativement retardé chez les français, le délai n'est pas très important, cependant il touche la petite enfance qui est une période particulièrement critique au cours du développement neurologique. La vitamine E pourrait protéger contre la dégénérescence neurologique grâce à son activité anti oxydante puissante. En effet, chez les patients présentant une neuropathie secondaire à une carence importante en vitamine E, la concentration intra axonale de vitamine E est diminuée, et cette diminution précède l'apparition des signes histologiques de dégénérescence [Traber 1987]. De plus, des dépôts de lipofushine sont décrits dans les muscles de patients avec AB et MRC, cette lipofushine étant produite par la peroxydation des lipides [Gauthier 1983] [Lazaro 1986] [Muller 1990] [Larnaout 1997]. L'importance de la vitamine E est illustrée aussi par une de nos patientes canadiennes : cette jeune fille a été diagnostiquée tardivement à 10 ans et suivie longuement jusqu'à l'âge de 23 ans, de plus elle a refusé la supplémentation de vitamines. Cependant, ses taux plasmatiques de vitamine E ne se sont jamais effondrés sans que cela soit bien expliqué. Or, elle ne présente qu'une atteinte neurologique minime (ERG légèrement pathologique). Par contre, certains éléments suggèrent que la carence en vitamine E n'expliquerait pas à elle seule les anomalies musculaires. En effet, chez nos patients, les CK diminuent mais non significativement alors que les taux de vitamine E augmentent drastiquement. Par ailleurs, la littérature rapporte une aggravation des anomalies histologiques à la biopsie musculaire malgré un an de supplémentation en vitamine E et une absence de signes cliniques



musculaires chez des sujets avec AB [Lazaro 1985]. Nous pouvons rappeler que SARA2 s'exprime dans le muscle strié, ce qui peut suggérer l'implication directe de la mutation dans l'expression de la maladie au niveau musculaire [Shoulders 2004]. Nous pouvons souligner que la différence des taux circulants de lipides entre les deux cohortes ne reflète pas une malabsorption intestinale plus sévère chez les sujets canadiens. En effet, les stéatorrhées ne sont pas différentes entre les deux groupes après évolution. Ce résultat pourrait suggérer que la malabsorption intestinale des graisses ne suffit pas à elle seule à expliquer les anomalies biologiques et neurologiques; ou bien que la mesure de la stéatorrhée est trop imprécise pour évaluer précisément la fonction absorbative des graisses.

Enfin, pour conclure sur les variations phénotypiques, il est essentiel de mentionner les différences histologiques retrouvées lors des biopsies intestinales entre nos deux populations et qui sont résumées dans le tableau ci-dessous. Ces différences histologiques pourraient indiquer que les mutations de la cohorte canadienne ne touche pas la formation des chylomicrons mais seulement leur sécrétion. En effet, il existe une accumulation de particules ayant des caractéristiques structurales proches de celles des chylomicrons; alors que les mutations de la cohorte française entraîneraient plutôt des anomalies de l'assemblage des chylomicrons puisque l'on note l'absence de particules ressemblant à des chylomicrons.

**Tableau X Aspect des inclusions lipidiques au niveau des biopsies intestinales**

Patients	Taille	Localisation	Entourées de membranes
Canadiens	Petites Uniformes	Partie supérieure cellule	Oui
Français	Plus grosses irrégulières	Uniformément réparties	Non

#### 4-4) PERSPECTIVES

A travers la littérature et les résultats de notre étude, plusieurs constatations restent mal comprises et demandent des investigations complémentaires. Tout d'abord les niveaux à jeun des TG sont normaux, alors qu'ils n'augmentent pas après une charge orale en graisse, ce qui laisse supposer que la mutation du gène de Sar1 affecte la sécrétion des

vésicules COPII seulement dans l'entérocyte et non dans le foie. Pourtant, la sortie de l'ApoB100 du réticulum endoplasmique dépend aussi des vésicules COPII [Gusarova 2003], ce qui suggère l'existence d'une autre voie de sécrétion des VLDL indépendante de Sar1. Pour pouvoir étudier les conséquences de la mutation du gène SARA2 sur le transport cellulaire des lipides, nous nous proposons d'invalider ce gène par transfection stable ou par SiRNA dans une lignée cellulaire entérocytaire (Caco2), ainsi que dans une lignée hépatocytaire (HepG2). Des études pourront alors être menées pour mesurer l'absorption des lipides, la régulation des transporteurs du cholestérol à la surface apicale, les niveaux de biosynthèse des apolipoprotéines, les niveaux de sécrétion et la composition des LP, ainsi que les modifications du métabolisme intra-cellulaire des lipides.

L'élaboration d'un modèle murin avec invalidation génique du gène SARA2 nous permettra en parallèle d'étudier les conséquences systémiques de cette invalidation, ainsi que l'impact des suppléments en AGE et vitamines liposolubles (évaluation des doses optimales, des formes galéniques les plus performantes ou de la voie d'administration appropriée).

Aucune étude à notre connaissance ne s'est intéressée à la recherche de polymorphisme du complexe vésiculaire COPII, particulièrement aux protéines Sar1, Sec12 et Sec23/24, ni aux conséquences de ces polymorphismes sur l'absorption intestinale des graisses et les niveaux de lipides circulants. Nous étudierons ce point, non seulement dans la cohorte de sujets avec MRC, mais aussi dans d'autres pathologies où existe une malabsorption des lipides, comme la FK.

Du fait de la rareté de cette maladie et de la collaboration déjà initiée entre les départements de pédiatrie de Montréal et de Lyon, nous souhaitons développer une collaboration internationale plus large qui permettra de proposer une grille de suivi commune et l'élaboration d'études de supplémentation en AGE et en vitamines liposolubles dans le but de prévenir et guérir les complications dégénératives de la maladie.

## V) CONCLUSION GÉNÉRALE

Grâce à ce travail de doctorat, nous avons évalué des aspects spécifiques à chacune des 3 étapes clefs de la phase absorptive des lipides, ainsi que les conséquences systémiques de leurs anomalies à travers plusieurs pathologies.

Pour la phase luminale de l'absorption des lipides, nous avons démontré qu'il existe une régulation du transporteur SR-BI par plusieurs nutriments, ainsi que par des effecteurs hormonaux, inflammatoires et médicamenteux. De plus, nous avons démontré que cette régulation est "polarisée", puisque le même effecteur induit une régulation qui peut être différente selon le pôle de la cellule. Enfin, nous avons mis en évidence que les variations de SR-BI ont lieu principalement au pôle apical de l'entérocyte et qu'une diminution de ce transporteur est associée à une captation diminuée du cholestérol. Les perspectives futures de ce travail seront d'étudier la coordination qui peut exister entre les différents transporteurs du cholestérol impliqués au niveau entérocytaire.

Pour la phase intraentérocytaire, nous avons démontré pour la première fois que la malabsorption intestinale des lipides au cours de la fibrose kystique est due, non seulement à des anomalies de la phase luminale (insuffisance pancréatique et anomalies biliaires), mais aussi à une diminution de la réestérification et de la sécrétion des lipides, ainsi que de la synthèse des apolipoprotéines. De plus, nous avons étayé nos hypothèses pour expliquer ces résultats à travers une revue de littérature. Il reste à déterminer le rôle propre que jouerait le déficit en AGE ou la mutation du CFTR dans ces anomalies. Le développement d'un réseau international étudiant les anomalies entérocytaires chez la FK propulserait la connaissance des mécanismes de ces troubles afin d'optimiser la prise en charge nutritionnelle des patients.

Pour la phase de sécrétion des lipides au pôle basolatéral, nous avons réuni la plus importante cohorte de patients atteints de Rétention de Chylomicrons pour étudier la corrélation génotype / phénotype ; fourni une description clinique et biologique exhaustive de l'évolution à long terme de ces patients ; et enfin établi des recommandations sur le suivi et le traitement dans cette maladie génétique rare. Ce travail a été possible grâce à la collaboration avec le service de gastroentérologie pédiatrique de Lyon (France) et nous souhaiterions étendre cette collaboration à d'autres centres pédiatriques.

## **Partie D : Bibliographie**

Abrams 1984 Lingual lipase in cystic fibrosis. Quantitation of enzyme activity in the upper small intestine of patients with exocrine pancreatic insufficiency. *J Clin. Invest* 1984 73:374-382.

Acton 1994 Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem.* 1994 Aug 19;269(33):21003-9.

Aggarwal 2005 JTT-130, a microsomal triglyceride transfer protein (MTP) inhibitor lowers plasma triglycerides and LDL cholesterol concentrations without increasing hepatic triglycerides in guinea pigs. *BMC Cardiovasc Disord.* 2005 Sep 27;5:30.

Aggerbeck 1974 Hypobetalipoproteinemia: clinical and biochemical description of a new kindred with 'Friedreich's ataxia'. *Neurology.* 1974 Nov;24(11):1051-63.

Ahnen 1983 Intestinal surface aminooligopeptidase. Distinct molecular forms during assembly on intracellular membranes in vivo. *J Biol Chem.* 1983 May 10;258(9):5960-6.

Allister 2004 Insulin decreases the secretion of apoB-100 from hepatic HepG2 cells but does not decrease the secretion of apoB-48 from intestinal CaCo-2 cells. *J Biomed Sci.* 2004 Nov-Dec;11(6):789-98.

Alpers 2000 Intestinal fatty acid binding protein may favor differential apical fatty acid binding in the intestine. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jan 31;1483(3):352-62.

Altmann 2002 The identification of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) by expression cloning and its role in cholesterol absorption. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Jan 30;1580(1):77-93.

Altmann 2004 Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science.* 2004 Feb 20;303(5661):1201-4.

Andersen 1979 A clinical and neurophysiological investigation of a Danish kindred with heterozygous familial hypobetalipoproteinemia. *Acta Paediatr Scand.* 1979 Mar;68(2):155-9.

- Arai 1999 Decreased selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in apolipoprotein E knock-out mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 12;96(21):12050-5.
- Araki 1991 Familial hypobetalipoproteinaemia complicated by cerebellar ataxia and steatocystoma multiplex. *J Intern Med*. 1991 Feb;229(2):197-9.
- Attie 2002 Identification and functional analysis of a naturally occurring E89K mutation in the ABCA1 gene of the WHAM chicken. *J Lipid Res*. 2002 Oct;43(10):1610-7.
- Atzel 1994 Identification of two classes of lipid molecule binding sites on the microsomal triglyceride transfer protein. *Biochemistry* 33:15382-88.
- Avigan 1984 Morphologic features of the liver in abetalipoproteinemia. *Hepatology*. 1984 Nov-Dec;4(6):1223-6.
- Azhar 1998 Simultaneous induction of an HDL receptor protein (SR-BI) and the selective uptake of HDL-cholesteryl esters in a physiologically relevant steroidogenic cell model. *J Lipid Res*. 1998 Aug;39(8):1616-28.
- Bach 1967 Congenital absence of beta-lipoproteins. A further case *Arch Fr Pediatr*. 1967 Dec;24(10):1093-111.
- Banapurmath 1994 Abetalipoproteinemia presenting with congestive cardiac failure. *Indian Pediatr*. 1994 Mar;31(3):331-3.
- Baranova 2002 Lipopolysaccharide down regulates both scavenger receptor B1 and ATP binding cassette transporter A1 in RAW cells. *Infect Immun*. 2002 Jun;70(6):2995-3003.
- Bendayan 1994 Biochemical and morpho-cytochemical evidence for the intestinal absorption of insulin in control and diabetic rats. Comparison between the effectiveness of duodenal and colon mucosa. *Diabetologia*. 1994 Feb;37(2):119-26.
- Berge 2000 Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*. 2000 Dec 1;290(5497):1771-5.

- Bernotti 2003 Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in Caco-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003 Nov;285(5):G898-906.
- Berriot-Varoqueaux 2000 The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *Annu Rev Nutr.* 20:663-97.
- Besnard 1996 Cellular and molecular aspects of fat metabolism in the small intestine. *Proc Nutr Soc.* 1996 Mar;55(1B):19-37.
- Bhattacharyya 1987 Relationships between dietary cholesterol, cholesterol absorption, cholesterol synthesis, and plasma cholesterol in rhesus monkeys. *Atherosclerosis.* 1987 Sep;67(1):33-9.
- Bieri 1984 Vitamin A and vitamin E replacement in abetalipoproteinemia. *Ann Intern Med.* 1984 Feb;100(2):238-9.
- Bietrix 2006 Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *J Biol Chem.* 2006 Mar 17;281(11):7214-9.
- Biwersi 1996 Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activation stimulates endosome fusion in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 29;93(22):12484-9.
- Blackberg 1979 Colipase enhances hydrolysis of dietary triglycerides in the absence of bile salts. *J Clin Invest.* 1979 Nov;64(5):1303-8.
- Bloks 2004 Down-regulation of hepatic and intestinal Abcg5 and Abcg8 expression associated with altered sterol fluxes in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2004 Jan;47(1):104-12.
- Blum 1982 Role of apolipoprotein E-containing lipoproteins in abetalipoproteinemia. *Clin Invest.* 1982 Dec;70(6):1157-69.
- Borgstrom 1980 Importance of phospholipids, pancreatic phospholipase A2, and fatty acid for the digestion of dietary fat: in vitro experiments with the porcine enzymes. *Gastroenterology.* 1980 May;78(5 Pt 1):954-62.

Brabson 1988 Inhibitors of sterol synthesis. The effects of dietary 5 alpha-cholest-8(14)-en-3 beta-ol-15-one on the fate of [4-14C]cholesterol and [2,4-3H] 5 alpha-cholest-8(14)-en-3 beta-ol-15-one after intragastric administration to rats. *Chem Phys Lipids*. 1988 May;47(1):1-20.

Braissant 1996 Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. 1996 Jan;137(1):354-66.

Briel 1998 Cl<sup>-</sup> transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to the inhibition of epithelial Na<sup>+</sup> channels (ENaCs) in *Xenopus* oocytes co-expressing CFTR and ENaC. *J Physiol*. 1998 May 1;508 ( Pt 3):825-36.

Bronstein 1992 Pancreatic insufficiency, growth, and nutrition in infants identified by newborn screening as having cystic fibrosis. *J Pediatr*. Apr; 120(4 Pt 1): 533-40.

Brown 1979 Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Jul;76(7):3330-7.

Brown 1997 The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997 May 2;89(3):331-40. Review.

Bubien 2001 CFTR may play a role in regulated secretion by lymphocytes: a new hypothesis for the pathophysiology of cystic fibrosis. *Pflugers Arch*. 2001;443 Suppl 1:S36-9.

Buechler 1999 Lipopolysaccharide inhibits the expression of the scavenger receptor Cla-1 in human monocytes and macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Aug 19;262(1):251-4.

Burgess 2000 Long-chain polyunsaturated fatty acids in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Clin Nutr*. 2000 Jan;71(1 Suppl):327S-30S.

Burnett 1999 Inhibition of ACAT by avasimibe decreases both VLDL and LDL apolipoprotein B production in miniature pigs. *J Lipid Res*. 1999 Jul;40(7):1317-27.

- Caballero 1980 Abetalipoproteinemia presenting as severe vitamin K deficiency. *Pediatrics*. 1980 Jan;65(1):161-3.
- Cai 2001 Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine. *J Lipid Res*. 2001 Jun;42(6):902-9.
- Calpe-Berdiel 2005 Changes in intestinal and liver global gene expression in response to a phytosterol-enriched diet. *Atherosclerosis*. 2005 Jul;181(1):75-85.
- Cantàfora 2003 Evaluation of RNA messengers involved in lipid trafficking of human intestinal cells by reverse-transcription polymerase chain reaction with competitor technology and microchip electrophoresis. *Electrophoresis*. 2003 Nov;24(21):3748-54.
- Carey 1992 Digestion and absorption of fat. *Sem Gastrointest Dis* 1992 3:186-208.
- Carlstedt-Duke 1986 Pathological regulation of arachidonic acid release in cystic fibrosis: the putative basic defect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec; 83(23): 9202-6.
- Carriere 1993 Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology* 1993 105:876-888.
- Carrocio 1992 Use of famotidine in severe exocrine pancreatic insufficiency with persistent maldigestion on enzymatic replacement therapy. A long-term study in cystic fibrosis. *Dig Dis Sci*. 1992 Sep;37(9):1441-6.
- Chan 1992 Performance of dual-energy x-ray absorptiometry in evaluating bone, lean body mass, and fat in pediatric subjects. *J Bone Miner. Res* 7:369-374.-2.
- Chen 1987 Digestion, absorption and effects on cholesterol absorption of menhaden oil, fish oil concentrate and corn oil by rats. *J Nutr*. 1987 Oct;117(10):1676-80.
- Chinetti 2000 CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation*. 2000 May 23;101(20):2411-7.
- Chong 1987 Effect of dietary fat saturation on plasma lipoproteins and high density lipoprotein metabolism of the rhesus monkey. *J Clin Invest*. 1987 Mar;79(3):675-83.



- Christophe 1994 Serum fatty acid profiles in cystic fibrosis patients and their parents. *Lipids*. 1994 Aug;29(8):569-75.
- Clandinin 1995 Fatty acid pool size in plasma lipoprotein fractions of cystic fibrosis patients. *Am J Clin Nutr*. Dec; 62(6): 1268-75.
- Collins 1988 Truncated variants of apolipoprotein B cause hypobetalipoproteinaemia. *Nucleic Acids Res*. Sep 12;16(17):8361-75.
- Compassi 1995 Cholesteryl ester absorption by small intestinal brush border membrane is protein-mediated. *Biochemistry*. 1995 Dec 19;34(50):16473-82.
- Cooper 1977 Decreased fluidity of red cell membrane lipids in abetalipoproteinemia. *J Clin Invest*. 1977 Jul;60(1):115-21.
- Copp 1999 Localization of alpha-tocopherol transfer protein in the brains of patients with ataxia with vitamin E deficiency and other oxidative stress related neurodegenerative disorders *Brain Res*. 1999 Mar 20;822(1-2):80-7.
- Corey 1988 A comparison of survival, growth, and pulmonary function in patients with cystic fibrosis in Boston and Toronto. *J Clin. Epidemiol*. 41:583-591.
- Corton 2000 Central role of peroxisome proliferator-activated receptors in the actions of peroxisome proliferators. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000;40:491-518. Review.
- Courtois 2003 Membrane peroxidation by lipopolysaccharide and iron-ascorbate adversely affects Caco-2 cell function: beneficial role of butyric acid. *Am J Clin Nutr*. 2003 Mar;77(3):744-50.
- Cox 1982 Gastric acid hypersecretion in cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1982;1(4):559-65.
- Cuneo 1993 Growth hormone treatment improves serum lipids and lipoproteins in adults with growth hormone deficiency. *Metabolism*. 1993 Dec;42(12):1519-23.
- Danek 2005 Neuroacanthocytosis *Curr Opin Neurol*. 2005 Aug;18(4):386-92. Review.

Danielsen 2003 Lipid rafts in epithelial brush borders: atypical membrane microdomains with specialized functions. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Oct 31;1617(1-2):1-9.

Davis 2004 Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem*. 2004 Aug 6;279(32):33586-92.

Dean 2001 The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*. 2001 Jul;42(7):1007-17. Review.

Deckelbaum 1982 Abnormal high density lipoproteins of abetalipoproteinemia: relevance to normal HDL metabolism. *J Lipid Res*. 1982 Dec;23(9):1274-82.

Delsing 2001 Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitor avasimibe reduces atherosclerosis in addition to its cholesterol-lowering effect in ApoE\*3-Leiden mice. *Circulation*. 2001 Apr 3;103(13):1778-86.

Detmers 2000 A target for cholesterol absorption inhibitors in the enterocyte brush border membrane. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jul 19;1486(2-3):243-52.

DiMagno 1973 Relations between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency. *N Engl J Med*. 1973 Apr 19;288(16):813-5.

Dodge 1990 Paradoxical effects of essential fatty acid supplementation on lipid profiles and sweat electrolytes in cystic fibrosis. *Br J Nutr*. 1990 Mar;63(2):259-71.

Dombrowsky 2003 Molecular species compositions of lung and pancreas phospholipids in the *cftr(tm1HGU/tm1HGU)* cystic fibrosis mouse. *Pediatr.Res*;53:447-54.

Downes 2003 A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol Cell*. 2003 Apr;11(4):1079-92.

Drobnik 2001 ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) affects total body sterol metabolism. *Gastroenterology*. 2001 Apr;120(5):1203-11.

Drover 2005 CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J Clin Invest*. 2005 May;115(5):1290-7.

Duan 2004 Cholesterol absorption is mainly regulated by the jejunal and ileal ATP-binding cassette sterol efflux transporters Abcg5 and Abcg8 in mice. *J Lipid Res.* 2004 Jul;45(7):1312-23.

During 2005 Carotenoid Transport Is Decreased and Expression of the Lipid Transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 Is Downregulated in Caco-2 Cells Treated with Ezetimibe. *J Nutr.* 2005 Oct;135(10):2305-12.

Eckhardt 2002 Dietary sphingomyelin suppresses intestinal cholesterol absorption by decreasing thermodynamic activity of cholesterol monomers. *Gastroenterology.* 2002 Apr;122(4):948-56.

Eidelman 2002 Role for phospholipid interactions in the trafficking defect of Delta F508-CFTR. *Biochemistry.* 2002 Sep 17;41(37):11161-70.

Erdmann 2004 Cholesterol lowering effect of dietary weight loss and orlistat treatment-efficacy and limitations. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004 Jun 1;19(11):1173-9.

Eynard 1992 Histopathology of essential fatty acid-deficient mice. *Nutrition.* 1992 Jan-Feb; 8(1): 37-40.

Farese 1992 A truncated species of apolipoprotein B, B-83, associated with hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res.* 1992 Apr;33(4):569-77.

Fayard 2003 Liver receptor homolog 1 controls the expression of carboxyl ester lipase. *J Biol Chem.* 2003 Sep 12;278(37):35725-31.

Field 2001 Regulation of sterol regulatory element-binding proteins in hamster intestine by changes in cholesterol flux. *J Biol Chem.* 2001 May 18;276(20):17576-83.

Fluiter 1997 Scavenger receptor B1 (SR-B1) substrates inhibit the selective uptake of high-density-lipoprotein cholesteryl esters by rat parenchymal liver cells. *Biochem J.* 1997 Sep 1;326 ( Pt 2):515-9.

Fluiter 1998 In vivo regulation of scavenger receptor BI and the selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J Biol Chem.* 1998 Apr 3;273(14):8434-8.

- Forman 1995 Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell*. 1995 Jun 2;81(5):687-93.
- Fredrikzon 1980 Lingual lipase: an important lipase in the digestion of dietary lipids in cystic fibrosis? *Pediatr Res*. 1980 Dec;14(12):1387-90.
- Freeman 2004 The orphan nuclear receptor LRH-1 activates the ABCG5/ABCG8 intergenic promoter. *J Lipid Res*. 2004 Jul;45(7):1197-206.
- Freye 1964 Light and electron microscopic examination of the small bowel of children with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 1964 Apr;64:575-9.
- Frezal 1961 Congenital absence of beta-lipoproteins: study of fat absorption after exsanguinotransfusion measuring the half-life of injected beta-lipoproteins. *Rev Fr Etud Clin Biol*. 1961 Aug-Sep;6:677-83.
- Gabelli 1996 Homozygous familial hypobetalipoproteinemia. Increased LDL catabolism in hypobetalipoproteinemia due to a truncated apolipoprotein B species, apo B-87Padova. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996 Sep;16(9):1189-96.
- Galabert 1978 Fatty-acid composition of serum-lecithins in cystic-fibrosis patients without steatorrhea. *Lancet*. 1978 Oct 21; 2(8095): 903.
- Gangl 1975 Intestinal metabolism of plasma free fatty acids. Intracellular compartmentation and mechanisms of control. *J Clin Invest*. 1975 Apr;55(4):803-13.
- Gangl 1978 In vivo metabolism of plasma free fatty acids by intestinal mucosa of man. *Gastroenterology*. 1978 May;74(5 Pt 1):847-50.
- Garcia-Calvo 2005 The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 7;102(23):8132-7.
- Gaskin 1982. Evidence for a primary defect of pancreatic HCO<sub>3</sub>-secretion in cystic fibrosis. *Pediatr. Res* 1982 16:554-557.

- Gaskin 1984 Colipase and lipase secretion in childhood-onset pancreatic insufficiency. Delineation of patients with steatorrhea secondary to relative colipase deficiency. *Gastroenterology*. 1984 Jan;86(1):1-7.
- Gauthier 1983 Action tremor as a manifestation of chylomicron retention disease. *Ann Neurol*. 1983 Nov;14(5):591.
- Gazzola 2004 Cholesterol induces fetal rat enterocyte death in culture. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Jul;37(7):1087-94.
- Gleeson 2000 The relationship between cholesterol absorption and intestinal cholesterol synthesis in the diabetic rat model. *Int J Exp Diabetes Res*. 2000;1(3):203-10.
- Glickman 1991 Apolipoprotein synthesis in normal and abetalipoproteinemic intestinal mucosa. *Gastroenterology*. 1991 Sep;101(3):749-55.
- Goodchild 1975 Aspects of bile acid metabolism in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 1975 Oct;50(10):769-78.
- Gordon 1994. Secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from HeLa cells is dependant on expression of the microsomal triglyceride transfer protein and is regulated by lipid availability. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7628-32.
- Goudriaan 2002 Intestinal lipid absorption is not affected in CD36 deficient mice. *Mol Cell Biochem*. 2002 Oct;239(1-2):199-202.
- Graf 2003 ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem*. 2003 Nov 28;278(48):48275-82.
- Graham 1991 Carboxyl-terminal truncation of apolipoprotein B results in gradual loss of the ability to form buoyant lipoproteins in cultured human and rat liver cell lines. *Biochemistry*. 1991 Jun 4;30(22):5616-21.
- Granot 1989 Hypocholesterolemia in childhood. *J Pediatr*. Aug;115(2):171-85.
- Grundy 1983 Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Annu Rev Nutr*. 1983;3:71-96. Review.

Grundy 2004 Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Aug;24(8):e149-61. Review.

Gusarova 2003 Apolipoprotein B100 exit from the endoplasmic reticulum (ER) is COPII-dependent, and its lipidation to very low density lipoprotein occurs post-ER. *J Biol Chem.* 2003 Nov 28;278(48):48051-8.

Gylling 1994 Cholesterol absorption and cholesterol and bile acid synthesis in two brothers with IDDM and diarrhea. *Diabetes Care.* 1994 Nov;17(11):1345-7.

Gylling 2004 Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity. *J Lipid Res.* 2004 Sep;45(9):1660-5.

Hagan 1994 Transcriptional regulation of human and hamster microsomal triglyceride transfer protein genes. Cell type-specific expression and response to metabolic regulators. *J Biol Chem.* 1994 Nov 18;269(46):28737-44.

Hamilton 1999 How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes.* 1999 Dec;48(12):2255-69.

Hamosh 1990 Lingual and gastric lipases. *Nutrition* 1990 6:421-428.

Hansen 2003 Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in pig enterocytes: trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption. *Gut.* 2003 Oct;52(10):1424-31.

Hansen 2003-b Deep-apical tubules: dynamic lipid-raft microdomains in the brush-border region of enterocytes. *Biochem J.* 2003 Jul 1;373(Pt 1):125-32.

Harper 1982 Essential fatty acid deficiency in the rabbit as a model of nutritional impairment in cystic fibrosis. In vitro and in vivo effects on lung defense mechanisms. *Am Rev Respir Dis.* 1982 Sep; 126(3): 540-7

Hauser 1998 Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine. *Biochemistry.* 1998 Dec 22;37(51):17843-50.

Hegele 1985 Arrest of neuropathy and myopathy in abetalipoproteinemia with high-dose vitamin E therapy. *Can Med Assoc J.* 1985 Jan 1;132(1):41-4.

Heinemann 1993 Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *Eur J Clin Invest.* 1993 Dec;23(12):827-31.

Henderson 1994 Oral absorption of omega-3 fatty acids in patients with cystic fibrosis who have pancreatic insufficiency and in healthy control subjects. *J Pediatr.* 1994 Mar;124(3):400-8.

Hernandez 2000 Intestinal absorption of cholesterol is mediated by a saturable, inhibitable transporter. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jul 19;1486(2-3):232-42.

Ho 2002 Monoacylglycerol metabolism in human intestinal Caco-2 cells: evidence for metabolic compartmentation and hydrolysis. *J Biol Chem.* 2002 Jan 18;277(3):1816-23.

Hofmann 1963 Hydrolysis of long-chain monoglycerides in micellar solution by pancreatic lipase. *Biochim Biophys Acta.* 1963 Jun 18;70:317-31.

Horton 1998 Intestinal absorption of cholesterol is mediated by a saturable, inhibitable transporter. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jul 19;1486(2-3):232-42.

Horton 2002 SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002 May;109(9):1125-31.

Hua 1993 SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 15;90(24):11603-7.

Huang 1989 Hypobetalipoproteinemia due to an apolipoprotein B gene exon 21 deletion derived by Alu-Alu recombination. *J Biol Chem.* Jul 5;264(19):11394-400.

Ikewaki 1994 In vivo metabolism of apolipoproteins A-I and E in patients with abetalipoproteinemia: implications for the roles of apolipoproteins B and E in HDL metabolism. *J Lipid Res.* 1994 Oct;35(10):1809-19.

Illingworth 1980 Abetalipoproteinemia. Report of two cases and review of therapy. *Arch Neurol.* 1980 Oct;37(10):659-62.

Illingworth 1981 High density lipoprotein metabolism in a patient with abetalipoproteinemia. *Ann Nutr Metab.* 1981;25(1):1-10.

Insull 2001 Efficacy and short-term safety of a new ACAT inhibitor, avasimibe, on lipids, lipoproteins, and apolipoproteins, in patients with combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis.* 2001 Jul;157(1):137-44.

Iso 1994 Serum total cholesterol and mortality in a Japanese population. *J Clin Epidemiol.* 1994 Sep;47(9):961-9.

Isselbacher 1964 Congenital beta-lipoprotein deficiency: an hereditary disorder involving defect in the absorption and transport of lipids. *Medicine (Baltimore).* 1964 May;43:347-61.

Istvan 2000 The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Dec 15;1529(1-3):9-18.

Jian 1998 Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors. *J Biol Chem.* 1998 Mar 6;273(10):5599-606.

Jiao 1988 Increased activity of intestinal acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in rats with streptozocin-induced diabetes and restoration by insulin supplementation. *Diabetes.* 1988 Mar;37(3):342-6.

Jiao 1989 Decreased activity of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase by insulin in human intestinal cell line Caco-2. *Diabetes.* 1989 May;38(5):604-9.

Jindrichova 2003 Corticosteroid effect on Caco-2 cell lipids depends on cell differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 Nov;87(2-3):157-65.

Johnson 1985 Effects of the degree of saturation of dietary fat on the hepatic production of lipoproteins in the African green monkey. *J Lipid Res.* 1985 Apr;26(4):403-17.



- Jolley 1999 Genetic differences in cholesterol absorption in 129/Sv and C57BL/6 mice: effect on cholesterol responsiveness. *Am J Physiol.* 1999 May;276(5 Pt 1):G1117-24.
- Jones 1967 Abnormalities of high density lipoproteins in abetalipoproteinemia. *J Clin Invest.* 1967 Jul;46(7):1151-61.
- Jones 2003 Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nature Genetics* online 14 April 2003 ; doi :10.1038/ng1145.
- Judd 2002 Dietary cis and trans monounsaturated and saturated FA and plasma lipids and lipoproteins in men. *Lipids.* 2002 Feb;37(2):123-31.
- Kaneko 2003 Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem.* 2003 Sep 19;278(38):36091-8.
- Katan 1991 Biological markers of dietary intake, with emphasis on fatty acids. *Ann Nutr Metab.* 1991;35(5):249-52. Review.
- Katz 1996 The use of an intravenous fish oil emulsion enriched with omega-3 fatty acids in patients with cystic fibrosis. *Nutrition.* 1996 May;12(5):334-9.
- Kayden 1980 Determinants in the control of lipid transport and metabolism. *J Environ Pathol Toxicol.* 1980 Mar;3(4 Spec No):315-21. Review.
- Kayden 1993 Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentration of vitamin E in humans. *J Lipid Res.* 1993;34:343-58.
- Kent 1996 Phenotypic abnormalities in long-term surviving cystic fibrosis mice. *Pediatr Res.* 1996 Aug;40(2):233-41.
- Khan 1995 Pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 Apr;151(4):1075-82.
- Khovidhunkit 2001 Regulation of scavenger receptor class B type I in hamster liver and Hep3B cells by endotoxin and cytokines. *J Lipid Res.* 2001 Oct;42(10):1636-44.
- Klett 2004 A mouse model of sitosterolemia: absence of Abcg8/sterolin-2 results in failure to secrete biliary cholesterol. *BMC Med.* 2004 Mar 24;2:5.

Knight 2003 Inhibition of cholesterol absorption associated with a PPAR alpha-dependent increase in ABC binding cassette transporter A1 in mice. *J Lipid Res.* 2003 Nov;44(11):2049-58.

Knopp 2003 Evaluation of the efficacy, safety, and tolerability of ezetimibe in primary hypercholesterolaemia: a pooled analysis from two controlled phase III clinical studies. *Int J Clin Pract.* 2003 Jun;57(5):363-8.

Ko 2001 Dynamic movements of organelles containing Niemann-Pick C1 protein: NPC1 involvement in late endocytic events. *Mol Biol Cell.* 2001 Mar;12(3):601-14.

Kobayashi 1983 Fat absorption in patients with surgically repaired biliary atresia. *Helv Paediatr Acta.* 1983 Oct;38(4):307-14.

Konstan 1994 Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 Aug;150(2):448-54.

Kraemer 1978 Relative underweight in cystic fibrosis and its prognostic value. *Acta Paediatr Scand.* 1978 Jan; 67(1): 33-7.

Kramer 2000 Identification of binding proteins for cholesterol absorption inhibitors as components of the intestinal cholesterol transporter. *FEBS Lett.* 2000 Dec 29;487(2):293-7.

Kramer 2003 Intestinal cholesterol absorption: identification of different binding proteins for cholesterol and cholesterol absorption inhibitors in the enterocyte brush border membrane. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Jul 4;1633(1):13-26.

Kramer 2005 Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane. *J Biol Chem.* 2005 Jan 14;280(2):1306-20.

Krul 1992 Lengths of truncated forms of apolipoprotein B (apoB) determine their intestinal production. *Biochem Biophys Res Commun.* Dec 15;189(2):1069-76.

Kudo 1977 Hypobetalipoproteinemia with abnormal prebetalipoprotein. *J Neurol Sci.* 1977 Apr;31(3):411-9.

- Larnaout 1997 Friedreich's ataxia with isolated vitamin E deficiency: a neuropathological study of a Tunisian patient. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1997 Jun;93(6):633-7.
- Lazaro 1986 Muscle pathology in Bassen-Kornzweig syndrome and vitamin E deficiency. *Am J Clin Pathol*. 1986 Sep;86(3):378-87.
- Le Morvan 2002 n-3 FA increase liver uptake of HDL-cholesterol in mice. *Lipids*. 2002 Aug;37(8):767-72.
- Lee 2001 Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet*. 2001 Jan;27(1):79-83.
- Lehmann 1994 Surface distribution of the EGF receptor during differentiation of the human colon carcinoma cell line HT29-D4. *J Recept Res*. 1994 Jul;14(5):319-33.
- Leonsson 1999 Growth hormone (GH) therapy in GH-deficient adults influences the response to a dietary load of cholesterol and saturated fat in terms of cholesterol synthesis, but not serum low density lipoprotein cholesterol levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Apr;84(4):1296-303.
- Leppert 1988 Inference of a molecular defect of apolipoprotein B in hypobetalipoproteinemia by linkage analysis in a large kindred. *J Clin Invest*. 1988 Sep;82(3):847-51.
- Levy 1994 Variable expression of familial heterozygous hypobetalipoproteinemia: transient malabsorption during infancy. *J Lipid Res*. Dec;35(12):2170-7.
- Levy 1996-a Lipid processing and lipoprotein synthesis by the developing human fetal colon. *Am J Physiol*. 1996 May;270(5 Pt 1):G813-20.
- Levy 1996-b Insulin modulation of newly synthesized apolipoproteins B-100 and B-48 in human fetal intestine: gene expression and mRNA editing are not involved. *FEBS Lett*. 1996 Sep 16;393(2-3):253-8.
- Levy 2000 Digestion and absorption of carbohydrates, fat and proteins. In: Rathaike RN, ed. *Small Bowel Disorders*. London (UK): Hodder Arnold, 2000:162-82.

- Levy 2001 The polymorphism at codon 54 of the FABP2 gene increases fat absorption in human intestinal explants. *J Biol Chem.* 2001 Oct 26;276(43):39679-84.
- Levy 2003 Combined effects of EFA deficiency and tumor necrosis factor-alpha on circulating lipoproteins in rats. *Lipids.* 2003 Jun;38(6):595-602.
- Levy 2004 Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. *J Cell Sci.* 2004 Jan 15;117(Pt 2):327-37.
- Lin 1994 Cloning and regulation of hamster microsomal triglyceride transfer protein. The regulation is independent from that of other hepatic and intestinal proteins which participate in the transport of fatty acids and triglycerides. *J Biol Chem.* 1994 Nov 18;269(46):29138-45.
- Linsdell 2000 Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel currents by arachidonic acid. *Can. J Physiol Pharmacol.* 78:490-499.
- Linton 1993 Familial hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 34 :521-541.
- Lloyd-Still 1980 Selenium and glutathione peroxidase levels in cystic fibrosis. *Pediatrics.* 1980 May;65(5):1010-2.
- Lloyd-Still 1981 Essential fatty acid status in cystic fibrosis and the effects of safflower oil supplementation. *Am J Clin Nutr.* Jan; 34(1): 1-7.
- Lobo 2001 Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids. *J Histochem Cytochem.* 2001 Oct;49(10):1253-60.
- Lodi 1997 Brain and skeletal muscle bioenergetic failure in familial hypobetalipoproteinaemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997 Jun;62(6):574-80. Review.
- Loirdighi 1997 Selective effects of hydrocortisone on intestinal lipoprotein and apolipoprotein synthesis in the human fetus. *J Cell Biochem.* 1997 Jul 1;66(1):65-76.

Loison 2002 Increasing amounts of dietary myristic acid modify the plasma cholesterol level and hepatic mass of scavenger receptor BI without affecting bile acid biosynthesis in hamsters. *Reprod Nutr Dev.* 2002 Mar-Apr;42(2):101-14.

Lu 2001 Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively. *Am J Hum Genet.* 2001 Aug;69(2):278-90.

Lutjohann 1995 Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated by deuterium-labeled sterols: effect of sitostanol treatment. *J Lipid Res.* 1995 Aug;36(8):1763-73.

Luu 1991 Oxysterols: biological activities and physicochemical studies. *Biochimie.* 1991 Oct;73(10):1317-20. Review.

MacGilchrist 1988 Abetalipoproteinaemia in adults: role of vitamin therapy. *J Inherit Metab Dis.* 1988;11(2):184-90.

MacLusky 1990 Cystic Fibrosis. In V Chernick, editor. *Disorders of the Respiratory Tract in Children*, 5<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders, Philadelphia. 692-729. 1990.

Maechler 1992 Role of the intestinal acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity in the hyperresponse of diabetic rats to dietary cholesterol. *J Lipid Res.* 1992 Oct;33(10):1475-84.

Maechler 1993 Importance of exogenous cholesterol in diabetic rats: effects of treatment with insulin or with an acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor. *Ann Nutr Metab.* 1993;37(4):199-209.

Malerod 2002-a The expression of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and caveolin-1 in parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Cell Tissue Res.* 2002 Feb;307(2):173-80.

Malerod 2002-b Oxysterol-activated LXRA/alpha/RXR induces hSR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Dec 20;299(5):916-23.

- Malerod 2005 Bile acids reduce SR-BI expression in hepatocytes by a pathway involving FXR/RXR, SHP, and LRH-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Nov 4;336(4):1096-105.
- Mall 1999 CFTR-mediated inhibition of epithelial Na<sup>+</sup> conductance in human colon is defective in cystic fibrosis. *Am J Physiol.* 1999 Sep;277(3 Pt 1):G709-16.
- Mansen 1996 Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in the mouse colonic mucosa. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 May 24;222(3):844-51.
- Mardones 2001 *J Lipid Res* 42 :170-80 Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res.* 2001 Feb;42(2):170-80.
- Mardones 2003 Fibrates down-regulate hepatic scavenger receptor class B type I protein expression in mice. *J Biol Chem.* 2003 Mar 7;278(10):7884-90.
- Mars 1969 Familial hypo-beta-lipoproteinemia: a genetic disorder of lipid metabolism with nervous system involvement. *Am J Med.* Jun;46(6):886-900.
- Mathias 1981 Optimization and validation of assays to estimate pancreatic esterase activity using well-characterized micellar solutions of cholesteryl oleate and tocopheryl acetate. *J Lipid Res.* 1981 Jan;22(1):177-84.
- Mawatari 1972 Familial hypo- lipoproteinaemia. *J Neurol Sci.* 1972 May;16(1):93-101.
- McLeod 1994 Carboxyl-terminal truncation impairs lipid recruitment by apolipoprotein B100 but does not affect secretion of the truncated apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J Biol Chem.* 1994 Jan 28;269(4):2852-62.
- McNeish 2000 High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Apr 11;97(8):4245-50.
- Mehran 1995 Tumor necrosis factor-alpha inhibits lipid and lipoprotein transport by Caco-2 cells. *Am J Physiol.* 1995 Dec;269(6 Pt 1):G953-60.

Mehta 1997 Epidermal growth factor up-regulates sodium-glucose cotransport in enterocyte models in the presence of cholera toxin. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1997 Jul-Aug;21(4):185-91.

Miettinen 1990 Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol.* 1990 Jan;131(1):20-31.

Miettinen 2004 Low synthesis and high absorption of cholesterol characterize type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2004 Jan;27(1):53-8.

Miwa 2005 ATP-binding cassette transporter G8 M429V polymorphism as a novel genetic marker of higher cholesterol absorption in hypercholesterolaemic Japanese subjects. *Clin Sci (Lond).* 2005 Aug;109(2):183-8.

Moreau 1988 Human gastric lipase: variations induced by gastrointestinal hormones and by pathology. *Scand J Gastroenterol.* 1988 Nov;23(9):1044-8.

Morel 2004 Lipid-dependent bidirectional traffic of apolipoprotein B in polarized enterocytes. *Mol Biol Cell.* 2004 Jan;15(1):132-41.

Morise 2004 Effects of dietary alpha linolenic acid on cholesterol metabolism in male and female hamsters of the LPN strain. *J Nutr Biochem.* 2004 Jan;15(1):51-61.

Moss 2000 Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 2000 Jun;120(3):518-25.

Muller 1977 Long-term management of abetalipoproteinaemia. Possible role for vitamin E. *Arch Dis Child.* 1977 Mar;52(3):209-14.

Muller 1983 Vitamin E, neurological function. *Lancet* 1 :225-28.

Muller 1990 Neurochemical, neurophysiological, and neuropathological studies in vitamin E deficiency. *Crit Rev Neurobiol.* 1990;5(3):239-63. Review.

Mulligan 2003 ABCA1 is essential for efficient basolateral cholesterol efflux during the absorption of dietary cholesterol in chickens. *J Biol Chem.* 2003 Apr 11;278(15):13356-66.

- Murao 1997 Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J Biol Chem.* 1997 Jul 11;272(28):17551-7.
- Murphy 1998 Sterol carrier protein-2 expression increases NBD-stearate uptake and cytoplasmic diffusion in L cells. *Am J Physiol.* 1998 Aug;275(2 Pt 1):G237-43.
- Murthy 2002 LXR/RXR activation enhances basolateral efflux of cholesterol in CaCo-2 cells. *J Lipid Res.* 2002 Jul;43(7):1054-64.
- Nagano 1995 Expression of prolactin and growth hormone receptor genes and their isoforms in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol.* 1995 Mar;268(3 Pt 1):G431-42.
- Naim 1988 Structure, biosynthesis, and glycosylation of human small intestinal maltase-glucoamylase. *J Biol Chem.* 1988 Dec 25;263(36):19709-17.
- Navarrette 2000 Aminopeptidase N/CD13 is associated with raft membrane microdomains in monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Mar 5;269(1):143-8.
- Needleman 1987 Inhibitors of sterol synthesis. Effect of dietary 5 alpha-cholest-8(14)-en-3 beta-ol-15-one on ACAT activity of jejunal microsomes of the rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Nov 13;148(3):920-5.
- Neuman 2002 Replication of linkage of familial hypobetalipoproteinémie. *J Lipid Res* 43:407-415.
- Nielsen 1998. Genes for apolipoprotein B and microsomal triglyceride transfer protein are expressed in the heart: evidence that the heart has the capacity to synthesize and secrete lipoproteins. *Circulation.* Jul 7;98(1):13-6.
- Noh 2004 Milk sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats. *J Nutr.* 2004 Oct;134(10):2611-6.
- Nohturfft 2000 Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell.* 2000 Aug 4;102(3):315-23.



Nomura 2004 Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *J Virol.* 2004 Aug;78(16):8701-8.

Nouri-Sorkhabi 2000 Parallel secretion of pancreatic phospholipase A(2), phospholipase A(1), lipase, and colipase in children with exocrine pancreatic dysfunction. *Pediatr Res.* 2000 Dec;48(6):735-40.

Nyberg 2000 A mutual inhibitory effect on absorption of sphingomyelin and cholesterol. *J Nutr Biochem.* 2000 May;11(5):244-9.

O'Brien 1993 Intestinal bile acid malabsorption in cystic fibrosis. *Gut.* 1993 Aug;34(8):1137-41.

Ohama 2002 Dominant expression of ATP-binding cassette transporter-1 on basolateral surface of Caco-2 cells stimulated by LXR/RXR ligands. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Aug 23;296(3):625-30.

Otte 2003 Identification of farnesoid X receptor beta as a novel mammalian nuclear receptor sensing lanosterol. *Mol Cell Biol.* 2003 Feb;23(3):864-72.

Ouahchi 1992 Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein. *Nat Genet.* 1995 Feb;9(2):141-5.

Pakarinen 2004 Growth hormone selectively improves intestinal cholesterol absorption after jejunoileal autotransplantation in pigs. *J Pediatr Surg.* 2004 Aug;39(8):1220-5.

Pan 2002 Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulates neurosecretory function in pulmonary neuroendocrine cell-related tumor cell line models. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002 Nov;27(5):553-60.

Parhofer 1991 Determination of kinetic parameters of apolipoprotein B metabolism using amino acids labeled with stable isotopes. *J Lipid Res.* 1991 Aug;32(8):1311-23.

Parker 1995 Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood. *Infect Immun.* 1995 Jan;63(1):253-8.

Parsons 1988 Supplemental calories improve essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patients. *Pediatr Res*. Sep; 24(3): 353-6.

Partin 1974 Liver ultrastructure in abetalipoproteinemia: Evolution of micronodular cirrhosis. *Gastroenterology*. 1974 Jul;67(1):107-18.

Patel 2001 Disturbances in the normal regulation of SREBP-sensitive genes in PPAR alpha-deficient mice. *J Lipid Res*. 2001 Mar;42(3):328-37.

Periti 1999 Efficacy and safety of high dose intravenous ciprofloxacin in the treatment of bacterial pneumonia. Italian Ciprofloxacin Study Group. *Int J Antimicrob Agents*. 1998 Aug;10(3):215-22.

Phillips 1962 Quantitative chromatographic analysis of plasma and red blood cell lipids in patients with acanthocytosis. *J Lab Clin Med*. 1962 Mar;59:357-63.

Pihlajamaki 2004 Insulin resistance is associated with increased cholesterol synthesis and decreased cholesterol absorption in normoglycemic men. *J Lipid Res*. 2004 Mar;45(3):507-12.

Pineda Torra 1999 Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging. *Curr Opin Lipidol*. 1999 Apr;10(2):151-9. Review.

Plosch 2004 Sitosterolemia in ABC-transporter G5-deficient mice is aggravated on activation of the liver-X receptor. *Gastroenterology*. 2004 Jan;126(1):290-300.

Post 2001 Fibrates suppress bile acid synthesis via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-mediated downregulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Nov;21(11):1840-5.

Pulai 1998 Genetic heterogeneity in familial hypobetalipoproteinemia: linkage and nonlinkage to the apoB gene in Caucasian families. *Am J Med Genet* 76:79-86.

Quinet 2004 Gene-selective modulation by a synthetic oxysterol ligand of the liver X receptor. *J Lipid Res*. 2004 Oct;45(10):1929-42.

Quintao 1971 Effects of dietary cholesterol on the regulation of total body cholesterol in man. *J Lipid Res.* 1971 Mar;12(2):233-47.

Raal 2003 Avasimibe, an ACAT inhibitor, enhances the lipid lowering effect of atorvastatin in subjects with homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2003 Dec;171(2):273-9.

Ramharack 1998 CI-1011 lowers lipoprotein(a) and plasma cholesterol concentrations in chow-fed cynomolgus monkeys. *Atherosclerosis.* 1998 Jan;136(1):79-87.

Ramsey 1992 Nutritional assessment and management in cystic fibrosis: a consensus report. The Consensus Committee. *Am. J Clin. Nutr.* 55:108-116.

Reaven 1996 Intracellular events in the "selective" transport of lipoprotein-derived cholesteryl esters. *J Biol Chem.* 1996 Jul 5;271(27):16208-17.

Reaven 1998 Expression and microvillar localization of scavenger receptor, class B, type I (a high density lipoprotein receptor) in luteinized and hormone-desensitized rat ovarian models. *Endocrinology.* 1998 Jun;139(6):2847-56.

Reboul 2006 Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *J Biol Chem.* 2006 Feb 24;281(8):4739-45.

Remaley 2002 Comparative genome analysis of potential regulatory elements in the ABCG5-ABCG8 gene cluster. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jul 12;295(2):276-82.

Repa 2000 The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:459-81. Review.

Repa 2002-a Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem.* 2002 May 24;277(21):18793-800.

Repa 2002-b Inhibition of cholesterol absorption by SCH 58053 in the mouse is not mediated via changes in the expression of mRNA for ABCA1, ABCG5, or ABCG8 in the enterocyte. *J Lipid Res.* 2002 Nov;43(11):1864-74.

- Richert 1984 Growth-rate-related and hydroxysterol-induced changes in membrane fluidity of cultured hepatoma cells: correlation with 3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA reductase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Apr 16;120(1):192-8.
- Riemann 1999 CD13-not just a marker in leukemia typing. *Immunol Today.* 1999 Feb;20(2):83-8.
- Rigotti 1995 The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem.* 1995 Jul 7;270(27):16221-4.
- Rigotti 1996 Regulation by adrenocorticotrophic hormone of the in vivo expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI), a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland. *J Biol Chem.* 1996 Dec 27;271(52):33545-9.
- Rigotti 1997 A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Nov 11;94(23):12610-5.
- Robb 1985 Conjugated bile acids in serum and secretions in response to cholecystokinin/secretin stimulation in children with cystic fibrosis. *Gut.* 1985 Nov;26(11):1246-56.
- Rogiers 1984 Abnormal fatty acid turnover in the phospholipids of the red blood cell membranes of cystic fibrosis patients (in vitro study). *Pediatr Res.* Aug; 18(8): 704-9.
- Ros 2000 Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis.* 2000 Aug;151(2):357-79.
- Rosenblum 1998 Discovery of 1-(4-fluorophenyl)-(3R)-[3-(4-fluorophenyl)-(3S)-hydroxypropyl]-(4S)-(4-hydroxyphenyl)-2-azetidinone (SCH 58235): a designed, potent, orally active inhibitor of cholesterol absorption. *J Med Chem.* 1998 Mar 12;41(6):973-80.
- Roulet 1980 Gastric emptying and lingual lipase activity in cystic fibrosis. *Pediatr. Res* 1980 14:1360-1362.

Roulet 1997 Essential fatty acid deficiency in well nourished young cystic fibrosis patients. *Eur. J Pediatr.* 156:952-956.

Ruotolo 1998 Hypobetalipoproteinemia associated with apo B-48.4, a truncated protein only 14 amino acids longer than apo B-48. *Atherosclerosis.* 1998 Mar;137(1):125-31.

Russell-Jones 1994 The effect of growth hormone replacement on serum lipids, lipoproteins, apolipoproteins and cholesterol precursors in adult growth hormone deficient patients. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1994 Sep;41(3):345-50.

Sakakura 2001 Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Aug 10;286(1):176-83.

Salen 1970 Metabolism of beta-sitosterol in man. *J Clin Invest.* 1970 May;49(5):952-67.

Salisbury 1995 Hypocholesterolemic activity of a novel inhibitor of cholesterol absorption, SCH 48461. *Atherosclerosis.* 1995 May;115(1):45-63.

Sarfeh 1974 Studies of the hepatic excretory defects in essential fatty acid deficiency. Their possible relationship to the genesis of cholesterol gallstones. *J Clin Invest.* 1974 Feb;53(2):423-30.

Sato 1996 Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem.* 1996 Oct 25;271(43):26461-4.

Schaffer 2002 Fatty acid transport: the roads taken. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Feb;282(2):E239-46.

Schmitz 2000 ABC transporters in cellular lipid trafficking. *Curr Opin Lipidol.* 2000 Oct;11(5):493-501. Review.

Schonfeld 2003 Familial hypobetalipoproteinemia: a review. *J Lipid Res* 44:878-883.

Schroepfer 1987 5 alpha-Cholest-8(14)-en-3 beta-ol-15-one. In vivo conversion to cholesterol upon oral administration to a nonhuman primate. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Aug 14;146(3):1027-32.

Schutt 1968 Protein in meconium from meconium ileus. *Arch Dis Child*. 1968 Apr;43(228):178-81.

Schwartz 1998 Marked reduction in bile acid synthesis in cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase-deficient mice does not lead to diminished tissue cholesterol turnover or to hypercholesterolemia. *J Lipid Res*. 1998 Sep;39(9):1833-43.

Schwartz 2001 Genetic analysis of intestinal cholesterol absorption in inbred mice. *J Lipid Res*. 2001 Nov;42(11):1801-11.

Scott 1979 Hypobetalipoproteinaemia--a variant of the Bassen-Kornzweig syndrome. *Gut*. Feb;20(2):163-8.

Sehayek 1998 U-shape relationship between change in dietary cholesterol absorption and plasma lipoprotein responsiveness and evidence for extreme interindividual variation in dietary cholesterol absorption in humans. *J Lipid Res*. 1998 Dec;39(12):2415-22.

Shah 1996 Transcellular delivery of an insulin-transferrin conjugate in enterocyte-like Caco-2 cells. *J Pharm Sci*. 1996 Dec;85(12):1306-11.

Sharp 1993 Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinaemia. *Nature*. 1993 Sep 2;365(6441):65-9.

Sharp 1994 Human microsomal triglyceride transfer protein large subunit gene structure. *Biochemistry*. Aug 9;33(31):9057-61.

Sheng 1995 Independent regulation of sterol regulatory element-binding proteins 1 and 2 in hamster liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Feb 14;92(4):935-8.

Shepherd 1978 Chemical and kinetic study of the lipoproteins in abetalipoproteinaemic plasma. *Clin Pathol*. 1978 Apr;31(4):382-7.

Shoulders 1993 Abetalipoproteinemia is caused by defects of the gene encoding the 97 kDa subunit of a microsomal triglyceride transfer protein. *Hum Mol Genet*. 1993 Dec;2(12):2109-16.

Shoulders 1994 Microsomal triglyceride transfer protein, the abetalipoproteinemia gene product, mediates the secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from heterologous cells. *J Biol Chem.* 1994 Sep 2;269(35):21951-4.

Shoulders 2004 The intracellular transport of chylomicrons requires the small GTPase, Sar1b. *Curr Opin Lipidol* 2004, 15, 191-197.

Simard 1996 Ontogeny of growth hormone receptors in human tissues: immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Aug;81(8):3097-102.

Simes 1994 Low cholesterol and risk of non-coronary mortality. *Aust N Z J Med.* 1994 Feb;24(1):113-9.

Sinal 2000 Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell.* 2000 Sep 15;102(6):731-44.

Smart 2004 Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 9;101(10):3450-5.

Spady 1983 Rates of receptor-dependent and -independent low density lipoprotein uptake in the hamster. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Jun;80(11):3499-503.

Spring 1992 Lipoprotein assembly. Apolipoprotein B size determines lipoprotein core circumference. *J Biol Chem.* 1992 Jul 25;267(21):14839-45.

Stahl 1999 Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol Cell.* 1999 Sep;4(3):299-308.

Stead 1986 Effect of abnormal liver function on vitamin E status and supplementation in adults with cystic fibrosis. *Gut.* Jun; 27(6): 714-8.

Steffensen 2004 Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). *Diabetes.* 2004 Feb;53 Suppl 1:S36-42.

Steinberg 1979 Metabolic studies in an unusual case of asymptomatic familial hypobetalipoproteinemia with hypoalphalipoproteinemia and fasting chylomicronemia. *J Clin Invest.* Jul;64(1):292-301.

Steinkamp 2000 Energy supplements rich in linoleic acid improve body weight and essential fatty acid status of cystic fibrosis patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000 Oct;31(4):418-23.

Sternby 1991 Pancreatic lipolytic enzymes in human duodenal contents. Radioimmunoassay compared with enzyme activity. *Scand J Gastroenterol.* 1991 Aug;26(8):859-66.

Stocker 2000-a Tocopherol-binding proteins: their function and physiological significance. *Antioxid Redox Signal.* 2000 Fall;2(3):397-404. Review.

Stocker 2000-b Identification of a novel cytosolic tocopherol-binding protein: structure, specificity, and tissue distribution. *IUBMB Life.* 1999 Jul;48(1):49-55.

Strandvik 1996 Prostanoid biosynthesis in patients with cystic fibrosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* Dec; 55(6): 419-25.

Strandvik 2001 Essential fatty acid deficiency in relation to genotype in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 139(5):650-5.

Strutt 2001 Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothed regulation. *Curr Biol.* 2001 Apr 17;11(8):608-13.

Sudhop 2002 Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. *Circulation.* 2002 Oct 8;106(15):1943-8.

Sutherland 1992 Plasma non-cholesterol sterols in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Horm Metab Res.* 1992 Apr;24(4):172-5.

Sviridov 2003 Low-density lipoprotein receptor and apolipoprotein A-I and B expression in human enterocytes. *Digestion.* 2003;67(1-2):67-70.

Sylven 1969 Absorption and lymphatic transport of cholesterol and sitosterol in the rat. *J Lipid Res.* 1969 Mar;10(2):179-82.

Sylven 1970 The site of absorption of cholesterol and sitosterol in the rat small intestine. *Scand J Gastroenterol.* 1970;5(1):57-63.



Tamir 1976 Further observations on familial hypobetalipoproteinaemia. *Clin Genet.* 1976 Feb;9(2):149-55.

Theunissen 1986 Membrane properties of oxysterols. Interfacial orientation, influence on membrane permeability and redistribution between membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1986 Aug 7;860(1):66-74.

Thiele 2000 Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol.* 2000 Jan;2(1):42-9.

Thiesen 2002 Locally and systemically active glucocorticosteroids modify intestinal absorption of lipids in rats. *Lipids.* 2002 Feb;37(2):159-66.

Thomson 1980 Experimental demonstration of the effect of the unstirred water layer on the kinetic constants of the membrane transport of D-glucose in rabbit jejunum. *J Membr Biol.* 1980 Jun 15;54(3):221-9.

Thomson 1986 Adaptation of colonic uptake of hexoses and lipids following ileal resection: effect of variations in the fat content of the diet. *Digestion.* 1986;35(2):89-94.

Thomson 1989 Influence of dietary fat composition on intestinal absorption in the rat. *Lipids.* 1989 Jun;24(6):494-501.

Thomson 1993 Lipid absorption: passing through the unstirred layers, brush-border membrane, and beyond. *Can J Physiol Pharmacol.* 1993 Aug;71(8):531-55.

Tobey 1985 Human intestinal brush border peptidases. *Gastroenterology.* 1985 Apr;88(4):913-26.

Torra 2001 Peroxisome proliferator-activated receptors: from transcriptional control to clinical practice. *Curr Opin Lipidol.* 2001 Jun;12(3):245-54. Review.

Traber 1987 Lack of tocopherol in peripheral nerves of vitamin E-deficient patients with peripheral neuropathy. *N Engl J Med.* 1987 Jul 30;317(5):262-5.

Traber 1990. RRR and SRR- $\alpha$ -Tocopherols are secreted without discrimination in human chylomicrons, but RRR-  $\alpha$ -Tocopherols is preferentially secreted in very low-density lipoproteins. *J Lipid Res* 31:675-85.

Trier 1981 Functional morphology of the mucosa of the small intestine. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. LR Johnson, editor. Raven Press, New-york. 925-961.

Trigatti 1999 Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 3;96(16):9322-7.

Trotter 1991 Fatty acid uptake and metabolism in a human intestinal cell line (Caco-2): comparison of apical and basolateral incubation. *J Lipid Res*. 1991 Feb;32(2):293-304.

Turley 2003 Sterol absorption by the small intestine. *Curr Opin Lipidol*. 2003 Jun;14(3):233-40.

Ueshima 2004 Possible involvement of enhanced intestinal microsomal triglyceride transfer protein (MTP) gene expression in acceleration of lipid absorption by a western-type diet in apolipoprotein E knockout mice. *Life Sci*. 2004 Nov 26;76(2):179-90.

Umeda 2001 Inhibitory action of gemfibrozil on cholesterol absorption in rat intestine. *J Lipid Res*. 2001 Aug;42(8):1214-9.

Van Bennekum 2005 Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary beta-carotene and cholesterol. *Biochemistry*. 2005 Mar 22;44(11):4517-25.

Van Biervliet 2003 Combined impact of mucosal damage and of cystic fibrosis on the small intestinal brush border enzyme activities. *Acta Clin Belg*. 2003 Jul-Aug;58(4):220-4.

Van der Veen 2005 Reduced cholesterol absorption upon PPARdelta activation coincides with decreased intestinal expression of NPC1L1. *J Lipid Res*. 2005 Mar;46(3):526-34.

Van Egmond 1996 Effect of linoleic acid intake on growth of infants with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr*. 1996 May;63(5):746-52.

Van Heek 1997 In vivo metabolism-based discovery of a potent cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, in the rat and rhesus monkey through the identification of the active metabolites of SCH48461. *Pharmacol Exp Ther.* 1997 Oct;283(1):157-63.

Van Heek 2000 Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663. *Br J Pharmacol.* 2000 Apr;129(8):1748-54.

Van Heek 2001 Ezetimibe selectively inhibits intestinal cholesterol absorption in rodents in the presence and absence of exocrine pancreatic function. *Br J Pharmacol.* 2001 Sep;134(2):409-17.

Van Hubbard 1987 Absorption of safflower oil and structured lipid preparations in patients with cystic fibrosis. *Lipids.* 1987 Jun;22(6):424-8.

Veerkamp 1993 Structural and functional aspects of cytosolic fatty acid-binding proteins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1993 Dec;49(6):887-906.

Vishnyakova 2003 Binding and internalization of lipopolysaccharide by Cla-1, a human orthologue of rodent scavenger receptor B1. *J Biol Chem.* 2003 Jun 20;278(25):22771-80.

Vlahcevic 1971 Kinetics and pool size of primary bile acids in man. *Gastroenterology.* 1971 Jul;61(1):85-90.

Voigt 2001 A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of docosahexaenoic acid supplementation in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Pediatr.* 2001 Aug;139(2):189-96.

Voshol 2001 Down-regulation of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) expression in rodents under conditions of deficient bile delivery to the intestine. *Biochem J.* 2001 Jun 1;356(Pt 2):317-25.

Wagner 1991 ApoB-54.8, a truncated apolipoprotein found primarily in VLDL, is associated with a nonsense mutation in the ApoB gene and Hypocholesterolemia. *J lipid Res* 35:468-477.

- Walters 1998 Faecal bile acid and dietary residue excretion in cystic fibrosis: age group variations. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998 Sep;27(3):296-300.
- Wang 1999 Cholic acid aids absorption, biliary secretion, and phase transitions of cholesterol in murine cholelithogenesis. *Am J Physiol.* 1999 Mar;276(3 Pt 1):G751-60.
- Wang 2001 Genetic factors at the enterocyte level account for variations in intestinal cholesterol absorption efficiency among inbred strains of mice. *J Lipid Res.* 2001 Nov;42(11):1820-30.
- Wang 2002 Susceptibility to murine cholesterol gallstone formation is not affected by partial disruption of the HDL receptor SR-BI. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Jul 11;1583(2):141-50.
- Wang 2003 Feeding natural hydrophilic bile acids inhibits intestinal cholesterol absorption: studies in the gallstone-susceptible mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003 Sep;285(3):G494-502.
- Wang 2003 Measurement of intestinal cholesterol absorption by plasma and fecal dual-isotope ratio, mass balance, and lymph fistula methods in the mouse: an analysis of direct versus indirect methodologies. *J Lipid Res.* 2003 May;44(5):1042-59.
- Wang 2004 Lack of the intestinal Muc1 mucin impairs cholesterol uptake and absorption but not fatty acid uptake in Muc1<sup>-/-</sup> mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 Sep;287(3):G547-54.
- Wang 2005 2-D reference map of Bacillus anthracis vaccine strain A16R proteins. *Proteomics.* 2005 Nov 17;5(17):4488-4495
- Ways 1963 Red-cell and plasma lipids in acanthocytosis. *Clin Invest.* 1963 Aug;42:1248-60.
- Ways 1967 Studies on the absorptive defect for triglyceride in abetalipoproteinemia. *J Clin Invest.* 1967 Jan;46(1):35-46.
- Weber 1973 Malabsorption of bile acids in children with cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 1973 Nov 8;289(19):1001-5.

- Wellington 2002 ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab Invest.* 2002 Mar;82(3):273-83.
- Welty 1991 A truncated species of apolipoprotein B (B67) in a kindred with familial hypobetalipoproteinemia. *J Clin Invest.* 1991 May;87(5):1748-54.
- Werder 2001 Role of scavenger receptors SR-BI and CD36 in selective sterol uptake in the small intestine. *Biochemistry.* 2001 Sep 25;40(38):11643-50.
- Wesley 1983 Human intestinal mucin in cystic fibrosis. *Pediatr Res.* 1983 Jan;17(1):65-9.
- Westergaard 1976 The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell. *J Clin Invest.* 1976 Jul;58(1):97-108.
- Wetterau 1992 Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science.* 1992 Nov 6;258(5084):999-1001.
- Wilcox 1999 ApoB100 secretion from HepG2 cells is decreased by the ACAT inhibitor CI-1011: an effect associated with enhanced intracellular degradation of ApoB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Apr;19(4):939-49.
- Willy 1995 LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 1995 May 1;9(9):1033-45.
- Wilson 1971 Unstirred water layers in intestine: rate determinant of fatty acid absorption from micellar solutions. *Science.* 1971 Dec 3;174(13):1031-3.
- Wilson 1994 Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *J Lipid Res.* 1994 Jun;35(6):943-55. Review.
- Witt 2000 Regulation by vitamin E of the scavenger receptor BI in rat liver and HepG2 cells. *J Lipid Res.* 2000 Dec;41(12):2009-16.
- Woollett 1997 Diet modification alters plasma HDL cholesterol concentrations but not the transport of HDL cholesteryl esters to the liver in the hamster. *J Lipid Res.* 1997 Nov;38(11):2289-302.

- Wu 1999 Known mutations of ApoB account for only a small minority of hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 40:955-959.
- Xu 2003 Transcriptional adaptation to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficiency. *J Biol Chem*. 2003 Feb 28;278(9):7674-82.
- Yahagi 1999 A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*. 1999 Dec 10;274(50):35840-4.
- Yang 1994 Comparison of the effect of hyperinsulinemia on acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activity in the liver and intestine of the rat. *Atherosclerosis*. 1994 May;107(1):25-34.
- Yokoyama 1993 Ten-year experience in the use of double balloon catheter for kidney procurement from non-heart beating donors in cadaveric kidney transplantation. *Clin Transplant*. 1993 Jun;7(3):258-62.
- Yoo 2002 Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway. *J Biol Chem*. 2002 Mar 29;277(13):11401-9.
- Yoshida 1992 Identification, purification, and immunochemical characterization of a tocopherol-binding protein in rat liver cytosol. *J Lipid Res*. 1992 Mar;33(3):343-50.
- Young 1988 Low plasma cholesterol levels caused by a short deletion in the apolipoprotein B gene. *Science*. 1988 Jul 29;241(4865):591-3.
- Yu 2002 Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 10;99(25):16237-42.
- Yu 2004 Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice. *J Lipid Res*. 2004 Feb;45(2):301-7.
- Yuan 2000. Linkage of a gene for familial hypobetalipoproteinemia to chromosome 3p21.1-22. *Am J Hum Genet* 66:1699-1704.

Zentler-Munro 1985 Effect of cimetidine on enzyme inactivation, bile acid precipitation, and lipid solubilisation in pancreatic steatorrhoea due to cystic fibrosis. *Gut* 26:892-901.

Zimmerman 1985 Peptide binding to intestinal epithelium: distinct sites for insulin, EGF and VIP. *Peptides*. 1985 Mar-Apr;6(2):229-35.

Zollner 2003 Role of nuclear bile acid receptor, FXR, in adaptive ABC transporter regulation by cholic and ursodeoxycholic acid in mouse liver, kidney and intestine. *J Hepatol*. 2003 Oct;39(4):480-8.